



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
EVANDRO DA CRUZ CITTADIN SOARES

**A ATIVAÇÃO IMUNOLÓGICA MATERNA NA GÊNESE DO COMPORTAMENTO
AUTISTA: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS**

Tubarão
2014

EVANDRO DA CRUZ CITTADIN SOARES

**A ATIVAÇÃO IMUNOLÓGICA MATERNA NA GÊNESE DO COMPORTAMENTO
AUTISTA: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Ciências da Saúde, da
Universidade do Sul de Santa Catarina,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Jucélia Jeremias Fortunato
Coorientadora: Prof^a Dr^a. Fabrícia Cardoso Petronilho

Tubarão
2014



UNISUL
UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO



Título da Dissertação

“A ativação imunológica materna na gênese do comportamento autista: aspectos comportamentais e neuroquímicos”.

EVANDRO DA CRUZ CITTADIN SOARES
AUTOR

Aprovado pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 24 de novembro de 2014.

Doutora Jucélia Jeremias Fortunato (orientador)

Doutora Gabriela Kozuchovski Ferreira (avaliador externo - UNESCO)

Doutora Fabiana Schuelter Trevisol (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson Traebert

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

Dedico este trabalho ao próximo independente de quem seja, do que faça, de onde more, do que use, do que sinta, ou mesmo, do que pense.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Grande Criador pela oportunidade de experimentar esta existência.

A Prof^a. Dra. Jucélia Jeremias Fortunato, pela orientação durante todo o mestrado, pelo amparo no decorrer de toda a caminhada desde a iniciação científica, pela orientação no TCC (graduação), pela indicação profissional para o cargo de professor, pelo carinho, pela amizade, enfim, pela parceria das boas, das que faria um bem danado se durasse por toda a vida (e espero que dure).

Ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior – FUMDES (Santa Catarina) pelo apoio financeiro.

A Prof^a. Dra. Fabrícia Cardoso Petronilho pela coorientação e aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNISUL, pelos ensinamentos, dedicação e auxílio.

Aos professores que atuaram como membros das bancas em que o projeto de pesquisa foi apresentado e qualificado, pelas boas arguições.

As colaboradoras da UNISUL, responsáveis pela secretaria do PPG-CS Silvane e Francieli, pelo profissionalismo, comprometimento e carinho.

Aos meus colegas de trabalho e parceiros de experimentos por toda a colaboração e dedicação, em especial a Ana Olivia Martins e Drielly Florentino.

Aos meus grandes amigos pela sincera e verdadeira amizade (Mauro Matos, Eduardo Saturno, André de Souza, Leandro de Andrade e Marcelo Matias) e a outros amigos que não foram citados mas que guardo com grande afeto.

Ao meu sogro Dilton, minha sogra Sandra, minha pequena cunhada Lara e minha querida vó Nininha (*in memorian*), por me permitirem descobrir que o amor familiar ultrapassa as barreiras relacionadas a semelhança gênica.

Aos meus avós paternos, Armando e Maria de Lourdes e materno Lucy (*in memorian*) pela contribuição genética, educativa e afetiva que muito me orgulha.

Aos meus pais Robinson e Elizabete e meus irmãos Robinson Leandro e Raniery, pela vida, pelo amor e por toda nossa trajetória em família.

A todas as pessoas não mencionadas, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

E por fim, mas em extremo e absoluto grau de importância, a minha amada esposa Layla, por partilhar comigo os grandes momentos de nossas vidas.

“Depois de algum tempo, você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma... Aprende que não importa o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher... Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo [...]. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário, enfrentando as consequências [...]. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!” (William Shakespeare)

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno neuropsiquiátrico desenvolvido na infância precoce caracterizado pelo prejuízo severo e invasivo de domínios nas áreas do desenvolvimento pertinentes à interação social, comunicação, comportamento e interesse. Possui uma prevalência global estimada de 0,62% e seu diagnóstico permanece baseado exclusivamente na observação clínica, não havendo até o momento nenhum exame complementar disponível para apoiá-lo. Nos últimos anos, interferências ambientais têm sido apontadas como possíveis causas para o desenvolvimento do TEA, uma vez que evidências clínicas demonstraram correlação entre o transtorno e a ocorrência de infecções maternas ou doenças autoimunes no período perinatal. Modelos animais de autismo utilizando infecções pré-natais apontam para a importância da ativação imunológica no encéfalo em desenvolvimento. Ratos expostos ao lipopolissacarídeo (LPS) em período pré-natal apresentaram redução no comportamento de brincar e a diminuição da interação social quando jovens e adultos. O objetivo deste estudo foi investigar a resposta inflamatória na prole de ratos submetidos ao modelo animal de autismo induzido por LPS no período pré-natal, em que fêmeas prenhes receberam LPS por via intraperitoneal na dose de 100 µg/kg aos 9,5 dias gestacionais. Os resultados mostraram que a exposição pré-natal ao LPS foi capaz induzir o comportamento autista na prole, alterar a permeabilidade da barreira encefálica, elevar os níveis de citocinas em estruturas encefálicas, além de aumentar os níveis de malondialdeído e diminuir as defesas antioxidantes. O conjunto desses resultados sugere que há um insulto pré-natal é capaz de interferir no desenvolvimento e na atividade do sistema nervoso dos filhotes em longo prazo, produzindo alterações comportamentais e neuroquímicas semelhantes àquelas encontradas no TEA.

Palavras-chave: Autismo, Ativação imune materna, Neuroinflamação, Barreira hematoencefálica.

ABSTRACT

The Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a neuropsychiatric disorder developed in early childhood, characterized by severe and pervasive impairment in the domains of development areas relevant to social interaction, communication, behavior and interests. It has an estimated global prevalence of 0.62% and its diagnosis remains exclusively based on clinical observation, without yet no supplementary exam available to support it. In recent years, environmental interferences have been identified as possible causes for the development of ASD since clinical evidence demonstrating a correlation between the disorder and the incidence of maternal infections or autoimmune diseases in the perinatal period. Animal models of autism using prenatal infections point to the importance of immune activation in the developing brain. Rats exposed to lipopolysaccharide (LPS) in the prenatal period have reduced play behavior and decreased social interaction when youth and adults. The aim of this study was to investigate the inflammatory response in the offspring of rats submitted to an animal model of autism induced by LPS in the prenatal period, where pregnant females were given LPS intraperitoneally at a dose of 100 mg / kg to 9.5 days of gestation. The results showed that prenatal exposure to LPS was able to induce autistic behavior in offspring, altering the permeability of brain barrier, elevate the levels of cytokines in brain structure, and increase the levels of malondialdehyde and decrease antioxidant defenses. Taken together, these results suggest that prenatal insult is able to interfere in the development and activity of the nervous system of the pups in the long term, producing behavioral and neurochemical changes similar to those found in ASD.

Keywords: Autism, Maternal immune activation, Neuroinflammation, Blood-brain barrier.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Cascata de efeitos originários de insultos no desenvolvimento neurológico que podem ocorrer em diferentes pontos do desenvolvimento.....	16
FIGURA 2. Resposta imunológica como uma hipótese etiológica para o TEA	17
FIGURA 3. Número (Figura 3A) e tempo (Figura 3B) de episódios de movimentos estereotipados (<i>grooming</i>) realizados pelo GA e GnA.	32
FIGURA 4. Duração (tempo) do comportamento social apresentados pelo GA e GnA.	33
FIGURA 5. Análise da permeabilidade da BHE através do extravasamento de Azul de Evans em animais neonatos (Figura 5A) e jovens (Figura 5B) do GA e GnA.	34
FIGURA 6. Dosagem de IL-1 β no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 6A) e jovens (Figura 6B) do GA e GnA.....	35
FIGURA 7. Dosagem de IL-6 no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 7A) e jovens (Figura 7B) do GA e GnA.....	36
FIGURA 8. Dosagem de TNF- α no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 8A) e jovens (Figura 8B) do GA e GnA.....	37
FIGURA 9. Medida de substâncias reativas ao TBARS no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 9A) e jovens (Figura 9B) do GA e GnA	38
FIGURA 10. Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 10A) e jovens (Figura 10B) do GA e GnA	38
FIGURA 11. Atividade da CAT no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 11A) e jovens (Figura 11B) do GA e GnA.....	39
FIGURA 12. Atividade da SOD no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 13A) e jovens (Figura 13B) do GA e GnA.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE – barreira hematoencefálica
CAT – catalase
COX-2 – ciclo-oxigenase-2
EDTA – ácido dissódico etilenodiaminotetracético
ERO – espécies reativas de oxigênio
GD – dia de gestação
GHS – glutatona reduzida
GHx – glutatona peroxidase
GSSG – glutatona desidrogenase
IL-1 β – interleucina 1 β
IL-6 – interleucina 6
iNOS – óxido nítrico sintetase induzível
ip – intraperitoneal
LPS – lipopolissacarídeo
MCP-1 – proteína quimiotrativa de monócitos
MDA – malondialdeído
MPO – mieloperoxidase
NaCl – cloreto de sódio
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PGE2 – síntese de prostaglandinas E2
PND – dia de vida pós-natal
ROS – espécies reativas ao oxigênio
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
TBA – ácido tiobarbitúrico
TEA – Transtorno do Espectro Autista
TID – transtornos invasivos do desenvolvimento
TNF α – fator de necrose tumoral α
3-CT – 3-clorotirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	12
1.2 HIPÓTESES ETIOLÓGICAS DO TEA	15
1.3 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	18
1.4 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)	20
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO.....	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MÉTODOS	25
3.1 TIPO DE ESTUDO	25
3.2 ANIMAIS.....	25
3.3 ACASALAMENTO	25
3.4 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE AUTISMO	25
3.5 PADRONIZAÇÃO DA NINHADA.....	26
3.6 PROTOCOLO PARA ANÁLISES DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	27
3.6.1 Permeabilidade da barreira hematoencefálica	27
3.7 PROTOCOLO PARA ANÁLISES NEUROQUÍMICAS.....	27
3.7.1 Isolamento de microvasos cerebrais	28
3.7.2 Dosagem de citocinas	28
3.7.3 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	28
3.7.4 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil	29
3.7.5 Atividade da Catalase (CAT)	30
3.7.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	30
3.7.7 Determinação de proteínas totais	30
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
3.9 ASPECTOS ÉTICOS.....	31
4. RESULTADOS	32
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS	32
4.1.1 Teste de estereotipia	32
4.1.2 Teste de interação social	33
4.2 PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA	33
4.3. ANÁLISES NEUROQUÍMICAS	34

4.3.1. Dosagem de IL-1β	34
4.3.2 Dosagem de IL-6	35
4.3.3 Dosagem de TNF-α	36
4.3.4 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	37
4.3.5 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil	38
4.3.6 Atividade da Catalase (CAT)	39
4.3.7 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	39
5. DISCUSSAO	41
6. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno neuropsiquiátrico desenvolvido na infância precoce caracterizado pelo prejuízo severo e invasivo de domínios nas áreas do desenvolvimento pertinentes à interação social, comunicação, comportamento e interesse, sendo relacionado ao atraso ou total ausência da comunicação verbal¹. Um estudo de revisão envolveu 61 trabalhos realizados em 18 países e publicados entre 1966 e 2009 descreve uma prevalência global de 0,7%, ou 1 criança em 143², outro estudo (2012) estima uma prevalência global de 0,62%³.

Até o momento, o diagnóstico do TEA permanece baseado unicamente na observação clínica, pois não há nenhum exame complementar disponível para apoiar este diagnóstico. Nos últimos anos⁴, grandes progressos ocorreram na identificação de regiões cromossômicas em articulação com o TEA e ainda assim, não houve a apresentação de genes como fator de grande importância, apontando um papel secundário para a herdabilidade genética e destacando os fatores ambientais como o principal fator possível para o seu desenvolvimento⁴, visto que evidências clínicas têm demonstrado uma alta associação entre o TEA e a ocorrência de infecções maternas ou doenças autoimune no período perinatal⁵.

Neste sentido, o estudo de mediadores e mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TEA em modelos pré-clínicos de autismo podem auxiliar no esclarecimento de questões ligadas a fisiopatologia e possivelmente a etiologia do transtorno.

1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O TEA é uma desordem neuropsiquiátrica desenvolvida na infância precoce, sendo caracterizada pelo prejuízo persistente na comunicação social recíproca e na interação social e padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesse ou atividades⁶. Estes sintomas, muitas vezes, prejudicam o funcionamento diário, ocasionando perdas marcantes no uso de múltiplos comportamentos não-verbais, como contato visual direto, expressão facial ou posturas e gestos corporais⁷.

O termo “autismo” foi utilizado pela primeira vez pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler no ano de 1911, para denominar os pacientes que apresentavam perda ou fuga da realidade, prejudicando desta forma sua comunicação⁸. A síndrome do

autismo foi conceituada pela primeira vez por Leo Kanner, em 1943, a partir da observação de um grupo de onze crianças que apresentavam características como movimentos repetitivos e estereotipados⁹. Em 1944, Hans Asperger descreveu um grupo de crianças com alterações na interação social similares aos do autismo¹⁰.

Anos depois surgiram muitas dúvidas em relação a natureza do transtorno e o pensamento mais comum era o de que a causa para o autismo seria a falta de afeto ou carinho dos pais em relação aos seus¹¹. No início da década de 1960, a partir de algumas evidências, sugeriu a hipótese de que o autismo deveria tratar-se de um transtorno cerebral desenvolvido desde a infância presente no âmbito global¹².

