



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO
NEONATAL DE LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI*: ESTUDO DE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS EM ANIMAIS
INFANTES.**

LARISSA MARIA FROTA CRISTINO

ORIENTADOR (A): PROFA. DRA. DANIELLE MACEDO GASPAR

FORTALEZA

2019

LARISSA MARIA FROTA CRISTINO

**MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO
NEONATAL DE LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI*: ESTUDO DE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS EM ANIMAIS
INFANTES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C951m Cristino, Larissa Maria Frota.
Modelo animal de autismo induzido pela administração neonatal de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*: estudo de alterações comportamentais e neuroquímicas em animais infantis. / Larissa Maria Frota Cristino. – 2019.
60 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profª. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.
1. Autismo. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Modelo Animal. I. Título.

CDD 616.9

LARISSA MARIA FROTA CRISTINO

**MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO
NEONATAL DE LIPOPOLISSACARÍDEO DE *ESCHERICHIA COLI*: ESTUDO DE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS EM ANIMAIS
INFANTES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Tatiana Barichello
Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC)

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos Patrocínio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor do impossível, por ter me dado a saúde, a força e a coragem que me permitiram realizar o sonho que vivo hoje.

Aos meus pais, Leônidas e Esther, por serem meus exemplos de força, determinação e boa índole. Obrigada pela educação, orientação, cuidado, amor e o incansável apoio que tive ao longo dessa jornada.

Ao meu irmão, Leônidas Filho, meu orgulho e fonte de inspiração, por todo o companheirismo e amizade que dedicou a mim, se fazendo sempre presente em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Professora Danielle, por ter acreditado e confiado em mim, bem como por sua orientação e dedicação.

À minha querida professora da graduação, Ângela Veras, por ter despertado em mim o amor pela microbiologia e me encorajado a seguir essa área tão desafiadora.

Ao meu amigo e companheiro de jornada, Adriano Chaves, por toda a ajuda, o apoio e a amizade. Sem você a realização desse trabalho não teria sido possível.

Aos meus companheiros do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, em especial Tatiana, Cyntia, Charllyany, Natássia, Charliene, Michelle e Paloma, por toda ajuda e amizade, e por terem feito essa jornada muito mais leve e feliz.

À banca qualificadora, por todas as contribuições para a melhoria do trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de luta do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, Anísio, Lavouisier, Natália, Bruno e Xhaulla, por todo o apoio para que pudéssemos chegar ao dia de hoje. A amizade e a força de vocês fizeram a diferença.

Aos meus amigos de todas as épocas e de todas as circunstâncias, por terem andado junto comigo na realização desse sonho, contribuindo com palavras de afeto e tranquilidade. Vocês são parte da minha vitória.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro que viabilizou a realização dessa pesquisa.

À banca examinadora, pela disponibilidade e colaboração.

A todos aqueles que, mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, torcendo e contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional, o meu mais sincero agradecimento.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.” Augusto Cury.

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por dificuldade de interação social e comunicação e pelo comprometimento qualitativo do desenvolvimento sociocomunicativo, assim como a presença de comportamentos e/ou interesses repetitivos ou restritivos. É uma síndrome comportamental complexa que ocorre principalmente no sexo masculino, com múltiplas etiologias, combinando fatores ambientais e genéticos. Infecções e estresse têm sido relacionados com a manifestação de transtornos neuropsiquiátricos, principalmente quando acontecem no início da vida, ocasionando alterações induzidas por mecanismos inflamatórios e/ou neurotróficos. Achados do nosso grupo de pesquisa mostram que a exposição de camundongos neonatos ao lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* é capaz de induzir alterações tipo-autismo dependentes do sexo em animais adolescentes e adultos. Neste contexto, realizamos estudo em camundongos Swiss machos e fêmeas desafiados nos dias pós-natais (PNs) 5 e 7 com LPS de *Escherichia coli*, com o objetivo de entender as alterações comportamentais e neurobiológicas em animais infantes, bem como a influência do sexo. Os testes comportamentais de interação social, campo aberto e memória de trabalho (labirinto em Y) foram realizados no PN 25, o que corresponde a 4 anos de idade no humano. Após as avaliações comportamentais, a atividade de MPO, os níveis de BDNF e a expressão de NF- κ B, parvalbumina, IBA1 e sinaptofisina foram realizadas no córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HC). Os camundongos machos desafiados com LPS apresentaram comportamentos tipo-ansioso, déficits de memória de trabalho e comportamento repetitivo, enquanto as fêmeas tiveram uma redução na capacidade de interação social e déficits de memória de trabalho. As fêmeas desafiadas com LPS apresentaram no hipocampo aumento da expressão de IBA1, níveis diminuídos de parvalbumina, e da atividade da MPO, enquanto no CPF ocorreram alterações no BDNF e diminuição na atividade da MPO. Entretanto, nos animais machos não foram observadas alterações significativas nos níveis de expressão desses marcadores. Em conjunto, estas foram as principais diferenças comportamentais e neuroquímicas observadas no presente estudo entre machos e fêmeas desafiados com LPS. Nossos resultados mostram uma vulnerabilidade diferencial de acordo com o gênero para os diferentes endofenótipos comportamentais relacionados ao TEA, ou seja, machos com alterações cognitivas e estereotipia, e fêmeas com déficits sociais.

Palavras-chave: Modelo animal. Lipopolissacarídeo. Autismo.

ABSTRACT

The Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopment disorder in which an individual has limited communication and social interaction skills and has qualitative socio-communicative development compromised, as well as repetitive and restrictive behavior and interests. It is a complex behavioral syndrome that occurs mainly in male individuals, with multiple etiologies, and that combines genetic and environmental factors. Infections and stress have been associated with the occurrence of neuropsychiatric conditions, mainly at start of life, leading to alterations induced by inflammatory and/or neurotrophic mechanisms. Findings by our research team show that the exposure of newborn rats to *Escherichia coli* Lipopolysaccharides (LPS) can induce autism-like alterations dependent on sex in teenage or adult animals. In this context, we conducted experiences in Swiss mice, both male and female neonatally challenged (PN 5 e 7) with *Escherichia coli* LPS, aiming to understand the behavioral and neurobiological alterations in infant animals, as well as the influence of gender. Social interaction behavioral tests, both open field and Y maze tests were carried out on PN 25, equivalent to a 4-year-old human being. After behavioral assessments, the MPO activity, BDNF levels and expression of NF-kB, parvalbumin, IBA1 and synaptophysin were performed in the hippocampus and the pre-frontal cortex. Male mice exposed to LPS presented anxiety-like behavior, work memory deficit and repetitive behavior, whereas female individuals only presented reduced social interaction capabilities and work memory deficit. Female individuals treated with LPS presented in the hippocampus increased levels of IBA1 (HC), reduced parvalbumin (HC), and MPO activity, while in the PFC occurred BDNF alterations and decrease of the MPO activity. However, alterations observed in the same markers levels were not significant for male individuals. In summary, those were the main behavioral and neurochemical differences observed between male and female individuals exposed to LPS in this research. Our results show a differential vulnerability according to gender for various behavioral endophenotypes associated to ASD: males with cognitive alterations and stereotypy, and females with pro-social deficits.

Keywords: Animal Model. Lipopolysaccharide. Autistic Disorder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sinais de alerta do TEA	16
Figura 2 – Etapas de desenvolvimento do cérebro e as diferentes janelas de vulnerabilidade .	18
Figura 3 – Modelo multifatorial para etiologia do TEA envolvendo genes, meio ambiente e imunidade	21
Figura 4 – Estrutura química do LPS	24
Figura 5 – Via clássica da ativação dos receptores por LPS.....	25
Figura 6 – Demonstração esquemática do protocolo experimental	30
Figura 7 – Demonstração esquemática do protótipo do aparato utilizado no teste de interação social	32
Figura 8 – Demonstração esquemática do teste do labirinto em Y	32
Figura 9 – Atividade locomotora no campo aberto em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS	36
Figura 10 – Efeito do desafio imune neonatal no número de groomings (A) e rearings (B) no campo aberto em animais machos e fêmeas	37
Figura 11 - Atividade locomotora (tempo gasto no centro) no campo aberto em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS	38
Figura 12 – Efeito do desafio imune neonatal em % de preferência social em animais machos e fêmeas	39
Figura 13 – Efeito do desafio imune neonatal na % de alternâncias corretas no labirindo em Y em animais machos e fêmeas	39
Figura 14 – Níveis de BDNF [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS	40
Figura 15 – Níveis de IBA1 [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS	41
Figura 16 – Níveis de Parvalbumina [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS	42
Figura 17 – Atividade da MPO [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS	43

Figura 18 - Níveis de Sinaptofisina [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] e NFκB [Hipocampo (C) Córtex Pré-frontal (D)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS 44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo dos resultados comportamentais obtidos no presente estudo 46

Quadro 2 – Resumo dos resultados neuroquímicos obtidos no presente estudo 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – Hormônio Adrenocorticotrófico

ANOVA – Análise de variância

AP-1 – Proteína ativadora 1

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BSA – Albumina de Soro Bovino

CNTF – Fator Neurotrófico Ciliar

COX-2 – Ciclooxigenase 2

DSM-5 – 5º Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERK – Proteína quinase regulada extracelular

GABA – Ácido Gama-aminobutírico

GDNF - Fator neurotrófico derivado da glia

h – Hora

HCl – Ácido clorídrico

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal

i.p - Intraperitoneal

IFN- γ – Interferon Gama

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IRAK – Quinase associada ao receptor

KCl – Cloreto de potássio

Kg – Quilograma

LBP – Proteína ligadora de LPS

LPS – Lipopolissacarídeo

MCP-1 – Proteína de quimioatração de monócitos

MD-2 – Proteína mielóide diferenciadora 2

mg - Miligrama

MHC – Complexo de Histocompatibilidade

MyD88 – Fator de Diferenciação Mielóide 88

NaCl – Cloreto de sódio

NF- κ B – Fator Nuclear Kappa B

NGF - Fator de crescimento nervoso

nm - Nanômetro

PBS – Tampão Fosfato-salino

PN – Dia pós-natal

Poly I:C – Ácido polirribonucleotídico-polirribocitídico

RAG1 – Gene de ativação de recombinação 1

rpm – Rotação por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SNC – Sistema Nervoso Central

TAK-1 – Proteína Quinase ativada por Mitógeno

TBS – Tampão tris salino

TEA – Transtorno do Espectro Autista

TLR-4 – Receptor toll-like tipo 4

TNF α – Interferon alfa

TRAF-6 – Fator Associado ao Receptor do Fator de Necrose Tumoral 6

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Aspectos Gerais do Autismo	15
1.2. Neurodesenvolvimento	18
1.3. Envolvimento Genético	20
1.4. Fatores de risco para o desenvolvimento do TEA: infecções e alterações imune	21
1.5. Hipótese Neuroinflamatória	23
1.6. Desafio Imune com LPS	24
1.7. Modelos Animais	27
1.7.1. Valproato de Sódio	27
1.7.2. Infecções	28
2. HIPÓTESE	30
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Animais	31
4.2. Drogas	31
4.3. Protocolo Experimental	31
4.4. Testes Comportamentais	32
4.4.1. Teste do Campo Aberto	32
4.4.2. Teste de Interação Social	32
4.4.3. Labirinto em Y (Y maze)	33
4.5. Testes Neuroquímicos	34
4.5.1. Expressão protéica de NFκB, IBA-1, Sinaptofisina e Parvalbumina por Western Blotting	34
4.5.1.1. Preparação do Extrato Total de Proteínas	34
4.5.1.2. Método Bradford para dosagem de proteína	34
4.5.1.3. Western Blotting	35
4.5.2. Quantificação de BDNF por ELISA	36
4.5.3. Ensaio para Mieloperoxidase (MPO)	36

4.6. Análise Estatística.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Resultados Comportamentais	37
5.2. Resultados Neuroquímicos	41
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1.Aspectos Gerais do Autismo

O Autismo foi citado pela primeira vez em 1911 por Bleuler, para designar a perda do contato com a realidade acarretando dificuldade ou impossibilidade de comunicação (AJURIAGUERRA, 1975). Em 1943, Kenner descreveu 11 crianças que tinham uma inabilidade inata para estabelecer contato afetivo e interpessoal, sugerindo uma síndrome rara (KANNER, 1943). Um ano depois, Asperger descreveu casos com características semelhantes ao autismo em relação às dificuldades de comunicação social em crianças com inteligência normal (RUTTER; SCHOPLER, 1992).

Atualmente, a Associação Americana de Psiquiatria padroniza os critérios diagnósticos no Manual de Diagnóstico e Estatística, que em sua última edição (DSM-5), absorveu os Transtornos Globais do Desenvolvimento, que incluíam o Autismo, Transtorno Desintegrativo da Infância, Transtornos Invasivos do Desenvolvimento e as Síndromes de Asperger e Rett em um único diagnóstico, Transtornos do Espectro Autista (TEA). A comunidade científica entendeu que aqueles transtornos são na verdade uma mesma condição com gradações em dois grupos de sintomas: Déficit na comunicação e interação social; Padrão de comportamentos, interesses e atividades restritos e repetitivos (CABRAL; LOTUFO NETO, 2014).

O Transtorno do Espectro Autista é um transtorno do neurodesenvolvimento, caracterizado por dificuldade de interação social e comunicação e pelo comprometimento qualitativo do desenvolvimento sociocomunicativo, assim como a presença de comportamentos e/ou interesses repetitivos ou restritivos, esses sintomas, quando tomados conjuntamente, limitam ou dificultam o funcionamento diário do indivíduo. Apesar desses sintomas serem o núcleo do transtorno, o conjunto de déficits que uma pessoa com TEA apresenta varia em graus de intensidade (podendo ser leve, moderado ou severo) e também de indivíduo para indivíduo (ARAUJO; VERAS; VARELLA, 2019). Os casos de TEA demandam minimamente por serviços de saúde para a redução dos seus déficits característicos e outros possíveis quadros que normalmente o acompanham, como por exemplo, anormalidades do sistema imunológico, distúrbio gastrointestinal, disfunção mitocondrial, distúrbios do sono, ansiedade, deficiência intelectual, hiperatividade, hiper-responsividade e hiporesponsividade a estímulos sensoriais

e epilepsia, entre outros. É um transtorno pervasivo e permanente, no entanto, a intervenção precoce pode melhorar os sintomas (MASI et al., 2017; ZANON; BACKES; BOSA, 2014).

Indivíduos com TEA precisam de serviços de saúde que possibilitem desde o diagnóstico precoce, tratamentos que promovam a sua inclusão social, atenção às possíveis comorbidades, além de suporte à família. Visto seus impactos sobre a rede de saúde e a necessidade de investimentos para sua atenção, o autismo deve ser tratado como uma questão de saúde pública e deve ser enfrentado como tal (ARAÚJO; VERAS; VARELLA, 2019).

