

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FONOAUDIOLOGIA

CAIO SERGIO GALINA SPILLA

MEMÓRIA ESPACIAL E NEUROQUÍMICA DO HIPOCAMPO EM MODELO
ANIMAL DE AUTISMO

Marília

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FONOAUDIOLOGIA

CAIO SERGIO GALINA SPILLA

MEMÓRIA ESPACIAL E NEUROQUÍMICA DO HIPOCAMPO EM MODELO
ANIMAL DE AUTISMO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP- Campus de Marília-SP, para obtenção do título de mestre em Fonoaudiologia.

Área de concentração: Distúrbios da Comunicação Humana.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Pinato.

Marília

2018

Spilla, Caio Sergio Galina.

S756m Memória espacial e neuroquímica do hipocampo em modelo animal de autismo / Caio Sergio Galina Spilla. – Marília, 2018.

83 f. ; 30 cm.

Orientadora: Luciana Pinato.

Dissertação (Mestrado em Fonoaudiologia) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Filosofia e Ciências, 2018.

Bibliografia: f. 57-83

1. Autismo. 2. Aprendizagem – Aspectos fisiológicos. 3. Cérebro - Desenvolvimento. 4. hipocampo. I. Título.

CDD 136.766

Elaboração por André Sávio Craveiro Bueno

CRB 8/8211

Unesp – Faculdade de Filosofia e Ciências

CAIO SERGIO GALINA SPILLA

**MEMÓRIA ESPACIAL E NEUROQUÍMICA DO HIPOCAMPO EM MODELO
ANIMAL DE AUTISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia, Área de Concentração Distúrbios da Comunicação Humana, da Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Marília (SP), para obtenção do título de Mestre em Fonoaudiologia.

Área de concentração: Distúrbios da Comunicação Humana

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): _____

Prof.^a Dra.^aLuciana Pinato
Universidade Estadual Paulista – UNESP FFC/Marília-SP.

Examinador (a): _____

Prof. Dr. Sanseray da Silveira Cruz - Machado
Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências / São Paulo – SP.

Examinador (a): _____

Prof. Dr. Vitor Engrácia Valenti
Universidade Estadual Paulista – UNESP FFC/Marília-SP.

Marília, 25 de maio de 2018

Dedico este trabalho aos meus pais, Sergio e Célia por guiar o meu caminho ensinando-me os verdadeiros valores da vida e por toda luta para proporcionar-me uma educação de qualidade.

“Só enquanto eu respirar, vou me lembrar de vocês...”. OTM.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora professora Dra. Luciana Pinato por todas as oportunidades proporcionadas para construção do meu conhecimento, pelo tempo investido nessa empreitada, por seus conselhos e orientações, por mostrar-me o verdadeiro sentido da palavra orientadora ao longo deste Mestrado.

A professora Dra. Célia Maria Giacheti, pelo acolhimento no programa de pós-graduação em Fonoaudiologia e por todos os momentos em que tive a oportunidade de aprender com toda a sua sabedoria.

Aos membros da banca, Dr. Sanseray da Silveira Cruz-Machado e Dr. Vitor Engrácia Valenti, por colaborarem disponibilizando tempo e sugerindo mudanças para a melhoria desse trabalho.

A minha família, especialmente, a minha avó Leobina, meu tio José Roberto, minha tia Lucia Helena e minha sogra Rose Maria, por estarem sempre ao meu lado.

A professora Dra. Leila Maria Guissoni Campos, por ter acreditado em minha capacidade.

Aos professores Dra. Percyleine Pelegrini Herculiani e Me. Fábio Augusto Freiria Barbosa, por quem tenho tanta admiração, respeito, carinho e gratidão.

Ao professor Dr. Silvio Morato de Carvalho e ao Dr. Rafael Carvalho Bonutti, por contribuírem com seus conhecimentos para realização desse trabalho.

Aos membros do Laboratório de Estudos em Neuroinflamação, que contribuíram em cada etapa da construção desse trabalho.

Agradecimento Especial

Meu agradecimento especial é a Ana Luiza, minha companheira de todos os momentos. Sem sua presença ao meu lado, nada teria acontecido. Muito obrigado por cada dia, cada palavra, cada incentivo, cada riso. Tenha certeza que foram fundamentais ao longo desse processo de crescimento científico.

RESUMO

Reações imunes geradas no organismo materno durante o período gestacional podem provocar alterações no desenvolvimento do feto. O LPS, endotoxina lipopolissacarídea presente na parede das bactérias gram-negativas, é capaz de gerar a produção de citocinas, mimetizando dessa forma um quadro de inflamação pré-natal quando administrado na fêmea prenhe durante o período gestacional. A prole de ratas prenhes expostas a esta endotoxina pode apresentar assim diversos problemas comportamentais e/ou cognitivos que refletem alterações ocorridas no sistema nervoso central (SNC) durante o seu desenvolvimento. Entre as diversas patologias que podem resultar de um transtorno no neurodesenvolvimento está o transtorno do espectro autista (TEA). Ainda sem uma causa definida em humanos, estima-se que cerca de uma a cada 150 crianças nascidas atualmente são acometidas por essa patologia. Distúrbios de comportamento e de comunicação/interação social constituem a tríade que caracteriza o TEA e dependendo do grau de acometimento é comum encontrar também nestes e de forma geral em indivíduos com transtornos de neurodesenvolvimento problemas atencionais, de aprendizado e memória. O quadro inflamatório no período de gestação causa uma série de alterações no organismo materno, sendo que algumas destas alterações alcançam o feto em desenvolvimento. Uma destas alterações pode ser a redução no conteúdo de melatonina na circulação materna e fetal. A melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal, apresenta funções sincronizadora, antioxidante e neuroprotetora que podem ser importantes durante o neurodesenvolvimento e a alteração na síntese e liberação desse hormônio no organismo materno ao longo da gestação vem sendo correlacionada a casos de TEA. Além disso, a exposição ao LPS durante o desenvolvimento do SNC em um modelo animal resulta em uma prole que apresenta comportamentos autísticos. Apesar destes dados, os efeitos desse quadro pré-natal no comportamento, na morfologia e na neuroquímica de áreas encefálicas da prole ainda não foram totalmente esclarecidos e sua elucidação pode contribuir como base de conhecimento para estudos que investiguem prevenção e terapias farmacológicas ou comportamentais nessas patologias. O presente trabalho teve como objetivos verificar se o quadro inflamatório pré-natal induzido por LPS: 1) Altera a concentração plasmática de melatonina materna, 2) altera a expressão de comportamentos que dependem da função de memória espacial e 3) induz mudanças morfométricas e neuroquímicas no hipocampo. Para atingir o primeiro objetivo foi coletado o sangue de ratas prenhe 3 h (fase de claro) e 16 h (fase de escuro) após à exposição ao LPS ou a solução salina e a dosagem de melatonina foi realizada por meio do método ELISA. Para alcançarmos o

segundo e terceiro objetivos as proles de ratas expostas ao LPS e de ratas controles expostas a solução salina no dia gestacional 9,5 foram avaliadas por meio de teste comportamental de alternância espontânea no labirinto em T. Em seguida, os animais foram perfundidos e os encéfalos processados para o estudo do volume hipocampal por estereologia, para análise de expressão neuronal das proteínas ligantes de cálcio calretinina e parvalbumina e para análise de expressão glial da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e da proteína de associação de ligação ao cálcio ionizada – 1 (IBA-1) por meio da técnica de imunohistoquímica. Os resultados mostraram que houve queda no conteúdo plasmático de melatonina noturno e aumento no conteúdo diurno após injeção com LPS nas fêmeas prenhes. A prole do grupo controle apresentou melhor desempenho no teste comportamental quando comparado a prole do grupo LPS. O hipocampo da prole do grupo LPS não apresentou diferença de volume total do desta estrutura em comparação ao grupo controle. Também não houve alteração na expressão de GFAP em astrócitos hipocampais no grupo LPS em relação ao controle. Por outro lado, ocorreu aumento na expressão de IBA-1, marcador de microglia, nas regiões do CA1, CA2 e CA3 no hipocampo da prole do grupo LPS em relação a prole do grupo controle. A prole do grupo LPS, considerada um modelo animal de autismo também apresentou variações na expressão das proteínas ligantes de Cálcio no hipocampo com menor expressão da proteína parvalbumina e maior expressão da proteína calretinina que o grupo controle. Os resultados mostraram que a exposição materna ao LPS foi capaz de alterar a concentração de melatonina plasmática circulante e que a prole exposta a esse ambiente inflamatório pré-natal apresentou alterações de comportamento dependente da memória espacial. Além disso, os resultados nos permitem concluir que tais alterações na memória espacial não são coincidentes com alterações no volume do hipocampo ou na reatividade astrocitária, mas sim com a ativação microglial e com alterações na neuroquímica dos neurônios gabaérgicos hipocampais que expressam as proteínas ligantes de cálcio e que conhecidamente controlam as conexões excitatórias e inibitórias envolvidas nos fenômenos de memória.

Palavras-chave: Autismo. Aprendizagem. Hipocampo. Neurodesenvolvimento. Neuroinflamação.

ABSTRACT

Immune reactions generated in the maternal organism during the gestational period may cause changes in the fetal development. The endotoxin lipopolysaccharide (LPS) present on the wall of Gram-negative bacteria is able to induce the production of cytokines, mimicking a state of prenatal inflammation when administered in the pregnant female during the gestational period. The offspring of pregnant rats exposed to this endotoxin may present several behavioral and/or cognitive problems that reflect changes in the central nervous system (CNS). The autism spectrum disorder (ASD) is one of these neurodevelopmental conditions, and although without a definite cause in humans, is related to be present in one to every 150 children born. Behavior and communication/social interaction disorders constitute the dyad that characterizes the ASD. Besides these, depending on the degree of involvement it is common to find in these individuals' attention, learning and memory problems. Melatonin, a hormone produced by the pineal gland, presents several functions during neurodevelopment and the alteration in the synthesis and release of this hormone in the maternal organism throughout pregnancy has been correlated to cases of ASD. Investigations about the effects of a prenatal inflammatory condition in behavior, in the morphology and neurochemistry of brain areas can contribute for future pharmacological or behavioral studies in these patients. Considering that exposure to LPS during the development of CNS in an animal model results in offspring presenting autistic behaviors, the present work aimed to check whether the prenatal inflammatory condition: 1) Changes the maternal melatonin plasma concentration, 2) alters behaviors that depend on the spatial memory function and 3) induces morphometric and neurochemical changes in the hippocampus. For this, blood from pregnant rats 03h and 16h after LPS exposure was collected and the melatonin dosage was performed using the ELISA method. Offsprings of rats exposed to the LPS (autism model) or saline (control) on the 9.5 gestational day were evaluated in the T-maze spontaneous alternation test. After, the animals were perfused with 4% paraformaldehyde and the brains were processed for the hippocampal volume quantification and for the analysis of the calretinin, parvalbumin, glial fibrillary acidprotein (GFAP) and ionized calcium binding association protein – 1 (IBA-1) expression by immunohistochemistry. There was difference in the plasma melatonin dosage in the day and night periods of the pregnant females of the control group and the LPS group. The results showed that the control group presented better performance in behavioral testing when compared to the autism model. The hippocampal volume showed no difference between the groups, as well as the expression of the GFAP in astrocytes. There was an increase in IBA-1

expression in all regions of the hippocampus except in the dentate gyrus in the autism model group in relation to the control group. The autism model presented lower expression of the parvalbumin and greater expression of de calretinin than the control group. The results showed that maternal exposure to LPS was able to alter maternal plasma melatonin concentration and that the offspring exposed to prenatal inflammatory environment showed deficits in behaviors dependent of spatial memory and indicate that these behaviors deficits are not coincident with changes in the hippocampal volume or in astrocytic reactivity, but but with microglial activation and with changes in the calcium binding proteins expression in gabaergic neurons of the hippocampus which are known to control excitatory and inhibitory sinapses involved in the memory phenomena.

Key words: Autism. Learning .Hippocampus. Neurodevelopment. Neuroinflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	34
FIGURA 2	38
FIGURA 3	39
FIGURA 4	39
FIGURA 5	40
FIGURA 6	40
FIGURA 7	41
FIGURA 8	41
FIGURA 9	42
FIGURA 10	43
FIGURA 11	44
FIGURA 12	45
FIGURA 13	46
FIGURA 14	47
FIGURA 15	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA-NAT	Arilalquilamina-N-Acetil Transferase
ASMT	Acetil-Serotonina O-Metil -Transferase
CA1	Região 1 do corno de amon
CA2	Região 2 do corno de amon
CA3	Região 3 do corno de amon
CaBPS	Proteínas ligantes de cálcio
CID-10	Classificação internacional das doenças
CNTNAP2	Do inglês contactin associated protein like 2
CR-IR	Imuno reativo à calretinina
c11orf30	Gene responsável por codificar proteína EMSY
GD	Giro denteado
DG	Dia Gestacional
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DSM-IV	Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais IV
DSM-IV TR	Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais IV Revisado
DSM-III	Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais IV
DSM-5	Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais 5
FFC	Faculdade de Filosofia e Ciências
FMRP	Do inglês de fragile X mental retardation protein
FMR1	Do inglês fragile X mental retardation, gene que codifica proteína
FOXP-3	Fator de Transcrição para diferenciação de células T reguladoras (Forkhead Box 3)

GABA	Ácido gama-aminobutírico
GATA3	Fator de transcrição da célula Th2
GFAP	Proteína glial fibrilarácida
HIOMT	Hidroxi-Indol-O-Metil Transferase
HIV	Human Immunodeficiency Virus / SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida NIMH Instituto Nacional de Saúde Mental
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
H ₂ O _d	Água destilada
IBA-1	Proteína de associação de ligação ao cálcio ionizada -1
IL-1 β	Interleucina1beta
IL-6	Interleucina6
IL-13	Interleucina13
IL-17	Interleucina17
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MCP-1 α	Proteína quimioatrativa de monócitos α
MD-2	Proteína Mielóide diferenciadora 2
MECP2	Do inglês Methyl-CpG-binding protein 2, gene que codifica repressor de proteína ligante
MTHFR	Enzima metileno tetra hidrofolato redutase
mTOR	Do inglês Mammalian Target of Rapamycin
NaCl	Cloreto de sódio
NAS	N- Acetilserotonina
NFKB	Fator nuclear kB
NF1	Do inglês Neurofibromin 1
NK	Natural Killer
NLGN3	Do inglês neuroligin 3, gene codificante de proteína de superfície neuronal

NLGN4	Do inglês neuroligin 4, gene codificante de proteína de superfície neuronal
NRXN1	Do inglês neurexin 1, gene que codifica proteína da família das neuroxinas
PBS	Salinatamponada
PN	Pós-natal
PplyI-C	Ácido polirriboinosínico-polirribocitidílico
PTEN	Do inglês phosphatase and tensin homolog, gene suppressor tumoral
PV-IR	Imuno reativo à parvalbumina
RDoC	Critério de Domínio de Pesquisa
RNA	Ácido ribonucleico
RORyT	Fator de transcrição da célula Th17
SAL	Salina
SHANK3	Gene que codifica proteína de suporte
T-bet	Fator de transcrição da célula Th1
TEA	Transtorno do espectroautista
TGFβ1	Fator de transformação do crescimento beta 1
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
Th17	Linfócito T helper 17
TLR-4	Toll-like receptor4
TNF	Tumor Necrosis Factor, Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulador
TSC1	Complexo de esclerose tuberosa 1
TSC2	Complexo de esclerose tuberosa 2
δ-catenin	Delta catenin

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Autismo	18
2.2 Etiologia	21
2.3 Melatonina e TEA.....	23
2.4 Inflamação Pré-Natal.....	24
2.5 Modelos Animais	25
2.6 Lipopolissacarídeo	25
2.7 Hipocampo-morfologia e populações celulares.....	27
2.8 Ligantes de cálcio.....	30
3 JUSTIFICATIVA.....	30
4 OBJETIVO	31
4.1 Objetivos específicos.....	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Animais.....	31
5.2 Acasalamento.....	32
5.3 Divisões dos grupos	32
5.4 Teste Comportamental	33
5.5 Perfusão Transcardíaca.....	35
5.6 Dosagem de Melatonina.....	35
5.7 Coloração de Nissl	36
5.8 Estereologia	36
5.9 Imuno-histoquímica- Imunoperoxidase	37
5.10 Análise Microscópica.....	37
5.11 Análise Morfológica e Quantitativa	38
6 RESULTADOS	38

7 DISCUSSÃO	48
8 CONCLUSÃO	56
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

O autismo, descrito em 1943 pelo médico austríaco Leo Kanner, caracteriza indivíduos que apresentam alterações no neurodesenvolvimento com consequentes prejuízos sociais, comportamentais, de comunicação e cognição (KANNER, 1943; RITVO et al., 1976; LANDRIGAN, 2010).

O Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação de Psiquiatria Americana (DSM-5) em 2013, estabeleceu mudanças nas classificações e nomenclaturas anteriormente propostas para o espectro. Na nova nomenclatura adotada como “Transtornos do Neurodesenvolvimento”, os transtornos que compunham o grupo dos transtornos globais do desenvolvimento foram agrupados em um único diagnóstico chamado de Transtorno do Espectro Autista (TEA) caracterizado agora por uma díade: a primeira relacionada ao comportamento e a segunda relacionada à comunicação/interação social (ARAÚJO; NETO, 2014; DSM-5, 2014).

Em 1966, surgem os primeiros dados epidemiológicos do TEA na Inglaterra com crianças entre 08 e 10 anos onde a prevalência foi de 4,5 casos para cada 10.000 crianças com maior acometimento em meninos (LOTTER, 1996; BRENTANI et al., 2013). Até a década de 80 o quadro ainda era considerado raro e entre os anos de 1992 até 2001 a prevalência relatada foi da ordem de 12 em 10.000 nascidos. Com o passar dos anos, esses dados foram aumentando significativamente para uma em cada 150 crianças, posteriormente uma em cada 88 crianças (GOMES et al., 2015), chegando atualmente nos Estados Unidos à uma estimativa de 1 a cada 68 crianças, com predominância de casos no sexo masculino (AUTISM AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES MONITORING NETWORK, 2009; BRUGHA et al., 2011; CONSTANTINO; MARRUS, 2017). No Brasil, em 2011, estimou-se uma prevalência 1:360 (PAULA et al., 2011).

O diagnóstico pode ser dado já nos primeiros anos de vida (VOLKMAR et al., 1994) o que contribui de maneira eficaz para a resposta terapêutica (SULLIVAN; STONE; DAWSON, 2014), já que intervenções precoces onde o tecido nervoso apresenta maior plasticidade resultam em melhor desenvolvimento das funções cognitivas, social e da linguagem (DAWSON et al., 2010; WALLACE; ROGERS, 2010; REICHOW, 2012).

A etiologia envolvida no TEA é de extrema complexidade e seus mecanismos ainda estão sendo desvendados (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004). Além de fatores genéticos, existe a possibilidade da influência de fatores ambientais, como ambiente inflamatório no

período pré-natal, em alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) e no sistema imune nesse quadro (NELSON; GREYER; CROEN, 2001; VARGAS et al., 2005; CHEZ et al., 2007). Diversos tipos de patógenos como o citomegalovírus, o HIV, a rubéola, a hepatite *Treponema pallidum*, vírus herpes simples, o *Trypanosomacruzi* e *Toxoplasma gondii* podem, ao se instalar na mãe, transpor a barreira placentária e via transmissão vertical infectar o feto, prejudicando o desenvolvimento embrionário (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007).

Tais alterações no neurodesenvolvimento do feto podem afetar áreas encefálicas que controlam comportamentos como interação social, comunicação e aprendizagem resultando assim na expressão dos chamados comportamentos autísticos (KRIGGER, 2006; DSM-5, 2014). Além disso, alterações em áreas encefálicas envolvidas no controle da ritmicidade biológica como o hipotálamo e a glândula pineal podem acrescentar nesse quadro, uma característica frequente no TEA que é o distúrbio de sono (FADINI et al., 2015; ZUCULO et al., 2017).

Um dos principais marcadores da ritmicidade biológica circadiana é o hormônio melatonina, produzido pela glândula pineal na fase de escuro. Este hormônio que exerce uma série de funções em nosso organismo como indução do sono, neuroproteção, função antioxidante, controle da temperatura corporal, controle imunológico, função como antidepressivo, cardioprotetor e sincronizador de ritmos biológicos (ARENDRT, 2005; PINATO et al., 2015; ZUCULO et al., 2017). Vários estudos estabelecem uma relação entre os níveis de melatonina e o TEA visto que esses indivíduos apresentam baixas concentrações nesse hormônio (BRAAM et al., 2018; JIN et al., 2018). A concentração de melatonina no organismo materno durante a gestação também vem sendo estudada e há estudos que associam baixos níveis de melatonina materna com o TEA (TORDJMAN et al., 2005; BRAAM et al., 2018).

As terapias farmacológicas ou comportamentais para o TEA se baseiam no entendimento sobre os mecanismos envolvidos nas causas e nas consequências dos transtornos do neurodesenvolvimento. Assim, com o propósito de proporcionar uma melhor compreensão dos complexos mecanismos envolvidos no TEA, a utilização de modelos animais experimentais torna-se uma ferramenta importante. Um dos modelos já validados de animais que expressam comportamentos autísticos envolve a exposição de ratas prenhes a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas (LIMA et al., 2011).

A injeção de LPS em uma determinada fase gestacional ativa o sistema imunológico da fêmea prenhe e a produção de citocinas, mimetizando dessa forma um quadro de inflamação/infecção pré-natal (KIRSTEN, 2012) comprometendo o neurodesenvolvimento do feto (BURD; BALAKRISHNAN; KANNAN, 2012). Ao analisar o comportamento da prole desses animais, foram observadas alterações na interação social demonstrada por meio do comportamento de brincar e na relação mãe-filho, além de alterações na atividade exploratória, no medo e na aprendizagem, com características similares as apresentadas no TEA (TARICANO, 2010; KIRSTEN, 2012; BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012).