Em 1978 surgiu a proposta de definição do autismo a partir de quatro critérios sendo eles: 1) atraso e desvio social; 2) problemas na comunicação; 3) comportamentos incomuns; 4) aparecimento dos sinais até o trigésimo mês de vida¹³. Em 1980, o autismo foi reconhecido e definido pela primeira vez no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais III (DSM-III), em uma nova classe de transtornos, os Transtornos Invasivos do Desenvolvimento (TDIs)¹².

A quarta edição do DSM¹⁴ utilizou um sistema multi-categórico do diagnóstico de TID, que incluía o Transtorno Autista, Transtorno de Asperger, o Transtorno Invasivo do Desenvolvimento sem outra Especificação, Transtorno Desintegrativo da Infância e Transtorno de Rett¹⁵. A quinta edição do DSM (edição atual) substituiu o sistema multi-categórico com uma única dimensão do diagnóstico: O Transtorno do Espectro Autista – TEA¹⁶, definido por critérios de diagnóstico que incluem prejuízos na comunicação social recíproca, na interação social e padrões restritos e repetitivos de comportamento e interesses ou atividades¹⁷.

As estimativas da prevalência do TEA variam de acordo com alguns fatores, como critérios para o diagnóstico e o tipo de população avaliada¹⁸, contudo, há um aumento dramático no número de diagnósticos registrado nas últimas décadas relatado no mundo inteiro¹⁹.

Alguma preocupação sobre o aparente aumento na frequência de diagnóstico de autismo avaliado na década de 1990 levou pesquisadores a cogitar a possibilidade da "Epidemia de Autismo"²⁰. Um dos fatores associados a este aumento pode estar relacionado à maior sensibilização da população para o transtorno, desencadeando maior frequência de encaminhamentos de crianças com comportamento anormal, além de critérios mais amplos de diagnóstico e averiguação mais completa de casos em estudos epidemiológicos¹⁹⁻²¹.

O diagnóstico do TEA permanece baseado unicamente na observação clínica, pois nenhum exame laboratorial (genético, neuroimagem, bioquímico) está atualmente disponível para apoiá-lo, uma vez que tais testes poderiam contribuir para diagnosticar conhecidas condições clínicas resultantes no transtorno²². No ano de 2007, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu um grupo para trabalhar com o TEA no âmbito do Sistema Único de Saúde. Um dos pontos discutidos pelo grupo de trabalho foi à necessidade de produzir conhecimento baseado em evidências para servir como base para o desenvolvimento de propostas em relação ao cuidado com o TEA²³.

A etiologia do TEA ainda não está definida, no entanto, a interação entre fatores genéticos e ambientais é apontada como condição merecedora de atenção^{24,25}. Há uma indicação de tratar-se de um distúrbio neurobiológico devido à presença de quadros de epilepsia em cerca de um terço das crianças autistas, além disso, evidências científicas mostram cada vez mais alterações morfofisiológicas, genéticas e neurológicas ligadas a este transtorno²⁶.

Um estudo revelou o envolvimento de regiões encefálicas na gênese do TEA, incluindo o sistema límbico e o cerebelo²⁷. Outro estudo, utilizando neuroimagem, sugeriu um padrão anormal do desenvolvimento encefálico no TEA, com um crescimento acelerado durante os primeiros anos de vida, seguido pela desaceleração em algumas regiões encefálicas, enquanto em outras áreas pode ocorrer parada no crescimento⁸.

Como os principais domínios afetados por este transtorno incluem o processo de interação social, de pensamento associativo e de reações emocionais apropriadas, os pesquisadores se mantêm focados nas regiões encefálicas associadas com estas funções, sendo elas, o córtex pré-frontal, o córtex temporal, o córtex cingulado anterior, o giro fusiforme, a amígdala e o cerebelo²⁶.

Nos últimos anos, grandes progressos ocorreram na identificação de regiões cromossômicas em articulação com o transtorno e ainda assim, nenhum gene foi apresentado como fator de grande importância, apontando um papel secundário para a herdabilidade e destacando os fatores ambientais como o possível principal fator para o desenvolvimento do TEA⁴, visto que evidências clínicas têm mostrado uma alta associação entre o desenvolvimento do TEA e a ocorrência de infecções maternas ou doenças autoimune, no período perinatal⁵.

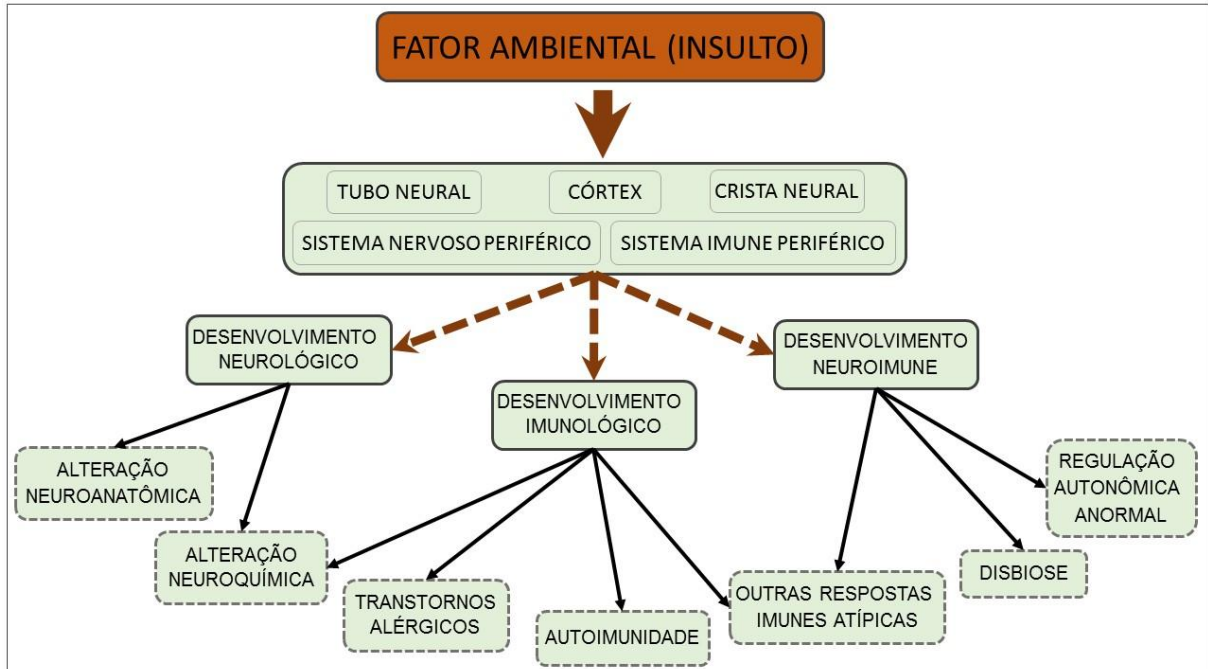
1.2 HIPÓTESES ETIOLÓGICAS DO TEA

Diversas linhas de pesquisa têm demonstrado que os fatores genéticos e ambientais podem influenciar no desenvolvimento de alterações no circuito neural podendo desencadear o TEA. Pesquisas têm focado nas conexões entre o sistema imune e nervoso, tendo encontrado alterações imunológicas periféricas além da ativação da neuroglia e do sistema imunológico no tecido encefálico e no líquido cefalorraquidiano de pacientes diagnosticados com TEA. Os autores também relatam a presença de anticorpos agindo diretamente em estruturas do SNC como o córtex frontal e células endoteliais cerebrais²⁸.

No âmbito do desenvolvimento neurológico, imunológico e neuroimune existe uma vulnerabilidade associada a alterações decorrentes de fatores ambientais. Tais alterações podem ser variáveis dependendo de alguns fatores como: a natureza do insulto, a época e sua duração. Estes insultos podem ocorrer em qualquer ponto do neurodesenvolvimento. Alterações no desenvolvimento da crista neural e do tubo neural no embrião ocasionariam resultados estruturais e funcionais em todos os elementos neurais do sistema nervoso periférico, incluindo o sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático), sistema sensorial periférico e entérico (intestino). Efeitos do tubo neural também poderiam produzir alterações nas funções autonômicas centrais e/ou sistemas de controle fisiológico residente no hipotálamo e tronco encefálico em núcleos autônomo⁵.

Fatores que afetam o desenvolvimento cortical teriam um impacto sobre as funções corticais superiores, incluindo a função psicossocial, processamento sensorial e funcionamento motor. Qualquer uma destas alterações no desenvolvimento neurológico poderia ocasionar efeitos em cascata através de vias sensoriais e neuroimune desencadando transtornos neurológicos, imunológicos e neuroimunes²⁹ (Figura 1).

Figura 1 - Cascata de efeitos originários de insultos no desenvolvimento neurológico que podem ocorrer em diferentes pontos do desenvolvimento (adaptado de GOYAL; MIYAN, 2014).

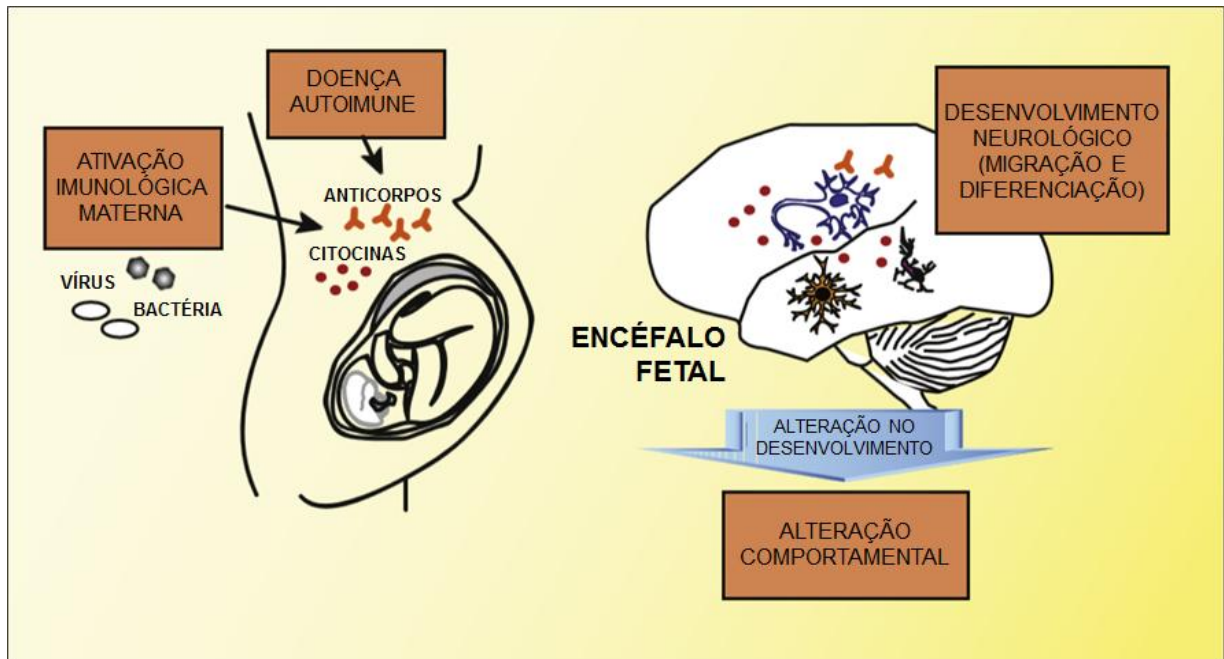


Infecções maternas durante o período pré-natal têm sido consideradas como potenciais indutores de alterações estruturais e funcionais no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) em longo prazo⁵. Estudos pré-clínicos têm destacado, o uso de um análogo sintético de RNA para mimetizar uma infecção viral^{30,31} ou a administração de lipopolissacárido (LPS) para mimetizar uma infecção bacteriana³², propondo que tais estímulos poderiam acarretar em alterações placentárias e atingir o sistema nervoso fetal, alterando os níveis de citocinas como as interleucinas 1 β (IL-1 β), interleucinas 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), tanto no período pré-natal quanto no neonatal, podendo desencadear profundos efeitos comportamentais sobre a prole³¹.

A hipótese apresentada na Figura 2 demonstra um aumento nos níveis de citocinas e/ou anticorpos na circulação materna proveniente da ativação imune materna ou doenças auto-imunes. Estas proteínas poderiam entrar diretamente no parênquima encefálico fetal ou provocar uma cascata de eventos na placenta, no sangue fetal e no tecido encefálico fetal que leva à secreção de citocinas pelos astrócitos e microglia fetal. As citocinas poderiam afetar o desenvolvimento neuronal,

atuando em processos de migração e diferenciação resultando em alterações comportamentais posteriormente⁵.

Figura 2 – Resposta imunológica como uma hipótese etiológica para o TEA (adaptado de DEPINO, 2012).



Citocinas são, na sua maioria, pequenas proteínas que foram originalmente caracterizadas apenas como moduladores imunes, mas que subsequentemente, foram incluídas na mediação de um conjunto diversificado de funções não imunes em diversos tecidos, incluindo o SNC. Representam proteínas de extrema importância para o desenvolvimento neurológico possuindo papel central na gliogênese e atuando nos fatores neurotróficos que promovem a sobrevivência das células que formam as conexões apropriadas bem como sua atuação como sinalizadores para provocar a apoptose de células não apropriadas³³.