O TEA é entendido como uma síndrome comportamental complexa que possui múltiplas etiologias, combinando fatores ambientais e genéticos (RUTTER, 2011).

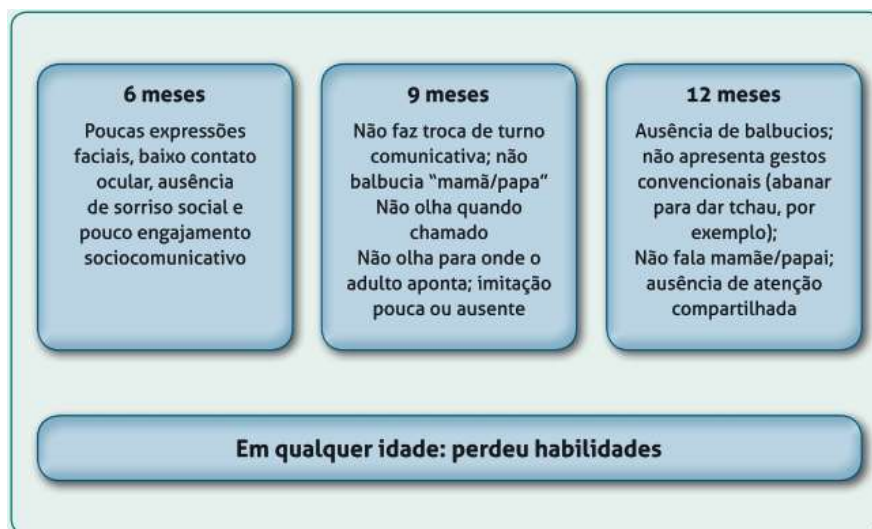
A alta hereditariedade dos distúrbios do espectro autista, alcançando uma concordância de 90% para gêmeos monozigóticos, em comparação com menos de 10% de concordância para gêmeos dizigóticos e irmãos, com suspeita de anormalidades genéticas nos cromossomos 7, 2 e 15, juntamente com uma relação de prevalência de 4:1 entre homens e mulheres, levou rapidamente a uma importante pesquisa internacional para genes causadores do autismo (CRAWLEY, 2012).

A prevalência do TEA vem aumentando ao longo dos anos. Na Ásia, a prevalência média antes de 1980 era de 1,9 casos por 10.000, subindo para 14,8 entre 1980 e 2010. Uma revisão de estudos epidemiológicos publicados entre 1996 e 2001 e realizados no Reino Unido, Estados Unidos, Escandinávia e Japão, indicou que a prevalência provavelmente estava na faixa de 30 a 60 casos por 10.000 crianças. Estimativas mais recentes demonstram que a prevalência em crianças e adolescentes é de 1 caso em 59 indivíduos nos Estados Unidos. Embora não haja dados oficiais brasileiros, se considerados tais números, a estimativa é de que exista no Brasil pelo menos dois milhões de pessoas diagnosticadas com TEA. Diversas possibilidades se destacam para esse aumento na prevalência: uma é que houve mudanças na interpretação dos critérios diagnósticos, outra diz respeito à sobreposição entre deficiência intelectual e transtorno do espectro autista (ARAÚJO; VERAS; VARELLA, 2019; MASI et al., 2017; SHARON et al., 2019; WHITBOURNE; HALGIN, 2015).

Os primeiros sintomas aparecem nos primeiros meses de vida quando a criança apresenta dificuldades em manter contato visual e no primeiro ano demonstram mais interesse em objetos do que em pessoas, entretanto, na maioria dos casos o diagnóstico só é possível entre os 12 e 24 meses de idade (ZANON; BACKES; BOSA, 2014). Ozonoff e colaboradores (2010) não encontraram diferenças entre bebês de 6 meses de idade que mais tardiamente

receberam diagnóstico de TEA e aqueles que se desenvolveram tipicamente, concluindo que o diagnóstico até o primeiro ano de vida pode não ser possível, ocorrendo, em média, aos 4 ou 5 anos de idade (OZONOFF et al., 2010).

Figura 1 – Sinais de alerta do TEA.



Fonte: SBP – Transtorno do Espectro do Autismo.

A nova edição da DSM-5 trouxe uma nova estrutura de sintomas. Os clínicos avaliam crianças ao longo de dois domínios centrais. O primeiro inclui distúrbios sociais e da comunicação e o segundo inclui uma variedade restrita de interesses e desempenho de comportamentos e atividades repetitivas, todos existentes dentro dos estágios iniciais do desenvolvimento neurológico (OSHODI et al., 2017).

Estudos demonstram que a intervenção precoce é um fator fundamental para melhora do quadro clínico do autismo, porém, inúmeros aspectos podem retardar a intervenção, como a demora na identificação das primeiras dificuldades comportamentais da criança, a demora na busca por atendimento profissional e na realização do diagnóstico (ZANON; BACKES; BOSA, 2014). Siklos e Kerns (2007) destacam quatro fatores que podem estar envolvidos no atraso do diagnóstico precoce: 1) a variabilidade dos sintomas do TEA; 2) a falta de profissionais habilitados e treinados para reconhecer as alterações precoces do transtorno; 3) as limitações da própria avaliação de pré-escolares; e 4) a escassez de serviços especializados (SIKLOS; KERNS, 2007).

1.2. Neurodesenvolvimento

Como o transtorno mental é poligênico por natureza, são necessárias várias abordagens para entender sua base. No mínimo, o conhecimento de como a genética, o sexo e os fatores de risco interagem com a ontogenia normal fornece uma orientação para o estudo sobre a expressão fenotípica dos distúrbios neuropsiquiátricos (LIGHTMAN; INSEL; INGRAM, 2002).

O questionamento de como experiências no início da vida comprometem o comportamento adulto é antigo e tem estimulado estudos sobre como os sistemas celulares são alterados em interação com o ambiente de maneira que desenvolvam e mantenham características que atuem na fisiologia de respostas comportamentais ao longo da vida (NORO; GON, 2015).

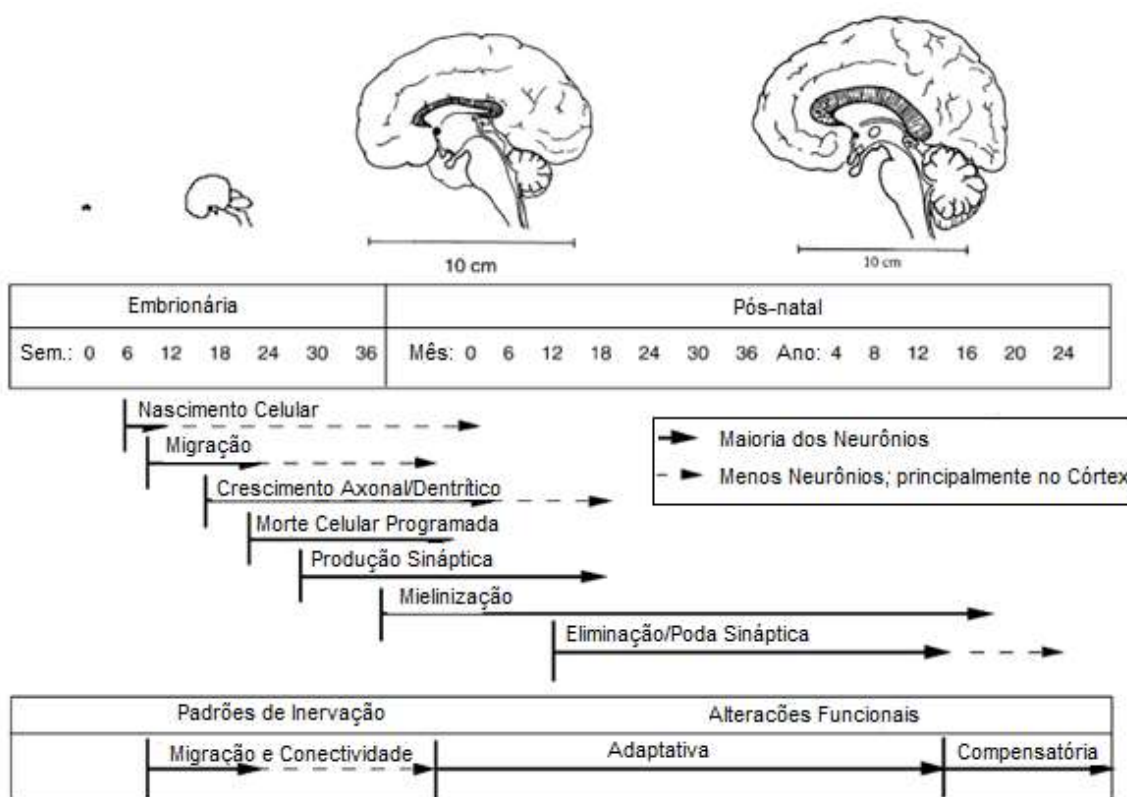
Alguns autores afirmam que estresses desde a concepção do indivíduo têm grande influência na duração e na qualidade de vida do mesmo, enfatizando a necessidade do desenvolvimento de intervenções efetivas para o tratamento e prevenção de transtornos neuropsiquiátricos. Essas intervenções são importantes quando acontecem no início do desenvolvimento infantil, diante das alterações fisiológicas que ocorrem nesse período e a gravidade do comprometimento da saúde física e emocional além do desenvolvimento cognitivo (MCEWEN; GETZ, 2013; HYMAN, 2009).

A população neuronal do SNC do adulto é gerada quase exclusivamente no desenvolvimento, portanto, alterações sutis no ambiente imunológico perinatal podem alterar o curso normal do desenvolvimento, aumentando potencialmente a suscetibilidade a insultos secundários e predispondo a distúrbios neuropsiquiátricos, como esquizofrenia e autismo (SMITH; NAYLOR, 2014).

Microglia e astrócitos compreendem 80-90% da população celular do cérebro. Em conjunto, a glia desempenha uma gama de funções essenciais para manter a homeostase no sistema nervoso e restabelecer a homeostase após insulto, infecção ou lesão. Microglia são células imunes primárias do SNC, que produzem múltiplos fatores imunes durante eventos neuroinflamatórios ou infecciosos e eliminam células mortas, além de exercerem funções fisiológicas importantes no sistema nervoso saudável, como a manutenção sináptica. Já os astrócitos, a maior população da glia, também são capazes de sintetizar moléculas imunes pró-inflamatórias em repouso e durante insulto ou desafio, e portanto, são igualmente consideradas células do SNC imunocompetentes (SCHWARZ; BILBO, 2012; SMITH; NAYLOR, 2014)

É importante entender que a trajetória do desenvolvimento cerebral ocorre em vários estágios, conforme esquema demonstrado na figura 2. Dentro da linha do tempo, diferentes regiões do cérebro têm um curso único no desenvolvimento. Estruturas de desenvolvimento tardio, incluindo córtex, hipocampo e cerebelo, preparam o cenário para períodos de vulnerabilidade de uma maneira específica (CUSTÓDIO, 2017).

Figura 2 – Etapas de desenvolvimento do cérebro (em cima) e as diferentes janelas de vulnerabilidade (embaixo). Os processos de desenvolvimento ocorrem em fases, preparando o cenário para períodos potenciais de vulnerabilidade. Insultos no início da vida (embaixo) serão assimilados em padrões de inervação, enquanto um insulto pré-puberal posterior causará alterações funcionais que são mais adaptáveis.



Fonte: Adaptado de ANDERSEN, 2003

A primeira metade da gestação é caracterizada pela proliferação e migração neuronal. Durante a segunda metade, predominam a proliferação celular glial e a morte celular programada. No último trimestre acontece o desenvolvimento da conectividade com brotamento axonal e dendrítico e formação de sinapses (RAMENGGHI; FUMAGALLI; SUPRAMANIAM, 2018).

As células progenitoras neuronais nascem, diferenciam-se e são estabelecidas de dentro para fora. Células maiores geralmente chegam mais cedo que células menores e aderem a algum grau de filogenia na qual as regiões mais antigas são estabelecidas primeiro (JACOBSON, 1991). Padrões adequados de inervação são guiados por glia radial ou fatores neurotróficos derivados do alvo. Por volta da 16ª semana fetal, os neurônios alcançam seu destino final, arborizam e ramificam na tentativa de estabelecer conexões apropriadas (JONES et al., 1985). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento nervoso (NGF), o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), CNTF e IGF-1 influenciam na migração ou retração dos neurônios (JONES et al., 1993).

A expressão dos fatores de crescimento atingem seus níveis mais altos durante o período pré-natal, desempenhando papel fundamental na ramificação dendrítica, e continuam a participar da plasticidade sináptica durante toda a vida útil e são essenciais para alterações neuronais associadas ao aprendizado, exposição à medicamentos e reparo neuronal após lesão ou transplante (JUNG; BENNETT, 1996; SEMPLE et al., 2013; TIMMUSK et al., 1994).

Aproximadamente 50% de todos os neurônios são eliminados imediatamente antes do nascimento, em um processo conhecido como morte celular programada ou apoptose. Durante esse período, ocorrem rearranjos morfológicos com o objetivo de aumentar a eficiência da transmissão sináptica. Mais tarde, durante a periadolescência, ocorre uma segunda onda de superprodução e eliminação (LANDMESSER, 1980).

Na fase pós-natal os estudos clínicos superam os pré-clínicos pela dificuldade de modelar comportamentos em animais, mas conclui-se que a maturação do comportamento motor, cognição e afeto está integralmente relacionada ao remodelamento sináptico ou à conectividade aprimorada que ocorre antes da idade adulta (CHANGEUX; DANCHIN, 1976; DANTZER, 2009; INNOCENTI, 1981; PURVES; LICHTMAN, 1980).

1.3. Envolvimento Genético

Como se sabe, a fisiopatologia do TEA ainda não é completamente conhecida, sendo a causa genética muito implicada como etiologia.

O aumento do diagnóstico associado às anormalidades genéticas permitiu sua nova especificação no DSM-5: “associada a condição médica ou genética conhecida”. No entanto, para crianças com autismo “não sindrômico ou idiopático”, os estudos de fatores de risco

genéticos têm sido menos conclusivos (CARRASCOSA-ROMERO; DE CABO-DE LA VEGA, 2017).

A probabilidade de uma família ter recorrência de autismo, ou seja, que já possui uma criança autista, é considerada alta (de 3 a 8%). Em até 92% dos casos em gêmeos monozigóticos, há diagnóstico de algum espectro de autismo nas duas crianças. Já nos gêmeos dizigóticos, em até 24% dos casos o diagnóstico é confirmado (ASHWOOD; WILLS; VAN DE WATER, 2006).