Tais mudanças comportamentais podem advir de alterações morfológicas em diferentes áreas encefálicas (PIVEN et al., 1998). Dentre estas áreas que podem estar envolvidas na expressão dos chamados comportamentos autísticos, encontra-se o hipocampo relacionado a funções de aprendizado e a memória (BUGALHO; CORREA; VIANA-BAPTISTA, 2006; ZHAO; DENG; GAGEF, 2008; FERREIRA, 2011; CAMPOS; CRUZ-RIZZOLO; PINATO, 2015). Essa estrutura estabelece conexões com diversas áreas encefálicas a fim de proporcionar uma resposta integrada para melhor relação do indivíduo com o meio que o cerca. Mudanças no volume, morfologia, aumento no número e na densidade dos neurônios (PIVEN et al., 1998; MACHADO et al., 2003; EDALATMANESH et al., 2013), diminuição no tamanho e número dos neurônios (AYLWARD et al., 1999) e aumento na ativação das células da glia hipocampais já foram demonstradas em indivíduos com TEA (PETRELLI; PUCCI; BEZZI, 2015; TAKANO, 2015). Tais alterações sugerem que alterações morfológicas e neuroquímicas no hipocampo podem estar associadas a possíveis alterações de memória e outras funções hipocampais no TEA e ressaltam a importância de se investigar os mecanismos envolvidos na expressão desses comportamentos em um modelo animal que apresenta comportamentos autísticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AUTISMO

O termo autismo foi utilizado pela primeira vez em 1911 por Bleuer para designar a perda do contato com a realidade que dessa maneira, gerava dificuldades e até mesmo impossibilidade de comunicação (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004). Kanner, em 1943, e Asperger, em 1944, caracterizaram como autistas indivíduos que apresentavam alterações no

neurodesenvolvimento com prejuízos sociais, comportamentais, de comunicação e cognição (KANNER, 1943). Ambos identificaram que estas crianças não possuíam interesse no contato social, apresentavam estereotipia de movimentos e alterações na linguagem (KANNER, 1943; RORIZ; CANIÇO, 2016).

Atualmente reconhece-se dentre as características apresentadas por indivíduos com TEA alterações na comunicação/interação social, resistência/rigidez a mudanças em suas rotinas diárias, comportamentos restritivo/repetitivos, inflexibilidade cognitiva, déficits ou até mesmo ausência de reciprocidade emocional, apego a objetos, ausência de medo frente a situações de risco iminente, risos e movimentação inapropriada quanto às situações, sensibilidade exacerbada ao toque ou estímulos sonoros, falta de contato visual, hiperatividade e comportamento arredo (GOMES et al., 2015; SILVA et al., 2017).

Estudos sobre a biologia do TEA demonstraram alterações em densidade celular, volume e morfologia de estruturas encefálicas como do hipocampo, amígdala, córtex, cerebelo (COURCHESNE, 1994; BAUMAN; KEMPER, 2005) corpo caloso, tálamo, núcleos da base (COURCHESNE et al., 1991; HASHIMOTO et al., 1992; LAINHART, 2006). Além das alterações em substância branca ou cinzenta, alterações no padrão de fluxo sanguíneo e conectividade na comunicação entre os neurônios podem limitar o fluxo de informações entre tais estruturas, o que corrobora com manifestações clínicas como as disfunções sócio-emocionais, alterações motoras e de linguagem (COURCHESNE et al., 2011; SABERS et al., 2014; VERLY et al., 2014; LIN et al., 2017; YENKOYAN et al., 2017).

Estes e outros estudos sobre o desenvolvimento normal e atípico do SNC morfológica e funcionalmente possibilitam a melhor compreensão para o plano de intervenção que visa contribuir para que o indivíduo compreenda e responda as demandas e assim possa interagir com o ambiente ao seu redor (FERNANDES et al., 2011; BANG; NADIG, 2015). Dentre as alterações funcionais encontradas no TEA estão as relacionadas às funções executivas que interferem no comportamento e na cognição. Prejuízos nessas funções acarretam déficits envolvendo o planejar, atenção e a flexibilidade cognitiva que se refletem na interação social, comunicação e comportamento repetitivo/restritivo (CZERMAINSKI, 2012; CZERMAINSKI; BOSA; SALLES, 2013). Funções executivas são definidas como processos cognitivos que permitem ao indivíduo planejar e organizar-se frente a um ambiente em mudança contínua. Dentre as diversas funções designadas como executivas estão o planejamento, a fluência verbal, a memória de trabalho e componentes associados como a

memória espacial, a flexibilidade mental e a inibição a estímulos distratores (PELLICANO, 2010;GEURTS; VISSERS, 2012).

Dentre as funções cognitivas, destaca-se a memória, que compreende processos de aquisição, consolidação e evocação (IZQUIERDO et al., 1989) e é essencial para a capacidade de reter informações (MAHR; CSIBRA, 2017). A memória pode ser caracterizada como declarativa, de procedimento, associativa e não associativa ou quanto ao tempo, como memória de trabalho, de curta e de longa duração, todas dependentes da integralidade no funcionamento do hipocampo (IZQUIERDO et al., 2013).

O registro de informações que obtemos ao longo do tempo e que fica armazenado por meio da aprendizagem segue um percurso que se inicia pela obtenção das informações a partir da memória de trabalho, a qual se correlaciona com as funções executivas, constituindo um sistema de armazenamento de informações temporárias que possibilita a manipulação de um volume de informações necessárias para que o indivíduo possa tomar decisões e realizar as ações presentes. A memória de trabalho é, portanto uma função importante para processos cognitivos complexos como compreensão, raciocínio e aprendizagem (BADDELEY, 2012; IZQUIERDO et al., 2013; SOUSA; SALGADO, 2015). De acordo com sua intensidade e repetição, forma-se a memória de curta duração e dessa a de longa duração (PINTO, 2001). Esse percurso é influenciado por diversos fatores como ambiente, emoções, sono, humor, importância e repetição da informação (ATKINSON; SHIFFRIN, 1968).

A memória espacial é classificada como do tipo declarativa episódica e seu papel resume-se em permitir ao indivíduo se situar no tempo e espaço mediante a recuperação de informações obtidas via o uso de sua capacidade de codificar e armazenar informações (ROSENBAUM et al., 2012; DRUZIAN, 2013). Isto permite a orientação do indivíduo no espaço que o cerca, o aprendizado de novos caminhos e a lembrança da localização de objetos vistos previamente (SANDERSON; BANNERMAN, 2012). Do ponto de vista evolutivo, esse tipo de memória é importante para os animais, pois permite a integração deste com o ambiente que o cerca tanto na relação com a busca por alimento quanto com os outros animais (ROSSATO et al., 2006; FOSTER; DEFAZIO; BIZON, 2012). O funcionamento normal dessa memória permite que o animal consiga explorar o ambiente sem retornar a locais já previamente explorados evitando assim desperdiçar tempo desnecessário nessas atividades (SANDERSON; BANNERMAN, 2012).

2.2 ETIOLOGIA

Várias hipóteses foram levantadas para as bases etiológicas do TEA. A primeira teoria proposta era uma visão psicogenética onde se avaliava o comportamento materno e correlacionava-se o distanciamento da mãe coma sintomatologia apresentada pelo filho (KANNER, 1943; KANNER; EISENBERG, 1956). Posteriormente surgiram novas teorias considerando-se as bases neurobiológicas (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004; PARELLADA et al., 2014) e atualmente considera-se que a complexa etiologia envolvida no TEA envolve fatores genéticos e ambientais (VARGAS et al., 2005; CHEZ et al., 2007; HERBERT, 2010; KIRSTEN; BERNARDI, 2017; YENKOYAN et al., 2017).

O fator genético não pode ser descartado na busca pelo entendimento da etiologia do TEA já que famílias que apresentam casos entre seus membros estão mais suscetíveis a apresentar nas gerações futuras, indivíduos com TEA (YOO, 2015). Mutações em genes que alteram o funcionamento sináptico como o NLGN3/4, NRXN1 e SHANK3 por codificarem moléculas que atuam na maturação das sinapses estão associadas ao TEA (KIM et al., 2008). O CNTNAP2 que codifica proteína de adesão neuronal agindo durante o desenvolvimento na interação entre as células da glia e os neurônios (VERNES et al., 2008) e o δ -catenin que codifica uma proteína de adesão regulada por cálcio que atua na regulação sináptica de processos como aprendizado e emoções também estão alterados tanto em indivíduos com TEA quanto em seus familiares (JOHNSON; MYERS, 2007; LIU et al., 2011; GUO et al., 2011; TURNER et al., 2015; CHEN et al., 2015; ESPARHAM et al., 2015; LU et al., 2016).

Além disso, a supressão de genes como o PTEN leva a alterações no crescimento e proliferação celular que resultam em alterações morfológicas e comportamentais associados ao TEA (KWON et al., 2006). Outros genes supressores que regulam crescimento celular, autofagia, atividade sináptica e expressão gênica como o mTOR, TSC1/2 e NF1 também estão dentre os genes correlacionados aos sintomas do TEA (VAROQUEAUX et al., 2006; BOURGERON, 2009; SPINELLI et al., 2015; SATO, 2016).

Além dos genes suscitados que apresentam correlação com o quadro do TEA, existem outros genes cuja expressão pode estar alterada no TEA resultando em sintomas secundários como é o caso do gene responsável por codificar a enzima ASMT (acetil-serotonina O-metil-transferase) que atua na via de síntese da melatonina. Mutações nesse gene apresentam correlação com comportamentos autísticos como déficit na interação social (MELKE et al., 2008; JONSSON et al., 2014).

O fator ambiental deve também estar envolvido na gênese do TEA quer seja por alterações no neurodesenvolvimento ou por mecanismos epigenéticos (HALL; KELLEY, 2014). Ainda, a relação entre o microbioma do intestino e o cérebro aponta para a participação da microbiota materna e da prole em mecanismos de ativação de proteínas, expressão gênica e produção e liberação de neurotransmissores como ácido propanóico, que alteram o neurodesenvolvimento e o funcionamento do SNC, como já demonstrado em modelos animais de autismo (BUFFINGTON et al., 2016; CENIT; SANZ; CODONER-FRANCH, 2017; LI et al., 2017; NITHIANANTHARAJAH et al., 2017; NEEDHAM; TANG; WU, 2018).

O ambiente neuroinflamatório pré-natal desencadeado por alteração no sistema imunológico materno resulta em transtornos do neurodesenvolvimento (GARAY et al., 2013). A ativação imune-materna durante o período gestacional apresenta uma forte relação entre a produção excessiva de citocinas inflamatórias e suas consequentes interações com a homeostasia do organismo materno e subsequentemente com o desenvolvimento fetal. As alterações das citocinas maternas desencadeada por uma ativação imunológica da mãe frente a agente agressor é capaz de elevar os níveis de citocinas como é o caso da IL-1, IL-8, IL-6, TNF- α e essas citocinas ao transpassar a barreira placentária, interferem na expressão de citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-13, MCP-1 e MIP1 α no organismo fetal afetando o neurodesenvolvimento (GARAY et al., 2013).

Os mecanismos envolvidos na resposta ao quadro inflamatório no período pré-natal, ainda estão sendo desvendados. Sabe-se que o processo neuroinflamatório presente no TEA leva a ativação das células da glia e a produção de moléculas como MCP-1, IL-6 e TGF β 1 que acabam por alterar também o funcionamento dos neurônios (ONORE; CAREAGA; ESHWOOD, 2012; EDMONSON; ZIATS; RENNERT, 2016).

Tanto os fatores genéticos como os ambientais envolvem mecanismos que incluem alterações na migração e no posicionamento adequado dos neurônios na região do córtex cerebral durante o neurodesenvolvimento, alterações nas conexões entre diferentes áreas encefálicas (LI; ZOU; BROWN, 2012; WANG et al., 2014) e alterações nas sinapses (na morfologia dos dendritos e nos níveis de neurotransmissores como GABA e o glutamato). Além disso, alterações no padrão de resposta imunológica do TEA influenciariam na comunicação entre neurônios, e na neuroplasticidade ao longo do neurodesenvolvimento (MEAD; ASWOOD, 2015). Tais alterações contribuiriam para as alterações neurofuncionais presentes no TEA causando desequilíbrio entre os processos de excitação e inibição neuronal

(TANG et al., 2013; ESSA et al., 2013; EL-ANSARY; AL- AYADHI, 2014) como as disfunções do sistema de neurônios-espelho localizados em áreas como o córtex pré-motor, lobo parietal, insula e o córtex cingulado anterior, responsáveis pelo reconhecimento de ações e intenções de outras pessoas (OBERMANN et al., 2005; PERKINS et al., 2010; ENTICOTT et al., 2012; YENKOYAN et al., 2017).

2.3 MELATONIA E TEA

Melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal e também poder ser sintetizada em outras áreas extra-pineais em caso de injúrias ao organismo, atuando como indutora do sono e participando do controle do ritmo circadiano (PINATO et al., 2015; BRAAM et al., 2018). Possui ainda efeito antioxidante (ASGHARI et al., 2016), atua durante o neurodesenvolvimento na plasticidade das sinapses em formação e na formação de redes de dendritos no hipocampo (JONSSON et al., 2010; TORDJMAN et al., 2013; DOMINGUEZ-ALONSO, VALDÉS-TOVAR, SOLIS-CHAGOYAN E BENÍTEZ-KING, 2015). Dentre os grupos neuronais alvos de influências da melatonina estão os neurônios dopaminérgicos vinculados a funções tanto cognitivas quanto motoras (KONG et al., 2008). Outras funções atribuídas a melatonina são seu efeito cardioprotetor, controle dos períodos de fertilidade em animais, ações na melhora de quadros de ansiedade e na atividade do sistema imunológico (MACCHI; BRUCE, 2004).

Sua síntese tem início a partir do triptofano que é convertido em serotonina na glândula pineal (ARENDDT, 2005). Na sequência, a serotonina é convertida em N-acetilserotonina (NAS) em uma reação de acetilação mediada pela enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT) e posteriormente a NAS é convertida em melatonina por meio de uma reação de metilação mediada pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) (SIMONNEAU; RIBELAYGA, 2003). Na regulação de sua síntese, o ciclo claro/escuro é o fator principal, pois determina o ritmo circadiano de produção e liberação desse hormônio. O mecanismo pelo qual a informação fótica controla a síntese de melatonina envolve o núcleo supraquiasmático (NSQ), principal oscilador endógeno circadiano (CAGNACCI; ELLIOTT; YEN, 1992; SIMONNEAU; RIBELAYGA, 2003). O ciclo claro/escuro controla a síntese de melatonina na glândula pineal a partir de uma via polissináptica que tem início nos neurônios ganglionares da retina os quais estão conectados com o NSQ via trato retino-hipotalâmico (fibras glutamatérgicas). A partir do NSQ emergem projeções (inibitórias gabaérgicas) para o

núcleo paraventricular para na sequência se ligar à coluna intermediolateral da medula espinal em neurônios pré-ganglionares simpáticos. Na sequência esses neurônios irão se conectar aos neurônios pós-ganglionares simpáticos do gânglio cervical superior que enviam fibras noradrenérgicas para a pineal agindo em receptores β -1 desencadeando alterações em vias de sinalização intracelular nos pinealócitos. Assim, na ausência de luz, a síntese de melatonina é induzida pela liberação da noradrenalina e a presença da luz inibe esta via. Após sua síntese, esse hormônio é liberado na corrente sanguínea e diretamente no líquido e assim pode percorrer todo o organismo inclusive o sistema nervoso central (SIMONNEAU; RIBELAYGA, 2003; NETO; CASTRO, 2008; BRAAM et al., 2018). Vários estudos mostram que parte dos indivíduos com TEA apresentam baixos níveis de melatonina com relação entre o nível de melatonina e a gravidade do quadro (TORDJMAN et al., 2005; FIDELEFF et al., 2006; FADINI, 2013).

2.4 INFLAMAÇÃO PRÉ-NATAL

Patologias associadas às fases pré, peri e pós-natal podem acarretar alterações no neurodesenvolvimento (KRIGGER, 2006). Durante a fase pré-natal, a exposição materna à diversas condições como citomegalovírus, o HIV, a rubéola, a hepatite, a sífilis, o *Treponema pallidum*, vírus herpes simples, o *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*, pode alterar a homeostase desse organismo, e por meio de transmissão vertical via hematogênica, comprometer o desenvolvimento embrionário incluindo o SNC (REDDIHOUGH; COLLINS, 2003; FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007; DUBEY; JONES, 2008; COSTA et al., 2013).

Além dos processos infecciosos, outros quadros como a ingestão de fármacos, fatores emocionais e nutricionais da mãe podem alterar o ambiente intrauterino e o desenvolvimento do feto (ZHANG et al., 2005; SMITH et al., 2007). Em resposta a um agente agressor, o organismo materno produz citocinas e glicocorticóides (PARKER-ATHILL; TAN, 2010; WATANABE et al., 2014) que compõem a resposta imune materna e favorecem alterações morfofuncionais em diversos órgãos do feto incluindo o SNC (MANCINI et al., 2002; MELO et al., 2006; RONOVSKY et al., 2016).

2.5 MODELOS ANIMAIS

A utilização de modelos animais tem permitido o estudo dos mecanismos envolvidos nas causas e consequências de diferentes patologias incluindo o TEA. Dentre esses, modelos alterados geneticamente que expressam déficits na interação social, comportamento restritivo e repetitivo (YOO et al., 2014), modelos animais cujos fatores ambientais determinam a expressão de características autísticas (REYNOLDS; URRUELA; DEVINE, 2013), modelos com alterações neuroendócrinas no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (FRYE; LLANEZA, 2010) e modelos voltados para o entendimento do papel da ativação imune materna que acabam por mimetizar quadros de infecção e inflamação pré-natal e suas consequências para o neurodesenvolvimento fetal (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012). Entre esses modelos, os mais utilizados são os modelos nos quais as fêmeas prenhes são injetadas com o vírus influenza, ácido poliinosínico-policitidílico (PolyI:C), lipopolissacarídeo (LPS) e o ácido valpróico (BOSKA, 2010; REISINGER et al., 2015; NICOLINI; FAHNESTOCK, 2018).

2.6 LIPOPOLISSACARÍDEO

O lipopolissarídeo (LPS) é uma endotoxina presente na parede das bactérias gram-negativas, obtido mediante extração fenólica (DAMMANN; O'SHEA, 2008) e comumente utilizado na experimentação animal por ser capaz de ativar o sistema imunológico do organismo (LEVITON; DAMMANN; DURUM, 2005). Ao atuar em receptores do tipo Toll-like receptor 4 (TLR-4) desencadeia mecanismos intracelulares responsáveis por ativar o fator de transcrição NF κ B (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, 2010_a; 2010_b) que por sua vez ativa a transdução de citocinas inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) e o TNF- α (KIRSTEN, 2012; CHANDLER; ERNST, 2017).

Assim, o LPS que em situações normais não transpassa a barreira hematoencefálica, atinge o SNC de maneira indireta mediante a ativação imunológica e a consequente liberação de citocinas e de óxido nítrico (NO) o qual causa vasodilatação e facilita a passagem das citocinas para o SNC. Após sua produção, as citocinas são capazes de atingir o sistema nervoso por diferentes vias que acabam se inter-relacionando e assim comprometendo o neurodesenvolvimento (DUNN, 2006). Além disso, os órgãos circunventriculares, localizados

fora da barreira hematoencefálica são alvos diretos do LPS (O'SULLIVAN et al., 1988; DUNN,2006; KONSMAN et al., 2000; DANTZER, 2009; KIRSTEN, 2012).

Além de agir nos órgãos circunventriculares, o LPS, assim como as citocinas inflamatórias pode agir, da periferia para o SNC por meio do nervo vago (DUNN,2006) e ainda a produção de prostaglandinas pós LPS, interage com as células endoteliais levando ao aumento na produção de citocinas o que levaria esses mediadores inflamatórios lipossolúveis a transpor a barreira hematoencefálica e assim alterar o desenvolvimento fetal (KIRSTEN, 2012).

A placenta é uma estrutura que se desenvolve durante o processo gestacional, formada a partir das células que constituem o trofoblasto com funções como a comunicação materno-fetal, produção de hormônios para manutenção da gestação, proteção para o feto contra agentes invasores e também do próprio sistema imunológico materno formando dessa forma uma barreira (GRIGSBY, 2016) a qual o LPS não transpõe, porém, quando em contato com o sistema imune materno, este desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias que transpõem a barreira placentária e afetam o feto em desenvolvimento (URAKUBO et al., 2001;BURD; BALAKRISHNAN; KANNAN, 2012; WISCHHOF et al., 2015)

As citocinas em níveis fisiológicos, atuam em processos como plasticidade neuronal e sináptica, processos de aprendizado e memória, sono, senilidade, embriogênese, diferenciação e migração de células embrionárias, reações frente à enxertos e à administração de vacinas (DINARELLO, 2007). Quando produzidas em resposta a infecções ou antígenos, o aumento nos níveis dessas moléculas quebra a homeostasia do organismo resultando em desequilíbrio na ativação de eixos neuroendócrinos com manifestação de comportamento doentio caracterizado por falta de atenção, apatia, diminuição de comportamento exploratório e sexual, déficits na interação social, na aprendizagem e memória (DANTZER, 2008; KIRSTEN, 2012; YOUNG; DAVID; NUNZIO, 2014; PAN et al., 2017).