Embora a ação das citocinas ocorra principalmente de forma local, seus efeitos podem ser distribuídos em via sistêmica, desta forma, a participação destas proteínas em resposta a uma infecção ou lesão materno-fetal pode afetar adversamente o desenvolvimento neurológico do feto. Evidências de estudo apontam para as infecções maternas como possíveis causas de anormalidades no desenvolvimento neurológico aumentando o risco para o desenvolvimento de transtornos como esquizofrenia e paralisia cerebral na prole³⁴.

Um grupo de pacientes autistas apresentou aumento dos níveis de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no soro e líquido cerebrospinal, reforçando a associação entre as citocinas e o autismo³⁵. Em outro estudo, foram encontrados níveis elevados de citocinas tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias em regiões encefálicas de pacientes autistas, especialmente as citocinas pró-inflamatórias envolvidas na ativação microglial²⁸.

Modelos animais de autismo utilizando infecções pré-natais apontam para a importância da ativação imunológica materna no sistema nervoso fetal³⁶. Os modelos animais de infecções pré-natais propõem mimetizar infecções durante a gestação, dentre as substâncias mais utilizadas estão o LPS, vírus Influenza e ácido poliinosinico-policitidílico (PolyI:C), administrados pelas vias intraperitoneal, intravenosa, subcutânea ou intranasal em ratos. O número de administrações durante a gestação, o período gestacional e a dose desses agentes infecciosos devem sempre ser levados em consideração, pois podem resultar em alterações bastante heterogêneas entre os animais³⁷.

Angelidou (2012)³⁸, propôs que a ativação imunológica por agentes infecciosos no período perinatal poderia ser um gatilho para o comprometimento do desenvolvimento neurológico alterando a permeabilidade da barreira hematoencefálica e contribuindo para a inflamação no sistema nervoso, o que poderia desencadear o desenvolvimento do TEA. Desta forma, uma das características deste transtorno, identificada pela diminuição da interação social, tornou-se o foco de estudo em muitos laboratórios de pesquisa pré-clínica.

O exato mecanismo de ação da ativação imunológica pré-natal que resultaria em alterações em longo prazo no SNC relacionadas ao TEA ainda é impreciso, porém diversas evidências de mediadores imunes como citocinas circulantes, elevação dos níveis de citocinas na placenta e estresse oxidativo no tecido encefálico fetal poderia ajudar a entender tal fenômeno³⁷.

1.3 BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A barreira hematoencefálica (BHE) constitui a barreira morfofuncional entre o SNC e a periferia, tratando-se de uma estrutura dinâmica com capacidade de modulação rápida que permite manter a homeostasia no SNC³⁹. Sob condições

normais, a BHE assegura o fornecimento de nutrientes ao SNC e permite que as células inflamatórias respondam a alterações no ambiente local³⁹.

O desenvolvimento da BHE pode ser classificado em duas etapas⁴¹:

1) Angiogênese encefálica (mecanismo através do qual se formam novos vasos a partir de vasos pré-existentes) – nesta etapa as células endoteliais encefálicas com origem em vasos permeáveis invadem a neuroectoderme e formam vasos intraneurais, sendo ainda muito primitivos e fenestrados, caracterizando-se por elevado diâmetro e forma irregular;

2) Diferenciação da BHE – ocorre durante o período embrionário tardio e pós-natal inicial, onde os capilares encefálicos quando em contato com o tecido neuronal (principalmente com os astrócitos) diferenciam-se, amadurecem gradualmente e expressam as características intrínsecas da BHE.

A BHE é responsável pelo controle estrito das trocas existentes entre os compartimentos encefálico e vascular, assegurando a homeostasia do microambiente encefálico. Esta ação só é possível impedindo a difusão paracelular de solutos hidrofílicos; mediando o transporte ativo de nutrientes para o encéfalo; permitindo o efluxo de moléculas hidrofóbicas e fármacos do encéfalo para o sangue; e regulando a migração transendotelial das células sanguíneas circulantes⁴².

Pelo uso de modelos *in vitro* constatou-se que a capacidade de os linfócitos se ligarem à parede vascular encefálica é muito inferior à observada na vasculatura não especializada, fato que pode ser explicado pela diminuição da expressão de moléculas de adesão no endotélio encefálico e atribuí à BHE o papel de barreira funcional⁴³. Apesar disto, em doenças neurológicas inflamatórias, como na esclerose múltipla, vários linfócitos, monócitos e neutrófilos atravessam rapidamente a BHE e têm acesso ao SNC⁴⁴.

A alteração na integridade da BHE e migração de leucócitos para dentro do SNC são eventos iniciais na patogenia das doenças inflamatórias do SNC. A adesão e a migração de linfócitos através da parede do endotélio aos locais de inflamação são eventos complexos que dependem da produção de citocinas inflamatórias, favorecendo a interação dos leucócitos via moléculas de adesão ICAM-1 (molécula de adesão intercelular), VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular) e selectinas presentes nas células endoteliais e os seus respectivos ligantes LFA-1 e VLA-4 expressos nos leucócitos⁴⁵. Além disso, as metaloproteinases (MMP) gelatinases A e B, também conhecidas como MMP-2 e MMP-9, cuja produção é influenciada por

diferentes tipos celulares (macrófagos, linfócitos, fibroblastos) e citocinas favorecem a migração de células inflamatórias pela BHE⁴⁰.

1.4 LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

O LPS é um componente tóxico estrutural, que constitui parte da membrana de bactérias gram-negativas sendo fundamental para sua integridade morfofuncional⁴⁶. Trata-se de um componente biologicamente ativo, com mecanismo de ação diretamente relacionado aos sintomas de algumas doenças⁴⁷. Por procedimentos de extração fenólica a partir da membrana dessas bactérias, o LPS pode ser utilizado para provocar os efeitos de infecção (mimetizar) para que seja possível avaliar suas consequências sintomatológicas bem como seu mecanismo de ação em experimentos. A extração do LPS é feita de diferentes bactérias gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp* dentre outras⁴⁹. Os modelos experimentais são muito utilizados para análise de alterações sistêmicas, compreensão dos mecanismos de ação, fisiopatologia e farmacocinética dos processos inflamatórios e infecciosos e fornecem ferramentas para testar as hipóteses clínicas. Comercialmente a principal fonte de LPS para estudo é a extraída da bactéria *Escherichia coli*⁴⁹.

O LPS é um forte indutor do sistema imune inato⁴⁶ e ao entrar em contato com o organismo animal, seja a partir de uma bactéria gram-negativa, ou pela administração direta do LPS extraído da membrana celular, provoca uma cascata de reações no organismo infectado, podendo atuar em diferentes células como: monócitos, neutrófilos, plaquetas sanguíneas, células endoteliais, e principalmente em macrófagos⁵⁰. A ação do LPS se inicia com a ligação com uma glicoproteína do hospedeiro gerando uma reação em cascata que segue até o núcleo do macrófago e estimula a expressão de genes responsáveis pela síntese das citocinas pró-inflamatórias: fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) dentre outras⁵¹. Devido à liberação destas citocinas, a administração sistêmica de LPS é um método amplamente utilizado para induzir a ativação da resposta imune com a participação dos macrófagos⁵².

A partir da verificação da presença de citocinas pró-inflamatórias no SNC em organismos cuja administração de LPS foi realizada periféricamente levantou-se a hipótese de que o LPS poderia atuar no SNC e posteriormente verificou-se que as

citocinas são mediadores essenciais entre o sistema imune e SNC⁵³, sendo potencialmente responsáveis pelas alterações comportamentais encontradas em animais, como a diminuição da exploração ambiental e social, diminuição da atividade motora, diminuição da memória, diminuição do comportamento sexual dentre outras alterações características do processo inflamatório⁵⁴.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo pode ser definido como uma perturbação do equilíbrio entre o nível de oxidantes e antioxidantes no organismo vivo. As células são expostas aos oxidantes provenientes de uma grande variedade de fontes exógenas e endógenas, incluindo gases naturais nocivos como o ozônio, altas concentrações de oxigênio, efeitos de radiações, produtos químicos, bactérias patogênicas, vírus, entre outros. Fontes endógenas incluem enzimas que podem indiretamente produzir espécies reativas ao oxigênio (EROs)⁵⁵.

Os radicais livres e outras EROs são átomos instáveis, moléculas ou íons com elétrons desemparelhados. São considerados prejudiciais porque o elétron não emparelhado reage com outros íons e moléculas para ligar-se a um elétron desta outra molécula, com o objetivo de emparelhar-se. Este efeito produz perturbações a estas moléculas e conseqüentemente danos às células⁵⁶. As EROs retiram elétrons da membrana lipídica (a membrana celular da maioria dos organismos vivos é feita de uma bicamada lipídica) e a degradação oxidativa da membrana lipídica é referida como a peroxidação lipídica. A peroxidação de lipídios resulta na perda da integridade da membrana e altera sua fluidez, o que em última análise leva à morte celular ^{56,57}. As EROs também reagem com as proteínas e os ácidos nucléicos que podem conduzir à morte celular por apoptose e conseqüentemente a necrose⁵⁸.

Sob condições normais existe um dinâmico equilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante da célula⁵⁹. Desta forma, o estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os radicais livres e a capacidade para neutralizá-los (isto é, um excesso de pró-oxidantes, uma diminuição nos níveis de antioxidantes, ou ambos)⁵⁵.

Estudos *post-mortem* revelaram que áreas encefálicas afetadas em indivíduos diagnosticados com TEA apresentaram morte celular acelerada em

condições de estresse oxidativo^{60,61}. Lopez-Hurtado e Prieto (2008), verificaram que a densidade de lipofuscina, uma matriz de lipídido oxidado e proteína de ligação cruzada que se forma como resultado de uma lesão oxidativa nos tecidos, foi observada acentuadamente em áreas corticais encefálicas envolvidas com comunicação em indivíduos diagnosticados com TEA quando comparadas ao grupo controle⁶⁰.

Um estudo descreveu que as regiões encefálicas com os mais altos níveis do marcador de estresse oxidativo 3-nitrotirosina (3-NT) foram: o córtex orbitofrontal, a área de Wernicke, o verme e hemisfério cerebelar (áreas do encéfalo associadas com o processamento da fala, coordenação motora e sensorial, comportamento emocional e social e memória, respectivamente) em indivíduos diagnosticados com TEA⁶³.

Viora e colaboradores (2001)⁶², sugerem a existência de um elo entre o estresse oxidativo e a resposta imune e propõe que a infecção materna gera um processo inflamatório que pode levar ao estresse oxidativo, tal como um aumento da peroxidação lipídica, produzindo efeitos perinatais adversos. A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia entre os ácidos graxos poli-insaturados e EROs, que produz peróxidos lipídicos e hidrocarbonetos, os chamados polímeros, considerados altamente citotóxicos⁶⁶. Em 2004, um estudo proposto por Chauhan e colaboradores encontraram aumento na peroxidação lipídica em plasma de crianças autistas quando comparadas aos irmãos não-autistas⁶¹.

O malondialdeído (MDA) é o produto final da peroxidação, sendo utilizado como um marcador para a peroxidação lipídica, encontrado em nível elevado, quando verificado por reação ao ácido tiobarbitúrico em indivíduos com TEA⁶¹. Diversas enzimas antioxidantes como a catalase a superóxido dismutase e a glutational peroxidase catalisam reações para neutralizar EROs formando os mecanismos de defesa endógena, entretanto, estudos têm demonstrado a diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes no plasma de crianças autistas⁶⁵.

Desta forma, alterações nas atividades de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GPx, aliada a uma interação entre fatores genéticos, ambientais, e fatores imunológicos poderiam estar envolvidas na síntese do TEA, sendo o estresse oxidativo o mecanismo de ligação entre tais fatores.

O TEA é um distúrbio neuropsiquiátrico desenvolvido na infância precoce caracterizado pelo prejuízo severo e invasivo de domínios nas áreas do

desenvolvimento pertinentes à interação social, comunicação, comportamento e interesse, sendo relacionado ao atraso ou total ausência da comunicação verbal¹.

Modelos experimentais de autismo induzidos por infecções pré-natais em ratas prenhes³² têm causado a redução do comportamento de brincar nos filhotes e a diminuição da interação social quando adultos, sugerindo que o efeito da inflamação materna sobre o comportamento dos filhotes poderia ocorrer devido a ativação imunológica materna pela ação de citocinas⁵². O modelo utilizado para a indução do comportamento autista neste trabalho possui a mesma proposta, considerando que a administração de LPS em período pré-natal é capaz de agir diretamente nas células placentárias e induzir à liberação de mediadores inflamatórios, provocando, na prole, comprometimentos comportamentais e cognitivos semelhantes aqueles encontrados em indivíduos autistas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta inflamatória na prole de ratos submetidos ao modelo animal de autismo induzido por LPS no período pré-natal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica no córtex pré-frontal, no cerebelo, e no hipocampo de ratos neonatos e de ratos jovens submetidos ao modelo animal de autismo induzido por LPS no período pré-natal.

Avaliar a concentração de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no córtex pré-frontal, no cerebelo e no hipocampo de ratos neonatos e de ratos jovens submetidos ao modelo animal de autismo induzido por LPS no período pré-natal.