Estudos demonstram que cerca de 20 genes podem estar envolvidos no desenvolvimento de autismo. Análises de ligação analisando todo o genoma encontraram sinais positivos de correlação nos cromossomos 2, 1, 7 e 17, especificamente em 2q e 7q. Genes como FOXP2, HOXA1 e RELN parecem estar ligados, embora não tenham achados consistentes (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004). Outro trabalho revela uma relação entre a transmissão preferencial de alelos de marcadores genéticos de dois genes transportadores de serotonina e o autismo (COOK et al., 1997).

A síndrome autística é sintomatologicamente heterogênea e pode ser associada em mais de 10% dos casos com outras doenças neurológicas e genéticas, como a esclerose tuberosa, síndrome do X frágil, de Down e Rett (COHEN et al., 2005).

Os genes envolvidos no TEA alteram as proporções de sinalização excitatória para inibitória no SNC afetando as vias moleculares e os mecanismos relacionados à disfunção sináptica. Mutações em diferentes genes podem produzir autismo “idiopático”, mas a exposição a modificadores ambientais pode resultar em uma expressão variável de características autísticas (CARRASCOSA-ROMERO; DE CABO-DE LA VEGA, 2017).

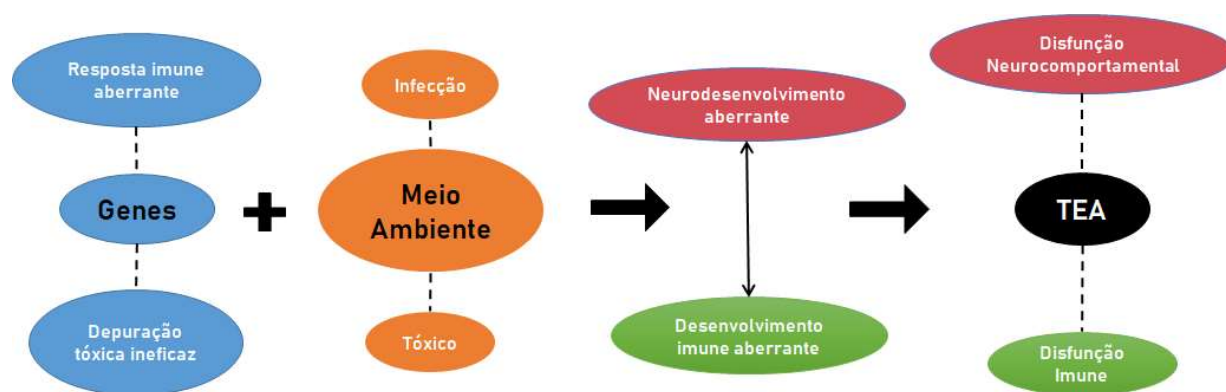
1.4. Fatores de risco para o desenvolvimento do TEA: infecções e alterações imune

Embora existam diversos fatores ambientais que contribuem para o TEA, a maioria deles converge em alterações nas respostas imunes durante o desenvolvimento pré-natal ou no início da vida pós-natal (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012).

O sistema imunológico é projetado para refletir mudanças ambientais e prever mudanças futuras como estratégia defensiva. A composição genética e programação inicial do sistema imune no útero e logo após o nascimento determinam a quantidade de insultos ambientais que são capazes de proteger na vida do indivíduo. Essa proteção é importante para a saúde em geral, mas também para o processamento neural, devido à comunicação difusa e

dinâmica que ocorre entre os sistemas imunológico e nervoso. De fato, o sistema imunológico pode ter efeitos profundos no desenvolvimento e cognição do cérebro, e alterações na sinalização imunológica podem, em diferentes contextos, induzir efeitos benéficos, homeostáticos e prejudiciais (ESTES; MCALLISTER, 2015).

Figura 3 – Modelo multifatorial para etiologia do TEA envolvendo genes, meio ambiente e imunidade. Esse modelo começa com um background genético que predispõe o indivíduo a responder inadequadamente a influências ambientais, como uma infecção ou exposição a substâncias tóxicas. Uma exposição ambiental durante um período crítico pode atrapalhar o desenvolvimento do sistema nervoso e imunológico. Essa interrupção pode levar ao TEA, bem como as disfunções neurológicas, comportamentais e imunológicas observadas no distúrbio.



Fonte: Adaptado de GOINES; ASHWOOD (2013)

Semelhante ao TEA, distúrbios do sistema imunológico da infância, como asma, alergias alimentares com risco de vida e distúrbios autoimunes atingiram níveis epidêmicos nas últimas duas décadas. Hipotetiza-se que o aumento desses distúrbios na infância reflita a exposição a um número crescente de estressores ambientais durante períodos críticos de desenvolvimento que resultam na expressão da doença em indivíduos com um background genético vulnerável. Esse modelo de múltiplo impacto para distúrbios imunológicos também é hipotetizado da etiologia do TEA (PESSAH et al., 2008; STAMOU et al., 2013).

A ativação imune materna e a produção de autoanticorpos maternos representam dois fatores de risco imunomediados, cujas influências no início da vida podem contribuir para o início do TEA. Estudo epidemiológico avaliando mais de dez mil casos de TEA demonstram que a infecção materna durante a gravidez, principalmente na presença de febre, está ligada ao risco elevado de TEA (ATLADÓTTIR et al., 2010). Além disso, a elevação das citocinas IFN-

γ , IL-4 e IL-5 no sangue materno e TNF α e MCP-1 no líquido amniótico ligado ao risco de autismo (Y. HSIAO, 2012).

Estudos revelam desregulação imune marcante no sistema imune neural, periférico e entérico. No cérebro observa-se ativação de micróglia e astrócitos, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e expressão alterada de genes de suscetibilidade ao TEA, juntamente com a expressão desregulada de genes relacionados com o sistema imune (inflamação e ativação glial) (CUSTÓDIO et al., 2017; VARGAS et al., 2005). À nível gastrointestinal, crianças autistas podem apresentar aumento da permeabilidade intestinal, hiperplasia linfóide, infiltração de linfócitos e microbiota intestinal alterada (HSIAO; PATTERSON, 2012).

As alterações imunes estão diretamente relacionadas à severidade dos sintomas do transtorno. As citocinas no cérebro desempenham papel importante no desenvolvimento sináptico, e os componentes tradicionais do sistema imune, como proteínas do complemento e complexos de histocompatibilidade (MHC), são críticos para a poda sináptica, a plasticidade neuronal e a padronização de circuitos neurais em cérebros normais (GARAY; MCALLISTER, 2010). À nível periférico, as citocinas estimulam as fibras aferentes do nervo vago, levando, em última instância, ao comportamento alterado, além disso, o nocaute de componentes imunológicos como RAG1 e receptor de célula T, leva ao comprometimento do comportamento cognitivo, aprendizado e memória (DANTZER, 2009). No trato gastrointestinal, a microbiota desempenha um papel importante no desenvolvimento e status do sistema imune. Estudos em animais *germ-free* exibem anormalidades nos comportamentos nociceptivos, emocionais, motores e ansiolíticos (HEIJTZ et al., 2011).

1.5. Hipótese Neuroinflamatória

No sistema nervoso central, a inflamação por bactéria contribui para inúmeros distúrbios neurológicos, incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson, leucomalácia periventricular, esclerose múltipla, traumatismo craniano, lesão medular e sepse (GRIN'KINA et al., 2012).

Há relatos de anormalidades nas células imunológicas periféricas, bem como associações entre variantes de genes para citocinas, seus receptores e HLA nestes distúrbios. O fato de que essa desregulação é encontrada no cérebro adulto indica que este é um estado permanente. Uma vez que esta desregulação também é encontrada em crianças (no TEA), a

sugestão é que a desregulação imune no cérebro começa cedo e é mantida por um mecanismo de feedback positivo (ESTES; MCALLISTER, 2015; GOTTFRIED et al., 2015; PATTERSON, 2009).

Algumas linhas de pesquisa mostram que tanto fatores ambientais como genéticos influenciariam o desenvolvimento de anormalidades na circuitaria neural que leva ao autismo. A conexão do sistema nervoso com o sistema imune têm sido muito estudada, tendo achados não só de alterações periféricas, mas também alterações neurais (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012; CUSTÓDIO et al., 2017; PANG et al., 2016)

Células neurogliais, como astrócitos e microglia, juntamente com macrófagos perivasculares e células endoteliais, desempenham papéis importantes na função neuronal e na homeostase. Microglia e astrogliia estão fundamentalmente envolvidas na organização cortical, orientação neuroaxonal e plasticidade sináptica. As células neurogliais contribuem para a regulação do sistema imune no SNC. Os astrócitos, por exemplo, participam da desintoxicação do excesso de aminoácidos excitatórios, da manutenção da integridade da barreira hematoencefálica e da produção de fatores neurotróficos (PARDO; VARGAS; ZIMMERMAN, 2005).

Todos os tipos celulares neurais e não neurais do sistema nervoso central em desenvolvimento utilizam citocinas para sinalizações autócrinas e parácrinas, e sabendo que essas citocinas também participam da modulação imune, processos de desenvolvimento normais mediados por citocinas podem favorecer distúrbios por desregulação imune, incluindo em infecções maternas e neonatais (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012; CUSTÓDIO et al., 2017).

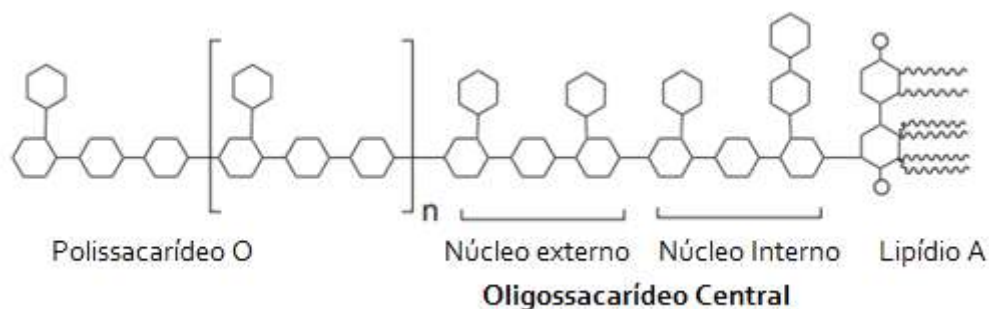
1.6. Desafio Imune com LPS

O Lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina presente na parede celular externa de bactérias Gram negativas, e funciona como importante fator de virulência, por ser capaz de estimular o sistema imune inato e induzir uma cascata de processos imunológicos desencadeando respostas fisiológicas, neuroendócrinas, metabólicas e comportamentais (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009). Sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa (TUIN et al., 2006).

O LPS possui três porções: 1) o lipídio A, formado principalmente de glicosamina ligado à fosfatos e longas cadeias de ácido graxo, sendo a parte inicial da molécula e responsável

pela toxicidade e pelas propriedades pró-inflamatórias; 2) o polissacarídeo O, situado na superfície externa da molécula, é uma cadeia variável responsável pelas mudanças conformacionais das bactérias; e 3) a região nuclear, porção capaz de ser reconhecida pelos anticorpos, liga as porções interna e externa da molécula (CAROFF et al., 2002)

Figura 4. Estrutura química do LPS



Fonte: Adaptado de KUSUMOTO; FUKASE, 2006

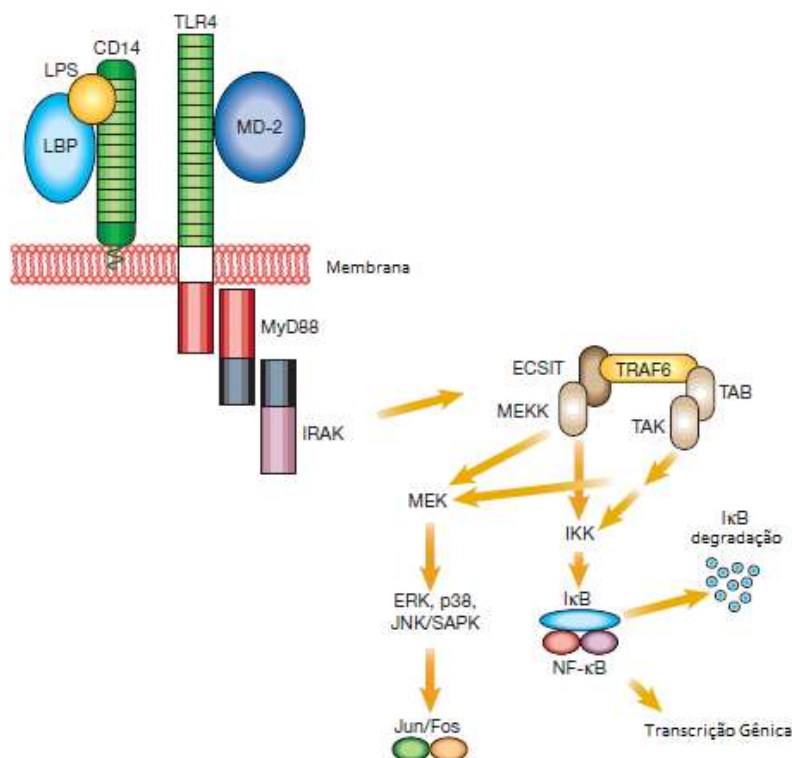
Essa endotoxina se liga a receptores próprios e desencadeia vias de sinalização intracelular. Os principais receptores estão localizados na membrana celular e são conhecidos como *Toll-like 4* (TLR4), estes são sensores primários de infecção microbianas (POLTORAK et al., 1998).

O reconhecimento do LPS é mediado por outras moléculas como a proteína CD14, que pode estar ancorada à membrana ou solúvel na circulação, proteína ligadora de LPS (LBP) e ainda a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2). Essas moléculas atuam como proteínas auxiliares, responsáveis por transferir o LPS para o receptor TLR4 (CRUZ-MACHADO, 2010). Diante do exposto, após o contato do LPS com o organismo animal, seja por inoculação direta da molécula ou infecção bacteriana, inicia-se uma cascata de respostas no organismo infectado. O LPS se liga à LBP, uma proteína de fase aguda produzida no fígado, formando um complexo chamado LPS-LBP. Esse complexo transfere o LPS para a superfície de células imunológicas, onde se liga na proteína de membrana periférica CD14, iniciando a ativação celular (ADEREM; ULEVITCH, 2000; MIYAKE, 2003).

Em seguida, o complexo LPS-CD14 ativa a sinalização do receptor TLR4, o qual é complexado à proteína MD-2, gerando sinal transmembranar para o núcleo. Assim, ocorre uma série de reações em cascata no interior das células que contém este receptor, no caso da periferia

o monócito/macrófago, incluindo a ativação do MyD88, IRAK, TRAF6, TAK-1, quinase I κ B, AP-1, dentre outras, até a ativação do fator nuclear de transcrição NF- κ B (envolvido na neurodegeneração e desenvolvimento de neurônios e células da glia e plasticidade) que ativa genes que codificam proteínas pró-inflamatórias (citocinas) (ADEREM; ULEVITCH, 2000; CRUZ-MACHADO, 2010; HAVA et al., 2006).