No que tange o desenvolvimento encefálico, uma das possíveis ações das citocinas no SNC é alterar a ação de neurotransmissores como GABA (ácido gama-aminobutírico), dopamina, serotonina, noradrenalina, acetilcolina e neuropeptídios em neurônios (DANTZER, 2007), além de estimular populações de células da glia, as quais podem elevar ainda mais os níveis de citocinas (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2012; HINES et al., 2013) provocando danos às células neuronais devido à liberação de produtos oxidativos (BURD; BALAKRISHNAN; KANNAN, 2012;ESPINOSA-OLIVA; DE PABLOS; HERRERA, 2013; PENATTI; SILVA, 2014).

Quanto ao efeito deste quadro no neurodesenvolvimento, ao analisar o comportamento da prole de fêmeas prenhes injetadas com LPS no dia gestacional 9,5 foram observadas alterações na interação social por meio do comportamento de brincar e da relação mãe-filho, alterações na atividade exploratória e no medo e diminuição nos mecanismos de aprendizagem, características estas presentes no TEA (TARICANO, 2010; KIRSTEN, 2012; BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012). Tais alterações comportamentais sugerem alterações em várias áreas encefálicas envolvidas na expressão dos chamados comportamentos autísticos (ZHAO; DENG; GAGEF, 2008; FERREIRA, 2011).

2.7 HIPOCAMPO- MORFOLOGIA e POPULAÇÕES CELULARES

O hipocampo, situado na porção medial do lobo temporal de cada hemisfério cerebral se estende ao longo do corno inferior dos ventrículos laterais e apresenta funções na modulação emocional, memória, memória associativa olfativa-espacial, aprendizagem espacial e comportamentos motivados (EICHENBAUM et al., 1999; BARRETO, 2016).

Estruturalmente, o hipocampo é constituído pelo giro denteado e pelo corno de amon(CA1,CA2 e CA3)(BARTSCH; WULFF, 2015). Durante o desenvolvimento, uma faixa contínua de neurônios responsáveis por originar tanto o CA quando o GD dobra-se sobre si mesmo e posteriormente resulta na formação das três camadas do arqueocórtex (TURNER et al., 1998). A região do CA é constituída por uma camada central denominada camada piramidal ou stratum pyramidale onde há o predomínio de neurônios piramidais cujos dendritos apicais formam o stratum radiatum e os basais formam o stratum oriens (TAVARES, 2006). O GD apresenta uma camada central denominada camada granulosa ou stratum granulosum, composta por neurônios granulares cujos dendritos apicais formam o stratum moleculare e os basais formam o hilus juntamente com interneurônios polimórficos(VANHOESEN; HYMAN, 1990). Ainda há o stratum lucidum formado pelos dendritos apicais das células piramidais da região de CA3 e o stratum lacunosum-moleculare, representado pelos dendritos distais das células granulares do GD (ALTMAN; BRUNNER; BAYER, 1973; CAMPOS; CRUZ-RIZZOLO; PINATO, 2015).

Funcionalmente os neurônios hipocampais são classificados em principais e interneurônios, sendo que os principais estabelecem sinapse com neurônios externos participando das vias de entrada e saída de informações (KNOWLES, 1992; KULLMANN, 2011) e os interneurônios estabelecem comunicação local, participando do controle e

modulação do fluxo interno de informações excitatórias e inibitórias (FREUND; BUZSÁKI, 1996).

Após o processamento das informações em diferentes áreas neocorticais, essas são encaminhadas até o hipocampo passando primeiramente pelo córtex entorrinal, que se divide em: córtex entorrinal mediano, associado a regiões de processamento espacial e córtex entorrinal lateral, associado a áreas de reconhecimento de objetos permitindo o influxo de informações para a aquisição visuo/espaco/temporal (KNIERIM, 2015). Os neurônios presentes no córtex entorrinal recebem essas informações e por meio de suas projeções as conduzem até as células granulares do GD as quais se projetam via fibras musgosas até as células piramidais da CA3 (KNIERIM, 2015). Na sequência essas informações são enviadas da CA3 via fibras colaterais de Schaffer para CA1 e desta ao subiculum (VIVAR; VAN-PRAAG, 2013).

Outras áreas corticais e subcorticais estabelecem conexões com o hipocampo, como o córtex peri-rinal e pós-rinal além das estruturas subcorticais como o septo medial, amígdala, locus coeruleus e núcleos da rafe (KNIERIM, 2015). Quanto às eferências hipocampais, as informações saem pelo fórnice por meio das projeções dos axônios dos neurônios presentes no subiculum e seguem para os corpos mamilares do hipotálamo enquanto axônios de CA1 e CA3 projetam-se para núcleos septais prosencefálicos, núcleo accumbens (estriado ventral), amígdala e córtex pré-frontal (GIGANTE, 2013; KNIERIM, 2015). Reciprocamente CA1 e o subiculum também se projetam ao córtex entorrinal (AMARAL; WITER, 1989; GIGANTE, 2013).

Além dos neurônios, as células da glia atuam na modulação das sinapses e no funcionamento do hipocampo. Dentre a população de células da glia do SNC distinguem-se dois tipos de astrócitos: os fibrosos, que apresentam prolongamentos mais longos e menos ramificados e são mais comuns na substância branca e os protoplasmáticos cujos prolongamentos são menores e com muitas ramificações e localizam-se principalmente na substância cinzenta (SOFRONIEW, 2009). Astrócitos participam do equilíbrio e a manutenção de íons e outras moléculas no ambiente extracelular, do controle/regulação do fluxo sanguíneo para o tecido nervoso, do suporte estrutural dos neurônios, da captação e fornecimento de metabólitos para prover energia aos neurônios, controle de fluídos e neurotransmissores, da plasticidade do tecido nervoso e das sinapses (SAFRONIEW, 2009; REICHENBACH; DEROUICHE; KIRCHHOFF, 2010).

Para possibilitar a identificação desse tipo celular usa-se um anticorpo para marcar a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (YANG; WANG, 2015) presente no citoplasma e com função estrutural na formação do citoesqueleto dos astrócitos (PEKNY; PEKNA, 2004).

Quando o tecido nervoso é alvo de injúrias, processos neurodegenerativos, processos inflamatórios ou alterações hemodinâmicas, essas células modificam sua morfologia e alteram a expressão de suas moléculas (SOFRONIEW, 2009). Nessa condição há o aumento na expressão do GFAP em astrócitos reativos que atuam isolando a lesão, controlando a proliferação de neurônios e o fluxo sanguíneo no tecido nervoso pós-trauma e dando suporte para o processo de mielinização (PEKNY; WILHELMSSON; PEKNA, 2014; BRENNER, 2014; HOL; PEKNY, 2015).

As microglias, além de atuar em processos de defesa exercendo função fagocítica, participam no refinamento e maturação das conexões sinápticas removendo sinapses mais fracas ou inativas, controlam processos de morte celular programada, proliferação celular e ainda apresentam um importante papel em processos inflamatórios oriundos de lesões ou injúrias ao tecido nervoso (KOYAMA; IKEGAYA, 2015; BILBO et al., 2018). Quando essas células detectam qualquer tipo de agressão ao tecido nervoso elas tornam-se ativadas expressando assim dois fenótipos conhecidos como M1 e M2. O primeiro, M1 é conhecido por induzir a produção de citoninas pró-inflamatórias e radicais livres como IL-1 β , TNF α e IL-6 (HOOGLAND et al., 2015; XU et al., 2017). Já M2 é conhecido por induzir o processo de reparação e remodelamento do tecido lesado (GLEZER; SIMARD; RIVEST, 2007). Sua caracterização é possível devido à proteína IBA-1 (proteína de associação de ligação ao cálcio ionizada – 1) (NORDEN et al., 2016). Estudos mostram que indivíduos com TEA apresentam microglias ativadas em diversas áreas encefálicas como córtex cerebral, giro cingulado anterior e cerebelo (SUZUKI et al., 2013; KOYAMA; IKEGAYA, 2015) além de apresentarem alterações em sua morfologia e densidade em áreas como a região do córtex pré-frontal região dorso-lateral (MORGAN et al., 2010). O conhecimento mais detalhado sobre a expressão da microglia em diferentes áreas encefálicas se faz importante para possibilitar uma melhor compreensão de sua função e relação com quadros que acometem o neurodesenvolvimento (SUZUKI et al., 2013).

2.8 LIGANTES DE CÁLCIO

As proteínas ligantes de cálcio (CaBPs), amplamente distribuídas ao longo do SNC, apresentam afinidade ao íon cálcio (Ca^{2+}) permitindo a sua passagem pela membrana celular e estão divididas no grupo das anexinas e das EF hand, do qual participam, dentre outras a, calbindina (CB), a calretinina (CR) e a parvalbumina (PV) que atuam na transmissão sináptica por meio do controle dos níveis de Ca^{2+} intracelular (SILVA, 2011; ALPAR et al., 2012; ZIMMERMANN et al., 2013). Assim as CaBPs por atuarem no tamponamento e transporte de Ca^{2+} estão relacionadas a fenômenos presentes em várias áreas do SNC como plasticidade, envelhecimento, atividade neuronal e a formação de memória (DEMEULEMEESTER et al., 1989; HOF et al., 1999). Nos neurônios hipocâmpais, a CB, CR e a PV estão localizadas em neurônios gabaérgicos (HOF et al., 1999; CAMP; WIJESINGHE, 2009), importantes nas alças inibitórias presentes nos processos de formação de memória (BAIMBRIDGE et al., 1992; GULYÁS et al., 1991). Alterações nos neurônios CaBPs-IR representam assim mudanças no sistema gabaérgico de interneurônios incidindo diretamente nas funções hipocâmpais (MIETTINEN et al., 1992; WOUTERLOOD et al., 2001).

3. JUSTIFICATIVA

O grupo de patologias que acometem o neurodesenvolvimento, incluindo o TEA apresenta grande incidência na população mundial. Embora os mecanismos envolvidos ainda não tenham sido totalmente elucidados, sabe-se que a exposição materna a processos inflamatórios e infecciosos durante a gestação está associada a tais distúrbios no feto. Nestes quadros inflamatórios o aumento dos níveis de citocinas causa uma série de alterações no organismo materno incluindo a diminuição na síntese de melatonina o que, devido a ampla gama de funções da melatonina pode agravar o quadro de problemas de neurodesenvolvimento da prole.

Entre as possíveis alterações comportamentais a serem encontradas na prole decorrentes deste quadro estão disfunções cognitivas como déficits na memória e nas habilidades que estão associadas a esse processo como é o caso da aprendizagem e da linguagem. Contudo essa condição e seus possíveis mecanismos ainda não estão esclarecidos devido à complexidade dos fenômenos envolvidos em sua gênese. A melhor compreensão

destes mecanismos pode advir de investigações comportamentais associadas a investigações da neuroquímica de áreas relacionadas.

Considerando a relação existente entre alterações morfofuncionais nas estruturas do SNC e os transtornos do desenvolvimento, esse estudo investigou a relação entre alterações morfológicas e neuroquímicas no hipocampo e comportamentos que dependem da memória espacial em um modelo animal que apresenta comportamentos autísticos.

4. OBJETIVO GERAL

Investigar a memória espacial por meio do comportamento intrínseco de alternar e aspectos morfológicos e neuroquímicos do hipocampo em modelo animal de autismo induzido pela exposição materna pré-natal ao LPS.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da injeção via intraperitoneal (i.p) de LPS na concentração de melatonina plasmática em ratas prenhes.

Analisar possíveis alterações no padrão de memória espacial da prole cuja rata prenhe foi exposta ao LPS durante o período gestacional e comparar com a prole do grupo controle.

Analisar possíveis alterações no volume hipocampal da prole cuja rata prenhe foi exposta ao LPS durante o período gestacional e comparar com a prole do grupo controle.

Analisar possíveis alterações nos padrões de expressão de Calretinina e Parvalbumina em neurônios e nos padrões de GFAP e IBA-1 em células da glia nas regiões de giro denteado, CA1, CA2 e CA3 da prole cuja rata prenhe foi exposta ao LPS durante o período gestacional em comparar ação com a prole do grupo controle.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Para formar os casais foram utilizados oito ratos machos e 16 fêmeas da espécie Wistar, provenientes dos biotérios de criação da Universidade de Marília (UNIMAR), Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), e Universidade Estadual Paulista (UNESP),

campus de Botucatu, com idade entre 14-17 semanas, sendo a média do peso desses animais de 256,5g. Os animais ficaram alojados no biotério de manutenção da FFC-UNESP, campus de Marília, em caixas de polipropileno com as seguintes dimensões: 38x32x16cm forradas com maravalha, com água filtrada e ração (Nuvilab) “*ad libitum*”, em salas com aeração e exaustão controladas, temperatura em 22° C e ciclo claro/escuro de 12/12horas.

Os experimentos seguem as normas estabelecidas pela Lei nº 11.794, de 2008, regulamentada pelo Decreto nº 6.899, de 2009. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética local, CEUA-FFC, proc. N.001/2016.

5.2 ACASALAMENTO

Para o acasalamento, os animais foram selecionados de forma que os machos(N=08) eram experientes e as fêmeas(N=16)não experientes. Dez casais foram colocados em caixas até o acasalamento detectado pela presença de espermatozoides por meio de esfregaço vaginal no qual o material coletado com cotonete umedecido em solução de cloreto de sódio a 0,9%, colocado em lâminas e analisado em microscopia óptica. Assim que foi detectada a presença de espermatozoides, este foi considerado o dia de gestação zero (DG 0) e a fêmea foi colocada em caixa individual até o nascimento dos filhotes (KIRSTEN, 2012; PACCOLA et al., 2013).

5.3 DIVISÃO DOS GRUPOS

As fêmeas prenhes (N=10) foram divididas em dois grupos: o grupo injetado com LPS (grupo LPS) (N=05) e o grupo injetado com salina (grupo controle) (N=05) de forma aleatória. No DG 9,5 de cada rata prenhe do grupo LPS, foi administrado por via intraperitoneal (i.p) 200µg/Kg de LPS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluído em solução salina 0,9% e o mesmo volume de salina (solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%) foi injetado (i.p) nas fêmeas no grupo controle. O dia no qual foi administrado o LPS corresponde ao período de neurulação, etapa importante processo de desenvolvimento do sistema nervoso embrionário em relação à migração e diferenciação das células nervosas (INOUE; NAKAMURA; OSUMI, 2001; KIRSTEN et al., 2012). Já a dose administrada foi fundamentada na literatura que refere que doses a partir de 100 µg/Kg promovem alterações nas vias endócrinas da rata prenhe, altera o tecido placentário e eleva os níveis de citocinas, além induzir alterações comportamentais da prole (KIRSTEN et al., 2012).

No primeiro dia pós-nascimento (PN1) os filhotes não foram manipulados para evitar um fator de estresse para a mãe que poderia levar ao infanticídio (KIRSTEN, 2012). No PN2 foi realizada a sexagem dos filhotes (SANTOS, 2002). As fêmeas das ninhadas foram descartadas e os machos (N=6 por ninhada) foram mantidos com a mãe. A escolha pela prole de machos foi devida a validação do modelo apenas em filhotes machos, os quais, nesse modelo apresentaram comportamentos autísticos (KIRSTEN, 2012).

Dois grupos de fêmeas prenhes (grupo LPS e grupo controle) foram utilizados exclusivamente para a coleta de sangue para dosagem de melatonina plasmática. Para isso, as ratas foram decapitadas no ZT 6 (fase de claro) e ZT18 (fase de escuro), o que representou um período de 3 horas e 15 horas respectivamente após a injeção i.p de salina ou LPS. Após a coleta, o sangue foi centrifugado e o sobrenadante foi congelado em -80°C até o momento das dosagens.

5.4 TESTE COMPORTAMENTAL

Para avaliação da memória espacial, foi utilizado o teste do labirinto em T (GERLAI, 1998). Nesse teste, foram utilizados 28 animais (14 animais do grupo LPS e 14 animais do grupo controle) provenientes de três ninhadas diferentes sendo utilizados seis animais de cada ninhada para evitar o “efeito ninhada” (PEREIRA; BERNARDI; GERARDIN, 2006).

O labirinto, confeccionado em acrílico de cor preta pela Sciencelabor[®], contém um braço “A” com 90 cm de comprimento e um braço “B” com 95 cm de comprimento, ambos conectados formando uma estrutura que se assemelha a um T. A 40 cm do início do braço “A”, havia uma porta guilhotina e esse local era considerado o braço inicial do teste. Após essa porta, havia mais 50 cm de comprimento para o animal percorrer até chegar ao local de escolha tendo acesso ao braço B. A distância entre as paredes laterais tanto no braço A quanto no B era de 15 cm e a altura dos braços era de 50 cm inibindo assim a possibilidade do animal sair do aparato do teste. O labirinto ficava sobre uma mesa a 75 cm de altura do chão, facilitando a ergonomia na hora de realizar o teste e o experimento foi realizado com luz de baixa intensidade (MORATO, 2006; KIRSTEN, 2012).

O peso de “linha de base” foi estabelecido avaliando-se o ganho de peso dos animais todos os dias a partir do PN 60 até que a variação não passasse de 10g ao longo de três dias. Este peso foi determinado como “linha de base”. Após essa “estabilização” do peso dos animais, foi realizada restrição na quantidade de ração ofertada (15 à 20g por dia) e o

monitoramento do peso todos os dias até que este se estabilizasse em 85% do peso estabelecido como linha de base (NERY, 2015).

Ao redor do PN 70 foi realizado o teste do labirinto em T adaptado, sempre no horário entre 13:00h e 15:00h (DEACON; RAWLINS, 2006; TIMOFEEVA et al., 2008). Inicialmente o animal foi colocado e mantido no braço de início por 10 segundos. Em seguida a porta guilhotina do braço A era aberta e o animal podia percorrer o labirinto até chegar ao ponto onde o braço A cruzava com braço B. Neste ponto o animal tinha que escolher entre o lado direito e o esquerdo do braço B sendo que na entrada para cada um desses lados havia uma porta basculante que mantínhamos aberta para permitir a entrada do animal. Feita a escolha, a porta era fechada e o animal permanecia confinado no lado do braço escolhido por 20 segundos e então era removido do local e colocado novamente no braço inicial (DEACON; RAWLINS, 2006). Esse processo foi realizado por dez vezes consecutivas e foi considerado que o animal alternou quando ele entrava com as quatro patas no lado do braço B em que ele não havia visitado anteriormente. Para excluir qualquer possibilidade de pistas olfativas, o aparato era limpo a cada tentativa realizada pelo animal com solução de hipoclorito 30% e álcool 70%. Todas as tentativas realizadas pelos animais foram filmadas e analisadas por um integrante do grupo que não teve acesso à identificação dos animais. Para nosso estudo foram avaliados o número de alternância e o tempo entre cada escolha realizada pelo animal.



Figura1. Labirinto em T utilizado para os testes de memória espacial e comportamento restrito/repetitivo.

5.5 PERFUSÃO TRANSCARDÍACA

Após a administração de 1mL do anestésico Rompum (solução com Acepromazina 1,8mL, Ketamina 4,5mL, Xylazina 4,5mL e H₂Od 7,2mL), aguardou-se o seu efeito e o grau de anestesia do animal foi verificado por teste de reflexo de aversão à dor com a deflexão da pata do animal quando pinçada.

Os animais (N=20, sendo 10 do grupo LPS e 10 do grupo salina) foram submetidos à perfusão transcárdica, para a qual foi realizada a exposição da região torácica do animal por incisão mediana no eixo axial. As costelas foram cortadas bilateralmente e a parede anterior da caixa torácica rebatida facilitando o acesso ao coração. Com a cavidade torácica exposta, a artéria aorta descendente do animal foi clampeada e foi realizada uma pequena incisão na parede do ventrículo esquerdo do coração, para inserção da cânula conectada a bomba de perfusão. A aurícula direita foi cortada para permitir extravasamento das soluções perfundidas, primeiramente salina 0,9% (200mL) e em seguida paraformaldeído 10% (400mL).

Ao final cada encéfalo foi retirado e colocado em solução de pós-fixação (25mL de paraformaldeído e 5g de sacarose) por 12 horas, e em seguida em solução crioprotetora contendo 25mL de PBS (Água destilada, Fosfato Monobásico, Fosfato Bibásico e Cloreto de Sódio pH 7,4) e 5g de sacarose, até o momento do congelamento e criosecção em cortes coronais de 30µm de espessura em criostato (Leica CM1850). Os cortes foram coletados em seis séries rostro-caudais e estocados em solução anti-congelamento (125mL de PBS, 125mL de H₂Od, 75g de sacarose e 125mL de etilenoglicol) à -20 °C.

5.6 DOSAGEM DE MELATONINA

A dosagem de melatonina plasmática foi realizada por meio da metodologia Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando-se kits comerciais e seguindo o protocolo indicado pelo fabricante (IBL, Alemanha). As concentrações de melatonina foram expressas em pg/mL.

5.7 COLORAÇÃO DE NISSL

Para a análise da citoarquitetura do hipocampo e as medidas de volume hipocampal, celular e análise morfológica, uma série de cortes encefálicos de cada animal foi lavada em PBS 0,1M pH 7,4 e montada em disposição rostro caudal em lâminas previamente gelatinizadas. Em seguida foi realizada a técnica de coloração em Nissl que consiste nas seguintes etapas: Desidratação, na qual o tecido passa por uma bateria de cinco diferentes concentrações de alcoóis, (95%, 95%, 100%, 100% e 100%, cinco minutos em cada um). A etapa seguinte é a diafanização onde o tecido passa por três baterias contendo em cada uma delas o solvente xilol (xilol I, xilol II e xilol III) permanecendo cinco minutos na primeira, dez minutos na segunda e dois minutos na terceira. Já na reidratação o tecido é submetido a uma nova bateria de sete diferentes concentrações de alcoóis (100%, 100%, 100%, 95%, 95%, 70%, 50%, dois minutos em cada um). Após dez mergulhos em H₂O_d, as lâminas foram mergulhadas por trinta segundos em solução contendo tionina 0,25% (200 mL de água destilada, 12 mL de ácido acético glacial, 1,44g de hidróxido de sódio e 2,5g de tionina), mergulhadas novamente dez vezes em H₂O_d e desidratadas em alcoóis (50%, 70% e 95%, três minutos em cada um), seguido por alcoóis (95%, 100%, 100% e 100%, três minutos em cada um). Após três minutos em xilol I e xilol II, as lâminas foram cobertas com lamínulas com meio de montagem DPX (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA).