Analisar o dano oxidativo em lipídios e proteínas no córtex pré-frontal, no cerebelo e no hipocampo de ratos neonatos e de ratos jovens submetidos ao modelo animal de autismo induzido por LPS no período pré-natal.

Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no córtex pré-frontal, no cerebelo e no hipocampo de ratos neonatos e de ratos jovens submetidos ao modelo animal de autismo induzido por LPS no período pré-natal.

3 MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo pré-clínico utilizando modelo animal de doença.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizadas 12 fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas (90 dias), virgens, pesando entre 250 e 300g, provenientes do biotério da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, sendo acasaladas com 6 machos da mesma linhagem.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em temperatura controlada (22°C +/- 1) e ciclos de luz artificial (12 horas claro/escuro) e receberam ração comercial padronizada para ratos de laboratório e água *ad libitum*.

3.3 ACASALAMENTO

Para o acasalamento, as fêmeas foram introduzidas ao final do período de luz (19h) nas gaiolas dos machos, sendo sempre duas fêmeas para cada macho.

As 7h da manhã do dia posterior a prenhez foi verificada por meio do lavado vaginal, que consistiu na introdução de cloreto de sódio através de uma pipeta plástica na vagina da fêmea, colhendo secreção para análise em microscópio óptico a procura de espermatozoides junto ao material biológico do animal⁶⁶. Quando verificada a presença de espermatozoides, considerou-se como dia gestacional zero (DG 0) daquela fêmea⁶⁷. As fêmeas prenhes foram separadas aleatoriamente caracterizando o grupo experimental e o controle, sendo colocadas individualmente em sua gaiola moradia onde permaneceram durante toda a gestação.

3.4 INDUÇÃO DO MODELO ANIMAL DE AUTISMO

Para a caracterização do modelo animal de autismo, fêmeas prenhes receberam a administração intraperitoneal (ip) de uma única injeção de lipopolissacarídeo (LPS) obtido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma®), na dose de 100 µg/kg no DG 9,5^{68,70} sempre no período vespertino (15h – 17h), diluída em 100 µg/mL de solução aquosa de NaCl 0,9% estéril, enquanto as fêmeas do grupo controle receberam apenas solução aquosa de NaCl 0,9% estéril ip no volume equivalente ao grupo experimental. Para a validação do modelo os animais jovens foram submetidos aos testes de interação social e estereotipia.

O teste de interação social é baseado na tendência natural dos roedores em investigar com maior dedicação um indivíduo intruso que lhe for apresentado pela primeira vez, sendo realizado de acordo com Schneider e Prezewlocki (2005)⁷⁰.

O comportamento estereotipado é bem definido pela permanência do animal em posição estacionária exibindo movimentos rápidos, repetidos da cabeça e membros dianteiros. Este teste foi realizado conforme descrito por Battisti et al. (2000)⁷¹.

3.5 PADRONIZAÇÃO DA NINHADA

Os partos ocorreram de forma natural e no dia pós natal (PND) 1 e PND 2 não ocorreram nenhuma manipulação para evitar a possibilidade de rejeição da mãe em relação a prole. No PND 3 cada ninhada foi ajustada em 4 machos e 4 fêmeas, totalizando 8 animais/ninhada. A diferenciação entre os gêneros foi realizada pela verificação da diferença visual relacionada a distância ano-genital, sendo maior em machos⁷³.

Os filhotes foram divididos em dois grupos, sendo caracterizados como grupo GA e GnA conforme segue:

Grupo GA: (grupo comportamento autista) composto por ratos machos, originários de mães que receberam LPS.

Grupo GnA: (grupo comportamento não autista) composto por ratos machos, originários de mães que receberam solução salina.

Ainda no PND 3 (ratos neonatos), os animais machos foram submetidos à avaliação da permeabilidade da BHE (n=6/grupo) e avaliação neuroquímica

(n=6/grupo). Os demais permaneceram com suas mães até o PDN 21, onde foi realizado o desmame e tanto as mães quanto a prole de fêmeas foram submetidas a morte indolor assistida, realizada pelo responsável técnico do biotério da UNISUL. Os animais permaneceram no biotério até o PDN 30 (ratos jovens), onde foram submetidos aos testes de interação social e estereotipia para validação do modelo e posteriormente à análise da permeabilidade da BHE (n= 6/grupo) e avaliação neuroquímica (n= 6/grupo).

3.6 PROTOCOLO PARA ANÁLISES DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

3.6.1 Permeabilidade da barreira hematoencefálica

A permeabilidade da BHE foi verificada pela análise quantitativa de extravasamento do corante Azul de Evans, de acordo com UYAMA et al. (1988)⁷². Os animais receberam o corante na concentração de 2% (diluído em solução salina), na dose de 4 mL/kg por via intravenosa (veia femoral) para ratos jovens e intraperitoneal para ratos neonatos.

Após 60 min os animais foram anestesiados com cetamina (6,6 mg/kg), xilazina (0,3 mg/kg) acepromazina (0,16 mg/kg) por via ip^{74,75} e perfundidos com solução salina no ventrículo esquerdo à pressão de 110 mm/Hg até que fosse obtido fluido incolor no átrio direito, sendo decapitados logo após.

O encéfalo foi rapidamente removido e fragmentado em córtex pré-frontal, cerebelo e hipocampo. As amostras foram pesadas, inseridas em solução de tricloroacético 50%, homogeneizadas e centrifugadas para extração do corante que foi diluído em etanol (1:3). A mensuração foi realizada através da fluorescência (excitação em 620nm e emissão a 680nm) com um espectrofotômetro de luminescência, sendo quantificada em Azul de Evans ng/mg tecido⁷¹.

3.7 PROTOCOLO PARA ANÁLISES NEUROQUÍMICAS

No PND 3 (ratos neonatos) ou no PND 30 (ratos jovens), os animais foram decapitados, tendo seus encéfalos retirados sobre superfície congelada. O córtex pré-frontal, o cerebelo e o hipocampo foram extraídos e armazenados em freezer -80°C para posteriores avaliações, conforme descrito a seguir.

3.7.1 Isolamento de microvasos cerebrais

Para o isolamento de microvasos cerebrais o córtex pré-frontal, o cerebelo e o hipocampo foram homogeneizados em 4ml de tampão PBS. O *pellet* foi ressuspensionado em 15% de dextrano T-500 e em seguida, adicionado em 20% dextrano T-500, seguido de centrifugação a 25.000rpm durante 10 min a 4 °C⁷⁷.

3.7.2 Dosagem de citocinas

Para as dosagens, primeiro foi realizada a extração de proteínas, em que os tecidos foram homogeneizados em 250µL de tampão contendo Tris HCl na concentração de 10mM e pH 7,4; EDTA 1mM, PMSF 0,001mM, pepstatina 1µg/mL e 1% Triton X 100. A mistura permaneceu 1h no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 25min a 12000rpm. O sobrenadante foi coletado para a dosagem de proteínas e também para os protocolos de ELISA. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry; Rosenbrough; Farr (1951)⁸¹.

A quantificação de citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α foi realizada pelo teste de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), de acordo com o protocolo do fabricante. Para a quantificação de IL-1β, IL-6 foi utilizado o kit Platinum ELISA da empresa eBioscience®; para a quantificação de TNF-α foi utilizado o kit Enzo Life Sciences®.

As dosagens de IL-1b, IL-6 e TNF-α foram realizadas pela técnica ELISA, Rat ELISA Biotrak TM System, GE, Healthcare, UK, sendo determinadas em pg/mg de proteína tecidual.

3.7.3 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada a partir da reação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico gerando bases de Schiff⁷⁸. Os ácidos graxos presentes na membrana lipídica, após sofrerem dano oxidativo, geram o MDA que reage com duas moléculas de TBA com a eliminação de duas moléculas de água, formando um complexo rosa com absorção máxima a 532 nm. Para a detecção do dano causado pela lipoperoxidação, 400 µL do homogenato foram misturados a 400

μL da solução (1% TBA / 50 mM NaOH / 0,1 mM BHT) e 200 μL de ácido fosfórico 7%. Posteriormente, a amostra foi incubada a 100 °C por 15 min e após a descanso de 5 min em banho de gelo para estabelecer o término da reação, foram adicionados 1,5 mL de butanol.

Os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 3.000 g por 10 min. A fase orgânica foi removida e medida espectrofotometricamente em 532 e 600 nm em cubetas de quartzo para volume igual a 1 mL. Para o branco foi substituída a solução de TBA por HCl 3,0 mM. A concentração de TBARS (nmol/g) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156 mM TBARS (nmol.g¹).

3.7.4 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil

O dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi determinado de acordo com o método proposto por Levine et al. (1990)⁸². As amostras foram homogeneizadas (na diluição de 1:10) em 5% de ácido sulfossalicílico gelado. Uma alíquota de 200 μL de homogenato foi adicionada a 800 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora, ao abrigo da luz, sendo vigorosamente agitadas a cada 15 min. Foram adicionados 800 μL de TCA 20% e os tubos foram agitados e centrifugados por 5 min a 5000g.

Os sobrenadantes foram descartados e o excesso de DNPH removido, lavando-se os precipitados inicialmente com 800 μL de TCA 10%, agitados e centrifugados por 5 min a 5000rpm e depois, lavados por três vezes, com 800 μL de uma solução de etanol: acetato de etila (1:1), sempre seguidos de agitação e centrifugação por 5 min a 14.000rpm. Após secagem das paredes dos tubos com o auxílio de um bastonete de algodão, os precipitados foram dissolvidos em 600 μL de guanidina 6 M, submetidos à agitação e incubados por 10 min a 37 °C, para dissolução.

Os brancos foram preparados substituindo-se DNPH por HCl 2M. As absorbâncias máximas em 360 nm foram determinadas e os valores finais das proteínas carboniladas foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar, a concentração de proteínas totais previamente determinada e o conteúdo de proteína carbonilada foi calculado conforme equação abaixo:

$$\text{Proteína Carbonilada (nmol/mg)} = (\text{Abs}_{360} \times 45,45) / [\text{Proteínas Totais}]$$

3.7.5 Atividade da Catalase (CAT)

O princípio deste método baseia-se no decaimento da absorvância ocasionado pela redução de H_2O_2 a água, pela CAT presente na amostra, medido espectrofotometricamente a 240 nm, durante tempo predeterminado⁷⁹. Para esse ensaio, foi utilizada a solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) preparada e titulada no dia da análise.

Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de H_2O_2 e 20 μL de amostra. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do H_2O_2 foi medida durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata, e os valores foram expressos em mmol de H_2O_2 consumido por minuto e por grama ($\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.7.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480 nm⁸⁰ mediante a oxidação da epinefrina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que gera o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, cuja formação foi retardada pela enzima presente na amostra. Em uma cubeta contendo 1,95 mL de glicina 50 mM, pH 10,0 foram adicionados 50 μL de epinefrina 60 mM (mantida em gelo, frasco âmbar e pH em torno de 2,0 para evitar a oxidação).

A velocidade de formação do adrenocromo foi acompanhada durante cerca de 90 segundos antes do início da reação, para então ser adicionada a alíquota da amostra (em torno de 20 a 70 μL , dependendo da concentração e atividade da enzima presente na amostra). O tempo total de monitoramento da reação foi de três minutos. Curvas de quatro a sete pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD em tais condições.

Os valores da SOD foram expressos em U SOD g^{-1} , ou seja, em termos de atividade da enzima, em uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do adrenocromo.

3.7.7 Determinação de proteínas totais

Todas as mensurações bioquímicas foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas com albumina bovina como padrão⁸¹, sendo expressas em mg/ml.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa estatístico *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS), versão 20.0. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão e analisados pelo teste t de *Student*. A significância estatística foi considerada para valores de $p \leq 0,05$.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina, sendo aprovado sob o protocolo 13.033.2.01.IV.

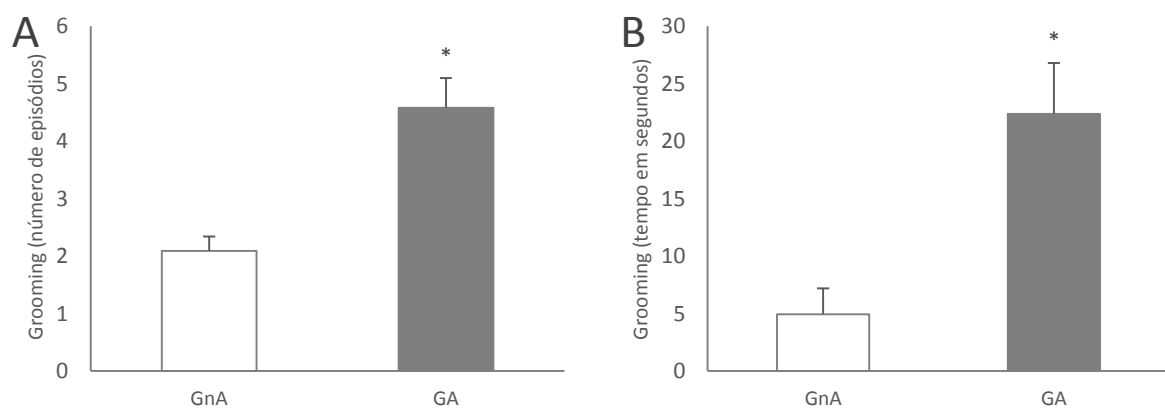
4. RESULTADOS

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.1.1 Teste de estereotipia

Atividade de auto-limpeza tem sido amplamente utilizada como um índice de comportamento repetitivo em estudos pré-clínicos do TEA⁸³. Os resultados demonstraram que os animais do GA apresentaram um número [(F = 6,634; P= 0,017)] e tempo [(F = 10,428; P= 0,004)] de *grooming* significativamente maior, quando comparados ao grupo controle (Figura 3), indicando que a exposição pré-natal ao LPS foi capaz de provocar comportamento autista, considerando este parâmetro como referência, nos animais experimentais.