Figura 5 – Via clássica da ativação dos receptores por LPS



Fonte: Adaptado de ADEREM; ULEVITCH (2000)

Após a exposição ao LPS, ocorre um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias periféricas, moléculas de adesão, quimiocinas, produção de ciclooxigenase 2 (COX-2) e prostaglandinas, resultando em inflamação (AVITSUR; YIRMIYA, 1999). Aliado a isso, o LPS ativa células da glia, como micróglia, astrócitos e os próprios neurônios. A ativação da microglia resulta na produção de mediadores inflamatórios e citocinas por diferentes vias no sistema nervoso central, afetando o metabolismo de neurotransmissores, como serotonina, dopamina, noradrenalina, ácido gama-aminobutírico (GABA), acetilcolina, neuropeptídeos, dentre outros, a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), aumentando os níveis de glicocorticoides e ACTH, e uma diminuição de fatores neurotróficos,

produção de óxido nítrico, causando neuroinflamação e danos neurais (LORTON et al., 2007; MCAFOOSE; BAUNE, 2009).

1.7. Modelos Animais

Modelos animais fornecem ferramentas translacionais essenciais para estudar os mecanismos subjacentes às desordens genéticas humanas, como investigar a influência dos fatores de risco e para desenvolver estratégias de tratamento. Dado que os critérios de definição do autismo são comportamentais, as investigações que empregam modelos animais requerem uma visão considerável de quais comportamentos são específicos no diagnóstico do autismo. Os principais procedimentos para ensaiar comportamentos relevantes para os sintomas associados ao TEA e as alterações do desenvolvimento neurológico são: mudanças nas habilidades cognitivas, tendências semelhantes à ansiedade, convulsões, disfunções motoras, hiperatividade, resposta a estímulos sensoriais e padrões de sono alterados em camundongos (CRAWLEY, 2012).

No entanto, nenhum modelo animal conseguiu reproduzir totalmente um transtorno exclusivamente humano, como o TEA. Além disso, como sua etiopatogenia ainda permanece desconhecida, e até o momento nenhum tratamento melhora consistentemente os sintomas centrais, atualmente não é possível incorporar a validade preditiva de um modelo animal de autismo (RICCERI; MICHETTI; SCATTONI, 2016).

1.7.1. Valproato de Sódio

Modelos animais utilizando medicamentos são propostos como modelos de autismo. O valproato de sódio foi escolhido para testar este modelo após relatos de uma relação entre o autismo e a exposição pré-natal a ele.

O valproato de sódio tem efeitos somáticos e teratogênicos semelhantes aos da talidomida, e como esta não tem o mesmo efeito teratogênico em roedores do que em primatas, o ácido valpróico é usado para ferir o tronco cerebral de ratos no útero causando disfunção somática e do sistema nervoso central (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005)

Em ratos, o tubo neural fecha no 11º dia de gestação e, no 12º dia, a produção dos núcleos motores dos nervos trigêmeo, abducente e hipoglosso está completa. A exposição à droga no momento crítico do fechamento do tubo neural produz alterações no número de células de Purkinje e no volume celular cerebelar, além disso, estudos clínicos em crianças expostas ao

valproato no útero caracterizaram uma “síndrome do valproato fetal” que mostra semelhanças fenotípicas com o autismo e inclui déficits na linguagem e na comunicação, comportamento estereotipado e hiperexcitável e atrasos globais no desenvolvimento comportamental (WAGNER et al, 2006).

1.7.2. Infecções

Os modelos animais de infecções pré-natais ou neonatais propõem mimetizar infecções virais e bacterianas durante a gestação ou logo após o nascimento, principalmente com a administração de LPS, vírus influenza e ácido poliinosínico-policidílico (PolyI:C), injetados por vias intravenosa, subcutânea, intraperitoneal e intranasal em roedores (BOKSA, 2010).

Esses modelos apontam para ativação imune no cérebro fetal em desenvolvimento. A ativação imune materna no meio da gestação de animais com PolyI:C (análogo sintético de RNA viral) ou IL-10 resulta em prole com comportamentos, histologia e expressão gênica anormal, de modo similar à pacientes autistas (MEYER; YEE; FELDON, 2007; SMITH et al., 2007).

Nos animais, as alterações comportamentais comumente consideradas como sinais de autismo são hiperatividade, reatividade aumentada e estereotipada e alteração nas habilidades de comunicação social, sendo a última limitada pela baixa sofisticação da análise comportamental em situações sociais (FORTIER; LUHESHI; BOKSA, 2007; SMITH et al., 2007).

Infecções bacterianas pré e pós-natais, que podem interferir na produção de citocinas pró-inflamatórias, tem se mostrado como possíveis indutoras do autismo. O tratamento com LPS no meio da gestação de ratas, leva a redução do comportamento de brincar nos filhotes e quando adultos reduzem a interação social (BOKSA, 2010; KIRSTEN et al., 2019). O desafio imune com LPS na fase pós-natal em camundongos também desenvolve alterações comportamentais e neuroquímicas na adolescência e idade adulta (CUSTÓDIO et al., 2017; PANG et al., 2016).

Além disso, sabe-se que a translocação de endotoxina bacteriana (LPS) da microbiota intestinal para a circulação sanguínea estimula respostas inflamatórias sistêmicas, dito isto, além de infecções, o desafio com LPS vem a simular um processo disbiótico intestinal acompanhado de translocação bacteriana (KIECOLT-GLASER et al., 2018).

Os copos da maioria dos animais são povoados por comunidades de microrganismos altamente complexas e geneticamente diversas. A maioria desses microrganismos reside no intestino em comunidades amplamente estáveis, dinamicamente interativas, que interagem positivamente com o hospedeiro. Estudos mostram que a exposição a estressores afeta a estabilidade da microbiota e leva à translocação bacteriana (BAILEY et al., 2011; KIECOLT-GLASER et al., 2018).

Modelos de roedores mostraram que alterações induzidas por estresse na microbiota intestinal podem provocar translocação bacteriana, e que bactérias intestinais contribuem para a imunopotenciação induzida por estresse (AIT-BELGNAOUI et al., 2012; BAILEY et al., 2011; MASLANIK et al., 2012). Merece destaque o fato de que pacientes com TEA apresentam importantes alterações intestinais que podem ser causa ou consequência do transtorno, e que um aumento da permeabilidade intestinal pode ocasionar em translocação bacteriana e consequente inflamação sistêmica que pode causar ou agravar alterações tipo-autista.

2. HIPÓTESE

A administração neonatal sistêmica de LPS em camundongos machos e fêmeas produz alterações comportamentais e neuroinflamatórias na infância semelhantes ao autismo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Determinar as alterações comportamentais e neuroquímicas desencadeadas pela administração neonatal de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* em animais infantis.

3.2. Objetivos Específicos

1. Determinar em animais tratados com LPS na fase neonatal e avaliados na infância, as alterações comportamentais analisadas pelos seguintes testes:

- Atividade locomotora e movimentos repetitivos através do teste do Campo aberto;
- Memória de trabalho através do Labirinto em Y (*Y maze*);
- Interação Social;

2. Avaliar no hipocampo (HC) e córtex pré-frontal (CPF) de animais expostos ao LPS, as alterações neuroquímicas e neuroinflamatórias:

- Avaliar resposta inflamatória pela atividade da mieloperoxidase (MPO);
- Avaliação da expressão de Sinaptofisina, NFκB, Parvalbumina e IBA1;
- Determinação dos níveis da neurotrofina BDNF.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, alojados em caixas de polipropileno, à temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Com 2 meses de idade as fêmeas foram colocadas em acasalamento e as que ficaram prenhas foram colocadas em caixas separadas e monitoradas diariamente até o dia do parto.

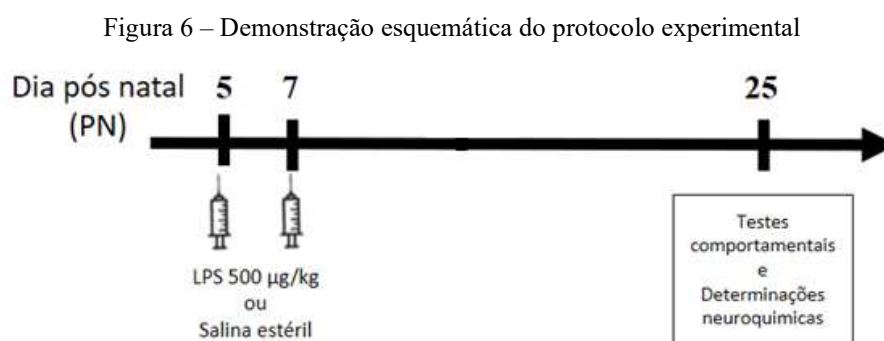
O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) sob número de protocolo 91/2017 e os experimentos foram realizados de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

4.2. Drogas

Os animais receberam injeções de Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EUA) por via intraperitoneal (i.p.), na concentração de $500 \mu\text{g}/\text{kg}$, dissolvido em solução salina estéril.

4.3. Protocolo Experimental

Logo após o nascimento da prole foi realizada uma permuta dos filhotes de diferentes mães, a fim de garantir a heterogeneidade genética dos grupos. No 5º e 7º dia após o nascimento, os animais foram pesados e receberam tratamento com LPS de *E. coli* ($500 \mu\text{g}/\text{kg}$) ou solução salina (grupo controle) por via intraperitoneal.



Fonte: Próprio autor.

Após 21 dias do nascimento, os filhotes foram desmamados e separados por grupo e sexo, e no 25º dia foram submetidos às avaliações comportamentais, eutanásia por decapitação.

O hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecados, pesados e imediatamente armazenados sob refrigeração de -80°C até o dia dos ensaios para avaliação neuroquímica.

4.4. Testes Comportamentais

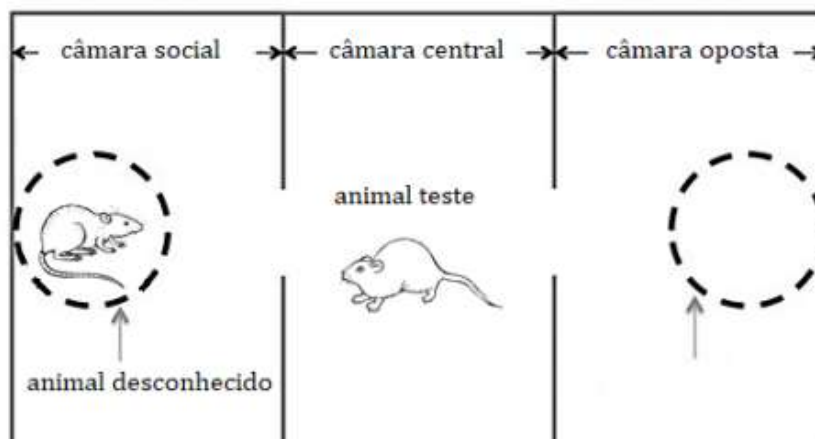
4.4.1. Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto tem como finalidade avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais e identificar comportamentos de ansiedade ou depressão. A arena para este teste é feita de acrílico (30 x 30 x 15 cm) com o chão dividido em nove quadrantes iguais. Os animais foram cuidadosamente colocados no centro da arena e sua atividade exploratória foi registrada durante 5 minutos, após 1 minuto de habituação (ARCHER, 1973). Os parâmetros avaliados foram: o número de travessias, número e tempo de *self-groomings* (comportamentos estereotipados), número de *rearings* (atividade exploratória vertical) e número e tempo de passagens no centro do campo.

4.4.2. Teste de Interação Social

O aparato do teste consiste em uma caixa de acrílico 60 x 40 cm dividida em 3 câmaras através de pequenas aberturas (6 x 6 cm). Nas câmaras das extremidades havia uma gaiola de ferro, uma com um animal desconhecido e do mesmo sexo (câmara social) e outra vazia (câmara oposta). Os animais teste foram colocados na câmara central e tiveram seu comportamento avaliado por 5 minutos (KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2010). Foi avaliado o tempo gasto em cada uma das câmaras e o tempo interagindo com o animal desconhecido, e a preferência social será definida como: (% o tempo gasto na câmara social) – (% o tempo gasto na câmara oposta).

Figura 7 – Demonstração esquemática do protótipo do aparato utilizado no teste de interação social.

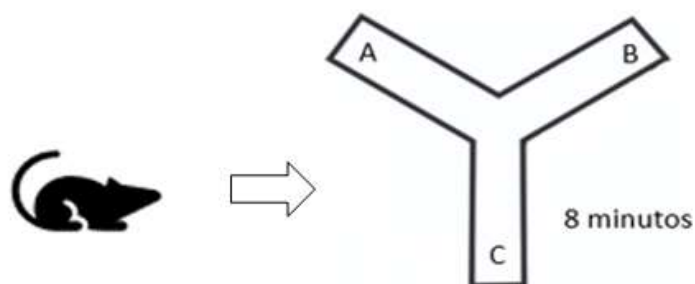


Fonte: MONTE, 2017

4.4.3. Labirinto em Y (Y maze)

O desempenho da memória de trabalho imediato, ou seja, o comportamento cognitivo exploratório dos animais foi avaliada através do comportamento de alternância espontânea dos braços enumerados (1, 2, 3) do labirinto em Y, durante uma única sessão (HUGHES, 2004). O labirinto consiste em 3 braços idênticos de 30 cm de comprimento, 6 cm de largura e 20 cm de altura). Cada camundongo foi colocado na extremidade de um braço e pôde se mover livremente através do labirinto durante uma sessão de 8 min. A sequência de entrada nos braços foi anotada e a percentagem de alternância correta será calculada da seguinte forma: $\text{total de alternâncias} / (\text{total de entradas nos braços} - 2) \times 100$, como previamente descrito (DALL'IGNA et al., 2007).

Figura 8 - Demonstração esquemática do teste do labirinto em Y



Fonte: Próprio autor

4.5. Testes Neuroquímicos

O hipocampo e o córtex pré-frontal foram retirados e imediatamente acondicionado em temperatura a -80°C para realização das seguintes avaliações neuroquímicas no PN 25.

4.5.1. Expressão protéica de NFκB, IBA-1, Sinaptofisina e Parvalbumina por Western Blotting.

Para avaliar a expressão protéica desses alvos moleculares realizou-se o ensaio de Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração e dosagem de proteínas e Western Blotting.