5.8 ESTEREOLOGIA

Na análise de volume por estereologia considera-se a forma geométrica permitindo estimar com precisão parâmetros quantitativos de estruturas tridimensionais (OLIVEIRA, 2013). Entre os princípios utilizados nesta técnica está o de Cavalieri que permite estabelecer o volume total de uma estrutura a partir de cortes seriados, sem a necessidade de análise de todos os cortes (KAPLAN et al., 2015; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

Os cortes histológicos do hipocampo foram analisados pelo Prof. Dr. Roelf J. Cruz-Rizzolo, pesquisador da UNESP de Araçatuba, em um microscópio Zeiss Imager Z2 equipado com platina motorizada e câmera digital conectada a um computador executando o programa Stereo Investigator 10 (Microbrightfield, EUA). Para a quantificação estereológica do volume hipocampal foi utilizado o método de Cavalieri (WEST; SLOMIANKA; GUNDERSEN, 1991).

5.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA- IMUNOPEROXIDASE

Séries adjacentes de cortes encefálicos de cada animal (N=5 animais por grupo) foram processadas por imuno-histoquímica para as proteínas calretinina, parvalbumina e GFAP. Para isso foram utilizados anticorpos primários, anti-calretinina (1:7500), anti-parvalbumina (1:7500), anti-GFAP (1:2000) e anti-IBA-1 (1:300) diluídos em solução contendo 2% de soro normal de burro (NDS). Inicialmente os cortes encefálicos contendo o hipocampo foram lavados em tampão PBS 0,1 M pH 7,4 composta por, sódio fosfato dibásico (Labsynth, Brasil) sódio fosfato monobásico anidro (Labsynth, Brasil), cloreto de sódio (Labsynth, Brasil) e H₂O. Em seguida os cortes foram incubados em solução tampão PBS-TX (PBS + Triton X-100-Amresco, Solon, EUA) contendo 2% de soro normal (NDS). Após 1 hora foi adicionado o anticorpo primário por 48 horas à 4° C em agitação. Em seguida os cortes foram lavados em tampão PBS 0,1 M pH 7,4, e incubados em PBS-TX contendo anticorpo secundário biotilado específico para cada anticorpo primário diluído 1: 200 por 2 horas (CAMPOS et al., 2014). Na seqüência, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M pH 7,4, incubados por 90 min em solução contendo complexo avidina biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) e lavados novamente com tampão PBS (0,1 M; pH 7,4). A marcação foi revelada utilizando-se o cromógeno diaminobenzidinatetrahydroclorato (DAB) com metal cobalto como intensificador (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) diluído em 5 mL de água deionizada. Na seqüência, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados, deslipidificados e as lâminas foram cobertas com lamínulas com o DPX como meio de montagem (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Como anti-GFAP e anti-IBA-1 utilizados são conjugados ao anticorpo secundário fluorescente CY3, após a incubação do primário por 24 horas, os cortes foram lavados em PBS, montados, e as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando como meio de montagem o tampão glicerol.

5.10 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A análise dos cortes encefálicos foi realizada em microscopia de campo claro e fluorescente (microscópio *Nikon Eclipse E1000*, adaptado a câmera digital *CoolSNAP-Pro Color*, e microcomputador com *software Image-Pro®Plus* (Média Cybernetcs, Silver Spring, MA, Estado Unidos). Para a identificação da área encefálica foi utilizado o atlas *The Rat Brain Atlas* (PAXINOS; WATSON, 2006).

5.11 ANÁLISE MORFOLÓGICA E QUANTITATIVA

Neste trabalho, foi utilizado o software de processamento e análise de imagens digitais Image J (McMaster Biophotonics Facility, Canadá) para avaliação da densidade óptica e do número de células imunorreativas em cada grupo. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. A comparação de médias foi feita por teste “T” de Student no caso de comparação entre dois grupos ou por ANOVA quando foi realizada a comparação entre mais que dois grupos. O nível de significância adotado foi 5%.

6. RESULTADOS

A dosagem de melatonina no plasma nos períodos de dia e noite das fêmeas prenhes do grupo controle e do grupo LPS mostrou diferença estatística entre os grupos (Figura 2). A concentração de melatonina plasmática do grupo controle no período diurno é menor do que no período noturno ($P < 0,0001$). A concentração noturna de melatonina do grupo LPS foi menor que a do grupo controle noite ($P < 0,0001$) e a concentração diurna do grupo LPS foi maior que a do grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 2).

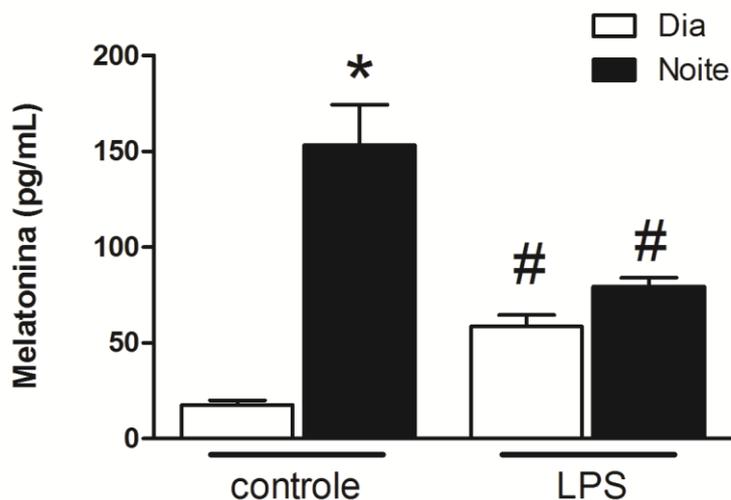


Figura 2. Gráfico comparativo de dosagem da concentração de melatonina plasmática (pg/mL) das fêmeas prenhes do grupo controle e do grupo LPS nas fases de claro (dia) e escuro (noite). N=10 por grupo, N=5 por ZT (dia ou noite).* significa dia \neq noite, $P < 0,0001$; # significa LPS \neq controle (dia $P < 0,05$, noite $P < 0,0001$).

O teste do labirinto em T mostrou que o grupo controle (salina) apresentou maior número de acertos em alternar o braço de escolha nas dez tentativas ($6,4 \pm 0,3$) quando comparado ao grupo modelo autismo (LPS) ($3,4 \pm 0,4$) ($P < 0,0001$) (Figura 3).

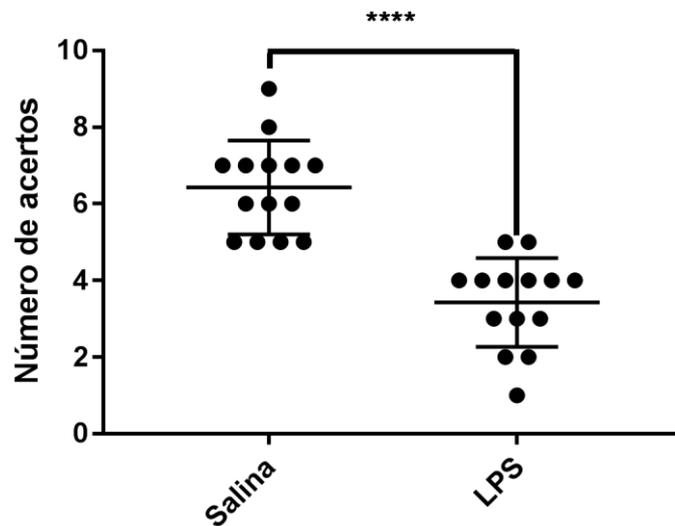


Figura 3. Gráfico comparativo do número de acertos entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS) no teste de alternância do labirinto em T. (**** $P < 0,0001$) (N=14 por grupo).

Não houve diferença ($P = 0,8449$) na média do tempo de escolha (em segundos) do braço a ser visitado em cada tentativa entre os animais do grupo controle (salina) ($38,9 \pm 3,1s$) e do grupo modelo autismo (LPS) ($39,9 \pm 3,6s$) (Figura 4).

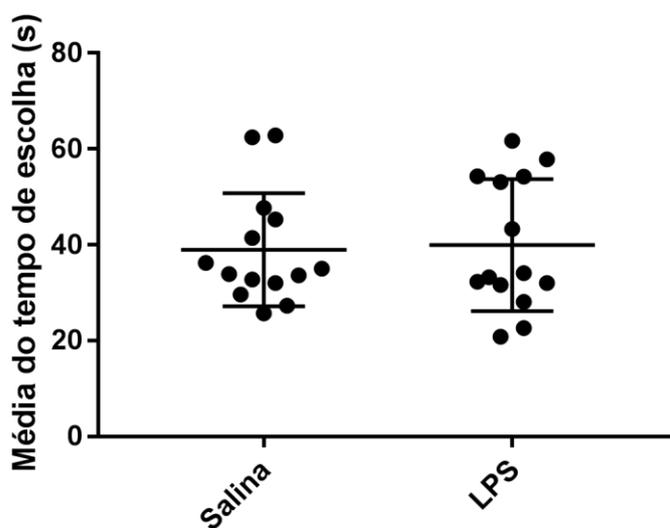


Figura 4. Gráfico comparativo do tempo de escolha em segundos entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS) no teste de alternância do labirinto em T. ($P = 0,8449$) (N=14 por grupo).

Não houve correlação entre o tempo (em segundos) para escolha do braço a ser visitado por cada animal e o número de acertos no teste de alternância espontânea no labirinto em T tanto no grupo controle (salina) ($P=0,209$) quanto no grupo modelo autismo (LPS) ($P=0,510$) (Figura 5).

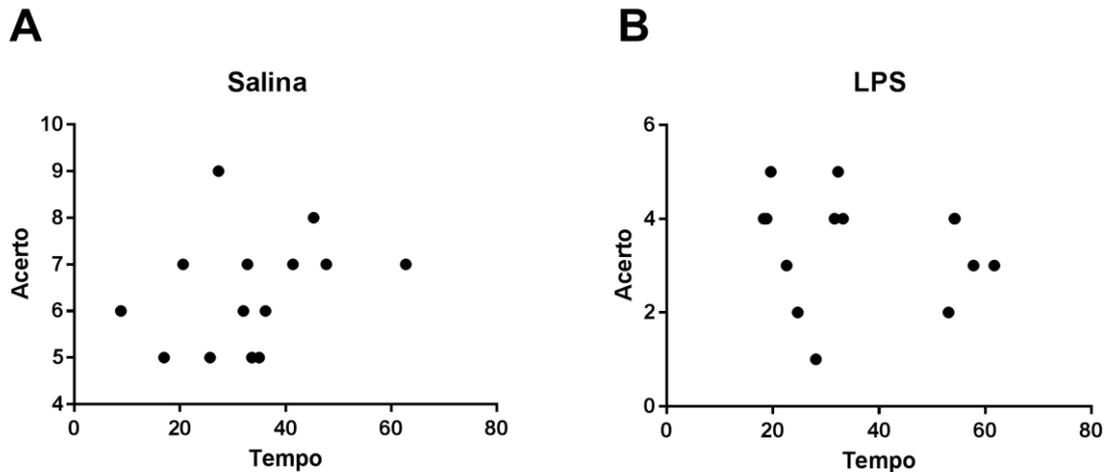


Figura 5. Gráfico de correlação entre o tempo médio gasto (em segundos) para escolha do braço a ser visitado por cada animal e o seu respectivo número de acertos. Em A, a correlação nos animais do grupo controle (salina) ($P=0,209$). Em B, a correlação nos animais do grupo modelo autismo (LPS) ($P=0,510$) no teste de alternância do labirinto em T. $N=14$ por grupo.

O número de acertos nas cinco primeiras escolhas no teste do labirinto em T do grupo controle (salina) foi maior ($3,2 \pm 0,1$) em comparação ao grupo modelo autismo (LPS) ($1,7 \pm 0,2$) ($P<0,0001$) (Figura 6).

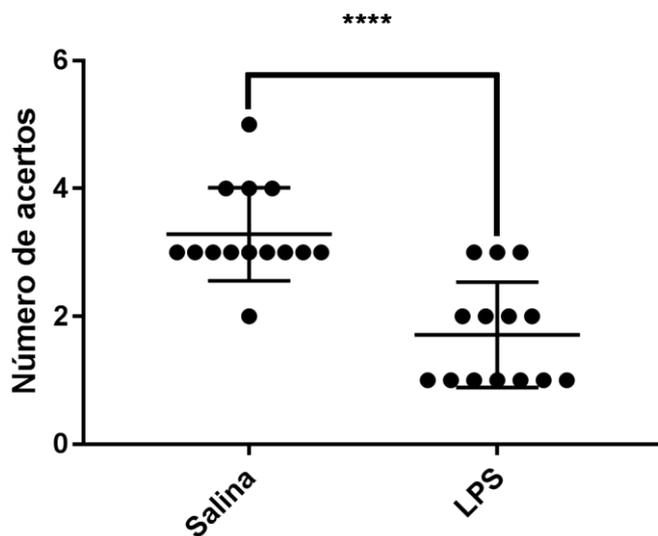


Figura 6. Gráfico comparativo do número de acertos nas cinco primeiras tentativas de escolhas no teste do labirinto em T entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS) no teste de alternância do labirinto em T. (**** $P<0,0001$) ($N=14$ por grupo).

Em relação às quatro últimas tentativas o grupo controle (salina) ($3,1 \pm 0,2$) obteve melhor desempenho quanto ao número de acertos em relação ao grupo modelo autismo (LPS) ($1,8 \pm 0,2$) ($P=0,0002$) (Figura 7).

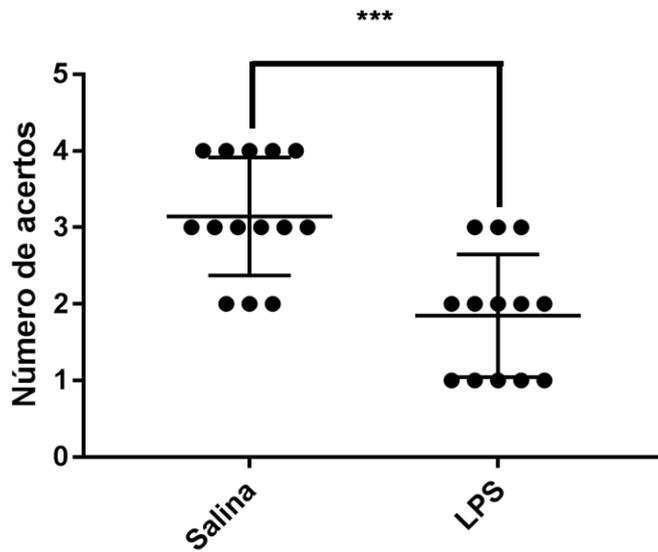


Figura 7. Gráfico comparativo do número de acertos nas quatro últimas tentativas de escolhas no teste do labirinto em T entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS) no teste de alternância. (** $P=0,0002$) ($N=14$ por grupo).

A medida do volume hipocampal mostrou que o grupo controle (salina) apresentou volume hipocampal de $24,1 \pm 0,5 \text{ mm}^3$ e o grupo modelo autismo (LPS) de $25,4 \text{ mm}^3 \pm 2,9 \text{ mm}^3$. Sem diferença entre os grupos nesse parâmetro ($P = 0,67$) (Figura 8).

A Corte coronal de encéfalo de rato ao nível do hipocampo

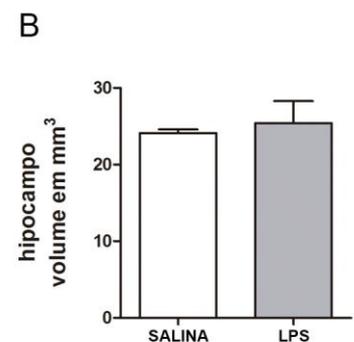
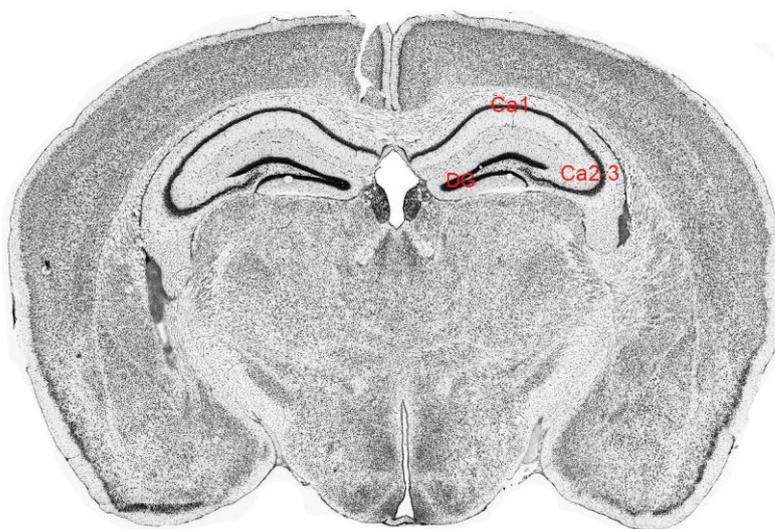


Figura 8. Em A, Fotomicrografia de corte coronal encefálico de rato corado em Nissl evidenciando o hipocampo e suas divisões e indicando a área a partir da qual foi calculado o volume hipocampal. Em

B, gráfico comparativo da média do volume hipocampal (mm^3) entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS). (N= 4 por grupo).

Dentre os aspectos neuroquímicos, a análise da expressão do GFAP por densidade óptica não apresentou diferença entre os grupos modelo autismo (LPS) ($43,1 \pm 2,2$) e o grupo controle (salina) ($49,9 \pm 2,6$), $P=0,0565$ (Figura 9).

HIPOCAMPO - GFAP

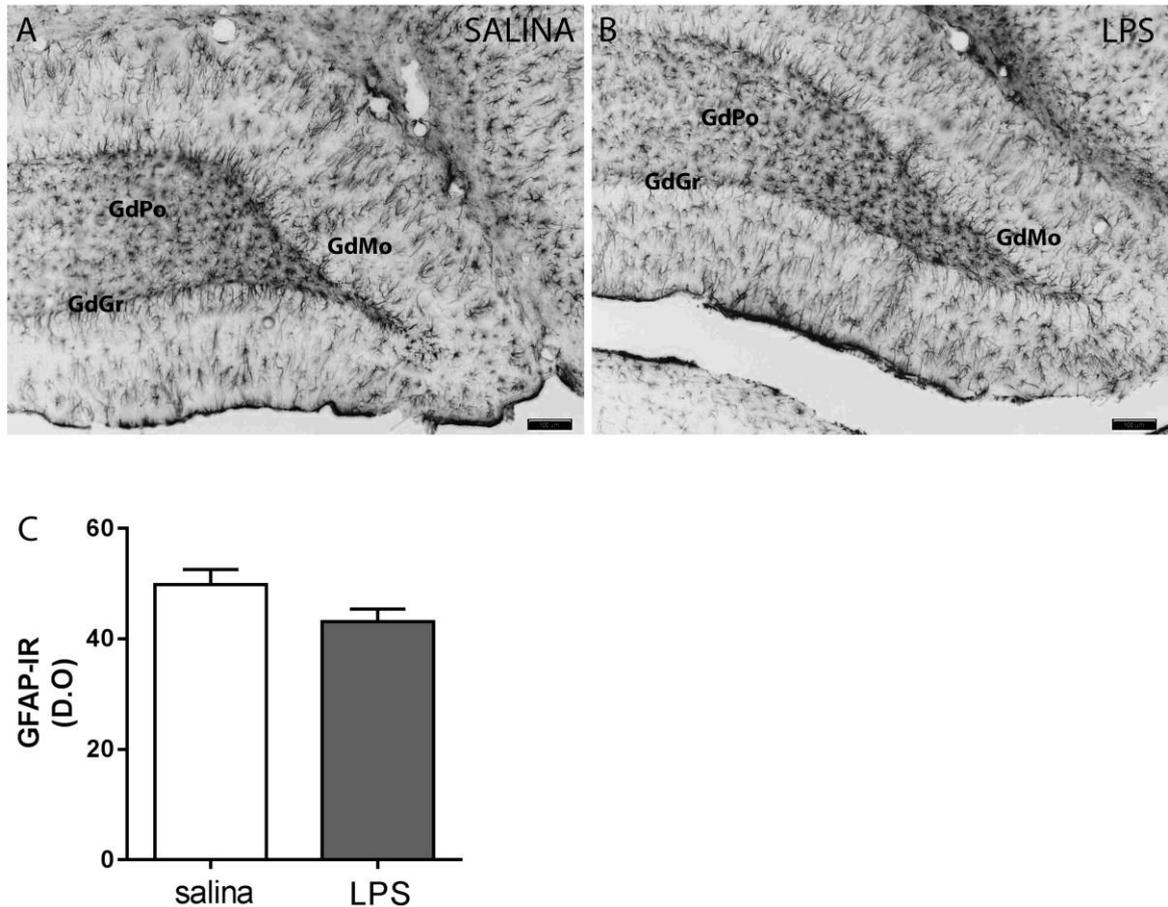


Figura 9. Fotomicrografias em fluorescência (em escala de cinza) de cortes coronais encefálicos de ratos ao nível do hipocampo submetidos à técnica de imuno-histoquímica para GFAP. Em A, hipocampo do animal do grupo controle. Em B, hipocampo do animal do grupo modelo autismo (LPS). Em C, comparação da densidade óptica (D.O) da imunorreatividade ao GFAP (GFAP-IR) nos grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS) ($P=0,0565$), $N= 5$ por grupo.