Figura 3 – Número (Figura 3A) e tempo (Figura 3B) de episódios de movimentos estereotipados (*grooming*) realizados pelo GA e GnA.



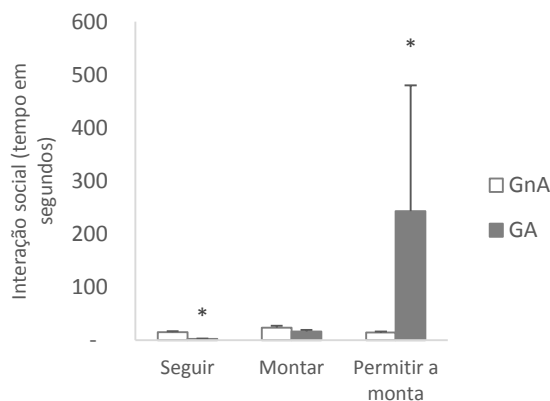
Legenda: Número (A) e tempo (B) de episódios de movimentos estereotipados (*grooming*) mensurados durante 5 min. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão, n= 12 para cada grupo. *Diferença significativa entre o GnA e GA. $P < 0,05$ (*T. Student*).

Fonte: Elaboração do autor, 2014.

4.1.2 Teste de interação social

Uma das características mais relevantes do TEA é o prejuízo na interação social, podendo manifestar-se como isolamento ou comportamento social impróprio, dificuldade em participar de atividades em grupo, indiferença afetiva ou demonstrações inapropriadas de afeto e falta de empatia social^{84,85}. Neste estudo, os resultados do teste de interação social demonstraram que houve diminuição na interação entre os animais. Dentre os parâmetros analisados, seguir o animal intruso [(F= 6,191; P= 0,021)] apresentou diminuição significativa e permitir a monta pelo animal intruso [(F= 5,292; P= 0,031)] apresentou um aumento significativo quando comparados o GA com o GnA, conforme Figura 4.

Figura 4 – Duração (tempo) do comportamento social apresentados pelo GA e GnA.



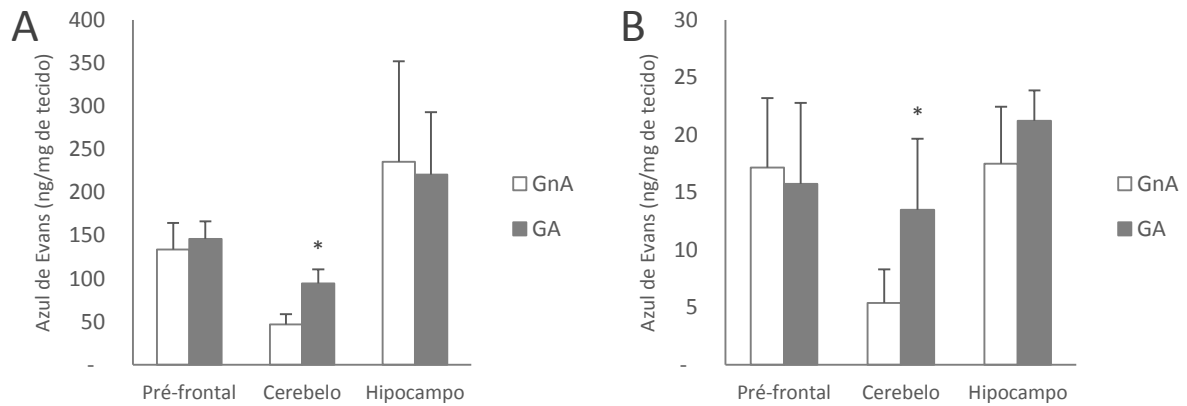
Legenda: Duração (tempo) do comportamento social mensurado durante 10 min. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão, n= 12 para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo GA e GnA. $P < 0,05$ (*T. Student*).

Fonte: Elaboração do autor, 2014.

4.2 PERMEABILIDADE DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA

A permeabilidade da BHE foi verificada pela análise quantitativa de extravasamento do corante azul de Evans, de acordo com UYAMA et al. (1988). Os resultados demonstraram que houve um maior extravasamento de corante no cerebelo de animais neonatos [(F= 0,096; P= 0,003)] (Figura 5A) e jovens [(F= 10,621; P= 0,047)] (Figura 5B) do GA, quando comparados ao GnA.

Figura 5 – Análise da permeabilidade da BHE através do extravasamento de Azul de Evans em animais neonatos (Figura 5A) e jovens (Figura 5B) do GA e GnA.



Legenda: Quantificação do extravasamento de azul de Evans em ratos neonatos (A) e jovens (B). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, n= 06 para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo GA e GnA. $P < 0,05$ (*T. Student*).

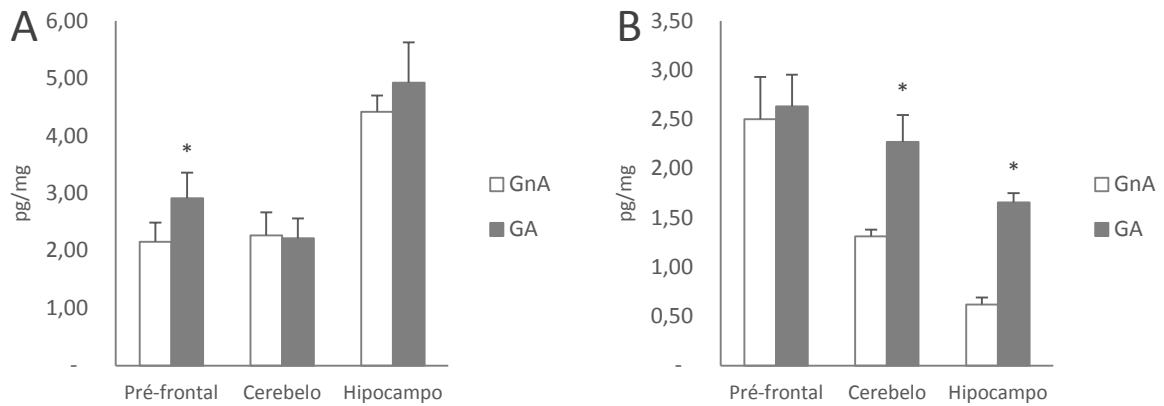
Fonte: Elaboração do autor, 2014.

4.3. ANÁLISES NEUROQUÍMICAS

4.3.1. Dosagem de IL-1 β

Os níveis de IL-1 β no tecido nervoso dos animais expostos ao LPS em período pré-natal foram maiores quando comparados ao grupo controle (Figura 6). Dentre as estruturas analisadas a diferença foi significativa em córtex pré-frontal [(F= 0,388; P= 0,027)] de animais neonatos (Figura 6A) e em cerebelo [(F= 10,038; P= 0,0004)] e hipocampo [(F= 0,791; P= 0,000004)] de animais jovens (Figura 6B).

Figura 6 – Dosagem de IL-1 β no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 6A) e jovens (Figura 6B) do GA e GnA.



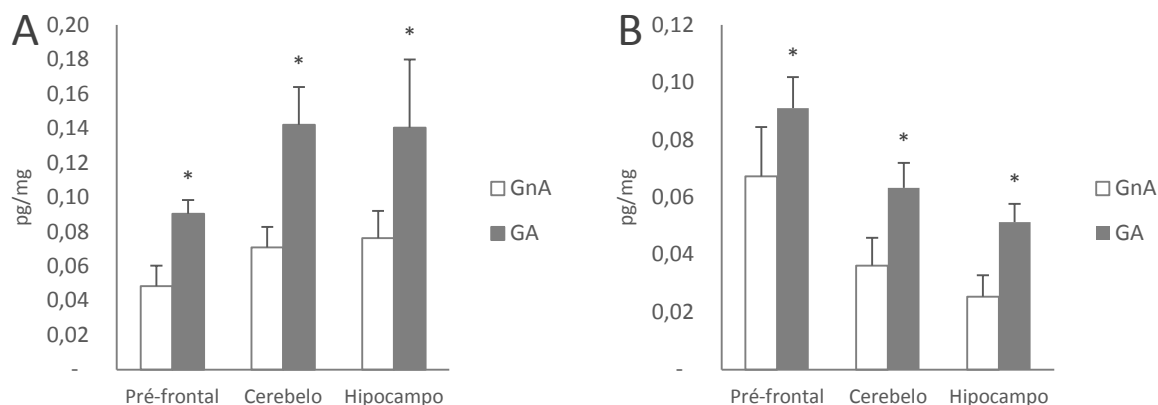
Legenda: Dosagem de IL-1 β no tecido nervoso de animais neonatos (A) e jovens (B). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, n= 06 para cada grupo. *Diferença significativa entre os grupos GA e GnA. $P < 0,05$ (*T. Student*).

Fonte: Elaboração do autor, 2014.

4.3.2 Dosagem de IL-6

Os resultados mostraram aumento significativo nos níveis de IL-6 em todas as estruturas encefálicas analisadas do GA, quando comparadas as do GnA tanto em animais neonatos (Figura 7A), quanto nos jovens (Figura 7B), sendo; córtex pré-frontal [(F= 1,077; P= 0,0005)], cerebelo [(F= 0,440; P= 0,0006)] e hipocampo [(F= 10,893; P= 0,0186)] de neonatos (Figura 7A) e córtex pré-frontal [(F= 3,584; P= 0,047)], cerebelo [(F= 0,853; P= 0,004)] e hipocampo [(F= 0,911; P= 0,001)] de animais jovens (Figura 7B).

Figura 7 – Dosagem de IL-6 no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 7A) e jovens (Figura 7B) do GA e GnA.



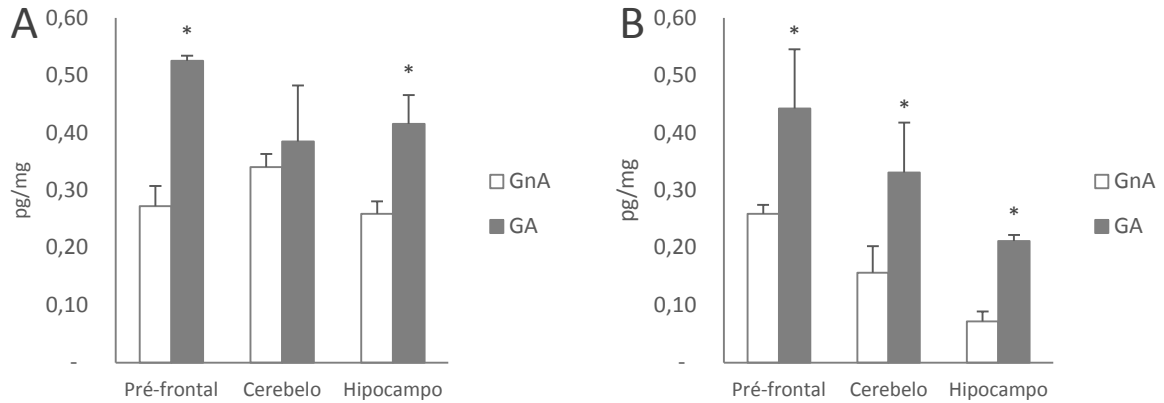
Legenda: Dosagem de IL-6 no tecido nervoso de animais neonatos (A) e jovens (B). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, $n=06$ para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo GA e GnA. $P < 0,05$ (*T. Student*).

Fonte: Elaboração do autor, 2014.

4.3.3 Dosagem de TNF- α

A Figura 8 apresenta o resultado das dosagens de TNF- α em animais neonatos (Figura 8A) e jovens (Figura 8B) do GA e GnA. Os resultados demonstraram um aumento nos níveis de TNF- α nas estruturas encefálicas analisadas do GA quando comparadas as do GnA tanto nos animais neonatos, quanto nos jovens. Dentre as estruturas analisadas, houve diferença significativa em córtex pré-frontal [(F= 10,275; P= 0,0004)] e hipocampo [(F= 2,116; P= 0,004)] de neonatos (Figura 8A) e córtex pré-frontal [(F= 11,774; P= 0,015)], cerebelo [(F= 3,523; P= 0,007)] e hipocampo [(F= 0,819; P= 0,00003)] de animais jovens (Figura 8B).

Figura 8 – Dosagem de TNF- α no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 8A) e jovens (Figura 8B) do GA e GnA.