4.5.1.1. Preparação do Extrato Total de Proteínas

Os tecidos hipocampais e pré-frontais foram homogeneizados manualmente em 2 mL de tampão de lise RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X- 100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma Aldrich, EUA, 1μL de inibidor de protease: 100μL de RIPA) usando um pistão de vidro (Potter). Os homogenatos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos, sendo os sobrenadantes, contendo o extrato de proteínas de todos os compartimentos celulares, coletados. Os pellets residuais foram descartados. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford descrito a seguir. Todos os procedimentos foram realizados com as amostras imersas em gelo, e em condições de boa refrigeração e condicionamento

4.5.1.2. Método Bradford para dosagem de proteína

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo emprego de reagente de Bradford (Bio-Rad Protein Assay – Dye Reagent Concentrate - BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). A ligação à proteína ocorre quando absorção máxima da solução ácida Coomassie Brilliant Blue G-250 muda de 465 para 595 nm. Foram pipetados 160 μL de amostra e 40 μL de solução de Bradford nas placas e a leitura foi feita por espectrofotômetro (595 nm), utilizando-se uma curva de calibração de albumina bovina sérica (BSA) de 0,2 a 1,0 mg / mL.

4.5.1.3. Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 50 μ g de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β -mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60V nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120V para o restante da corrida, onde foi utilizado o gel a 10% e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Foi usado o Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (Biorad, EUA) como padrão de peso molecular de proteínas. Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100V por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 5 minutos cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos primários anti-parvalbumina (1:1000; Abcam, USA) IgG, ou anti-sinaptofisina (1:1000, SantaCruz Biotechnology), ou anti-NF κ B (1:1000 SantaCruz Biotechnology), ou anti-Iba1 (1:1000, Rheabiotech), ou anti- β -actina (1:1000, Rheabiotech) diluído em 1% de BSA em TBS-T. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit IgG (1:1000; Invitrogen, USA) ou HRP-goat anti-mouse IgG (1:1000; Sigma, USA) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas 4 vezes, duração de 5 minutos cada, com TBS-T. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 minutos. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc MP System (Biorad, EUA). A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageLab Biorad (Biorad, EUA).

4.5.2. Quantificação de BDNF por ELISA

As áreas cerebrais dissecadas foram homogeneizadas em 9 volumes de tampão PBS (137 mM NaCl – 8,0 g, 2,7 mM KCl – 0,2 g, 10 mM Na₂HPO₄ anidro – 1,189 g, 2 mM KH₂PO₄ – 0,2 g, água destilada q.s.p. – 1.0 L, pH: 7,2 – 7,4) com coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich) e posteriormente centrifugadas (12000 rpm, 30 min, 4°C). Os sobrenadantes das amostras foram coletados e usados no ensaio. Em seguida, o protocolo foi realizado de acordo com as orientações do fabricante: para BDNF (mouse/human BDNF, R&D Systems, USA). Por fim, as placas foram lidas na absorvância de 450 nm e a concentração de BDNF foi expressa em pg/mg de tecido.

4.5.3. Ensaio para Mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos de neutrófilos. Essa enzima é utilizada como indicador de processo inflamatório, mais especificamente, como marcador para o conteúdo de neutrófilos dos tecidos. Neste ensaio, a H₂O₂ é clivada por meio da MPO liberada das amostras de tecido por homogeneização com tampão HTAB (detergente). O radical oxigênio resultante se combina com diidrocloreto de θ -dianisidina, o doador de hidrogênio, que é convertido a um composto colorido. O aparecimento deste composto, ao longo do tempo, é medido por espectrofotômetro para determinar o conteúdo de MPO do ensaio. Após a decapitação, as áreas cerebrais foram homogeneizadas (50mg/ml) em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB) em tampão fosfato 50mM, pH 6,0. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (14000 rpm, 4°C) por 2 minutos. Foram retirados 30 μ L do sobrenadante da amostra e adicionados a placa de ELISA juntamente com 200 μ L da solução contendo 0,167 mg/ml de hidrocloreto de θ -dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. A absorvância foi medida nos tempos 0 e 3 minutos com comprimento de onda de 450nm.

4.6. Análise Estatística

Os dados foram analisados por análise de variância univariada de duas vias (ANOVA) com o teste post hoc de Tukey considerando os fatores "LPS" (controle e LPS) x "Sexo" (macho e fêmea). O nível de significância foi estabelecido em $P \leq 0,05$. As análises foram realizadas com o *software* GraphPad Prism (Versão 7.00 para Windows).

5. RESULTADOS

5.1. Resultados Comportamentais

No teste do campo aberto, avaliamos a atividade locomotora, o comportamento tipo-ansioso e presença ou não de movimentos repetitivos e estereotípicos. Na atividade locomotora houve significância na interação “sexo” x “LPS” (ANOVA: $[F(1,29) = 4,469, P = 0,0432]$), mas não houve significância quando realizada a análise grupo a grupo pelo teste de Tukey (Fig. 9).

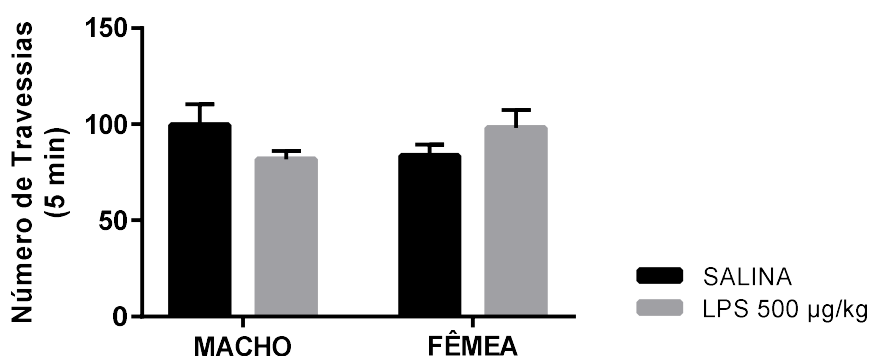


Figura 9 – Atividade locomotora no campo aberto em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS. As barras representam média ± SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*.

Também houve interação significativa entre “sexo” x “LPS” na análise do número de groomings (Fig. 9A) (ANOVA: [F (1,36) = 6,521, P = 0,0150]), e o teste de Tukey evidenciou maior comportamento de grooming em machos tratados com LPS quando comparados com os machos controle (P = 0,0156). Já na avaliação da capacidade exploratória vertical dos animais (rearing), não houve alteração significativa (Fig. 10B).

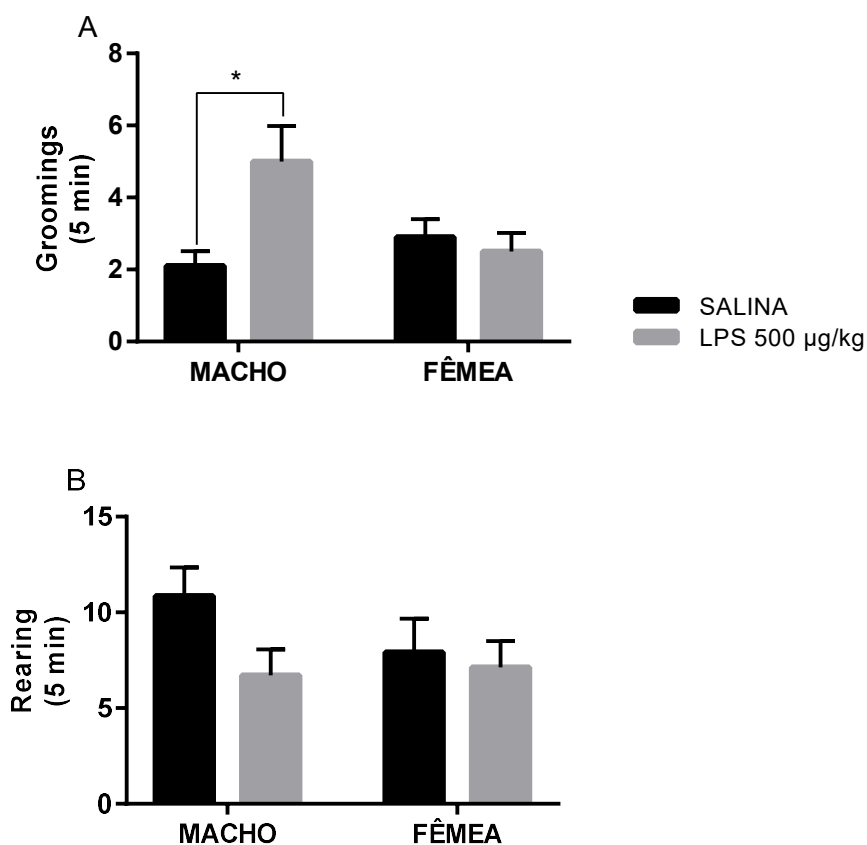


Figura 10 – Efeito do desafio inume neonatal no número de groomings (A) e rearings (B) no campo aberto em animais machos e fêmeas. As barras representam média \pm SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. *P < 0,05.

Observou-se também que camundongos machos desafiados com LPS apresentaram uma diminuição significativa do tempo gasto no centro do campo aberto ($P = 0,0242$) quando comparados com os respectivos animais controle (Fig. 11). Adicionalmente, observou-se um aumento do tempo gasto no centro do campo nos animais machos tratados com salina quando comparados com as fêmeas tratadas também com solução salina ($P = 0,0011$) (ANOVA de tempo no centro: “sexo” x “LPS” [$F(1,19) = 7,627, P = 0,0124$]; “sexo” isoladamente [$F(1,19) = 12,49, P = 0,0022$]).

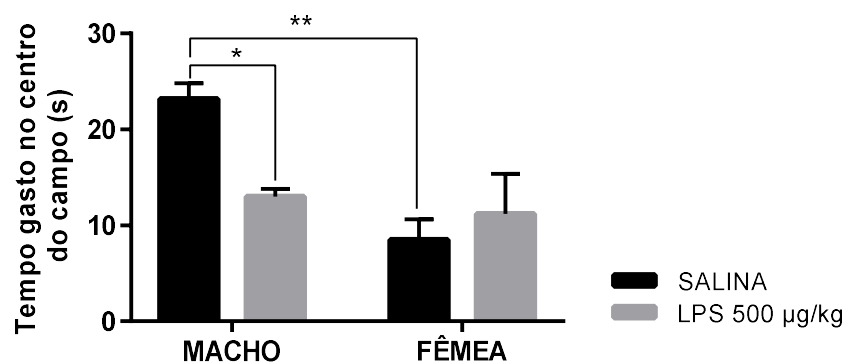


Figura 11 - Atividade locomotora (tempo gasto no centro) no campo aberto em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS. As barras representam média \pm SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Conforme observado na figura 12, houve interação significativa entre “sexo” x “LPS” no teste de interação social (ANOVA: [F (1,35) = 5,895, P = 0.0205]). Além disso, o fator “LPS” (ANOVA: [F (1,35) = 5,789, P = 0.0215]) e o fator “sexo” (ANOVA: [F (1,35) = 7,733, P = 0.0087]), isoladamente, deram significância estatística. O teste de múltiplas comparações revelou que apenas as fêmeas que sofreram desafio imune com LPS apresentaram diminuição na % preferência social (P = 0,0074).

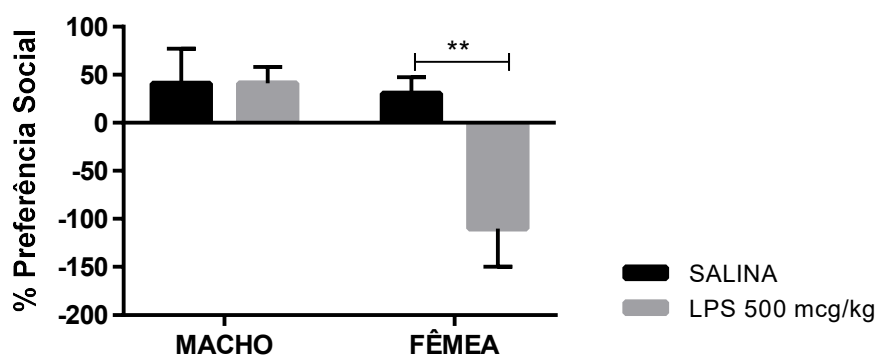


Figura 12 – Efeito do desafio imune neonatal em % de preferência social em animais machos e fêmeas. As barras representam média \pm SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. **P < 0,01.

Em relação à avaliação da memória de trabalho no labirinto em Y, o fator “LPS” mostrou significância (ANOVA: [F (1,34) = 19,84, P < 0,0001]). O teste post hoc mostrou que os camundongos machos (P = 0,0058) e fêmeas (P = 0,0465) tratados com LPS tiveram déficits na memória de trabalho quando comparados com seus respectivos controles (salina) (Fig. 13).

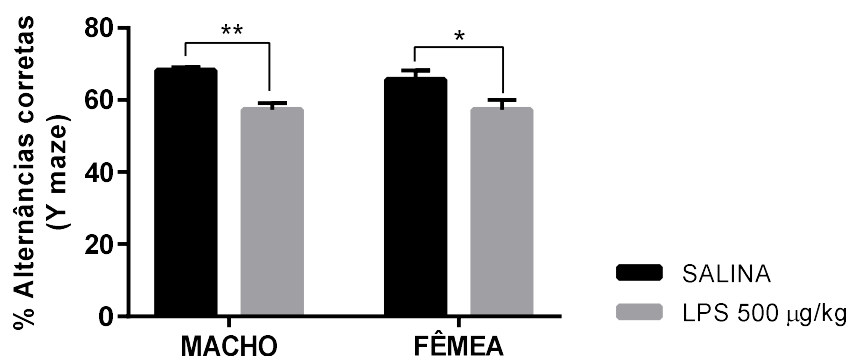


Figura 13 – Efeito do desafio imune neonatal na % de alternâncias corretas no labirinto em Y em animais machos e fêmeas. As barras representam média \pm SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. *P < 0,05, **P < 0,01.

5.2. Resultados Neuroquímicos

A análise dos níveis de BDNF no CPF revelou significância estatística no fator “LPS” (ANOVA: [F (1,28) = 13,69, P = 0,0009]), já no teste de múltiplas comparações mostrou diminuição importante dos níveis cerebrais de BDNF nas fêmeas tratadas com LPS em comparação com as fêmeas tratadas com salina (P = 0,0175) (Fig. 13B). No hipocampo, houve significância apenas nos fatores “sexo” (ANOVA: [F (1,27) = 7,238, P = 0,0121]) e “LPS” (ANOVA: [F (1,27) = 8,53, P = 0,0070]) isoladamente. Apesar dos níveis terem diminuído nos animais desafiados com LPS, não houve relevância estatística, segundo o teste de Tukey (Fig. 14A).