A expressão do GFAP calculada por densidade óptica não mostrou diferença entre os grupos modelo autismo (LPS) ($90,2 \pm 4,3$) e o grupo controle (salina) ($97,3 \pm 6,3$) na região de CA1 ($P=0,3634$). Também não houve diferença na expressão do GFAP entre os grupos modelo autismo (LPS) ($104,1 \pm 3,3$) e o grupo controle (salina) ($96,5 \pm 6,6$) nas regiões de CA2 ($P=0,3143$) e de CA3 (LPS $96,3 \pm 3,5$ vs. controle $93,9 \pm 7,0$; $P= 0,7612$) (Figura 10).

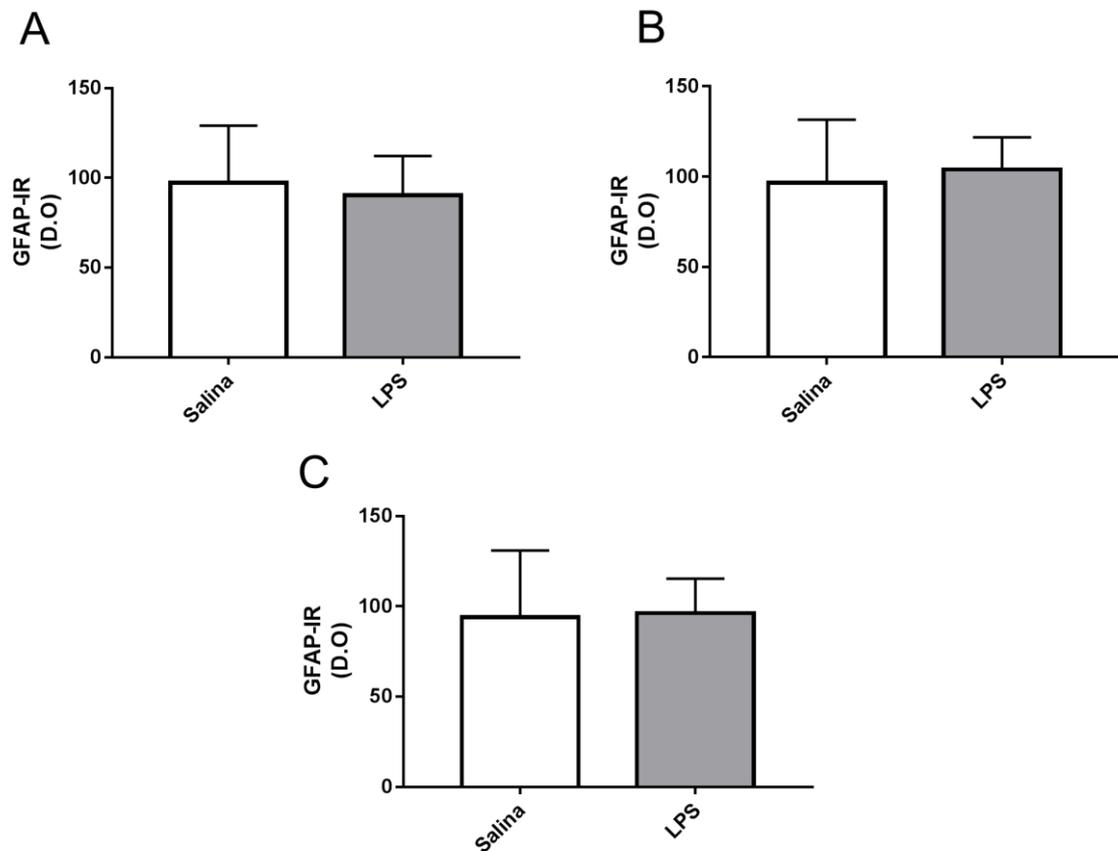


Figura 10. Gráficos comparativos da média \pm e.p.m da densidade óptica (D.O) da imunorreatividade ao GFAP (GFAP-IR) nos grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS). Em A, a região de CA1 ($P= 0,3634$). Em B, a região de CA2 ($P= 0,3143$). Em C, a região de CA3 ($P= 0,7612$). ($N= 5$ por grupo).

O total de células IBA-1 na região de GD não diferiu entre os grupos ($P=0,0914$). O total de células IBA-1-IR na região de CA1 foi maior no grupo modelo autismo (LPS) quando comparado ao grupo controle (salina) ($P=0,0257$). O total de células IBA-1-IR na região de CA2 foi maior no grupo modelo autismo (LPS) quando comparado ao grupo controle (salina) ($P=0,0022$). O total de células IBA-1-IR na região de CA3 foi maior no grupo modelo autismo (LPS) quando comparado ao grupo controle (salina) ($P=0,0138$) (Figura 11).

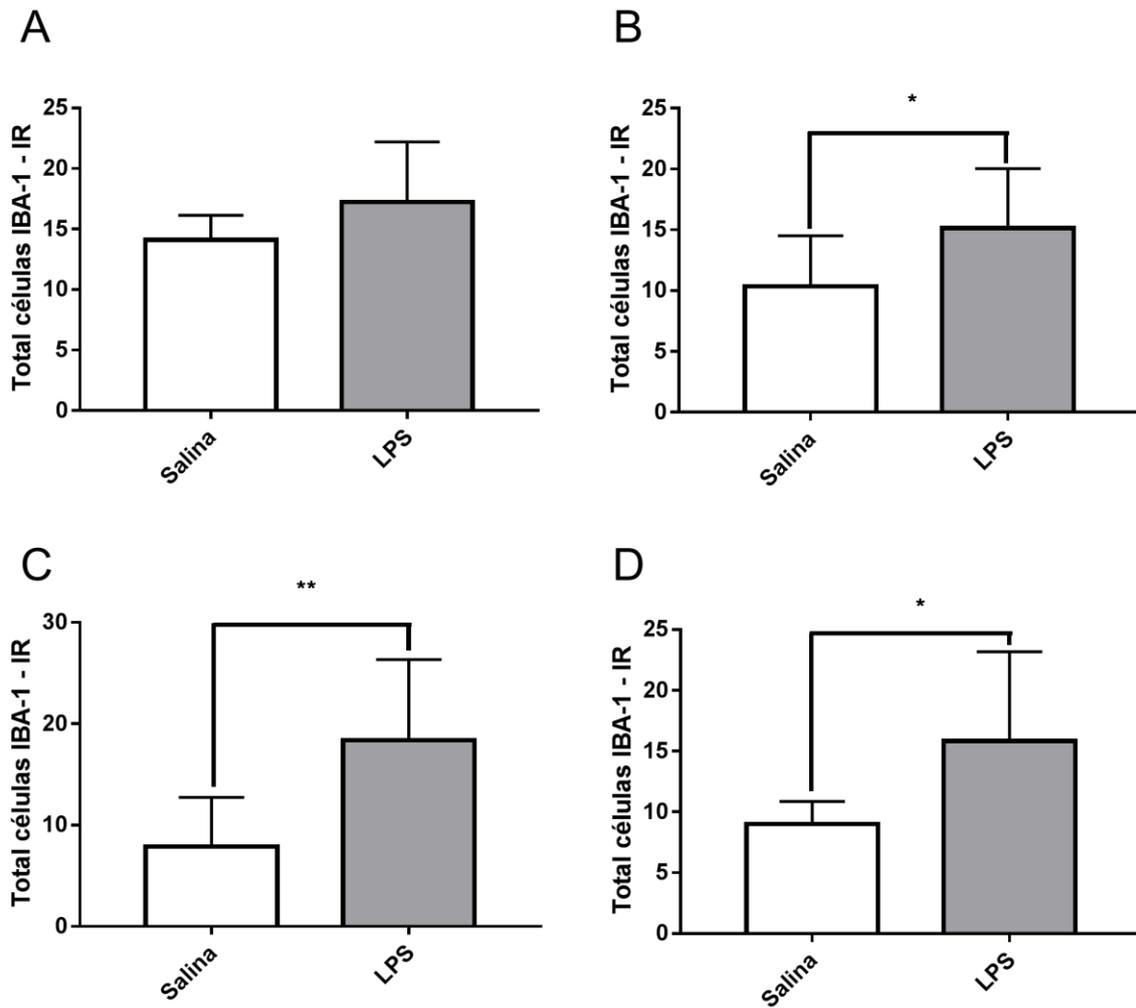


Figura 11. Gráficos comparativos do total de células IBA-1 – IR entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS) quantificadas na região do GD (A) (P=0,0914). Em B, na região de CA1 (*P=0,0257). Em C, na região CA2 (**P=0,0022). Em D, na região CA3 (*P=0,0138). N= 3 por grupo.

A quantificação das proteínas ligantes de Cálcio mostrou que o total de células PV-IR foi menor no grupo modelo autismo (LPS) ($5,9 \pm 0,6$) quando comparado ao grupo controle (salina) ($12,2 \pm 1,1$) (P<0,0001) (Figura 12).

HIPOCAMPO - PARVALBUMINA

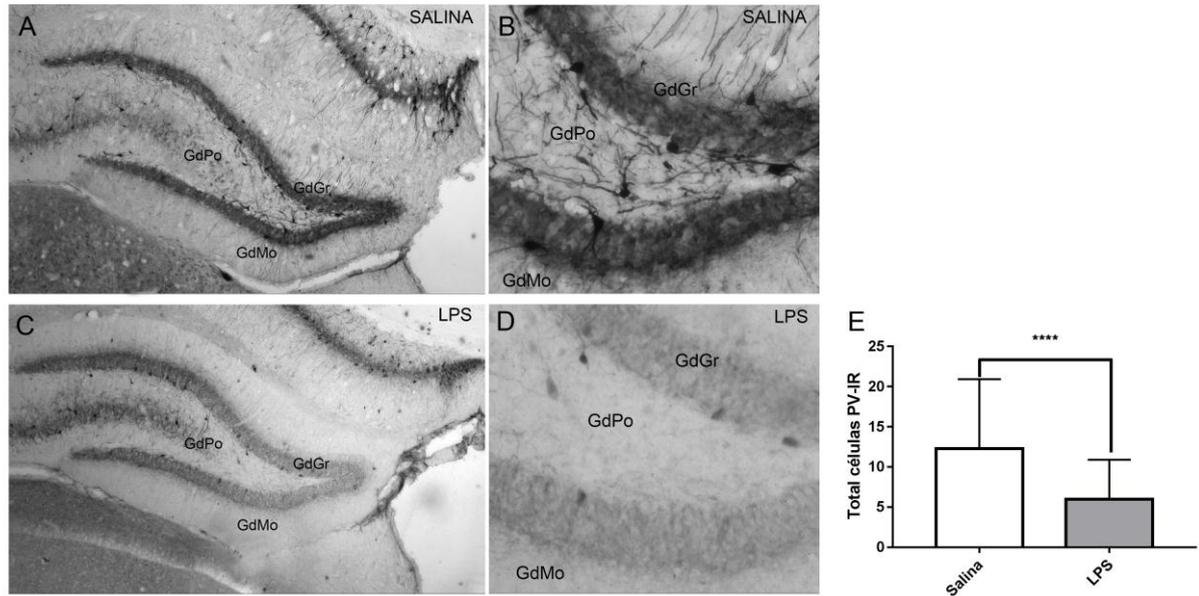


Figura 12. Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais encefálicos de ratos ao nível do hipocampo submetidos à técnica de imuno-histoquímica para parvalbumina (PV). Em A e B, hipocampo de animal do grupo controle. Em C e D, hipocampo de animal do grupo modelo autismo (LPS). Em E, gráfico comparativo do total de células PV-IR no GD entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS) (**** $P < 0,0001$). $N = 5$ por grupo.

O total de células PV-IR na região de CA1 foi menor no grupo modelo autismo (LPS) ($6,1 \pm 0,3$) quando comparado ao grupo controle (salina) ($14,9 \pm 0,5$) ($P < 0,0001$). Na região de CA2 o total de células PV-IR foi menor no grupo modelo autismo (LPS) ($4,0 \pm 0,2$) em relação ao grupo controle (salina) ($11,8 \pm 0,5$) ($P < 0,0001$). O total de células PV-IR na região de CA3 foi menor no grupo modelo autismo (LPS) ($3,7 \pm 0,2$) quando comparado ao grupo controle (salina) ($9,1 \pm 0,4$) ($P < 0,0001$) (Figura 13).

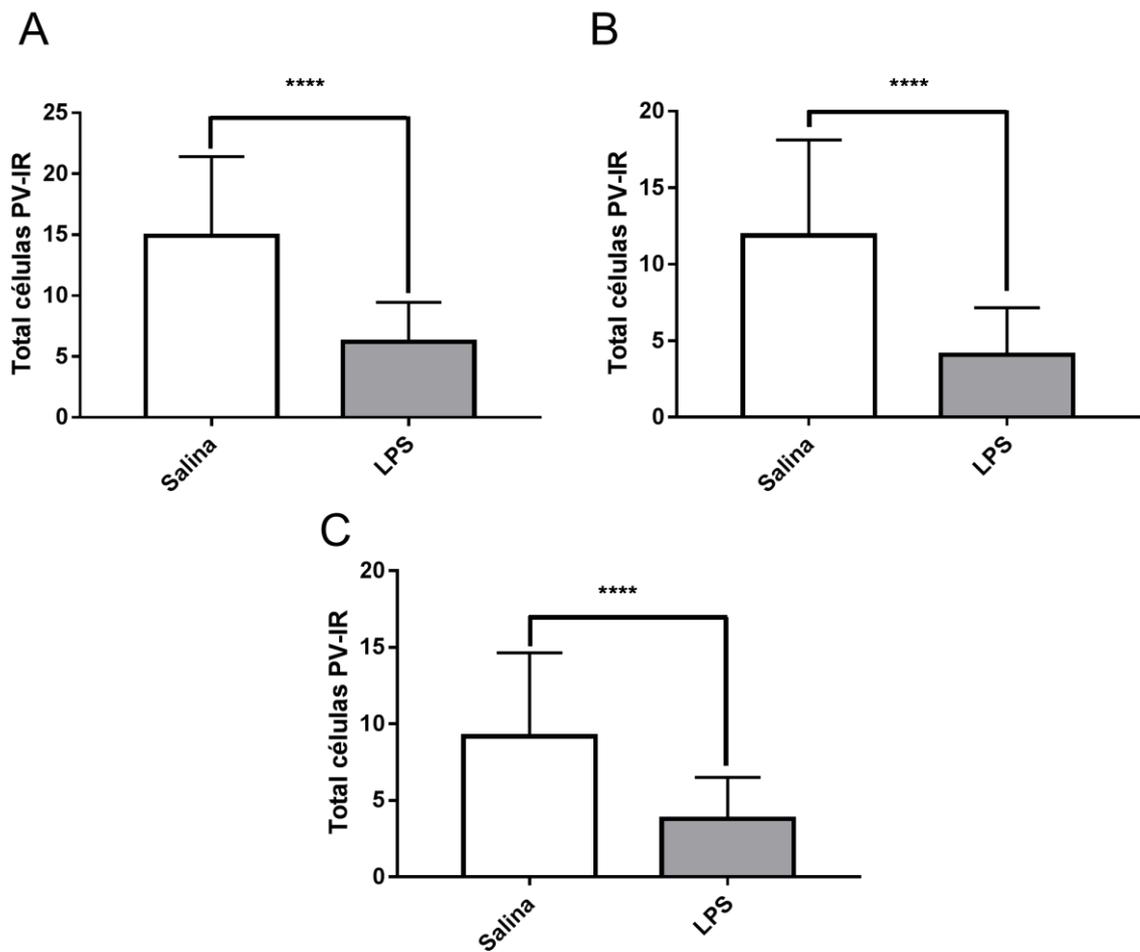


Figura 13. Gráficos comparativos do total de células PV-IR. Em A, comparação entre o total de células PV-IR entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS) em A na região de CA1 (****P<0,0001). Em B, na região de CA2 (****P<0,0001). Em C, na região CA3 (****P<0,0001). (N= 5 por grupo).

O total de células CR-IR quantificadas foi maior no grupo modelo autismo (LPS) ($13,6 \pm 0,7$) quando comparado ao grupo controle (salina) ($7,4 \pm 0,4$) ($P < 0,0001$) (Figura 14).

HIPOCAMPO - CALRETININA

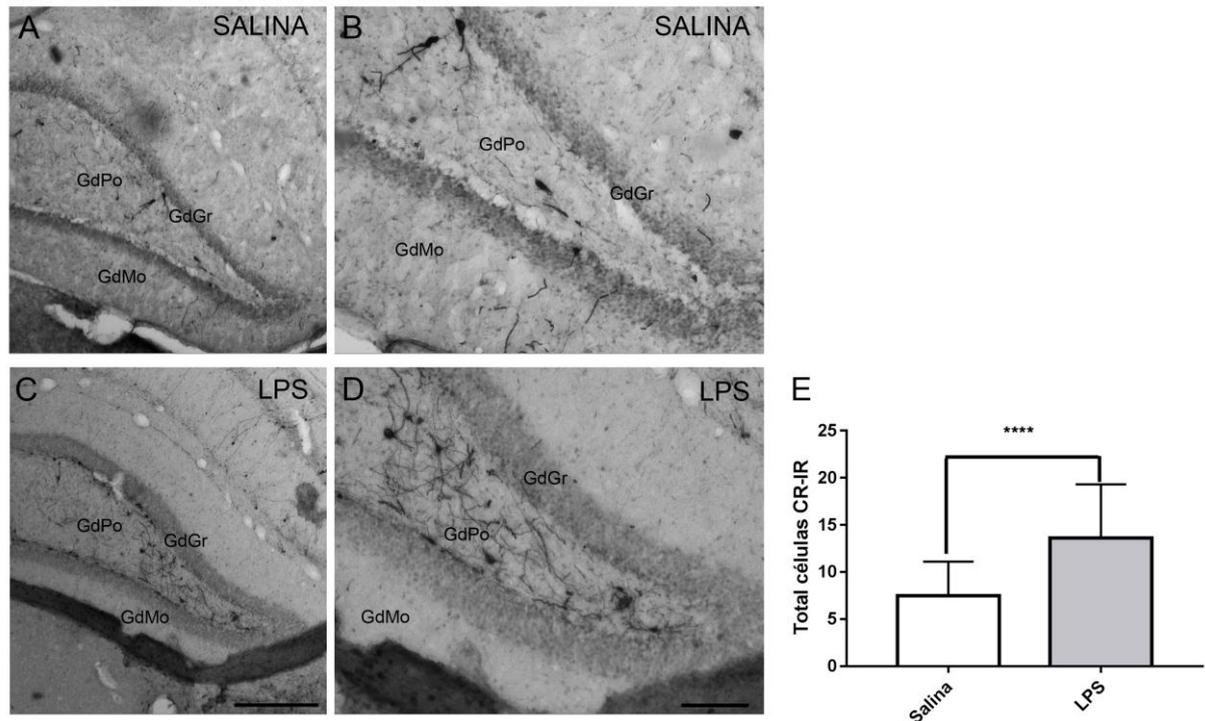


Figura 14. Fotomicrografias em campo claro de cortes coronais encefálicos de ratos ao nível do hipocampo submetidos à técnica de imuno-histoquímica para calretinina (CR). Em A e B, hipocampo de animal do grupo controle. Em C e D, hipocampo de animal do grupo modelo autismo (LPS). Em E gráfico comparativo do total de células CR-IR no GD entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS) (**** $P < 0,0001$). $N = 5$ por grupo.

O total de células CR-IR na região de CA1 foi maior no grupo modelo autismo (LPS) ($12,7 \pm 0,4$) quando comparado ao grupo controle (salina) ($5,0 \pm 0,3$) ($P < 0,0001$). Na região de CA2 o total de células CR-IR foi maior no grupo modelo autismo (LPS) ($5,9 \pm 0,2$) em relação ao grupo controle (salina) ($4,3 \pm 0,2$) ($P < 0,0001$). O total de células CR-IR na região de CA3 foi maior no grupo modelo autismo (LPS) ($9,7 \pm 0,3$) quando comparado ao grupo controle (salina) ($5,4 \pm 0,2$) ($P < 0,0001$) (Figura 15).