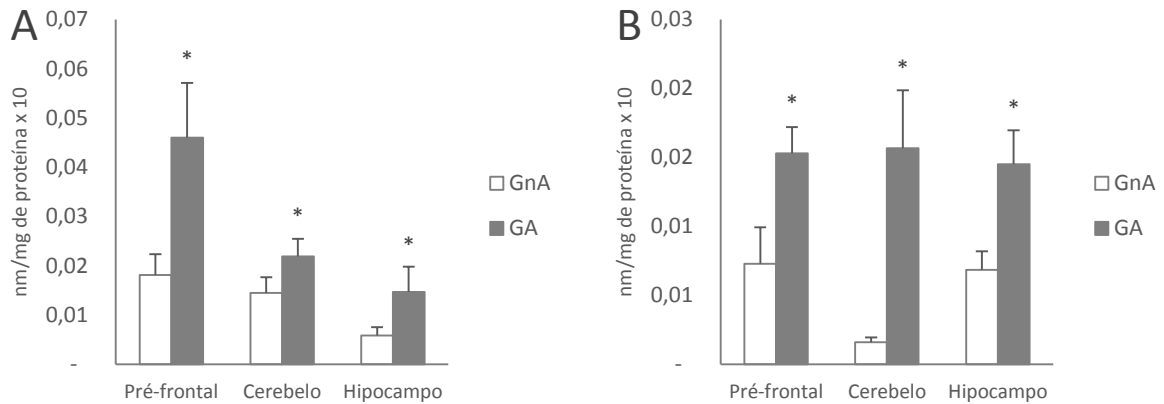
Legenda: Dosagem de TNF- α no tecido nervoso de animais neonatos (A) e jovens (B). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, n= 06 para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo GA e GnA. $P < 0,05$ (T. Student).

Fonte: Elaboração do autor, 2014.

4.3.4 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A Figura 9 demonstra aumento significativo na medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em todas as estruturas encefálicas analisadas tanto em animais neonatos quanto em jovens, quando comparado o GA com o GnA, sendo: córtex pré-frontal [(F= 4,151; P= 0,011)], cerebelo [(F= 0,217; P= 0,022)] e hipocampo [(F= 2,671; P= 0,035)] de neonatos (Figura 9A) e córtex pré-frontal [(F= 2,352; P= 0,004)], cerebelo [(F= 11,299; P= 0,002)] e hipocampo [(F= 0,595; P= 0,0005)] de animais jovens (Figura 9B).

Figura 9 – Medida de substâncias reativas ao TBARS no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 9A) e jovens (Figura 9B) do GA e GnA.



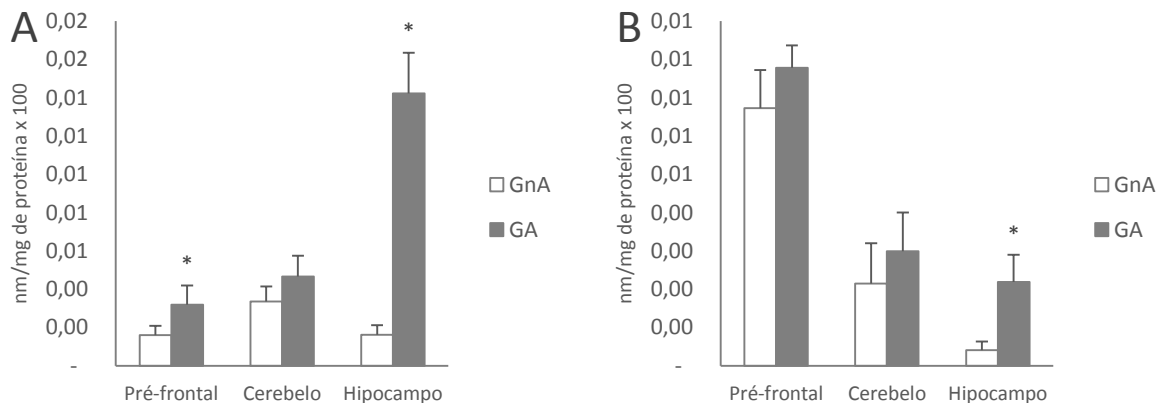
Legenda: Medida de substâncias reativas ao TBARS no tecido nervoso de animais neonatos (A) e jovens (B). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, n= 06 para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo GA e GnA. $P < 0,05$ (T. Student).

Fonte: Elaboração do autor, 2014.

4.3.5 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil

O dano oxidativo em proteínas do grupamento carbonil foi significativamente maior em córtex pré-frontal [(F= 21,943; P= 0,040)] e hipocampo [(F= 8,886; P= 0,0008)] de neonatos (Figura 10A) e hipocampo [(F= 1,173; P= 0,003)] de animais jovens (Figura 10B).

Figura 10 – Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 10A) e jovens (Figura 10B) do GA e GnA.



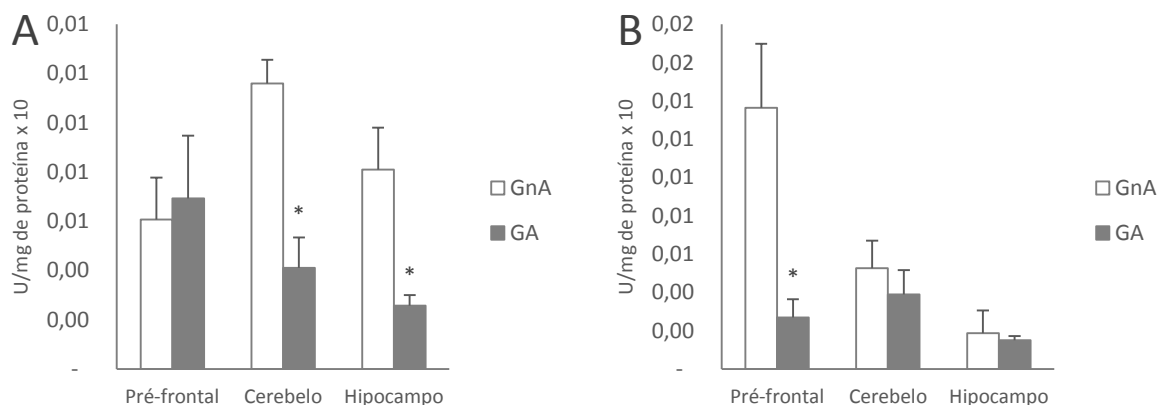
Legenda: Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no tecido nervoso de animais neonatos (A) e jovens (B). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, n= 06 para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo GA e GnA. $P < 0,05$ (T. Student).

Fonte: Elaboração do autor, 2014.

4.3.6 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da enzima antioxidante catalase foi significativamente menor em cerebelo [(F= 0,024; P= 0,000008)] e hipocampo [(F= 5,565; P= 0,001)] de neonatos (Figura 11A) e em córtex pré-frontal [(F= 4,760; P= 0,005)] de animais jovens (Figura 11B) expostos ao LPS em período pré-natal.

Figura 11 – Atividade da CAT no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 11A) e jovens (Figura 11B) do GA e GnA.



Legenda: Avaliação da atividade da CAT no tecido nervoso de animais neonatos (A) e jovens (B). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, n= 06 para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo GA e GnA. $P < 0,05$ (T. Student).

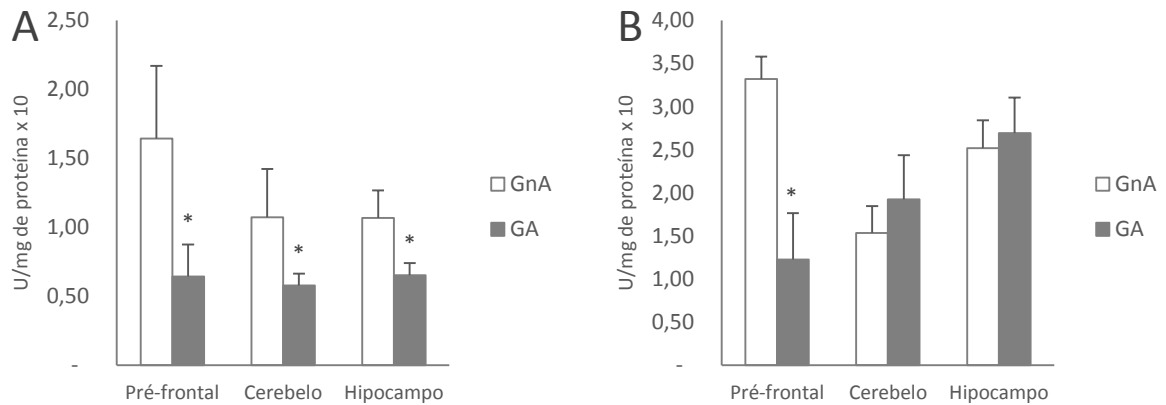
Fonte: Elaboração do autor, 2014.

4.3.7 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase é representada pela Figura 12, demonstrando sua diminuição em estruturas encefálicas analisadas em animais neonatos, quando comparado o GA com o GnA. As estruturas que apresentaram diferença significativa foram: córtex pré-frontal [(F= 5,786; P= 0,009)], cerebelo [(F=

3,609; $P= 0,032$) e hipocampo [($F= 1,441$; $P= 0,009$)] de neonatos (Figura 12A) e córtex pré-frontal [($F= 8,912$; $P= 0,002$)] de animais jovens (Figura 12B).

Figura 12 – Atividade da SOD no tecido nervoso de animais neonatos (Figura 13A) e jovens (Figura 13B) do GA e GnA.



Legenda: Avaliação da atividade da SOD no tecido nervoso de animais neonatos (A) e jovens (B). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, $n= 06$ para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo GA e GnA. $P < 0,05$ (*T. Student*).

Fonte: Elaboração do autor, 2014.

5. DISCUSSAO

Neste trabalho investigaram-se os aspectos sociais envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso central de ratos machos expostos ao LPS pré-natalmente. Os aspectos investigados demonstraram que o comportamento social foi prejudicado, do mesmo modo que o aumento no número de movimentos estereotipados, confirmando que o modelo foi capaz de reproduzir o comportamento autista e corroborando com os resultados descritos por Kirsten e colaboradores (2010)⁵².

A etiologia do TEA ainda não está definida, no entanto, a interação entre fatores genéticos e ambientais é apontada como condição merecedora de atenção^{24,25}. Uma das hipóteses sugere que citonas oriundas da ativação imunológica materna (discutidas a seguir), possam atingir a circulação fetal através da placenta e migrar para o SNC atravessando a BHE imatura, alterando o desenvolvimento encefálico de modo que justifique tal alteração comportamental ao longo do tempo³².

A alteração no desenvolvimento cortical teria um impacto sobre as funções corticais superiores, incluindo a função psicossocial, processamento sensorial e funcionamento do motor, sendo que qualquer uma destas alterações no desenvolvimento neurológico poderia ocasionar efeitos em cascata através de vias sensoriais e neuroimune desencadando transtornos neurológicos, imunológicos e neuroimunes²⁹.

A barreira hematoencefálica (BHE) constitui a barreira morfofuncional entre o SNC e a periferia, tratando-se de uma estrutura dinâmica com capacidade de modulação rápida que permite manter a homeostasia no SNC³⁹, assegurando seu fornecimento nutricional. Alguns estudos têm demonstrado que a alteração na permeabilidade da BHE proporciona o influxo de mediadores inflamatórios para o SNC e que está envolvida na fisiopatologia de doenças neuroinflamatórias^{44,45}. Nossos resultados demonstraram que a BHE dos animais induzidos ao comportamento autista foi considerada mais permeável (cerebelo) pelo extravasamento do corante azul de Evans, demonstrando que o influxo de citocinas para o SNC proveniente da ativação imunológica materna pode ter causado alterações no desenvolvimento e diferenciação da BHE que ocorre durante o período embrionário tardio e pós-natal inicial⁴¹. É possível ainda sugerir que este influxo de citocinas facilitado pela barreira imatura poderia resultar em alterações em *lócus* afetando o desenvolvimento do sistema

nervoso, uma vez que a permeabilidade anormal da BHE parece preceder os sintomas clínicos associados a doenças relacionadas a neuroinflamação³⁸. Tais informações contribuem com a hipótese sugerida por Goines e Van de Water (2010) que, após constatarem a presença de anticorpos no encefálo de crianças autistas, relatam que tal susceptibilidade poderia ocorrer a partir da exposição à xenobióticos, interrompendo ou prejudicando o desenvolvimento da BHE e conseqüentemente sua seletividade.

O cerebelo é considerado uma estrutura distinta do encéfalo devido sua anatomia, fisiologia e desenvolvimento, uma vez que possui a maior densidade de células de qualquer área encefálica (cerca de quatro vezes mais do que o neocórtex)^{86,87} e as células de *Purkinje* cerebelares possuem maior poder sináptico do que qualquer outro tipo de célula⁸⁸. Para que seja possível desempenhar este papel único é necessário que a sinaptogênese cerebelar seja consideravelmente intensificada, utilizando energia o suficiente para uma apropriada complexidade molecular e eficaz síntese proteica⁸⁹⁻⁹¹ resultando em alta energia metabólica⁹².

Devido a esta distinção, é possível que as alterações no cerebelo de autistas sejam mais evidentes do que em outras áreas encefálicas. Além disso, sugere-se que o cerebelo não seja etiológico na patogênese do TEA, mas sim que suas propriedades anatomofisiológicas únicas poderiam acentuar os mecanismos que são aberrantes em todo o encéfalo autista⁹³. E ainda, é possível que tal influxo de citocinas seria potencialmente facilitado pela mediação aberrante realizada pela BHE mais permeável no tecido cerebelar.