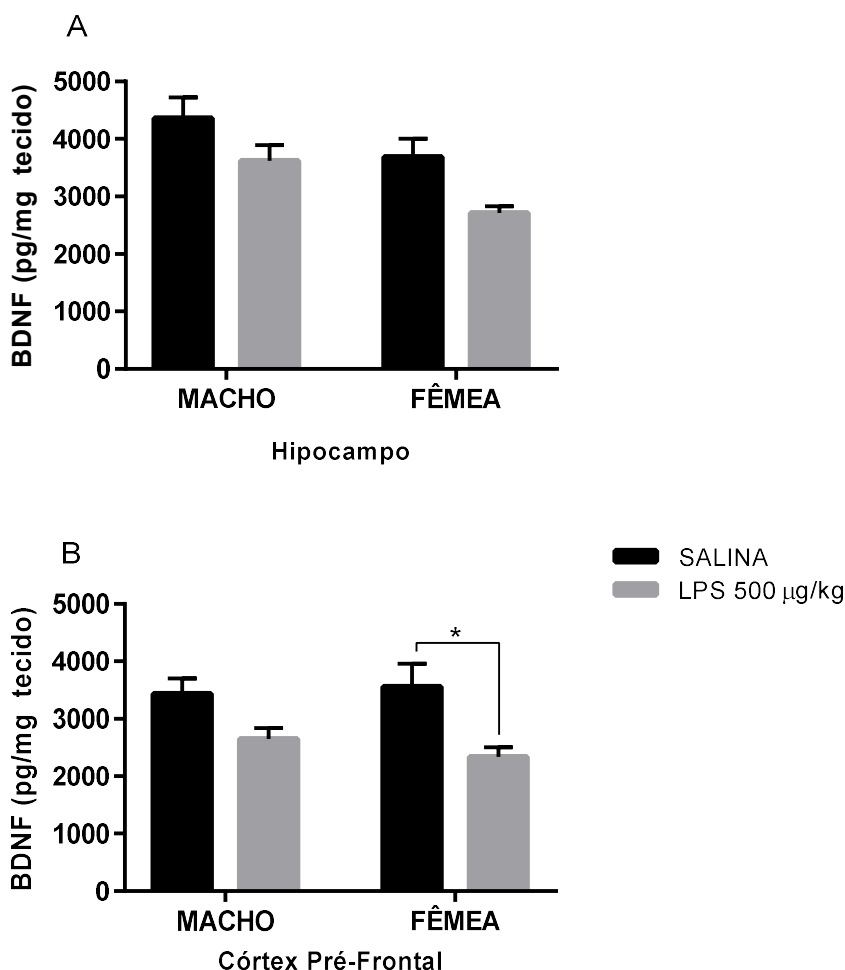


Figura 14 – Níveis de BDNF [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS. As barras representam média ± SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. *P < 0,05.

Já na análise estatística do IBA1, foram observadas significância nos fatores “sexo” (ANOVA: [F (1,9) = 5,703, P = 0,0407]) e “LPS” (ANOVA: [F (1,9) = 8,475, P = 0,0173]), isoladamente. O teste post hoc mostrou que as fêmeas desafiadas com LPS diminuíram a expressão de IBA1 no hipocampo, quando comparado com seu respectivo controle (P = 0,0455) (Fig. 15A). Não houve alterações significativas na avaliação do CPF dos camundongos machos e fêmeas (Fig. 15B).

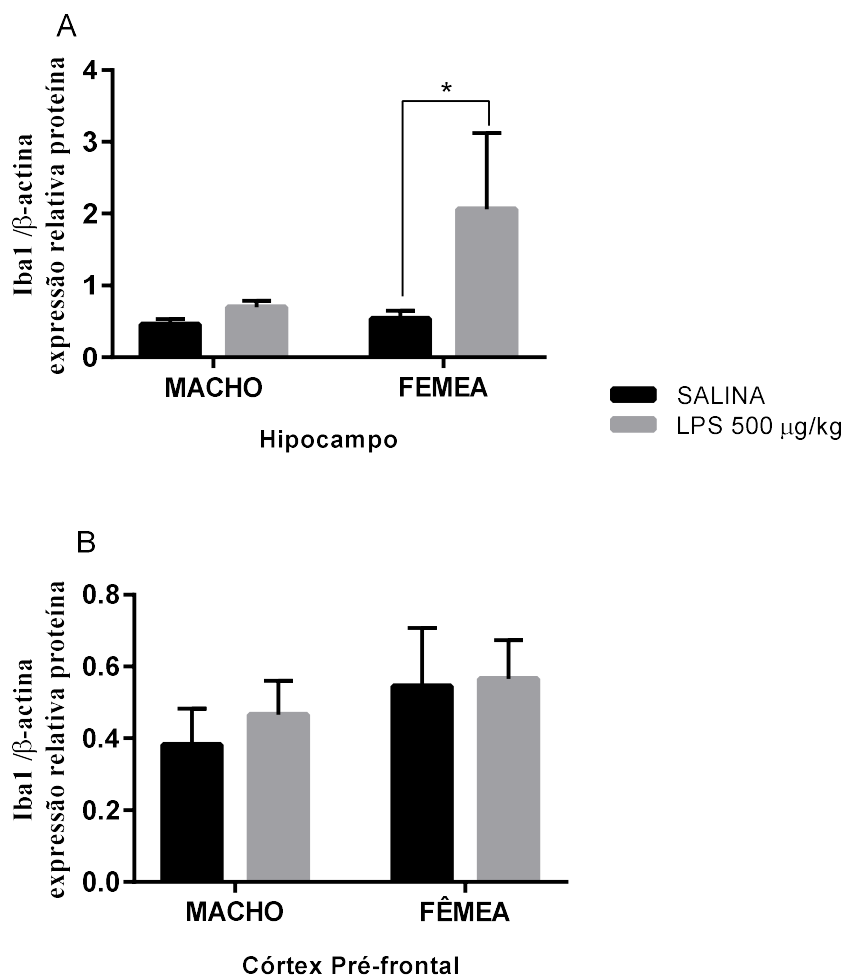


Figura 15 – Níveis de IBA1 [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS. As barras representam média \pm SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. *P < 0,05.

Na avaliação das dosagens de parvalbumina, não houve interação significativa entre os fatores, porém, o teste T não paramétrico demonstrou diminuição da expressão nas fêmeas tratadas com LPS em comparação ao seu respectivo controle no hipocampo (Fig. 16A) ($P = 0,0171$). No córtex pré-frontal não houve significância estatística (fig. 16B).

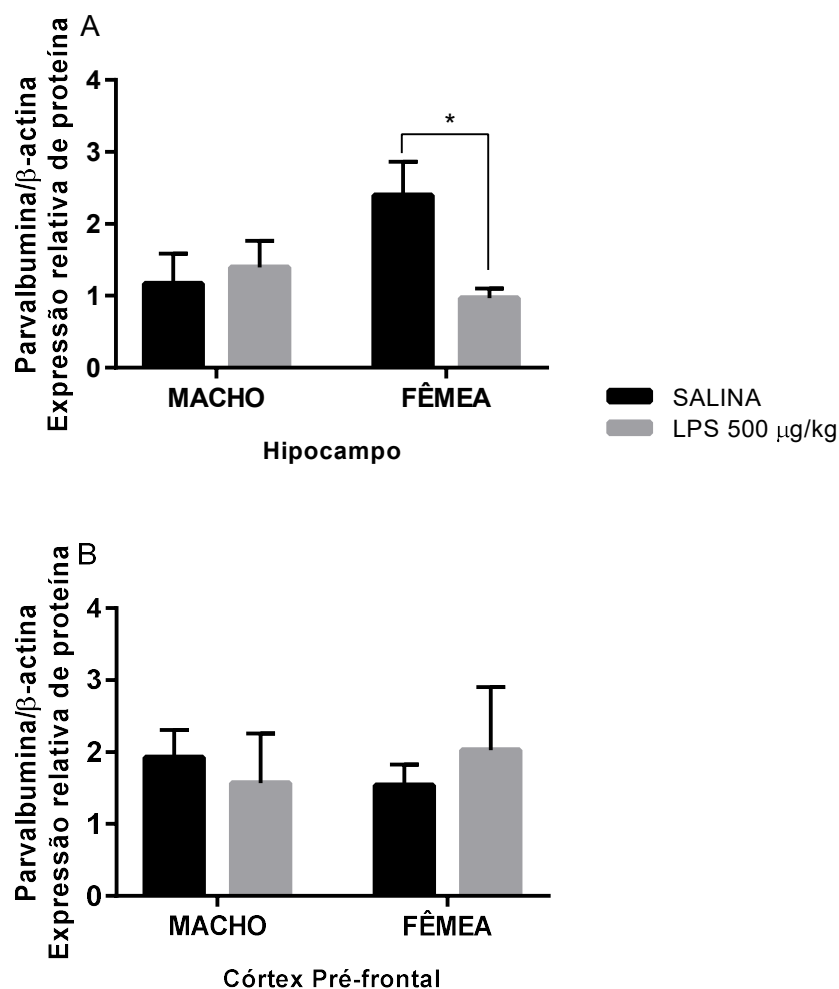


Figura 16 - Níveis de Parvalbumina [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS. As barras representam média \pm SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por teste T não paramétrico. * $P < 0,05$.

A atividade da mieloperoxidase (Fig. 17) se mostrou reduzida em ambas as áreas analisadas (HC: $P = 0,0062$ e CPF: $P = 0,0104$) nas fêmeas desafiadas em relação às fêmeas controle. No CPF houve, ainda, interação significativa entre “sexo” x “LPS” (ANOVA: $[F (1,24) = 5,342, P = 0.0297]$). Além disso, o fator “LPS” (ANOVA: $[F (1,24) = 6,613, P = 0.0167]$) e o fator “sexo” (ANOVA: $[F (1,24) = 14,14, P = 0.0010]$), isoladamente, deram significância estatística. No hipocampo, apenas o fator “LPS” mostrou relevância estatística (ANOVA: $[F (1,24) = 13,72, P = 0.0011]$).

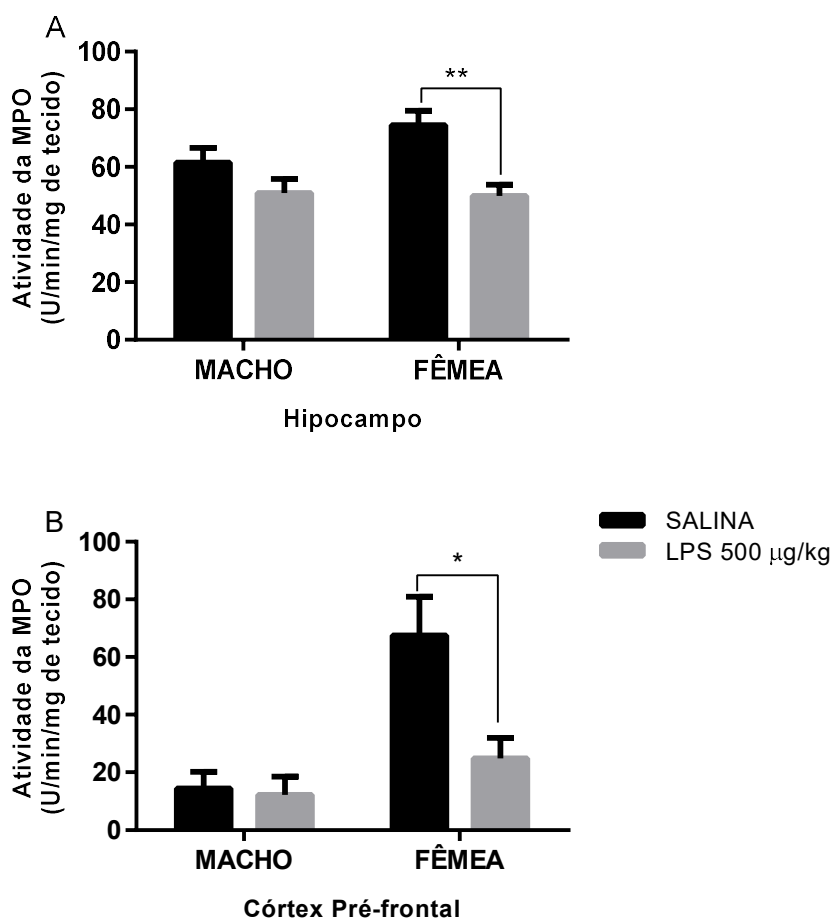


Figura 17 – Atividade da MPO [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS. As barras representam média \pm SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*. * $P < 0,05$.

De acordo com a figura 18, as dosagens de sinaptofisina no HC (Fig. 18A) e no CPF (Fig. 18B) e NFκB no HC (Fig. 18C) e no CPF (Fig. 18D) não mostraram resultados estatisticamente relevantes para nenhum dos fatores analisados.

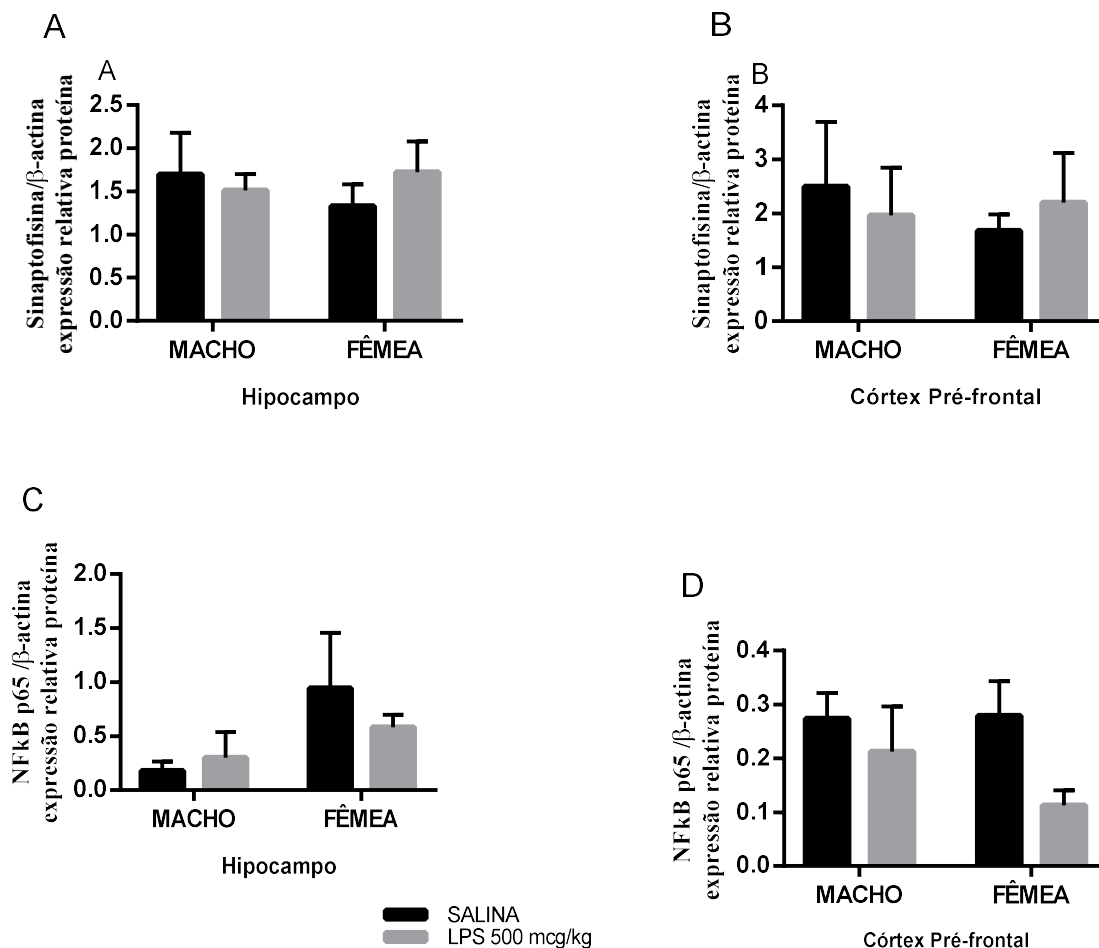


Figura 18 - Níveis de Sinaptofisina [Hipocampo (A) Córtex Pré-frontal (B)] e NFκB [Hipocampo (C) Córtex Pré-frontal (D)] em animais machos e fêmeas após desafio imune neonatal de LPS. As barras representam média ± SEM. Análise estatística por ANOVA de duas vias seguida por Tukey *post test*.