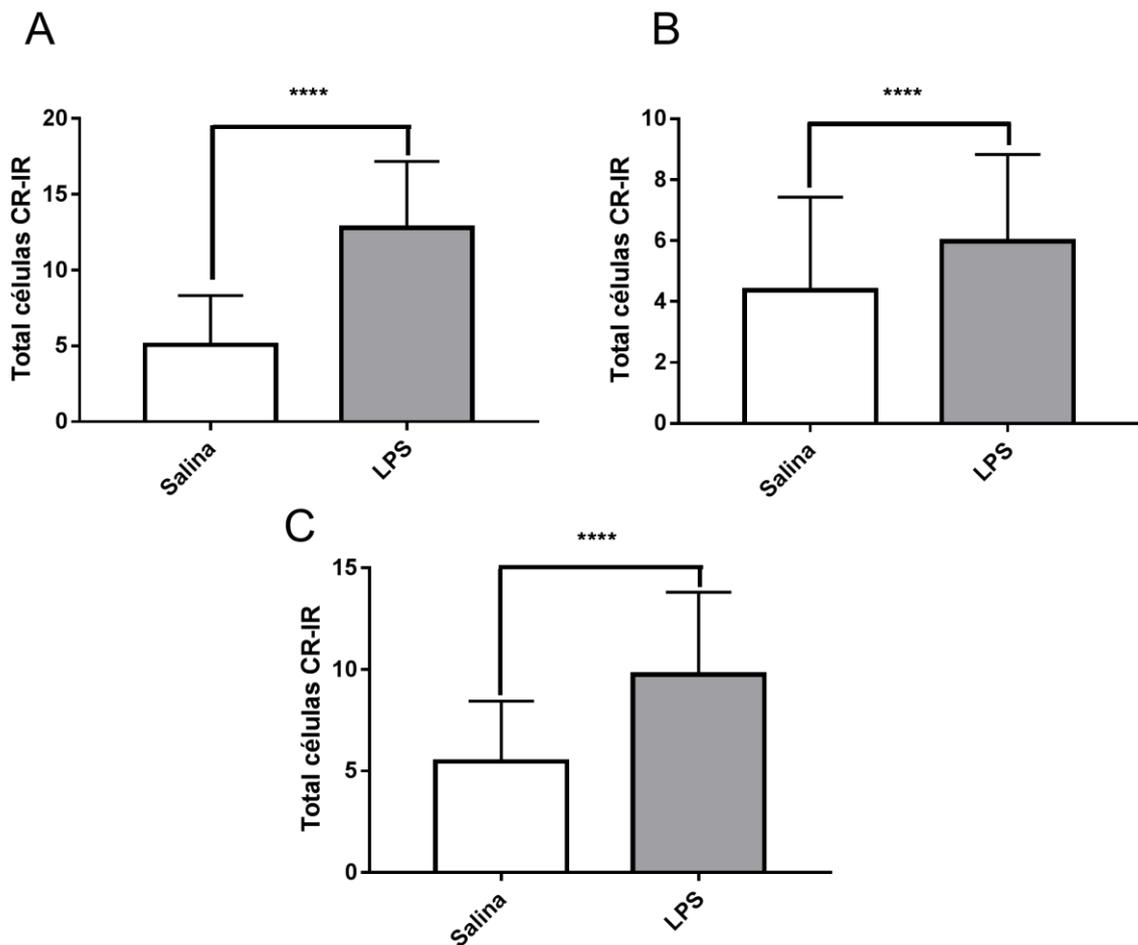


Figura 15. Gráficos comparativos do total de células CR-IR entre os grupos controle (salina) e modelo autismo (LPS). Em A, na região de CA1 (**** $P < 0,0001$). Em B, na região de CA2 ($P < 0,0001$). Em C, na região de CA3 (**** $P < 0,0001$). N=5 por grupo.

7. DISCUSSÃO

O primeiro resultado demonstrado no presente estudo foi de que a injeção de LPS i.p em fêmeas prenhes no 9,5 dia gestacional resultou em queda no conteúdo noturno de melatonina em comparação com fêmeas prenhe do grupo controle 15 horas após a injeção do LPS evidenciando que um quadro inflamatório durante a gestação influencia na síntese de melatonina materna o que, por conseguinte resulta em um déficit desse hormônio na circulação fetal. É importante ressaltar que na fase fetal, a pineal ainda não sintetiza melatonina, ficando assim, o feto sujeito ao conteúdo plasmático de melatonina da mãe a qual passa pela barreira placentária exercendo o seu efeito protetor e sincronizando o ritmo do embrião com o da mãe (MERCHANT et al., 2013; SAGRILLO-FAGUNDES et al., 2016; BRAAM et al., 2018).

A redução na síntese de melatonina na glândula pineal após administração de LPS já foi demonstrada em vários modelos animais e na glândula pineal *in vitro* (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2010b; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2012; PINATO et al., 2015; FERNANDES et al., 2017; MARKUS et al., 2017; HERMAN et al., 2017) a qual possui receptores ativados pelo LPS (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2010b) que promovem uma série de reações em pinealócitos e principalmente células da glia que compõem a pineal envolvendo aumento na produção de TNF- α que resultaria na redução da síntese de melatonina por inibição do gene responsável por codificar a enzima AA-NAT (MARKUS et al., 2007; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2010b; CARVALHO-SOUZA et al., 2011).

Em humanos, os mesmos mecanismos estão envolvidos na diminuição da síntese de melatonina em quadros inflamatórios (PONTES et al., 2007; DE OLIVEIRA TATSCH-DIAS et al., 2013; PINTO; DA SILVA; PINATO, 2016). O aumento do conteúdo diurno de melatonina no grupo LPS também corrobora com estudos prévios que demonstraram a indução da produção extra-pineal de melatonina por células do sistema imunológico e por células nervosas em quadros inflamatórios (MARKUS et al., 2007; PINATO et al., 2015). A diminuição do conteúdo de melatonina modula a resposta imunológica possibilitando a ativação da resposta imunológica inata por meio das células de defesa que por sua vez passa a sintetizar melatonina no local da lesão (MARKUS et al., 2007; HERMAN et al., 2017). A tendência é de que posteriormente a fase inflamatória a homeostasia do organismo seja retomada e a síntese da melatonina via pineal se normalize (MARKUS et al., 2007).

Os efeitos da diminuição de melatonina circulante no neurodesenvolvimento do feto ainda não foram elucidados, porém há diversos estudos que comprovam a ação neuroprotetora da melatonina (BASSANI et al., 2014; VOICULESCU et al., 2014; JOSHI et al., 2015; PINATO et al., 2015; WATSON et al., 2016) e estudos que estabelecem a relação entre a melatonina materna e o acometimento de crianças pelo TEA (ROSSIGNOL; FRYE, 2011; BRAAM et al., 2018).

A alteração comportamental e as alterações neuroquímicas encontradas no hipocampo no presente estudo indicam ser esta uma das áreas possivelmente afetadas por este quadro inflamatório pre-natal e contribuem para se estabelecer as bases que determinam as dificuldades de aprendizagem em quadros que cursam com problemas de neurodesenvolvimento. Características como inflexibilidade cognitiva, comportamentos restritivos/repetitivos e dificuldade quanto a mudanças na rotina diária estão presentes em

indivíduos com TEA (DSM-5). Estudos anteriores já utilizaram o teste de alternância espontânea no labirinto em T para avaliar tais características em modelos animais (MACFABE et al., 2011; KIRSTEN, 2012). O processo de alternar espontaneamente é intrínseco dos animais e depende da capacidade da memória espacial e conseqüentemente da integridade de estruturas relacionadas a essa função como o hipocampo (LALONDE, 2002).

Os resultados do presente estudo mostraram que o grupo de animais modelo autismo apresentou pior desempenho no teste de memória espacial quando comparado ao grupo controle tanto na avaliação do número total de acertos em alternar em todas as tentativas quanto do número de acertos quando analisadas as cinco primeiras tentativas ou as quatro últimas. A insistência do animal em visitar o braço do labirinto o qual ele já havia visitado, além de sugerir alterações na habilidade da memória espacial é sinal de inflexibilidade em explorar novos ambientes e comportamento repetitivo (LALONDE, 2002; EDALATMANESH et al., 2013).

Estes resultados corroboram com resultados de estudos anteriores que utilizaram o mesmo modelo animal, porém com diferente protocolo de avaliação com duas sessões de teste para cada grupo sendo uma de manhã e outra à tarde (KIRSTEN, 2012; KIRSTEN et al., 2015). Segundo este protocolo eram realizadas duas tentativas para cada animal. Na primeira tentativa um braço do labirinto estava previamente bloqueado, forçando o animal a escolher o braço livre (escolha forçada). Após 20-30 minutos o animal era novamente colocado no labirinto e os dois braços estavam abertos para ele realizar a escolha. Caso o animal escolhesse o braço previamente bloqueado era considerado uma alternância caso contrário era considerado um erro. Na segunda sessão o mesmo processo era repedido e ao final cada animal recebia uma pontuação na dependência do número de acertos. No presente estudo os animais foram expostos a um número maior de escolhas livres permitindo assim um maior número de dados para avaliação da memória espacial do animal. O cálculo do total do número de acertos nas primeiras cinco tentativas e nas quatro últimas, descartou a hipótese de que durante o teste comportamental sem recompensa, o animal ficaria desmotivado para realização do teste interferindo nos dados obtidos (DEACON; RAWLINS, 2006).

A média do tempo para escolha do braço do labirinto a ser visitado em cada tentativa não mostrou diferença entre os animais dos dois grupos, assim como não houve diferença entre os grupos na relação entre o número de acertos e o tempo médio de escolha entre os animais de cada grupo. A mensuração do tempo despendido pelo animal para realizar uma escolha, para permanecer em um determinado local explorando ambientes e para entrar e sair

de ambientes identifica sinais de ansiedade, medo, estresse e até a perda do interesse na exploração de novos ambientes (WANG et al., 2013; WOLF et al., 2016).

Quanto às bases envolvidas no déficit de memória espacial, estudos anteriores mostraram diminuição na eficácia em alternar após lesões cirúrgicas (STEVENS; COWEY, 1973; SAVAGE; BUZZETTI; RAMIREZ, 2004) ou intervenções farmacológicas no hipocampo de ratos (BLAMPIED WILBY, 1974; HUGUES; DESCHAUX; GARCIA, 2004).

Estudos anteriores em indivíduos com TEA relataram alterações de volume em áreas encefálicas como o complexo olivar superior (KULESZA; MANGUNAY, 2008), amígdala (SCHUMANN; AMARAL, 2006), núcleos como o caudado, accumbens, globo pálido e putame, córtex entorrinal, tálamo, cerebelo e corpo caloso (BAUMAN; KEMPER, 2005; WEGIEL et al., 2014; WEGIEL et al., 2015). Segundo estes estudos, com exceção do corpo caloso e amígdala estas estruturas apresentaram aumento de volume no TEA sem correlação com melhor funcionalidade (STANFIELD et al., 2008; BARNEA-GORALY et al., 2014).

No presente estudo não foi encontrada diferença no volume hipocampal entre os animais do grupo controle e do grupo modelo autismo. Os resultados da literatura em humanos são contraditórios, sendo que alguns não encontraram diferença entre o volume do hipocampo de indivíduos com TEA e controles (PIVEN et al., 1998), outros encontraram diminuição (EILAM-STOCK et al., 2016), a qual, principalmente do giro denteado estaria associada a disfunções executivas como redução da capacidade de memória presentes em indivíduos com TEA (SAITOH; KARNS; COURCHESNE, 2001; FRODL, et al., 2006). Outros estudos relataram ainda aumento do volume dessa estrutura no TEA (SCHUMMANN et al., 2004; BARNEA-GORALY et al., 2014), sendo o aumento comum em indivíduos com TEA que apresentam coeficiente de inteligência acima de 100 (MAIER et al., 2015). Estudos com modelos animais após exposição ao LPS no período neonatal ou exposição crônica, encontraram diminuição do volume do hipocampo de ratos (WANG et al., 2013; MALAEB et al., 2014).

Quanto aos aspectos bioquímicos no hipocampo a menor expressão de células PV-IR e a maior expressão de células CR-IR encontradas no presente estudo no grupo modelo autismo evidencia que o ambiente inflamatório durante o neurodesenvolvimento induziu alterações em interneurônios hipocampais de classes diferentes (KOBAYASHI; BUCKMASTER, 2003). Os interneurônios GABAérgicos hipocampais podem expressar além do GABA, proteínas ligantes de cálcio como PV, CR e CB (COGHLAN et al., 2012). Durante o neurodesenvolvimento, o sistema GABAérgico é fundamental nos processos intrínsecos de

controle e regulação da atividade inibitória das células nervosas. Disfunções nesse sistema são comuns em quadros como epilepsia, TEA, distúrbios de aprendizagem e ansiedade (COGHLAN et al., 2012; WU; SUN, 2015).

Os interneurônios (GABAérgicos) PV-IR situam-se entre os neurônios principais (glutamatérgicos) que constituem o hipocampo e com esses estabelecem relação controlando suas atividades. A literatura aponta que no TEA são mais comuns alterações em interneurônios do hipocampo que expressam PV (MARÍN, 2012).

As células PV-IR participam da modulação das sinapses relacionadas aos circuitos locais responsáveis pelo aprendizado e memória por meio do controle e tamponamento do cálcio intracelular. Essas sinapses inibitórias para os neurônios principais permitem a origem de ritmos elétricos denominados oscilações gama e são vitais para o processo de codificação temporal e recuperação da informação permitindo assim a sincronização dos disparos dos neurônios piramidais (KONRADI et al., 2011). Estudos apontam que uma redução das células PV-IR leva a perda da inibição dos neurônios piramidais, o que resultaria na dessincronização desse ritmo, comprometendo a formação da memória no TEA (BARTOS; VIDA; JONAS, 2007; LEE et al., 2014). Esta função é demonstrada em um estudo com animais onde a redução das células PV-IR acarretou aumento da atividade dos neurônios do hipocampo (CABALLERO; DIAH; TSENG, 2013) e prejuízos na interação social e comportamento repetitivo características presentes no TEA (WÖHR et al., 2015).

Redução na expressão de células PV-IR já foram demonstradas no córtex pré-frontal em animais submetidos ao estresse crônico perinatal e a mudanças na ativação imunológica após fêmeas prenhes ter sido expostas ao Poly I:C (GIOVANOLI; WEBER; MEYER, 2014; ZHANG; PRAAG, 2015; HASHEMI et al., 2017).

Assim, a diminuição no número de células PV-IR encontrada no presente estudo em todas as regiões do hipocampo resulta em alteração no sistema GABAérgico com menor controle inibitório exercido por esses interneurônios tornando as células principais do hipocampo hiper-excitáveis o que resulta nas alterações comportamentais presentes no TEA como diminuição da interação social e tendência ao isolamento social (FREUND; BUZSAKI, 1996; NAKAMURA et al., 2015; FILICE et al., 2016; ZELETTEL; FILIPOVIC; PUSKAS, 2016).

Quanto a maior expressão de células CR-IR encontradas no grupo modelo autismo nas regiões do GD, CA1, CA2 e CA3 no presente estudo, esses resultados, corroboram com

outros estudos que mostraram um aumento significativo dos neurônios CR-IR especificamente na região de CA1 do hipocampo em tecido cerebral de indivíduos com TEA (LAWRENCE et al., 2010). Essas células também são identificadas como interneurônios que constituem o sistema GABAérgico porém apresentam padrão de comunicação diferente dos interneurônios PV-IR. Enquanto os neurônios PV-IR estabelecem comunicação perissomática exclusivamente com as células principais do hipocampo, as células CR-IR além de estabelecerem sinapse dendrodendrítica com estas mesmas células, também estabelecem sinapse com outros interneurônios e por meio do tamponamento do cálcio, atuam na modulação excitatória e inibitória destas sinapses além de apresentar efeito neuroprotetor evitando a excitotoxicidade resultante da ativação neuronal constante (CAMP; WIJESINGHE, 2009), além de funções no controle do ciclo e da proliferação celular em células não excitáveis como as células mesoteliais (SCHAWLLER, 2014).

Por outro lado o aumento na expressão encontrado no presente estudo pode indicar menor vulnerabilidade das células CR-IR frente a quadros inflamatórios pré-natais, e um possível aumento na inibição a outros interneurônios, o que contribui para um maior estímulo das células principais excitatórias (BOTTERILL et al., 2017). No córtex entorrinal de pacientes com doença de Alzheimer a expressão das células CR-IR oscilam com o passar do tempo enquanto os interneurônios PV-IR diminuem, demonstrando que é possível haver oscilações nessa expressão de acordo com o estímulo e o tempo (MIKKONEN et al., 1999; ALTOBELLI et al., 2015). Oscilações na expressão da CR podem resultar em morte neuronal pelo desequilíbrio na concentração do cálcio, hiper-excitabilidade das células, alterando o controle inibitório das sinapses o que é característico de quadros de epilepsia (TOTH; MAGLOCZKY, 2014).

Considerando a relevância destas proteínas na circuitaria hipocampal e para o funcionamento adequado dos processos pelos quais o hipocampo é responsável, tais alterações podem ser à base para o entendimento das anormalidades comportamentais além das alterações nos mecanismos de aprendizagem e memória observadas nesse modelo (LALONDE, 2002).

Além dos neurônios principais e interneurônios, as células da glia desempenham funções imunológicas tanto no hipocampo quanto nas outras áreas encefálicas, por meio da liberação de citocinas, como as interleucinas, interferons e TNF e também por apresentarem receptores TLR-4, importantes na detecção de sinais patológicos. Sabe-se também de sua atuação na plasticidade, regulação, formação e eliminação de sinapses bem como a produção

de fatores de crescimento fundamentais para o funcionamento neuronal(CARPENTIER; DUNCAN; MILLER, 2008; GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013; PETRELLI; PUCCI; BEZZI, 2015).Os astrócitos atuam ainda na captação de glutamato e síntese de glutamina essenciais para a formação do GABA e para a regulação dos níveis de glutatona a qual atua na proteção do tecido frente aos radicais livres (BERNARDI et al., 2013).

O GFAP é um filamento intermediário encontrado nos astrócitos e marcador imunohistoquímico destas células(LEMOS; ALESSI, 1999). Mediante a uma agressão, os astrócitos reagem (reatividade astrocitária) e apresentam alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares aumentando ou diminuindo a expressão de proteínas. Este quadro pode ser verificado na epilepsia(COULTER; STEINHÄUSER, 2015), doença de Alzheimer (SERENKI; VITAL, 2008), Parkinson, Huntington, esclerose lateral amiotrófica (PHATNANI; MANIATIS, 2015) e no TEA(PETRELLI; PUCCI; BEZZI, 2015).

Os dados do presente estudo mostraram que o ambiente inflamatório pré-natal desencadeado pela ativação imune materna não representou alteração na expressão da proteína GFAP no hipocampo do animal adulto indicando que a reatividade astrocitária não tem relação com as disfunções hipocampais apresentadas por estes animais. Estes resultados corroboram com achados de outras áreas encefálicas de indivíduos com TEA onde não houve alteração na expressão de GFAP em astrócitos da substância branca do córtex pré-frontal região dorso-lateral o que demonstra que não ocorreu ativação astrocitária nessa região (LEE et al., 2017). Por outro lado, nossos resultados são contrários a outros estudos que demonstraram alteração na expressão de GFAP no hipocampo da prole de ratas expostas ao ácido valpróico (CODAGNONE et al., 2015), ou em animais com 30 dias PN da prole de ratas expostas ao Poly I:C na gestação (RATNAYAKE et al., 2012). Outros estudos também demonstraram aumento na expressão de GFAP na amígdala da prole de ratas que foram expostas ao LPS durante a gestação (O'LOUGHLIN et al., 2017) e aumento na expressão de GFAP em áreas corticais e no cerebelo de indivíduos com TEA (LAURENCE; FATEMI, 2005; CROWFORD et al., 2015).Um possível explicação para estes diferentes resultados pode estar nos diferentes tempos pós-exposição utilizados e na diversidade de estímulos propostos (HAN;XIAO;WEN, 2015).

Analisando-se outros transtornos neuropsiquiátricos, os dados são variáveis. Alguns estudos mostraram que o tecido encefálico de indivíduos com transtorno bipolar não apresentou alterações significativas na expressão de GFAP tanto na substância cinzenta quanto na branca na região do córtex cingulado (WILLIAMS et al., 2013). Já na esquizofrenia

análise de tecido encefálico de indivíduos também mostrou que não houve diferença na expressão em regiões como o córtex entorrinal, subículo (FALKAI et al., 1999). Houve diminuição na expressão de GFAP no hipocampo de indivíduos com transtorno depressivo maior (COBB et al., 2016).

Diferentemente do predomínio de achados de aumento na expressão de GFAP em indivíduos com TEA, nossos resultados sugerem uma mudança de olhar para com o papel da ativação astrocitária indicando que em nem todos os casos essa reação ocorra o que aponta para uma investigação mais detalhada dos mecanismos envolvidos nessa ativação.

Nossos resultados mostraram que o número total de microglias IBA-1-IR foi maior nas regiões CA1, CA2 e CA3 do hipocampo dos animais do grupo modelo autismo quando comparados com o do grupo controle, exceto na região do GD onde não houve diferença estatística entre os dois grupos. As microglias quando se encontram frente ao processo de injúria ao tecido nervoso respondem desencadeando um quadro de microgliose que corresponde a sua ativação (NORDEN et al., 2016). Esse processo se faz por uma série de vias, entre elas, a ligação e o aumento na expressão de seus TLR-4 que por consequência desencadeia a ativação do fator NFKB. Outras moléculas também são capazes de controlar o seu funcionamento como é o caso do GABA e do glutamato (HOOGLAND et al., 2015). O aumento de citocinas inflamatórias muitas vezes precede o aumento na ativação das micróglias no tecido nervoso (NORDEN et al., 2016). Estudos utilizando tecido cerebral post-mortem de indivíduos com TEA mostraram sinais de ativação de microglias em diferentes áreas como córtex e cerebelo (VARGAS et al., 2005). Estudos presentes na literatura mostram que alterações nas células microgлияis acarretam em déficit funcional dessas células como é o caso das alterações na poda sináptica em um modelo animal que utilizava camundongos geneticamente modificados para mimetizar o fenótipo da síndrome de Rett. Nesse modelo, os animais apresentaram falta de maturação em suas sinapses na região de CA1 o que prejudicou o fluxo de informações transmitidas ao longo do hipocampo comprometendo assim aspectos cognitivos os quais estão presentes em indivíduos com características similares ao TEA (JAWAID et al., 2018). Estudos utilizando o LPS administrado em ratos com 03 dias pós-natal mostraram que as microglias respondem a essa toxina tornando-se ativadas mediante a ligação do LPS em seus TLR-4 e desencadeando assim a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α o que levou a um comprometimento em funções cognitivas e de comunicação desses animais (PANG et al., 2016). Outros estudos utilizando modelos animais com doenças neurodegenerativas e que utilizaram o LPS mostraram

aumento na ativação e no número de microglias no hipocampo nas regiões do GD, CA1, CA2 e CA3 (LANA et al., 2017). A administração de LPS na rata prenhe também resulta em alteração morfológica nas microglias na região da amígdala indicando um aumento em sua ativação o que acarretou em alterações comportamentais a esses animais correlacionadas a quadros de ansiedade e depressão (O'LOUGHLIN et al., 2017).