Esta hipótese não diminui a importância potencial de alterações cerebelares relacionadas ao desenvolvimento de comportamento autista, ao contrário, as alterações das células de *Purkinje* descritas em estudos recentes⁹³ poderiam auxiliar na identificação de alterações biológicas em pacientes com TEA de forma precoce, colocando o cerebelo como um foco de estudo para o possível diagnóstico ideal^{94,95}.

É sabido que interferências ambientais durante a ontogênese do SNC podem resultar em danos em longo prazo, especialmente pela ativação de células do sistema imune e aumento de mediadores imunológicos. Quando avaliado os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) em estruturas encefálicas dos animais submetidos à exposição pré-natal de LPS, nossos resultados demonstraram aumento destes mediadores em todas as estruturas analisadas e em diferentes períodos de desenvolvimento encefálico.

Vários estudos pré-clínicos têm demonstrado que a neuroinflamação pré-natal e neonatal podem estar associadas ao desenvolvimento do TEA e fortalecem a ideia de que o espectro de manifestações clínicas pode estar relacionado a uma desordem imunológica⁹⁶⁻¹⁰⁰. Além disso, dados obtidos em estudos clínicos revelam aumento significativo nos níveis de citocinas no soro de crianças autistas quando comparadas ao grupo controle^{101,102}.

Diante disso, a alteração no desenvolvimento neurológico observado no TEA pode estar relacionada à neurotoxicidade oriunda das alterações (superprodução ou diminuição) nos níveis de citocinas, da mesma forma como acontece em outros distúrbios neuropsiquiátricos como esquizofrenia¹⁰³. Os resultados dos estudos realizados por Boksa (2010) utilizando modelo pré-clínico de infecção demonstraram que a ativação imune pré-natal causou alterações comportamentais, estruturais e funcionais no SNC, inclusive aumentando a expressão de agentes oxidantes no SNC do feto.

O alto índice de citocinas pró-inflamatórias e a ativação da neuroglia têm sido relatados em regiões encefálicas no TEA o que poderia justificar este efeito, além de um nível significativamente elevado de 3-CT (3-clorotirosina) (um biomarcador utilizado para avaliar resposta inflamatória crônica) no cerebelo e área 22 de Brodmann e de células fagocitárias ativadas que produzem ácido hipoclorídrico, o produto da mieloperoxidase (MPO)¹⁰⁴. A expressão elevada da MPO foi demonstrada em doenças neurológicas crônicas, tais como a doença de Alzheimer¹⁰⁵ Parkinson¹⁰⁶ e esclerose múltipla¹⁰⁷.

O aumento observado em 3-CT no cerebelo e área 22 de Brodmann de autistas é uma indicação da expressão de MPO elevada e suporta relatórios anteriores que descreveram a ativação da microglia e de citocinas inflamatórias no TEA¹⁰⁸ o que dá aos estudos relacionados a neuroinflamação na neuropatologia do TEA um papel de extrema importância.

O aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias potencializa a expressão da proteína quimiotrativa de monócitos (MCP-1) e das moléculas de adesão (CAMs) consideradas cruciais para a o recrutamento e transmigração de leucócitos nas respostas inflamatórias^{109,110} e eleva também a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2)¹¹¹ e do óxido nítrico sintetase induzível (iNOS)¹¹². A COX-2 é um fator limitante na velocidade na síntese de prostaglandinas E2 (PGE2) e esta produção, induzida pela inflamação é regulada tanto pela expressão da COX-2,

quanto pela disponibilidade de ácido araquidônico^{111,113}. O ácido araquidônico é expresso a partir do metabolismo das fosfolipases cPLA2 e sPLA2 e o aumento na sua expressão eleva a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que esgota a glutatona intracelular e conseqüentemente eleva o índice do MDA, o subproduto da peroxidação lipídica¹¹⁴. O iNOS, por sua vez, produz grandes quantidades de óxido nítrico (NO)^{115,112} um radical livre que contribui para a formação do peroxinitrito que leva ao dano as proteínas¹⁰⁸.

O delicado equilíbrio existente entre a produção de EROs e de defesas antioxidantes pode ser perturbado tanto pelo aumento da produção de EROs ou quanto pela inadequada defesa antioxidante. O aumento da geração de EROs em recém-nascidos pode ocorrer como resultado de várias condições, incluindo hiperoxia, reperfusão, e/ou infecção, uma vez que o bebê prematuro tem concentrações inadequadas de antioxidantes no nascimento, bem como uma síntese diminuída de antioxidantes em resposta a hiperoxia sendo, particularmente susceptível a danos induzidos por EROs.

O estresse oxidativo ocorre quando os mecanismos de defesa antioxidantes não são efetivos contra fontes endógenas ou exógenas de EROs¹²¹. Evidências apontam para aumento dos níveis de estresse oxidativo em regiões encefálicas de indivíduos autistas^{60,61,117,118}, especialmente em lobo temporal, parietal, frontal, hipocampo e cerebelo^{60,64,117}. Estudos *pos-mortem* envolvendo avaliação de marcadores de estresse oxidativo em crianças autistas demonstraram níveis elevados de hidroperóxidos de lípidos no cerebelo e córtex temporal¹¹⁹ e dano oxidativo a proteínas mitocondriais no giro temporal superior (áreas 41/42 e 22 de Brodmann)¹²⁰. Além disso, foi encontrado níveis plasmáticos diminuídos de enzimas antioxidantes^{61,121,122}, incluindo GSH e GSSG¹²³⁻¹²⁵.

Uma das propostas de nosso estudo foi avaliar o estresse oxidativo em estruturas encefálicas a partir da ativação imunológica materna e os resultados mostraram aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (um marcador para o dano oxidativo a lipídeos), aumento do dano oxidativo em proteínas do grupamento carbonil, bem como a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) no tecido nervoso tanto em animais neonatos quanto em animais jovens expostos ao LPS em período pré-natal.

Estes resultados corroboram com achados descritos em estudos pré-clínicos, que apresentaram diminuição nos níveis de enzimas antioxidantes frente a

exposição pré-natal ao LPS^{126,127} bem como a oxidação de proteínas¹²⁸ e lipídios. O que nos leva a sugerir que o aumento de citocinas proveniente da ativação imunológica materna oriunda da exposição ao LPS inicia uma cascata que leva ao aumento de ERO proveniente da peroxidação, diminuição nas defesas antioxidantes e conseqüentemente no estresse oxidativo.

Por fim, embora exista crescente evidência de que ativação imunológica materna altere aspectos neurobiológicos e comportamentais na prole de ratos, os mecanismos pelos quais estas reações alteram o desenvolvimento encefálico ainda permanecem obscuros. Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo sugerem que um insulto pré-natal é capaz de causar efeitos em longo prazo nos filhotes e que, apesar das características comportamentais e neuroquímicas, estes dados necessitam de mais investigações para que se possa identificar marcadores e mecanismos mais precisos a respeito da fisiopatologia do TEA. Em vista disso, outros experimentos estão sendo conduzidos em nosso laboratório para uma melhor compreensão dos mecanismos que possam estar envolvidos nos sintomas nucleares do espectro autista.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que a exposição pré-natal ao LPS foi capaz de induzir o comportamento autista na prole, alterar a permeabilidade da barreira encefálica, elevar os níveis de citocinas em estruturas encefálicas e aumentar o dano oxidativo em proteínas e lipídeos além de diminuir as defesas antioxidantes. Desta forma, torna-se possível sugerir que uma das hipóteses etiológicas que apontam para fatores ambientais no desenvolvimento do TEA, pode estar relacionada a neuroinflamação.

REFERÊNCIAS

- 1 Nikolov R, Jonker J, Scahill L. Autism? Tratamentos psicofarmacológicos e áreas de interesse para desenvolvimentos futuros. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006; 28:39-46.
- 2 Fombonne E, Quirke S, Hagen A. *Epidemiology of pervasive developmental disorders.* Oxford University Press. 2011; 90-111.
- 3 Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marci'n C, et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Research,* 2012; 5(3), 160-79.
- 4 Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch. Gen. Psychiatry.* 2011; 68:1095-102.
- 5 Depino AM. Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2012; 53:69-76.
- 6 American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders.* 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association; 2013.
- 7 Bernardi MM, Kirsten TB, Trindade MO. Sobre o Autismo, Neuroinflamação e Modelos Animais para o Estudo de Autismo: Uma Revisão. *Rev. Neurocienc.* 2012; 20:117-27.
- 8 Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT. Autism and pervasive developmental disorders. *J. Pediatr.* 2004; 80:83-94.
- 9 Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child.* 1943; 2:217-50.
- 10 Rutter M, Schopler E. Classification of pervasive developmental disorders: some concepts and practical considerations. *J Autism Dev Disord.* 1992; 22:459-82.
- 11 Borges TP. Considerações sobre o autismo infantil. *Mental.* 2006; 4:137-46.
- 12 Klin A. Autism and Asperger syndrome: an overview. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006; 28:3-12.
- 13 Rutter M. Diagnosis and definitions of childhood autism. *J Autism Dev Disord.* 1978; 8:139-61.
- 14 American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV-TR).* 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 2000.
- 15 Lord C, Petkova E, Hus V, Gan W, Lu F, Martin D, et al. A multisite study of the clinical diagnosis of different autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 2011; 69:306-13.

- 16 McPartland JC, Reichow B, Volkmar FR. Sensitivity and specificity of proposed DSM-5 diagnostic criteria for autism spectrum disorder. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*. 2012; 51(4), 368-83.
- 17 Grzadzinski R, Huerta M, Lord C: DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes. *Mol Autism*. 2013; 4(12):5-6.
- 18 Yeargin-Allsopp M, Rice C, Karapurkar T, Doernberg N, Boyle C, Murphy C. Prevalence of autism in a US metropolitan area. *JAMA*. 2003; 289:49-55.
- 19 Davidovitch M, Hemo B, Manning-Courtney P, Fombonne E. Prevalence and Incidence of Autism Spectrum Disorder in an Israeli Population *J Autism Dev Disord*. 2013, 43:785-93.
- 20 Fombonne E. The prevalence of autism. *JAMA* 2003; 289:87-9.
- 21 Madsen KM, Hviid A, Vestergaard M, Schendel D, Wohlfahrt J, Thorsen, et al. A population-based study of measles, mumps, and rubella vaccination and autism. *New Engl J Med*. 2002; 347:1477-82.
- 22 Smalley SL. Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet* 1997; 6:1276-82.
- 23 Teixeira MCTV, Mecca TP, Velloso RI, Bravo RB, Ribeiro SHB, Mercadante MT, Paula CS. Literatura científica brasileira sobre transtornos do espectro autista. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; 56(5):607-14.
- 24 Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat. Rev. Genet*. 2008; 9:341-55.
- 25 Persico AM, Bourgeron T. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends Neurosci*. 2006; 29:349-58.
- 26 Courchesne E, Pierce K, Schumann CM, Redcay E, Buckwalter JA, Kennedy DP, et al. Mapping Early Brain Development in Autism. *Neuron*. 2007; 56:399-413.
- 27 Bugalho P, Correa B, Viana-Baptista M. Role of the cerebellum in cognitive and behavioural control: scientific basis and investigation models. *Acta Med. Port*. 2006; 19:257-67.
- 28 Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int Rev Psychiatry* 2005; 17:485-95.
- 29 Goyal DK, Miyan JA. Neuro-Immune Abnormalities in Autism and Their Relationship with the Environment: A Variable Insult Model for Autism. *Front Endocrinol*. 2014; 5:29.
- 30 Fatemi, SH, Reutiman TJ, Folsom, TD, Huang H, Oishi K, Mori S, et al. Maternal infection leads to abnormal gene regulation and brain atrophy in mouse offspring: implications for genesis of neurodevelopmental disorders. *Schizophr*. 2008; 99:56-70.

- 31 Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, et al. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J. Neurosci.* 2006; 26:4752-62.
- 32 Graciarena M, Depino AM, Pitossi FJ. Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGFbeta(1) downregulation. *Brain Behav. Immun.* 2010; 24: 1301-9.
- 33 Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron.* 2009; 64:61-78.
- 34 Ellman LM, Susser ES. The Promise of Epidemiologic Studies: Neuroimmune Mechanisms in the Etiologies of Brain Disorders. *Neuron.* 2009; 64:1 25-7.
- 35 Chez MG, Dowling T, Patel PB, Khanna P, Kominsky M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatr Neurol* 2007; 36:361-5.
- 36 Patterson PH. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002; 12:115-8.
- 37 Boksa P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain Behav Immun* 2010; 24(6)881-97.
- 38 Angelidou A, Asadi S, Alysandratos K, Karagkouni A, Kourembanas S, Theoharides TC. Perinatal stress, brain inflammation and risk of autism-Review and proposal. *BMC Pediatrics.* 2012; 12: 89-101.
- 39 Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005; 57:173-85.
- 40 Abraham M, Shapiro S. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J Neuroimmunol.* 2005; 163:157-64.
- 41 Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res.* 2003; 314(1):119-29.
- 42 Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 2002; (6):629-38.
- 43 Pryce G, Male D, Campbell I, Greenwood J. Factors controlling T-cell migration across rat cerebral endothelium in vitro. *J Neuroimmunol.* 1997; 75(1-2):84-94.
- 44 Etienne-Manneville S, Manneville JB, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud PO. ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol.* 2000; 165(6):3375-83.