Os quadros abaixo demonstram o resumo de todos os resultados obtidos nesse estudo através dos testes comportamentais (Quadro 1) e neuroquímicos (Quadro 2) realizados, segundo os parâmetros analisados e a manifestação de acordo com o gênero:

Quadro 1 – Resumo dos resultados comportamentais obtidos no presente estudo

Teste	Parâmetro	LPS Macho	LPS Fêmea
Interação Social	Preferência social	Não significativo	↓
	Labirinto em Y	↓	↓
Campo Aberto	Groomings	↑	Não significativo
	Rearing	Não significativo	Não significativo
	Tempo no centro	↓	Não significativo

Quadro 2 - Resumo dos testes neuroquímicos obtidos no presente estudo

Teste	Área Cerebral	LPS Macho	LPS Fêmea
BDNF	HC	Não significativo	Não significativo
	CPF	Não significativo	↓
MPO	HC	Não significativo	↓
	CPF	Não significativo	↓
Parvalbumina	HC	Não significativo	↓
	CPF	Não significativo	Não significativo
IBA1	HC	Não significativo	↑
	CPF	Não significativo	Não significativo
Sinaptofisina	HC	Não significativo	Não significativo
	CPF	Não significativo	Não significativo
NF-κB	HC	Não significativo	Não significativo
	CPF	Não significativo	Não significativo

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o desafio imune neonatal com LPS de *E. coli* (PN 5 e 7) provocou alterações comportamentais e neuroquímicas em regiões cerebrais específicas de forma diferenciada em camundongos machos e fêmeas. Observamos que machos e fêmeas apresentaram prejuízos na memória de trabalho, mas apenas os machos apresentaram comportamento tipo-ansioso e estereotipado com movimentos repetitivos. Por outro lado, as fêmeas tiveram uma redução significativa na capacidade de interação social. Nas avaliações neuroquímicas, apenas as fêmeas apresentaram diminuição significativa dos níveis de BDNF e da atividade da enzima MPO (no CPF), e aumento dos níveis de IBA1 (no HC) e redução de parvalbumina (no HC)

Desafios imunes pelo uso de partículas vírus miméticas como poly I:C e por LPS em períodos críticos do desenvolvimento (pré-natal ou neonatal) vem sendo utilizados como modelos animais para o estudo de transtornos neurodesenvolvimentais, com o intuito de simular infecções durante as fases iniciais da vida e sua relação com o desenvolvimento de TEA e esquizofrenia, visto que evidências epidemiológicas fortes vêm demonstrando esta associação nas últimas décadas (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012; CUSTÓDIO et al., 2017; FORTIER; LUHESHI; BOKSA, 2007; HAVA et al., 2006; KIRSTEN; PALERMONETO; BERNARDI, 2012; PANG et al., 2016; PATTERSON, 2009; SMITH; NAYLOR, 2014). Além de infecções, o desafio com LPS vem a simular um processo disbiótico intestinal acompanhado de translocação bacteriana (KIECOLT-GLASER et al., 2018). Merece destaque o fato de que pacientes com TEA apresentam importantes alterações intestinais que podem ser causa ou consequência do transtorno (HEIJTZ et al., 2011; SHARON et al., 2019).

No presente estudo, camundongos foram desafiados no PN 5 e 7 (período do neurodesenvolvimento correspondente ao último trimestre de gestação humana) e avaliados no PN 25 (correspondente a 4-5 anos no humano em comparação etológica), portanto as alterações comportamentais e neuroquímicas foram realizadas em animais infantes. A decisão de avaliar animais infantes foi baseada no fato de que nesse período da infância, as alterações comportamentais do TEA se tornam marcadamente evidentes, desta forma estudos pré-clínicos com o objetivo de avaliar as consequências desenvolvimentais de eventos neuroimunes nesse período contribuem para o melhor entendimento sobre a base biológica da doença e das diferenças de sexo subjacentes a ela (SEMPLE et al., 2013).

É importante mencionar que a maioria dos estudos realizados até o presente momento utilizou o desafio imune com LPS no dia gestacional 9.5 ou PN 3 e/ou 5 (KIRSTEN et al., 2019; KIRSTEN; PALERMO-NETO; BERNARDI, 2012; PANG et al., 2016; SMITH; NAYLOR, 2014; TISHKINA et al., 2016). O dia neonatal de exposição ao LPS pode ser bastante relevante no desenvolvimento das alterações previstas no modelo, visto que condizem com momentos neurodesenvolvimentais diferentes. Até o PN 3, ainda há o estabelecimento da barreira hematoencefálica e o desenvolvimento do sistema imune, enquanto que nos PNs 5-10, o sistema imunológico já está consolidando, havendo aumento da densidade axonal e dendrítica e pico da gliogênese (ANDERSEN, 2003; RAMENGGHI; FUMAGALLI; SUPRAMANIAM, 2018; SEMPLE et al., 2013).

O presente trabalho vem em continuidade ao estudo previamente conduzido pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o desafio imune com LPS nos PNs 5 e 7 e avaliando camundongos machos e fêmeas nos PNs 35 e 70, ou seja, respectivamente adolescência e idade adulta (CUSTÓDIO et al., 2017). Nesse contexto, levando em consideração que o autismo se manifesta de forma característica no início da infância, optamos por avaliar os animais mais precocemente, no PN 25, com o objetivo de entender quais alterações comportamentais e neuroquímicas começam a se manifestar nesta fase da vida, e que podem indicar possíveis estados prodrômicos. Merece destaque o fato de que o LPS é um dos fatores de risco relacionado ao desenvolvimento do autismo.

Conforme mencionado anteriormente o TEA apresenta influência do sexo na sua incidência e gravidade dos sintomas, sendo a prevalência do TEA de 4 homens para cada 1 mulher. Com o intuito de avaliar o viés do sexo nas alterações induzidas pelo LPS avaliamos o comportamento de camundongos machos e fêmeas. Nossos resultados no PN25 mostraram que o desafio imune por LPS causou prejuízos de memória de trabalho em ambos os sexos. Interessantemente, no estudo prévio conduzido por Custódio et al., 2017, o desafio com LPS nesse mesmo período desenvolvimental resultou em alterações de memória de trabalho apenas em animais machos no PN35 (CUSTÓDIO et al., 2017). Apesar da maioria dos estudos anteriores não terem avaliado os comportamentos de animais fêmeas, os resultados encontrados nos machos corroboram com estudos realizados em ratos Wistar jovens e adultos que sofreram desafio pré-natal com LPS (DG 9.5) (KIRSTEN et al., 2019; KIRSTEN; PALERMO-NETO; BERNARDI, 2012). Este dado nos mostra que possivelmente este comportamento

alterado desenvolvido pelo desafio com LPS nas fêmeas infantis pode ser reprimido em idades mais avançadas, permanecendo apenas no macho.

Outra alteração importante evidenciada em nossos resultados foi um marcante comportamento tipo-ansioso, somente nos machos, por meio da diminuição do tempo no centro e no aumento no número de groomings no campo aberto. Esse padrão tipo-ansioso dos machos evidenciado no nosso estudo, está de acordo com trabalhos prévios do nosso grupo de estudo em que os animais machos obtiveram o mesmo padrão comportamental no PN 35. Porém, no PN 70, esses sujeitos demonstraram uma normalização tanto do comportamento ansioso quanto no comportamento repetitivo-estereotipado no teste do campo aberto, sugerindo uma atenuação dessas alterações na vida adulta (CUSTÓDIO et al., 2017). Esses resultados corroboram ainda parcialmente estudo anterior em que ratos Wistar machos sofreram desafio neonatal com LPS no PN 3 e 5 e foram avaliados na adolescência (PN 33-36) e idade adulta (PN 101-107), havendo comportamento tipo-ansioso avaliado pelo número de entradas no centro da arena do campo aberto nas duas idades em estudo (TISHKINA et al., 2016). Como podemos observar, alguns comportamentos se mantêm com o avançar da idade, enquanto outros tendem a desaparecer. Este resultado nos mostra a importância de avaliar os padrões comportamentais em diferentes idades.

O TEA é um transtorno heterogêneo, com manifestações variáveis e de diagnóstico exclusivamente clínico. A alta prevalência no sexo masculino pode ocorrer, também, por diferentes alterações comportamentais observadas no sexo feminino, ou seja, uma apresentação atípica da doença neste sexo.

Além do déficit na memória de trabalho, as fêmeas apresentaram uma importante diminuição na capacidade de interação social, enquanto os machos não apresentaram esse prejuízo. No estudo prévio realizado por nosso grupo em animais adolescentes e adultos (PN 35 e 70) não houveram diferenças significativas na performance social dos animais submetidos a este desafio, mostrando que possivelmente em animais desafiados com LPS e neste período desenvolvimental, a doença não se manifesta com grande comprometimento social em idades mais avançadas (CUSTÓDIO et al., 2017). A ausência de comprometimento social importante nos animais adolescentes e adultos, mas não nos infantis, nos mostra que este desafio imune em animais neonatos pode estar relacionado ao desenvolvimento do subtipo leve de TEA. De fato, esta observação é meramente especulativa, devido ao fato da dificuldade em

observar certos comportamentos tipicamente humanos em animais, como iniciar e manter uma conversa.

Os sintomas mais típicos do TEA são déficits sociais, de comunicação e comportamento repetitivo. Mostramos que a exposição neonatal de camundongos ao LPS prejudica a memória de trabalho em ambos os sexos, enquanto causa prejuízos de habilidades sociais (em fêmeas), e induz comportamento tipo-ansioso e repetitivo (em machos). Portanto, com esses resultados, podemos dizer que nosso modelo de desafio imune induz comportamentos relevantes para o TEA em animais infantis, tendo variações fenotípicas dependentes da idade e do sexo.

O BDNF é um membro da família das neurotrofinas e é encontrado no SNC e no sangue periférico. É importante para o desenvolvimento normal do sistema nervoso periférico e central e desempenha um papel fundamental na sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica, orientação axonal, morfologia celular, formação de memória e cognição no cérebro adulto (SIUDA et al., 2017). Estudos clínicos mencionam que o BDNF pode ser um biomarcador importante na diferenciação de autismo típico (fenótipo clinicamente grave) e atípico (fenótipo clinicamente mais leve).

Em relação às concentrações de BDNF, observou-se uma diminuição dos níveis dessa neurotrofina no córtex pré-frontal das fêmeas em relação aos controles. Nossos resultados corroboram com um estudo realizado em camundongos C-57BL, onde avaliaram os efeitos do desafio imune materno no desenvolvimento do cérebro fetal. A inflamação foi induzida por LPS no DG 17, e os animais foram avaliados durante o desenvolvimento pós-natal (PN 1, 7, 14, 21 e 270). Os níveis de BDNF foram significativamente mais baixos no grupo tratado com LPS, em comparação com os controles no PN 21, em todas as áreas analisadas (GOLAN et al., 2005). Outros estudos realizados com desafio imune pré e pós-natal e mencionam o aumento dos níveis cerebrais de BDNF (CUSTÓDIO et al., 2017; KIRSTEN et al., 2019; KIRSTEN; PALERMO-NETO; BERNARDI, 2012).

Níveis diminuídos de BDNF podem indicar comprometimento no mecanismo neuroprotetor, como é visto em outras doenças neuropsiquiátricas, como a depressão e o transtorno bipolar, o que justifica nossos achados, considerando que as concentrações da neurotrofina foram determinadas em animais infantis.

No presente estudo, ativação microglial foi associada a níveis elevados da expressão proteica do marcador IBA-1 no hipocampo das fêmeas desafiadas com LPS. Uma

ativação elevada da microglia é neurotóxica e causa a produção de fatores citotóxicos. Portanto, o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias derivadas da microglia é prejudicial aos neurônios, podendo sobrecarregar as defesas antioxidantes do cérebro, e prejudicar a apoptose de células neuronais. Esses dados corroboram com estudos realizados com ativação imune com LPS em que houve aumento da expressão de IBA1 em machos 48 h após a administração dessa endotoxina (PANG et al., 2016; SMITH; NAYLOR, 2014). Em consonância com os nossos resultados, estudos realizados com a exposição neonatal de LPS demonstraram aumento nos níveis proteicos de IBA-1 em camundongos machos adultos (KATAFUCHI et al., 2012; MELLO, 2017).

Aumento de reações oxidativas e inflamatórias no cérebro têm sido associadas a degeneração de interneurônios GABAérgicos de disparo rápido que apresentam a proteína parvalbumina, portanto chamados neurônios parvalbumina. Estes neurônios estão muito envolvidos na homeostase das funções cerebrais como memória, sendo um achado importante na esquizofrenia e no TEA, incluindo em modelos animais e humanos com estes transtornos (HASHEMI et al., 2017). Na determinação da expressão de parvalbumina, obtivemos níveis reduzidos no hipocampo das fêmeas desafiadas com LPS em relação ao controle. Os neurônios parvalbumina convertem sinal de entrada excitatório em sinal de saída inibitório. Diferentemente do nosso estudo de desafio imune, CUSTÓDIO et al. (2017) encontrou níveis reduzidos dos neurônios de parvalbumina após exposição neonatal ao LPS em animais machos adultos enquanto WISCHHOF e colaboradores (2015) encontraram níveis reduzidos da expressão da parvalbumina no CPF em ratos Wistar machos e fêmeas que sofreram desafio pré-natal com LPS (CUSTÓDIO et al., 2017; WISCHHOF et al., 2015).