8. CONCLUSÃO

O LPS administrado em fêmeas prenhes no período pré-natal foi capaz de desencadear um quadro inflamatório no organismo materno o que provocou alterações na concentração plasmática de melatonina e alterou o neurodesenvolvimento da prole. Animais do grupo modelo autismo apresentaram déficit na memória espacial. Tal alteração não está relacionada a mudanças na ativação astrocitária no hipocampo desses animais, mas sim a alterações na ativação de microglias e na expressão das proteínas ligantes de cálcio parvalbumina e calretinina presentes nos interneurônios gabaérgicos hipocampais. Isto indica um comprometimento sináptico entre neurônios e interneurônios que atuam nas alças excitatórias e inibitórias de formação de memória.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPÁR, A. et al. The renaissance of Ca²⁺-binding proteins in the nervous system: secretagoin takes centre stage. **Cellular signalling**, v.24, n.2, p.378-87, 2012.

ALTMAN, J.; BRUNNER, R.L.; BAYER, S.A. The hippocampus and behavioral maturation. **Behav. Biol.**, v.5, p.557-96, 1973.

ALTOBELLI, G.G. et al. Analysis of calretinin early expression in the rat hippocampus after beta amyloid (1-42) peptide injection. **Brain Res.**, v. 12, n.1610, p.89-97, 2015.

AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v.31, n. 3, 571-91, 1989.

AMEIS, S.H. et al. Impaired structural connectivity of socio-emotional circuits in autism spectrum disorders: A diffusion tensor imaging study. **PLoS ONE**, v.6, n.11, p. 1-9, 2011.

American Psychiatric Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais:- DSM-5. 5ª ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2014.

ASGHARI, M. H. et al. A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity. **Expert Opin Drug MetabToxicol.**, v.13, n. 5, p. 545-54,2016.

ATKINSON, R. C; SHIFFRIN, R. M. Human memory: A proposed system and its control processes. **Psychology of Learning and Motivation**, v.2, p. 89-195, 1968.

ARAÚJO, A. C.; NETO, F. N. A nova classificação americana para os transtornos mentais: o DSM-5. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 16, n. 1, p. 67-82, 2014.

ARENDT, J. Melatonin: Characteristics, concerns, and prospects. **J Biol Rhythms**, v.20, n.4, p. 291-303, 2005.

AUTISM AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES MONITORING NETWORK, UNITED STATES (CDC). Prevalence of Autism Spectrum disorders. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 58, p.57-66, 2009.

AYLWARDE.H, N.J. et al. MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. **Neurology**, v. 53, p. 2145-50, 1999.

BADDELEY, A. . Working memory: theories, models and controversies. **Annual Review of Psychology**, v.63, p. 1-29, 2012.

BAIMDRIDGE, K. G.; CELIO, M.; ROGERS, J. H. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends in neurosciences**, v. 15, p. 303-7, 1992.

BANG, J.; NADIG, A. Learning language in autism: maternal linguistic input contributes to later vocabulary. **Autism Res.**, v. 8, n. 2, p. 214-23, 2015.

BARNEA-GORALY, N. et al. A preliminary longitudinal volumetric MRI study of amygdala and hippocampal volumes in autism. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 48. p. 124-128, 2014.

BARRETO, D. D. C. C. **A área hipocampal CAI é essencial para a memória similar à episódica.** 2016.69f. Dissertação (Mestrado Neurociências Cognitiva e Comportamento), Universidade Federal da Paraíba UFPB – João Pessoa –PB, 2016.

BARTOS, M.; VIDA, I.; JONAS, P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. **Nature Reviews Neuroscience**, v.8, p.45-56, 2007.

BARTSCH, T; WULFF, P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. **Neuroscience**, v.309, p.1-16, 2015.

BASSANI, T.B. et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain Res.**, v.17, n.1593, p.95-105, 2014.

BAUMAN, M.L.; KEMPER, T.L. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. **Int J Dev Neurosci.**, v.23, n.2-3, p.183-7, 2005.

BENTLEY, A. L.; RÉTY, S. EF-hand calcium-binding proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v.10, p.637-43, 2000.

BERNARDI, M.M.; KIRSTEN, T.B.; TRINDADE, M.O. Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: uma revisão. **Rev Neurocienc.**, v.20, n.1, p.117-27, 2012.

BERNIER, R.; MAO, A.; YEN, J. Psychopathology, families, and culture: autism. **Child and adolescent psychiatric clinics of North America**, v.19, n.4, p.855- 67, 2010.

BLAMPIED, N. M.; WILBY, C. M. Effects of 3-acetylpyridine on Spontaneous Alternation in the Mouse. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 3, p. 317-19, 1974.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. **Brain Behav Immun.**, v.24, n.6, p.881-97, 2010.

BOTTERILL, J.J. et al. Selective plasticity of hippocampal GABAergic interneuron populations following kindling of different brain regions. **J Comp Neurol.**, v. 525, n.2, p.389-406, 2017.

BOURGERON, T. A synaptic trek to autism. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 19, n. , p. 231- 34, 2009.

BRAAM, W. et al. Low maternal melatonin level increases autism spectrum disorder risk in children. **Res Dev Disabil.** , v. 18, p. 42-8, 2018.

BRENNER, M. Role of GFAP in CNS injuries. **Neuroscience letters**, v. 565, p. 7-13, 2014.

BRENTANI, H. et al. Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and treatment. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v.35, n.1, p. 562-72, 2013.

BRUGHA, T. S. et al. Epidemiology of autism spectrum disorders in adults in the community in England. **Archives of general psychiatry**, v.68, n.5, p.459-65, 2011.

BUFFINGTON, S.A. et al. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. **Cell.** v. 165, n.7, p.1762-1775, 2016.

BUGALHO, P.; CORREA, B.; VIANA-BAPTISTA, M. Papel do cerebelo nas funções cognitivas e comportamentais: bases científicas e modelos de estudo. **Revista de Exemplo**, v. 19 n.3, p. 257-67, 2006.

BURD, I.; BALAKRISHNAN, B.; KANNAN, S. Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, p.287 - 95, 2012.

CABALLERO, A.; DIAH, K.C.; TSENG, K.Y. Region-specific upregulation of parvalbumin, but not calretinin-positive cells in the ventral hippocampus during adolescence. **Hippocampus**, v.23, n.12, p.1331-36, 2013.

CAGNACCI, A.; ELLIOTT, J.A.; YEN, S.S. Melatonin: a major regulator of the circadian rhythm of core temperature in humans. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.75, n.2, p.447-52, 1992.

CAMP, A.J.; WIJESINGHE, R. Calretinin: modulator of neuronal excitability. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.41, n.11, p. 2118-21, 2009.

CAMPOS, L. M. G.; CRUZ-RIZZOLO R. J.; PINATO, L. The primate seahorse rhythm. **Brain Research**, v.1613, p. 81 - 91, 2015.

CARPENTIER, P.A.; DUNCAN, D.S.; MILLER, S.D. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. **Brain, behavior, and immunity**, v.22, n.2, p.140-147, 2008.

CARVALHO-SOUSA, C.E. et al. Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor. **Front Endocrinol.**, v. 13, n.2, p.10, 2011.

CELIO, M.R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. **Neuroscience**, v.35, n.2, p.375-475, 1990.

CENIT, M. C.; SANZ, Y.; CODOÑER-FRANCH, P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. **World Journal of Gastroenterology**, v.23, n.30, p. 5486-498, 2017.

CHANDLER, C.E.; ERNST, R.K. Bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response. **F1000 Research.**, v.6, p. 1-11, 2017.

CHEN, J.A. et al. The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. **Annu Rev Pathol.**, v.10, p.111- 44, 2015.

CHEZ, M. G. et al. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. **Pediatr. Neurol.**, v.36, n.6, p.361- 65, 2007.

COBB, J.A. et al. Density of GFAP-immunoreactive astrocytes is decreased in left hippocampi in major depressive disorder. **Neuroscience**, v.1, n.316, p.209-20, 2016.

CODAGNONE, M.G. et al. Differential local connectivity and neuroinflammation profiles in the medial prefrontal cortex and hippocampus in the valproic acid rat model of. **Autism.Dev Neurosci.**, v.37, n.3, p.215-31, 2015.

COGHLAN, S. et al. GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v.36, n.9, p.2044-55. 2012.

CONSTANTINO, J.N.; MARRUS, N. The early origins of autism. **Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.**, v, 26, n.3, p. 555-70, 2017.

COSTA, F.A.S. et al. Síndrome da rubéola congênita: revisão de literatura. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 2, n. 1, p. 46-57 2013.

COULTER, D.A.; STEINHÄUSER, C. Role of astrocytes in epilepsy. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.5, n.3, p. 1-12, 2015.

COURCHESNE, E. et al. Abnormality of cerebellar vermillion lobules VI and VII in patients with infantile autism: identification of hypoplastic and hyperplastic subgroups with MR imaging. **Am J Roentgenol.**, v.162, p. 123-30, 1994.

COURCHESNE, E. Neuroanatomic imaging in autism. **Pediatrics**. v.87, n.5, p.781-90, 1991.

COURCHESNE, E. et al. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. **JAMA**, v.306, n.18, p.2001-10, 2011.

CRAWFORD, J. D. et al. Elevated GFAP protein in anterior cingulate cortical white matter in males with autism spectrum disorder. **Autism Research, Johnson City**, v.8, p. 649-57, 2015.

CZERMAINSKI, F. R. **Avaliação neuropsicológica das funções executivas no transtorno do espectro autista**. 2012. 54f. Dissertação (Mestrado em Psicologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2012.

CZERMAINSKI, F. R.; BOSA, C. A.; SALLES, J. F. Funções executivas em crianças e adolescentes com transtorno do espectro do autismo: uma revisão. **Psico.**, v. 44, n. 4, p. 518-25, 2013.

DAMMANN, O.; O'SHEA, M. Cytokines and perinatal brain damage. **Clinics in perinatology.**, v.35, n.4, p.643-63, 2008.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF- kB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40-43, 2010a.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFkB pathway. **J Pineal Res.**, v.49, n.2, p.183-92, 2010b.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. Glia-Pinealocyte network: The paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). **Plos One**, v. 7, p. 401-42, 2012.

DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. **Brain, behavior, and immunity**, v.21, n.2, p.153-160, 2007.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature reviews Neuroscience**, v.9, n.1, p.46-56, 2008.

DANTZER, R. Expression and action of cytokines in the brain: Mechanisms and pathophysiological implications. **In Psychoneuroimmunology**, v.1, p.271-80, 2007.

DANTZER R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Immunology and allergy clinics of North America**, v.29, n.2, p. 247-64, 2009.

DAWSON, G. et al. Randomized, controlled trial of an intervention for toddlers with autism: the early start denver model. **Pediatrics**, v.125, n.1, p.17-23, 2010.

DEACON, R.M.; RAWLINS, J.N.T-maze alternation in the rodent.**Nat Protoc.**, v.1, n.1, p. 7-12, 2006.

DELFRATE, C.B; SANTANA, A.P.O.; MASSI, G.A. A aquisição de linguagem na criança com Autismo: um estudo de caso. **Psicol. estud.**, v. 14, n. 2, p. 321-31, 2009.

DEMEULEMEESTER, H. et al. Calbindin D-28K and parvalbumin immunoreactivity is confined to two separate neuronal subpopulations in the cat visual cortex, whereas partial coexistence is shown in the dorsal lateral geniculate nucleus. **Neurosci Lett.**, v.99, n.1-2, p.6-11, 1989.

DE OLIVEIRA TATSCH-DIAS, M. et al. The concept of the immune-pineal axis tested in patients undergoing an abdominal hysterectomy. **Neuroimmunomodulation.**, v.20, n.4, p.205-12. 2013.

DINARELLO, C.A. Historical review of cytokines. **European journal of immunology**, v.37, 2007.

DOMINGUEZ-ALONSO, A. et al. Melatonin stimulates dendrite formation and complexity in the hilar zone of the rat hippocampus: Participation of the Ca⁺⁺/Calmodulin complex. **Int J Mol Sci.**, v.16, n.1, p.1907-27, 2015.

DOMÍNGUEZ, R. A.P. et al. Maternal administration of melatonin exerts short- and long-term neuroprotective effects on the offspring from lipopolysaccharide-treated mice. **J Pineal Res.**, v.63, n.4, p. 124-39, 2017.

DRUZIAN, A. F. **A influência do ambiente enriquecido na memória espacial de camundongos swiss em três diferentes faixas etárias.** 2013. 68f. Dissertação (Mestrado Saúde e Desenvolvimento), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States **Int J Parasitol.**, v.38, n.11, p.1257-78, 2008.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical Neuroscience Research**, v.6, n.1-2, p.52-68, 2006.

EDALATMANESH, M.A. et al. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. **Brain Res.**, v. 1526, p.15-25, 2013.

EDMONSON, C.A.; ZIATS, M.N.; RENNERT, O.M. A non-inflammatory Role for Microglia in Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in Neurology**, v.7, n.9, 2016.

EICHENBAUM, H. et al. The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? **Neuron.**, v.23, n.2, p.209-26, 1999.

EILAM-STOCK, T, et al. Neuroanatomical alterations in high-functioning adults with autism spectrum disorder. **Frontiers in Neuroscience**, v.10, p.237, 2016.

EL-ANSARY, A.; AL-AYADHI, L. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorder. **Journal of Neuroinflammation**, v.11, p.189, 2014.

ENTICOTT, P.G. et al. Mirror neuron activity associated with social impairments but not age in autism spectrum disorder. **Biol Psychiatry**, v.71, n. 5, p.427-33, 2012.

ESPARHAM, A.E. et al. Nutritional and metabolic biomarkers in autism spectrum disorders: an exploratory study. **Integrative Medicine: A Clinician's Journal**, v.14, n.2, p.40-53,2015.

ESPINOSA-OLIVA, A.M.; DE PABLOS, R.M.; HERRERA, A.J. Intracranial injection of LPS in rat as animal model of neuroinflammation. **Methods Mol Biol.**, v.1041, p.295-305, 2013.

ESSA, M.M. et al. Excitotoxicity in the pathogenesis of autism. **Neurotox Res.**, v.23, n.4, p.93-400, 2013.

FADINI, C.C. et al. Influence of sleep disorders on the behavior of individuals with autism spectrum disorder. **Front Hum Neurosci.**, n.9, p.347, 2015.

FALKAI, P. et al. No evidence for astrogliosis in brains of schizophrenic patients. A post-mortem study. **Neuropathol Appl Neurobiol.**, v.25 n.1, p. 48-53, 1999.

FATEMI, S.H. et al. Prenatal viral infection in mouse causes differential expression of genes in brains of mouse progeny: a potential animal model for schizophrenia and autism. **Synapse**, v.57, n.2, p.91-9, 2005.

FERNANDES, F. D. M. et al . Orientação a mães de crianças do espectro autístico a respeito da comunicação e linguagem. **J. Soc. Bras. Fonoaudiol.**,v. 23, n. 1, p. 1-7, 2011.

FERNANDES, P.A. et al. Dual effect of catecholamines and corticosterone crosstalk on pineal gland melatonin synthesis. **Neuroendocrinology**, v.104, n.2, p.126-34, 2017.

FERREIRA, A. F. B. **Neuroplasticidade induzida pelo exercício: efeitos sobre o hipocampo e regiões motoras do encéfalo de ratos**. 2011. 44f. Tese (Doutorado Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FIDELEFF, H. L et al. Gender-related differences in urinary 6-sulfatoxymelatonin levels in obese pubertal individuals. **J Pineal Res.**, v.40, n.3, p.214-8, 2006.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. et al. Frequência das infecções pelo HIV-1, rubéola, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes simples, hepatite B, hepatite C, doença de Chagas e HTLV I/II em gestantes, do Estado de Mato Grosso do Sul. **RevSocBrasMedTrop.**, v.40, n.2, p.181-87, 2007.

FILICE, F. et al. Reduction in parvalbumin expression not loss of the parvalbumin-expressing GABA interneuron subpopulation in genetic parvalbumin and shank mouse models of autism. **Molecular Brain.**, v.9, n.10, p.2 -17, 2016.

FOSTER, T.C.; DEFAZIO, R.A.; BIZON, J.L. Characterizing cognitive aging of spatial and contextual memory in animal models. **Front Aging Neurosci.** 2012; v.4 n.12, p.1-18, 2012.

FREUND, T.F.; BUZSÁKI, G. Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus**, v.6, n.4, p.347- 470, 1996.

FRODL, T. et al. Reduced hippocampal volume correlates with executive dysfunctioning in major depression. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 316-325, 2006.

FRYE, C. A.; LIANEZA, D. C. Corticosteroid and neurosteroid dysregulation in an animal model of autism, BTBR mice. **Physiol Behav.**, v.100, n.3, p.264-67, 2010.

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N.T. Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. **Jornal de pediatria**, v.80, n.2, p. 583-94, 2004.

GARAY, P.A. et al. Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development. **Brain, behavior, and immunity**, v. 31, p. 54-68. 2013.

GERLAI, R. A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice. A strain comparison and lesion study. **Behav Brain Res.**, n.1, p. 91-101, 1998.

GEURTS, H.M.; CORBETT, B.; SOLOMON, M. The paradox of cognitive flexibility in autism. **Trends in cognitive sciences.**, v.13, n. 2, p. 74-82, 2009.

GEURTS, H.M.; VISSERS, M.E. Elderly with Autism: Executive functions and memory. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 42, n.5, p.665-75, 2012.

GIGANTE, A. D. **Estudo do hipocampo de portadores de transtorno afetivo bipolar após o primeiro episódio de mania através do uso da espectroscopia por ressonância magnética de próton (1H-ERM)**. 2013. 172 f.Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

GINHOUX, F. et al. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. **Science**, v.330, n.6005, p.841-45, 2010.

GIOVANOLI, S.; WEBER, L.; MEYER, U. Single and combined effects of prenatal immune activation and peripubertal stress on parvalbumin and reelin expression in the hippocampal formation. **Brain Behav Immun.**, v.40, p.48-54, 2014.

GLEZER, I; SIMARD, A.R.; RIVEST, S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. **Neuroscience**, v.147, n.4, p.867-83, 2007.

GOMES, F.C.A.; TORTELLI, V. P; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estud. av.**,v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.

GOMES, P.T.M. et al . Autismo no Brasil, desafios familiares e estratégias de superação: revisão sistemática. **J. Pediatr.**, v. 91, n. 2, p. 111-121, 2015 .

GRIGSBY, P.L. Animal models to study placental development and function throughout normal and dysfunctional human pregnancy. **Seminars in reproductive medicine**, v.34, n.1, p.11-16, 2016.

GULYÁS, A.I. et al. Septal GABAergic neurons innervate inhibitory interneurons in the hippocampus of the macaque monkey. **Neuroscience**, v.41, n.2-3, p.381-90, 1991.

GUO, H. et al. Genetics of autism spectrum disorders. **Zhong Nan Da XueXueBao Yi Xue Ban.**, v. 36, n. 8, p.703-11,2011.

HALL, L.; KELLEY, E. The contribution of epigenetics to understanding genetic factors in autism. **Autism.**,v.18, n.8, p.872-81, 2014.

HAMER, B.L.; MANENTE, M. V.; CAPELLINI, V.L.M.F. Autismo e família: revisão bibliográfica em bases de dados nacionais. **Rev. Psicopedag.**, v. 31, n. 95, p. 169-77, 2014.

HAN, F.; XIAO, B.; WEN, L. Loss of glial cells of the hippocampus in a rat model of post-traumatic stress disorder. **Neurochem Res.**, v.40, n.5, p.942-51, 2015.

HASHEMI, E. et al. The number of parvalbumin-expressing interneurons is decreased in the medial prefrontal cortex in autism. **Cereb Cortex.**, v.27, n.3, p.1931-43, 2017.

HASHIMOTO, T. et al. Reduced brainstem size in children with autism. **Brain Dev.**, v.14, p. 94-7, 1992.

HERBERT, M.R. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. **Curr Opin Neurol.**, v.23, n.2, p.103-10, 2010.

HERMAN, A. P. et al. Endotoxin-induced inflammation disturbs melatonin secretion in ewe. **Asian-Australas J Anim Sci.**, v.30, n.12, p.1784-95, 2017.

HINES, D. J. et al. Prevention of LPS-Induced Microglia Activation, Cytokine Production and Sickness Behavior with TLR4 Receptor Interfering Peptides. **PLoS ONE.**, v.8, n.3, p. 1-10, 2013.

HOF, P.R. et al. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. **J.Chem. Neuroanat.**, v.16, p.77-116,1999.

HOL, E.M.; PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Curr Opin Cell Biol.**, v.32, p.121-30, 2015.

HOOGLAND, I. C. et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **Journal of Neuroinflammation.**, v.12, n.14, p. 2-13, 2015.

HUGUES, S.; DESCHAUX, O.; GARCIA, R. Postextinction infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into the medial prefrontal cortex impairs memory of the extinction of conditioned fear. **Learn Mem.**, v.11, n.5, p.540-3, 2004.

INOUE, T.; NAKAMURA, S.; OSUMI, N. Current topics in comparative developmental biology of vertebrate brains. **Neurosci Res.**, v.39, n.4, p.371-76, 2001.

IZQUIERDO, I. Memórias. **Estud. Av.**, v. 3, n. 6, p. 89-112, 1989 .

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. *Revista USP*, n. 98 p. 9-16, 2013.

JAWAID, S. et al. Alterations in CA1 hippocampal synapses in a mouse model of fragile X syndrome. **Glia**, v.66, n.4, p.789-800, 2018.

JIN, Y. et al. The relationship between Autism Spectrum Disorder and Melatonin during Fetal Development. **Molecules**, n.23, p.198, 2018.

JOHNSON, C.P.; MYERS, S.M. American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. **Pediatrics**, v.120, n.5, p.1183-215, 2007.

JONSSON, L. et al. Association between ASMT and autistic-like traits in children from a Swedish nationwide cohort. **Psychiatr Genet.**, v.24, n.1, p. 21-7, 2014.