- 45 Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, Couraud PO. Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at bloodbrain barrier. *Vascular Pharmacology*. 2002; 38:315-22.
- 46 Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide induced inflammation and perinatal brain injury. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2006; 11:5 343-53.
- 47 Mwanza AM, Rodriguez-Martinez H, Kindahl H, Einarsson S. Postovulatory effect of intravenous administration of lipopolysaccharide (*E. coli*, O55:B5) on the contractile activity of the oviduct, ova transport, binding of accessory spermatozoa to the zona pellucida and embryo development in sows. *Reprod Dom Anim*. 2002; 37: 269-74.
- 48 Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick & Adelberg: *Microbiologia Médica*. 2000; Editora Guanabara Koogan, 21^a Ed.
- 49 Meyer U, Feldon J, Fatemi H. In-vivo rodent models for the experimental investigation of perinatal immune activation effects in neurodevelopment brain disorders. *Neurosci. Biobehav*. 2009; 10:1016.
- 50 Saluk-juszczak J, Wachowicz B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. *Postepy Biochemii*. 2005; 51:3 280-7.
- 51 Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2007; 25:121-39.
- 52 Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17:240-51.
- 53 Quan N, Herkenham M. Connecting cytokines and brain: a review of current issue. *Histol Histopathol*, 2002; 17: 273-78.
- 54 Kinoshita D, Cohn DW, Costa-Pinto FA, de Sá-Rocha LC. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. *Physiol Behav*. 2009; 96(2): 328-32.
- 55 Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, Oxford University Press. 2000; 160-5.
- 56 Efe H, Deger O, Kirci D, Karahan SC, Orem A, Calapoglu M. Decreased neutrophil antioxidative enzyme activity and increased lipid peroxidation in hyperlipoproteinemic human subjects. *Clin Chem Acta*. 1999; 279:155-65.
- 57 Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991; 11:81-128.
- 58 Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000; 7:153-63.

- 59 Granot E, Kohen R. Oxidative stress in childhood - in health and disease states. *Clin. Nutr.* 2004; (23)3-11.
- 60 López-Hurtado E, Prieto JJ. A microscopic study of language-related cortex in autism. *Am. J. Biochem. Biotech.* 2008; 4:130-45.
- 61 Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen IL. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin - the antioxidant proteins, *Life Sci.* 2004; 25:39-49.
- 62 Viora M, Quaranta MG, Straface E, Vari R, Masella R, Malorni W: Redox imbalance and immune functions: opposite effects of oxidized low- density lipoproteins and N-acetylcysteine. *Immunology.* 2001; 104:431-8.
- 63 Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, McGinnis W, Koibuchi N. Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD) *Cerebellum.* 2011;10:43-8.
- 64 Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Rev. Toxicol.* 1987; 27-79.
- 65 Adams JB, Audhya T, Donough-Means S, Rubin RA, Quig D, Geis E, Gehn E, Loresto M, Mitchell J, Atwood S, Barnhouse S, Lee W: Nutritional and Metabolic Status of Children with Autism vs. Neurotypical Children, and the Association with Autism Severity. *Nutr Metab.* 2011; 8:34.
- 66 Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology.* 2002; 62(4): 609-14.
- 67 Leite LG, Riet-Correa F, Medeiros RMT, Piacent A, Aragão M, Schons SV. Susceptibilidade de animais de laboratório à intoxicação por *Ateleia glazioviana*. *Pesquisa veterinária brasileira.* 2002; 22(2) 73-8.
- 68 Bernardi MM, Spinosa HS, Górnica SL. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal: *Farmacologia aplicada à medicina veterinária.* Guanabara Koogna, 2006. 807-16.
- 69 Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *American journal physiology.* 2007; 293: 581-9.
- 70 Schneider A, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacol.* 2005; 30(1):80-9.
- 71 Battisti JJ, Shreffler CB, Uretsky NJ, Wallace LJ. NMDA antagonists block expression of sensitization of amphetamine and apomorphine induced stereotypy. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000; 67:241-6.

- 72 Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M. Quantitative Evaluation of Vascular Permeability in the Gerbil Brain After Transient Ischemia Using Evans Blue Fluorescence. *Journal Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1988; 8:282-4.
- 73 Holson J F, Memec MD, Stump DG, Kaufman IE, Lindstöm P, Varsho J. Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. 2002; 22:185-221.
- 74 Hoogman M, Van de Beek D, Weisfelt M, Gans J, Schmand B. Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(10):1092.
- 75 Grandgirard D, Steiner O, Täuber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol*. 2007; 114(6):609-17.
- 76 Smith SL, Hall ED. Mild Pre- and Posttraumatic Hypothermia Attenuates Blood-Brain Barrier Damage Following Controlled Cortical Impact Injury in the Rat. *Journal of Neurotrauma*. 1996; 13(1): 1-9.
- 77 Kago T, Takagi N, Date I, Takenaga Y, Takagi K, Takeo S. Cerebral ischemia enhances tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 339:1197-203.
- 78 Hermes-Lima M, Willmore WG, Storey KB. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation, *Free Radical Biology & Medicine*. 1995; 27:1-80.
- 79 Aebi H. Catalase in vitro. *Met Enzymol* 1984;105: 121-6.
- 80 Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem*. 1972; 317:0-5.
- 81 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-75.
- 82 Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Met Enzymol* 1990; 186:464-78.
- 83 Crawley JN, Paylor R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav*. 1997; 3:197-211.
- 84 Casanova MF. The neuropathology of autism. *Brain pathol*. 2007; 17:422-33.
- 85 Geschwind DH. Advances in autism. *Annu Rev Med*. 2009; 60:367-80.
- 86 Herculano-Houzel S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci*. 2009; 3:31.

- 87 Herculano-Houzel S. The remarkable, yet not extraordinary, human brain as a scaled-up primate brain and its associated cost. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109(1):10 661–8.
- 88 Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, Siegelbaum S, Hudspeth AJ. *Principles of Neural Science*. 5th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2012. 966.
- 89 Mazin P, Xiong J, Liu X, Yan Z, Zhang X, Li M, et al. Widespread splicing changes in human brain development and aging. *Mol Syst Biol*. 2013; 22(9):633-8.
- 90 Kang HJ, Kawasawa YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M, et al. Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature*. 2011; 478(7370):483-9.
- 91 Fountoulakis M, Juranville JF, Dierssen M, Lubec G. Proteomic analysis of the fetal brain. *Proteomics*. 2002; 2(11):1547-76.
- 92 Howarth C, Gleeson P, Attwell D. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012; 32(7):1222-32.
- 93 Ziats MN, Rennert OM. The Cerebellum in Autism: Pathogenic or an Anatomical Beacon? *Cerebellum*. 2013; 12:776-7.
- 94 Howlin P, Magiati I, Charman T. Systematic review of early intensive behavioral interventions for children with autism. *Am J Intellect Dev Disabil*. 2009; 114(1):23-41.
- 95 Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet*. 2009; 374(9701):1627-38.
- 96 Gayle DA, Beloosesky R, Desai M, Amidi F, Nunez SE, Ross MG. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286(6):1024-9.
- 97 Hava G, Vered L, Yael M, Mordechai H, Mahoud H. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Dev Psychobiol*. 2006; 48(2):162-8.
- 98 Cai Z, Pan ZL, Pang Y, Evans OB, Rhodes PG. Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res*. 2000; 47:164–72.
- 99 Urakubo A, Jarskog LF, Lieberman JA, Gilmore JH. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophr Res*. 2001; 47(1):27-36.
- 100 Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*. 2007; 27(40):8.
- 101 Vojdani A, Campbell AW, Anyanwu E, Kashanian A, Bock K, Vojdani E. Antibodies to neuron-specific antigens in children with autism: Possible cross-reaction with encephalitogenic proteins from milk, *Chlamydia pneumoniae* and *Streptococcus* group A. *Journal of Neuroimmunology*. 2002; 129:168-77.

102 Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansenc R, Pessahd I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2011; 25:40-5.

103 Malek-Ahmadi P. Cytokines and etiopathogenesis of pervasive developmental disorders. *Me Hypotheses*. 2001; 56(3):321-4.

104 Heinecke JW, Hsu FF, Crowley JR, Hazen SL, Leeuwenburgh C, Mueller DM, et al. Detecting oxidative modification of biomolecules with isotope dilution mass spectrometry: sensitive and quantitative assays for oxidized amino acids in proteins and tissues. *Methods Enzymol*. 1999; 300:124-44.

105 Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, et al. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2004; 90:724-33.

106 Choi DK, Pennathur S, Perier C, Tieu K, Teismann P, Wu DC, et al. Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of Parkinson's disease in mice. *J Neurosci*. 2005; 25:6594-6600.

107 Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, et al. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1997; 78:97-107.

108 Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*. 2005; 57:67-81.

109 Radi ZA, Kehrl ME Jr, Ackermann MR. Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. *J Vet Intern Med*. 2001; 15:516-29.

110 Proost P, Wuyts A, Van Damme J. The role of chemokines in inflammation. *Int J Clin Lab Res*. 1996; 26:211-23.

111 Perkins DJ, Kniss DA. Tumor necrosis factor-alpha promotes sustained cyclooxygenase-2 expression: attenuation by dexamethasone and NSAIDs. *Prostaglandins*. 1997; 54:727-43.

112 Bolanos JP, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A. Linking glycolysis with oxidative stress in neural cells: a regulatory role for nitric oxide. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35:1224-7.

113 Miyaura C, Inada M, Matsumoto C, Ohshiba T, Uozumi N, Shimizu T, Ito A. An essential role of cytosolic phospholipase A2alpha in prostaglandin E2-mediated bone resorption associated with inflammation. *J Exp Med*. 2003; 197:1303-10.

- 114 Victor VM, De la Fuente M. Immune cells redox state from mice with endotoxin-induced oxidative stress. Involvement of NF-kappaB. *Free Radic. Res* 2003; 37:19-27.
- 115 Brown GC, Bolanos JP, Heales SJ, Clark JB. Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration. *Neurosci Lett.* 1995; 193:201-4.
- 116 Jones DP. Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging. *Rejuvenation Res.* 2006; 9:169-81.
- 117 Evans TA, Siedlak SL, Lu L, Fu X, Wang Z, McGinnis WR, et al. The autistic phenotype exhibits a remarkably localized modification of brain protein by products of free radical-induced lipid oxidation. *Am. J. Biochem.* 2008; 4:61-72.
- 118 Tang G, Gutierrez RP, Kuo SH, Akman HO, Rosoklija G, Tanji K, et al. Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. *Neurobiol.* 2013; 54:349-61.
- 119 Chauhan A, Gu F, Essa M M, Wegiel J, Kaur K, Brown WT, et al. Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. *J. Neurochem.* 2011; 117:209-20.
- 120 Palmieri L, Papaleo V, Porcelli V, Scarcia P, Gaita L, Sacco R, et al. Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1. *Mol. Psychiatry.* 2010; 15:38-52.
- 121 Sogut S, Zoroglu SS, Ozyurt H, Yilmaz HR, Ozugurlu F, Sivasli E, et al. Changes in nitric oxide levels and antioxidant enzyme activities may have a role in the pathophysiological mechanisms involved in autism. *Clin Chim Acta.* 2003; 331:111-7.
- 122 Boso M, Emanuele E, Minoretti P, Arra M, Politi P, Ucelli di Nemi S, et al. Alterations of circulating endogenous secretory RAGE and S100A9 levels indicating dysfunction of the AGE-RAGE axis in autism. *Neurosci Lett.* 2006; 410:169–73.
- 123 James SJ, Cutler P, Melnyk S, Jernigan S, Janak L, Gaylor DW, et al. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1611–7.
- 124 James SJ, Melnyk S, Fuchs G, Reid T, Jernigan S, Pavliv O, et al. Efficacy of methylcobalamin and folinic acid treatment on glutathione redox status in children with autism. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89:425–30.
- 125 James SJ, Melnyk S, Jernigan S, Cleves MA, Halsted CH, Wong DH, et al. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2006; 141B:947-56.
- 126 Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S, Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64:1037-48.

127 Thiruchelvam M, Prokopenko O, Cory-Slechta DA, Buckley B, Mirochnitchenko O. Overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase protects against the paraquat + maneb-induced Parkinson disease phenotype. *J Biol Chem.* 2005; 280(23):22530-9.

128 Ling ZD, Chang Q, Lipton JW, Tong CW, Landers TM, Carvey PM. Combined toxicity of prenatal bacterial endotoxin exposure and postnatal 6-hydroxydopamine in the adult rat midbrain. *Neuroscience.* 2004; 124:619-28.

ANEXO



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Tubarão, 19 de novembro de 2013.

Registro na CEUA (código): 13.033.2.01.IV

Ao pesquisador: Jucélia Jeremias Fortunato
Evandro da Cruz Citadim Soares

Curso de Biologia - Campus Universitário Tubarão

Prezado(a) Pesquisador(a) ,

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa "**Estudo de mediadores envolvidos na fisiopatologia do autismo**", foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UNISUL.

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

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informado imediatamente à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNISUL.

Atenciosamente.

Peter Johann Bürger

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNISUL
Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina

☎ (48) 3279-1036

✉ ceua@unisul.br peter.burger@unisul.br



Antes de imprimir este e-mail pense em sua responsabilidade e compromisso com o MEIO AMBIENTE