No presente estudo, encontramos um aumento da expressão de IBA-1 e redução de parvalbumina no HC das fêmeas desafiadas. Esse resultado reforça os efeitos inflamatórios e oxidativos causados pela exposição neonatal ao LPS. O aumento de IBA-1 nos sugere uma ativação microglial que gera estresse oxidativo e apoptose neuronal, justificando a redução dos níveis de parvalbumina, por, possivelmente, haver a destruição de neurônios parvalbumina.

Não foram vistas alterações significativas no fator de transcrição NF- κ B, embora tenhamos visto uma redução na atividade da enzima MPO. Esta enzima está relacionada a imunidade inata e tem sua atividade associada a processos oxidativos/inflamatórios. Com base neste achado necessitamos de uma avaliação mais profunda do perfil de ativação microglial, desde que o marcador IBA1 mostra um aumento da microglia, mas não o estado de ativação da

mesma, ou seja, se pró- ou anti-inflamatório. Portanto, uma importante limitação do presente trabalho foi a ausência de avaliação do perfil da micróglia destes animais. Pode ser que mecanismos protetores estejam ocorrendo nas fêmeas e que estes sejam responsáveis pela remissão de alguns dos sintomas observados nestes animais infantis e não mais observados em animais adolescentes e adultos.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram a influência do sexo nas alterações comportamentais e neuroquímicas no modelo animal de TEA induzido por desafio imune neonatal com LPS no PN 5 e 7, com fêmeas apresentando prejuízo na preferência social e déficits na memória de trabalho, enquanto os machos apresentando déficits na memória de trabalho associado a comportamento tipo-ansioso e comportamento estereotipado. No caso das fêmeas as alterações comportamentais foram acompanhadas por expressão hipocampal aumentada de IBA1, níveis diminuídos de parvalbumina, e da atividade da MPO, enquanto no CPF ocorreram alterações no BDNF e diminuição na atividade da MPO.

REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782–787, 2000.

AIT-BELGNAOUI, A. et al. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 11, p. 1885–1895, 2012.

AJURIAGUERRA, J. DE. Las Psicosis Infantiles. In: **Manual de Psiquiatria Infantil**. 4. ed. Barcelona: Toray-Masson, 1975. p. 673–731.

ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1–2, p. 3–18, 2003.

ARAÚJO, J. A. M. R.; VERAS, A. B.; VARELLA, A. A. B. Breves Considerações Sobre a Atenção à Pessoa com Transtorno do Espectro Autista na Rede Pública de Saúde. **Revista Psicologia e Saúde**, v. 11, n. 1, p. 98, 2019.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.

ASHWOOD, P.; WILLS, S.; VAN DE WATER, J. The immune response in autism: a new frontier for autism research. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, n. 1, p. 1–15, 2006.

ATLADÓTTIR, H. Ó. et al. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 40, n. 12, p. 1423–1430, 2010.

AVITSUR, R.; YIRMIYA, R. The immunobiology of sexual behavior: Gender differences in the suppression of sexual activity during illness. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 787–796, 1999.

BAILEY, M. T. et al. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced immunomodulation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 397–407, 2011.

BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; TRINDADE, M. O. Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: Uma revisão. **Revista Neurociências**, v. 20, n. 1, p. 117–127, 2012.

BISWAS, S. K.; LOPEZ-COLLAZO, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 10, p. 475–487, 2009.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010.

CABRAL, Á.; LOTUFO NETO, F. Revista brasileira de terapia comportamental e cognitiva. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 16, n. 1, p. 67–82, 2014.

CAROFF, M. et al. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 9, p. 915–926, 2002.

CARRASCOSA-ROMERO, M. C.; DE CABO-DE LA VEGA, C. The Genetic and Epigenetic Basis Involved in the Pathophysiology of ASD: Therapeutic Implications. **Autism - Paradigms, Recent Research and Clinical Applications**, 2017.

CHANGEUX, J. P.; DANCHIN, A. Selective stabilisation of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. **Nature**, v. 264, n. 5588, p. 705–712, 1976.

COHEN, D. et al. Specific genetic disorders and autism: Clinical contribution towards their identification. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 35, n. 1, p. 103–116, 2005.

COOK, E. H. et al. Evidence of linkage between the serotonin transporter and autistic disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 2, n. 3, p. 247–250, 1997.

CRAWLEY, J. N. Genetic causes of autism spectrum disorder Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. p. 293–305, 2012.

CRUZ-MACHADO, S. DA S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFKB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2010.

CUSTÓDIO, C. **Desafio imune neonatal com lipopolissacarídeo desencadeia alterações comportamentais e imunológicas/neurotróficas/duradouras relacionadas ao sexo e a idade em camundongos: relevância para o Transtorno do Espectro Autista (TEA)**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.

CUSTÓDIO, C. S. et al. Neonatal Immune Challenge with Lipopolysaccharide Triggers Long-lasting Sex- and Age-related Behavioral and Immune / Neurotrophic Alterations in Mice : Relevance to Autism Spectrum Disorders. 2017.

DALL'IGNA, O. P. et al. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent β -amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v. 203, n. 1, p. 241–245, 2007.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 247–264, 2009.

ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 469–486, 2015.

FORTIER, M. E.; LUHESHI, G. N.; BOKSA, P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. **Behavioural Brain Research**, v. 181, n. 2, p. 270–277, 2007.

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. Autismo e doenças invasivas do desenvolvimento. **Jornal de Pediatria**. p. 83–94, 2004.

GARAY, P. A.; MCALLISTER, A. K. Novel roles for immune molecules in neural development: Implications for neurodevelopmental disorders. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 2, n. SEP, p. 1–16, 2010.

GOINES, P. E.; ASHWOOD, P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 36, p. 67–81, 2013.

GOLAN, H. M. et al. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 6, p. 903–917, 2005.

GOTTFRIED, C. et al. The impact of neuroimmune alterations in autism spectrum disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, n. SEP, p. 1–16, 2015.

GRIN’KINA, N. M. et al. Sphingosine kinase 1 deficiency exacerbates LPS-induced neuroinflammation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–11, 2012.

HASHEMI, E. et al. The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Medial Prefrontal Cortex in Autism. **Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)**, v. 27, n. 3, p. 1931–1943, 2017.

HAVA, G. et al. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. **Developmental Psychobiology**, v. 48, n. 2, p. 162–168, 2006.

HEIJTZ, R. D. et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 7, p. 3047–3052, 2011.

HUGHES, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 5, p. 497–505, 2004.

INNOCENTI, G. Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connections. **Science**, v. 212, n. May, p. 824–827, 1981.

JONES, J. I. et al. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the $\alpha 5 \beta 1$ integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 22, p. 10553–10557, 1993.

JONES, L. et al. Postnatal Development of Brain Alpha , -Adrenergic Receptors : in Vu-R0 Autoradiography With [$^{125} \text{I}$] Heat in Normal Rats and Rats Treated With Alpha-Difluoromethylornithine , Irreversible Inhibitor of Ornithine. v. 15, n. 4, p. 1195–1202, 1985.

JUNG, A. B.; BENNETT, J. P. Development of striatal dopaminergic function. III: Pre- and postnatal development of striatal and cortical mRNAs for the neurotrophin receptors *trkBTK+* and *trkC* and their regulation by synaptic dopamine. **Developmental Brain Research**, v. 94, n. 2, p. 133–143, 1996.

KAIDANOVICH-BEILIN, O. et al. Assessment of social interaction behaviors. **Journal of Visualized Experiments**, v. 0, n. 48, p. 1–6, 2010.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Pathology**, 1943.

KATAFUCHI, T. et al. Effects of plasmalogens on systemic lipopolysaccharide-induced glial activation and β -amyloid accumulation in adult mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1262, n. 1, p. 85–92, 2012.

KIECOLT-GLASER, J. K. et al. Marital distress, depression, and a leaky gut: Translocation of bacterial endotoxin as a pathway to inflammation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 98, p. 52–60, 2018.

KIRSTEN, T. B. et al. Pioglitazone abolishes cognition impairments as well as BDNF and neurotensin disturbances in a rat model of autism. **Biology Open**, 2019.

KIRSTEN, T. B.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. 11. A rat model of autism induced by a single early prenatal exposure to LPS. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, p. S4, 2012.

KUSUMOTO, S.; FUKASE, K. Synthesis of endotoxic principle of bacterial lipopolysaccharide and its recognition by the innate immune systems of hosts. **Chemical Record**, v. 6, n. 6, p. 333–343, 2006.

LANDMESSER, L. T. The Generation of Neuromuscular Specificity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 3, n. 1, p. 279–302, 1980.

LIGHTMAN, S. L.; INSEL, T. R.; INGRAM, C. D. New genomic avenues in behavioural neuroendocrinology. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 369–372, 2002.

LORTON, D. et al. Bidirectional communication between the brain and the immune system: Implications for physiological sleep and disorders with disrupted sleep. **NeuroImmunoModulation**, v. 13, n. 5–6, p. 357–374, 2007.

MARCUS JACOBSON. **Developmental Neurobiology**. New York: Plenum Press, 1991.

MASI, A. et al. An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 183–193, 2017.

MASLANIK, T. et al. Commensal Bacteria and MAMPs Are Necessary for Stress-Induced Increases in IL-1 β and IL-18 but Not IL-6, IL-10 or MCP-1. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–10, 2012.

MCAFOOSE, J.; BAUNE, B. T. Evidence for a cytokine model of cognitive function. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 3, p. 355–366, 2009.

MCEWEN, B. S.; GETZ, L. Lifetime experiences, the brain and personalized medicine: An integrative perspective. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 62, n. SUPPL.1, p. S20–S26, 2013.

MELLO, B. **Exposição sistêmica de camundongos adultos a lipopolissacarídeo de Escherichia coli: influência do sexo nas alterações comportamentais e neuroquímicas e efeito do tratamento com escitalopram e doxiciclina.** [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2017.

MEYER, U.; YEE, B. K.; FELDON, J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: The earlier the worse? **Neuroscientist**, v. 13, n. 3, p. 241–256, 2007.

MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: Unique roles for MD-2. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 1, p. 119–128, 2003.

MONTE, A. S. **Estudo da influência do sexo e do efeito preventivo da n-acetilcisteína em ratos submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por desafio imune neonatal combinado a estresse na adolescência.** Universidade Federal do Ceará, 2017.[s.l: s.n.].

NORO, G.; GON, M. C. C. Epigenética, cuidados maternos e vulnerabilidade ao estresse: Conceitos básicos e aplicabilidade. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 28, n. 4, p. 829–839, 2015.

OSHODI, Y. O. et al. Autism spectrum disorder in a community-based sample with neurodevelopmental problems in Lagos, Nigeria. **Journal of Public Health in Africa**, v. 7, n. 2, 2017.

OZONOFF, S. et al. A Prospective Study of the Emergence of Early Behavioral Signs of Autism. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 3, p. 256–266.e2, 2010.

PANG, Y. et al. Early postnatal lipopolysaccharide exposure leads to enhanced neurogenesis and impaired communicative functions in rats. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–18, 2016.

PARDO, C. A.; VARGAS, D. L.; ZIMMERMAN, A. W. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. **International Review of Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 485–495, 2005.

PATTERSON, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: Etiology, pathology and animal models. **Behavioural Brain Research**, v. 204, n. 2, p. 313–321, 2009.

PESSAH, I. N. et al. Immunologic and neurodevelopmental susceptibilities of autism. **NeuroToxicology**, v. 29, n. 3, p. 532–545, 2008.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998.

PURVES, D.; LICHTMAN, J. W. Elimination of synapses in the developing nervous system. **Science**, v. 210, n. 4466, p. 153–157, 1980.

RAMENGGHI, L. A.; FUMAGALLI, M.; SUPRAMANIAM, V. Brain Development and Perinatal Vulnerability to Cerebral Damage. In: **Neonatology**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 1999–2017.

RICCERI, L.; MICHETTI, C.; SCATTONI, M. L. **Mouse Behavior and Models for Autism Spectrum Disorders**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

RUTTER, M. L. Progress in understanding autism: 2007-2010. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 41, n. 4, p. 395–404, 2011.

RUTTER, M.; SCHOPLER, E. Classification of pervasive developmental disorders: Some concepts and practical considerations. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 22, n. 4, p. 459–482, 1992.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005.

SCHWARZ, J. M.; BILBO, S. D. Hormones and Behavior Sex , glia , and development : Interactions in health and disease. **Hormones and Behavior**, v. 62, n. 3, p. 243–253, 2012.

SEMPLE, B. D. et al. Progress in Neurobiology Brain development in rodents and humans : Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, 2013.

SHARON, G. et al. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. **Cell**, v. 177, n. 6, p. 1600–1618.e17, 2019.

SIKLOS, S.; KERNS, K. A. Assessing the diagnostic experiences of a small sample of parents of children with autism spectrum disorders. **Research in Developmental Disabilities**, v. 28, n. 1, p. 9–22, 2007.

SIUDA, J. et al. Cognitive impairment and BDNF serum levels. **Neurologia i Neurochirurgia Polska**, v. 51, n. 1, p. 24–32, 2017.

SMITH, P. L. P.; NAYLOR, S. Activates Microglia and Inhibits Neurogenesis in the Developing Murine Hippocampus. p. 119–131, 2014.

SMITH, S. E. P. et al. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 40, p. 10695–10702, 2007.

STAMOU, M. et al. Neuronal connectivity as a convergent target of gene × environment interactions that confer risk for Autism Spectrum Disorders. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 36, p. 3–16, 2013.

STEVEN E HYMAN. How Poverty Gets Under the Skin. v. 12, n. 3, p. 241–244, 2009.

TIMMUSK, T. et al. Brain-derived, Developmental Regulation O F From, Transcribed Promoters, Different The, I N Brain, R A T. **Neuroscience**, v. 60, n. 2, p. 287–291, 1994.

TISHKINA, A. et al. Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. **Behavioural Brain Research**, 2016.

TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 2, 2006.

VARGAS, D. L. et al. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 1, p. 67–81, 2005.

WAGNER, G. C. et al. A new neurobehavioral model of autism in mice: Pre- and postnatal exposure to sodium valproate. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 36, n. 6, p. 779–793, 2006.

WHITBOURNE, S. K.; HALGIN, R. P. **Psicopatologia: Perspectivas clínicas dos transtornos psicológicos**. 7. ed. New York: Artmed, 2015.

WISCHHOF, L. et al. Prenatal LPS-exposure - a neurodevelopmental rat model of schizophrenia - differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 57, p. 17–30, 2015.

Y. HSIAO, E. Immune Involvement in Autism Spectrum Disorder as a Basis for Animal Models. **Autism- Open Access**, v. 01, n. S1, 2012.

ZANON, R. B.; BACKES, B.; BOSA, C. A. Identificação dos primeiros sintomas do autismo pelos pais. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 30, n. 1, p. 25–33, 2014.