JOSHI, N. et al. Promising Role of Melatonin as Neuroprotectant in Neurodegenerative Pathology. **Mol Neurobiol.**, v.52, n.1, p.330- 40, 2015.

JUNIOR, C. A. M.; MELO, L. B. R. Integração de três conceitos: função executiva, memória de trabalho e aprendizado. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v.27 n. 3, p. 309-14, 2011.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous Child**, v.2, p. 217-50, 1943.

KANNER, L.; EISENBERG, L. Early infantile autism, 1943-1955. **Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc.**, n.7, p.55-65,1957.

KAPLAN, S. et al. The disector counting technique. **Neuroquantology**, v.10, n. 1, p. 44-53, 2015.

KENNAWAY, D.J.; KENNAWAY, F.C.; GOBLE, G.E. Stamp factors influencing the development of melatonin rhythmicity in humans. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.81, n.4, p. 1525-32, 1996.

KIM, H.G. et al. Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. **American Journal of Human Genetics**, v.82, n.1, p.199-207,2008.

KIRSTEN, T. B. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 4, p. 240-251, 2010.

KIRSTEN, T.B. **Lipopolissacarídeo no início do periodpre-natal como modelo experimental de autism e prejuízos dopaminérgicos estriatais**. 2012. 195f. Tese (Doutorado Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KIRSTEN ,T.B. et al. Lipopolysaccharide exposure induces maternal hypozincemia, and prenatal zinc treatment prevents autistic-like behaviors and disturbances in the striatal dopaminergic and mtor systems of offspring. **PLoS ONE**, v.10, n.7, p. 1-18, 2015.

KIRSTEN, T.B.; BERNARDI, M.M. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. **Behav Brain Res.**, v.28, p. 25-29,2017.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Curr Biol.**, v.25, n.23, p. 1116-21, 2015.

KNOWLES, W.D. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation **J Clin Neurophysiol.**, v.9, n.2, p. 252-63,1992.

KNOX, J.J. et al. T-bet⁺ B cells are induced by human viral infections and dominate the HIV gp140 response. **JCI Insight**, v. 2, n. 8, p.929 - 43, 2017.

KOBAYASHI, M.; BUCKMASTER, P.S.Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy.**J Neurosci.**, v.23, n.6, p.2440-52, 2003.

KONG, X. et al. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. **CELL MOL NEUROBIOL.**, v.28, n.4, p. 569-79, 2008.

KONSMAN, J. P. et al. The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals: A functional anatomical analysis. **Eur. J. Neurosci.**, v.12, p. 4434-446, 2000.

KONRADI, C. et al. Hippocampal interneurons in bipolar disorder. **Archives of general psychiatry.**, v.68, n.4, p.340-50, 2011.

KOYAMA, R.; IKEGAYA, Y. Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders. **Neurosci Res.**, v.100, p.1-5, 2015.

KRIGGER, K.W. Cerebral palsy na overview. **Am Fam Physician.** v. 73, p. 91- 100, 2006.

KULLMANN, D.M. Interneuron networks in the hippocampus. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 21, n. 5, p. 709-16, 2011.

KULESZA, R.J.; MANGUNA, Y. Morphological features of the medial superior olive in autism. **Brain Res.**, v.2, p.132–137, 2008.

KWON, C. H. et al. Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. **Neuron.**, v. 50, n. 3, p. 377-88, 2006.

LAINHART, J.E. Advances in autism neuroimaging research for the clinician and geneticist. **Am J Med Genet C Semin Med Genet.**, v.142, n.1, p.33-9, 2006.

LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.26, n.1, p.91-104, 2002.

LANA, D. et al. Alterations in the Interplay between Neurons, Astrocytes and Microglia in the Rat Dentate Gyrus in Experimental Models of Neurodegeneration. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v.9, n.296, 2017.

LANDRIGAN, P. J. What causes autism? Exploring the environmental contribution. **Current opinion in pediatrics**, v. 22, n.2, p. 219-25,2010.

LAURENCE, J.A.; FATEMI, S.H. Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. **Cerebellum**, v.4, n.3, p.206-10, 2005.

LAWRENCE, Y.A. et al. Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive hippocampal interneuron density in autism. **Acta Neurol Scand.**, v.121, n.2, p.99-108, 2010.

LEE, S.H. et al. Parvalbumin-positive basket cells differentiate among hippocampal pyramidal. **Cells. Neuron.**, v.82, n.5, p.1129-144, 2014.

LEE, T.T. et al. No preliminary evidence of differences in astrocyte density within the white matter of the dorsolateral prefrontal cortex in **autism. Mol Autism.**, v. 8, n.8, p.64, 2017.

LEMOS, K. R.; ALESSI, A. C. Astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em sistema nervoso central de equinos normais e de equinos com leucoencefalomalácia. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 19, n. 3-4, p. 104-108, 1999.

LEVITON, A.; DAMMANN, O.; DURUM, S. K. The adaptive immune response in neonatal cerebral white matter damage. **Annals of Neurology**, v. 58, n. 6, p. 821-828, 2005.

LI, Q. et al. The Gut Microbiota and autism spectrum disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.11, 120, p. 1-14, 2017.

LI, X.; ZOU, H.; BROWN, W.T. Genes associated with autism spectrum disorder. **Brain Res Bull.**, v.88, n.6, p.543-52, 2012.

LIMA, J. B. A. et al. Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos induzida por sepse: estudo experimental em ratos. **ABCD, arq. bras. cir. dig.**, v.24, n.2, p.95-102, 2011.

LIN, H.Y. et al. Shared atypical brain anatomy and intrinsic functional architecture in male youth with autism spectrum disorder and their unaffected brothers. **Psychol Med.**, v.47, n.4, p.639-54, 2017.

LINDAU, T. A. et al. Instrumentos sistemáticos e formais de avaliação da linguagem de pré-escolares no brasil: uma revisão de literatura. **Rev. CEFAC**, v.17, n. 2, p. 656-62, 2015 .

LIU. X. et al. Population- and family-based studies associate the MTHFR gene with idiopathic autism in simplex families. **J Autism DevDisord.**, v.41, n.7, p.938-44, 2011.

LOTTER V. Epidemiology of autistic conditions in young children. **Social psychiatry**, v.1, n.3, p.124-35, 1996.

LU, Q. et al. Genetic alterations of δ -catenin/NPRAP/neurojungin (CTNND2): Functional implications in complex human diseases. **Humangenetics**, v.135, n.10, p.1107-1116, 2016.

MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Front Neuroendocrinol.**, v.25, n.3-4, p.177-95, 2004.

MACHADO, M. G.; et al. Alterações anátomofuncionais do sistema nervoso central no transtorno autístico-um estudo com RNM e SPECT. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, n. 4, p. 957-61, 2003.

MACFABE, D.F. et al. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. **Behav Brain Res.**, v.217, n.1, p. 47-54, 2011.

MAHR, J.; CSIBRA, G. Why do we remember? The communicative function of episodic memory. **Behav Brain Sci.**, v.19, p.1-93, 2017.

MAIER, S. et al. Increased hippocampal volumes in adults with high functioning autism spectrum disorder and an IQ4100: A manual morphometric study. **Neuroimaging**, v.234, p. 152-155, 2015.

MALAEB, S.N. et al. Effect of sustained postnatal systemic inflammation on hippocampal volume and function in mice. **Pediatric research**, v.76, n.4, p.363-369, 2014.

MANCINI, M.C. et al. Comparação do desempenho de atividades funcionais em crianças com desenvolvimento normal e crianças com paralisia cerebral. **Arq Neuropsiquiatr.**, v.60, n.2, p. 446-52, 2002.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v.75, n. 4, p. 469-86, 2003.

MARCONDES, M, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, v. 62, n. 4, p. 609-14, 2002.

MARÍN, O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. **Nat Rev Neurosci.**, v.13, n.2, p.107-20, 2012.

MARKUS, R. P. et al. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, v.14, n.3/4, p.126-33, 2007.

MARKUS, R.P. et al. Immune-pineal axis - acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. **Br J Pharmacol.**, 2017.

MASI, A. et al. The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder. **Neuroscience Bulletin**, v.33, n.2, p.194-204, 2017.

MCPARTLAND, J.; VOLKMAR, F.R. Autism and related disorders. **Handb Clin Neurol.**, v.106, p.407-18, 2012.

MEAD, J.; ASHWOOD, P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. **Immunol Lett.**, v.163, n.1, 49-55, 2015.

MELKE, J. et al. Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. **Molecular Psychiatry.**, v.13, n.1, p.90-8, 2008.

MELLO, A. M. S. R. Autismo: guia prático. 5ª ed. São Paulo: **AMA**; Brasília: Corde, v. 104, 2007.

MELO, T. M. et al. Relações entre alterações anatomofuncionais do sistema nervoso central e autismo. **Revista CEFAC**, v.1, p. 36-41, 2006.

MELTZER, A.; VAN DE WATER J. The role of the immune system in autism spectrum disorder. **Neuropsychopharmacology**, v.42, p. 284-98, 2017.

MERCHANT, N. M. et al. Pharmacokinetics of melatonin in preterm infants. **Br J ClinPharmacol.**, v.76, n.5, p. 725-733, 2013.

MIDDELDORP, J.; HOL, E.M.GFAP in health and disease. **Prog Neurobiol.**, v.93, n.3, p. 421-43,2011.

MIETTINEN, M. et al. Coexistence of parvalbumin and GABA in nonpyramidal neurons of the rat entorhinal cortex. **Brain Res.**, v.706, n.1, p.113-22, 1996.

MIKKONEN, M. et al. Miettinen subfield- and layer-specific changes in parvalbumin, calretinin and calbindin-D28k immunoreactivity in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v.92 , p. 515-32, 1999.

MORGAN, J.T. et al. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. **Biol Psychiatry.**, v.68, n.4, p.368-76, 2010.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicol. USP**, v.17, n.4, p. 159-74, 2006.

NAKAMURA, T. et al. Relationships among parvalbumin-immunoreactive neuron density, phase-locked gamma oscillations, and autistic/schizophrenic symptoms in pdgfr- β knock-out and control mice. **PLoS ONE**, v.10, n.3, p.1-21, 2015.

NEEDHAM, B.D.; TANG, W.; WU, W.L. Searching for the gut microbial contributing factors to social behavior in rodent models of autism spectrum disorder. **Dev Neurobiol.** v.78, n.5, p.474-99, 2018.

NELSON, K. B.; GREYER, J. K.; CROEN, L. A. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. **Ann. Neurol.**, v.49, n.5, p. 597- 606, 2001.

NETO, J. A. S.; CASTRO, B. F. Melatonina, ritmos biológicos e sono - uma revisão da literatura. **Rev Bras Neurol**, v.44, n.1, p.5-11, 2008.

NERY, V. W. Efeitos da probabilidade e proporção de reforço sobre o comportamento de escolha em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2015.

NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Exp Neurol.**, v. 299, p. 217-27, 2018.

NITHIANANTHARAJAH, J. et al. Using animal models to study the role of the gut–brain axis in autism. **Current Developmental Disorders Reports.**, v.4, n.2, p.28-36, 2017.

NORDEN, D.M. Sequential Activation of Microglia and Astrocyte Cytokine Expression Precedes Increased Iba-1 or GFAP Immunoreactivity following Systemic Immune Challenge. **Glia.**, v.64, n.2, p.300-16, 2016.

OBERMAN, L.M. et al. EEG evidence for mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. **Brain Res Cogn Brain Res.**, v.24, n.2, p.190-8, 2005.

OLIVEIRA, K.C. Análise estereológica postmortem do córtex orbitofrontal de indivíduos acometidos por transtorno obsessivo-compulsivo ou por transtorno afetivo bipolar. 2013. 235f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O'LOUGHLIN, E. et al. Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. **J Neuroinflammation**, v.14 n.1 p.212. 2017.

ONORE, C.; CAREAGA, M.; ASHWOOD, P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. **Brain, behavior, and immunity**, v. 26, n.3, p. 383-92, 2012.

O'SULLIVAN, A. M. et al. The effect of campylobacter lipopolysaccharide on fetal development in the mouse. **J. Med. Microbiol.**, v. 26, p. 101-5, 1988.

PACCOLA, C. C. et al. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. **Anim. Reprod.**, v.10, n.4, p.677-83, 2013.

PAN, Z. et al. Role of proinflammatory cytokines in dopaminergic system disturbances, implications for anhedonic features of MDD. **Current Pharmaceutical Design**, v.23, n.14, p. 2065-2072, 2017.

PANG Y, et al. Early Postnatal Lipopolysaccharide Exposure Leads to Enhanced Neurogenesis and Impaired Communicative Functions in Rats. **PLoS ONE**, v.11, n.10, p.1-18, 2016.

PARELLADA, M. et al. The neurobiology of autism spectrum disorders. **Eur Psychiatry**. v.29, n.1, p.11- 9, 2014.

PARKER-ATHILL, E.C.; TAN, J. Maternal immune activation and autism spectrum disorder: interleukin-6 signaling as a key mechanistic pathway. **Neuro-Signals**, v.18, n.2, p.113-28, 2010.

PAUL. C. R.;MAGDA, G.; ABELA, S. Spatial memory: theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. **Behavioural Brain Research**, v.203, n. 2, p. 151- 64, 2009.

PAULA, C.S. et al. Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: a pilot study. **J Autism Dev Disord.**, v. 41, n.12, p.1738-42, 2011.

PAXINOS, G.;WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th dn. San Diego, CA: **Academic Press.**, 2006.

PENATTI, C. A. A.; SILVA, J. C. Dos modelos animais à investigação do transtorno do espectro autista: Correlação com a fonte materna? **Resbcal**, v.2, n.3, p. 215-219, 2014.

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neurosci Lett.**, v.565, p.30-8, 2014.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **J Pathol.**, v.204, n.4, p.428-37, 2004.

PELLICANO, E. The development of core cognitive skills in autism: a 3-year prospective study. **Child Dev.**, v.81, n.5, p.1400-16, 2010.

PERKINS, T. et al. Mirror neuron dysfunction in autism spectrum disorders. **J Clin Neurosci.**, v.17, n.10, p.1239-43, 2010.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends Neurosci.**, v. 32, n. 8, p.421-31, 2009.

PEREIRA, O. C.; BERNARDI, M. M.; GERARDIN, D. C. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? **Life Sciences**, v.78, n.24, p.2767-771, 2006.

PETRELLI, F.; PUCCI, L.; BEZZI, P. Astrocytes and microglia and their potential link with autism spectrum disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.10, n. 21, p. 1-8, 2015.

PETRYSZYN, S.; PARENT, A.; PARENT, M. The calretinin interneurons of the striatum: comparisons between rodents and primates under normal and pathological conditions. **J Neural Transm**, p. 1-12, 2017.

PHATNANI, H.; MANIATIS, T. Astrocytes in neurodegenerative disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.7, n.6, p.1 -18, 2015.

PINATO, L. et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. **Brain Struct Funct.**, v.220, n.2, p.827- 40, 2015.

PINTO, A. C. Memória, cognição e educação: Implicações mútuas. In B. Detry e F. Simas (Eds.), **Educação, cognição e desenvolvimento**, p. 17-54, 2001.

PINTO, A.R.; DA SILVA, N.C.; PINATO L. Analyses of melatonin, cytokines, and sleep in chronic renal failure. **Sleep Breath.**, v.20, n.1, p.339-44, 2016.

PIVEN, J. et al. No difference in hippocampus volume detected on magnetic resonance imaging in autistic individuals. **J Autism Dev Disord.**, v. 28, p.105-10, 1998.

PONTES, G.N. et al. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. **J Pineal Res.**, v.43, n.4, p.365-71, 2007.

RATNAYAKE, U. et al. Behaviour and hippocampus-specific changes in spiny mouse neonates after treatment of the mother with the viral-mimetic Poly I:C at mid-pregnancy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.26, p.1288-1299, 2012.

REDDIHOUGH, D.S.; COLLINS, K.J. The epidemiology and causes of cerebral palsy. *Aust J Physiother*, v. 49, n.1, p.7-12, 2003.

REICHENBACH, A.DEROUICHE, A.; KIRCHHOFF, F. Morphology and dynamics of perisynaptic glia **Brain Research Reviews**,v. 63,n.1-2, p. 11-25, 2010.

REICHOW, B. Overview of meta-analyses on early intensive behavioral intervention for young children with autism spectrum disorders. **J Autism Dev Disord.**, v. 42, n.4, p. 512-20, 2012.

REISINGER, S.et al. The poly (I:C) - induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. **PHARMACOL THER.**, v. 149, p. 213-26, 2015.

REYNOLDS, S.; URRUELA, M.; DEVINE, D.P. Effects of environmental enrichment on repetitive behaviors in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **Autism Res.**, v. 6, n. 5, p.337-43, 2013.

RITVO E. R. et al. Autism: diagnosis, current research and management. **New York: Spectrum**, 1976.

RONOVSKY, M. et al. Animal models of maternal immune activation in depression research. **Current Neuropharmacology.**, v.14, n. 7, p.688-704, 2016.

RORIZ, D.A.C.; CANIÇO, H. P. **Autismo: o doente a família e a sociedade**. 2016. 111f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra- Portugal, 2016.

ROSSATO, J.I. et al. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. **Learn Memory**, v.13, n.4, p. 431-40, 2006.

ROSSIGNOL, D.A.;FRYE, R. E. Melatonin in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis.**Dev Med Child Neurol.**, v.53, n.9, p. 783-92, 2011.

ROSENBAUM, R.S. et al. Remote spatial memory in aging: all is not lost. **Front Aging Neurosci.**, v. 4, n. 25, p. 1-10, 2012.

SABERS, A. et al. Long-term valproic acid exposure increases the number of neocortical neurons in the developing rat brain. A possible new animal model of autism. **Neurosci Lett.**, v.580, p.12-6, 2014.

SAGRILLO-FAGUNDES, L.et al. Melatonin in pregnancy: effects on brain development and cns programming. **Disorders.Curr Pharm Des.**, v.22, n.8, p.978-86, 2016.

SAITOH, O.; KARNS, C.M.; COURCHESNE, E. Development of the hippocampal formation from 2 to 42 years: MRI evidence of smaller area dentata in autism. **Brain J Neurol.**, v.124, p.1317-24, 2001.

SANDERSON, D.J.; BANNERMAN, D.M. The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. **Hippocampus**, v.22, n.5, p.981-94, 2012.

SANTOS, B.F. Modelo animal. in. animais de laboratório criação e experimentação. **Editores FioCruz**, p. 33, 2002.

SATO, A. mTOR, a potential target to treat autism spectrum disorder. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v.15, n.5, p.533-43, 2016.

SAVAGE, L. M.; BUZZETTI, R. A.; RAMIREZ, D. R. The effects of hippocampal lesions on learning, memory, and reward expectancies. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 82, p. 109-119, 2004.

SCHUMANN, C.M.; AMARAL, D.G.Stereological analysis of amygdala neuron number in autism.**J Neurosci.**, v.26, n.29, p. 7674-679, 2006.

SCHUMANN, C. M. et al. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. **Journal of Neuroscience**, v.24, n.28, p.6392-401, 2004.

SCHWALLER, B. Calretinin: from a “simple” Ca^{2+} buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes. **Frontiers in Neuroanatomy**, v.8, n.3, p. 1-7, 2014.

SERENIKI, A.; VITAL, M.A.B.F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. **Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul**, v. 30, n. 1, p.1-17, 2008.

SILVA, J. G. **Caracterização de subpopulações de interneurônios imunorreativos para proteínas ligante de cálcio no córtex pré-frontal do Saguí (*Callithrix jacchus*): distribuição e morfologia**. 2011. 113f. Tese (Doutorado Psicobiologia) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2011.

SILVA, D.C.R. et al. Percepção de mães com filhos diagnosticados com autismo. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, v.7, n.3, p.377-83, 2017.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol Rev.**, v.55, n.2, p.325-95, 2003.

SMITH, S.E.P. et al. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v.27, n.40, p.10695-702, 2007.

SOFRONIEW, M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends in neurosciences**, v.32, n.12, p.638-47, 2009.

SOLOMON, B.D.; HSIEH, C.S. Antigen specific development of mucosal Foxp3+ROR γ t+ T cells from regulatory T cell precursors. **Journal of immunology**, v. 197, n.9, p.3512-519, 2016.

SOUSA, A. B.; SALGADO, T. D. M. Memória, aprendizagem, emoções e inteligência. **Revista Liberato**, v.16, n.26, p.101-220, 2015.

SPINELLI, L. et al. Functionally distinct groups of inherited PTEN mutations in autism and tumour syndromes. **Journal of Medical Genetics**, v.52, n.2, p.128-34, 2015.

STANFIELD, A.C. et al. Towards a neuroanatomy of autism: a systematic review and meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. **Eur Psychiatry**, v.23, n.4, p.289-99, 2008.

STEVENS, R.; COWEY, A. Effects of dorsal and ventral hippocampal lesions on spontaneous alternation, learned alternation and probability learning in rats. **Brain Res.**, v.52, p.203-24, 1973.

SULLIVAN, K.; STONE, W.L.; DAWSON, G. Potential neural mechanisms underlying the effectiveness of early intervention for children with autism spectrum disorder. **Research in developmental disabilities**, v.35, n.11, p.2921-32, 2014.

SUZUKI, K, et al. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. **JAMA Psychiatry.**, v.70, n.1, p.49-58, 2013.

TAKANO, T. Role of Microglia in Autism: Recent Advances. **Dev Neurosci.**, v.37, n.3, p.195-20, 2015.

TANG, G. et al. Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. **Neurobiology of disease**, v.54, p.349-61, 2013.

TARICANO, M. **Efeitos da administração pré-natal de LPS no aprendizado e/ou memória na prole de ratas.** 2010. 104f. Dissertação (Mestrado Instituto de Psicologia) Universidade de São Paulo, 2010.

TIMOFEEVA, A. O. A. et al. Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, n. 1, p. 38-45, 2008.

TÓTH, K.; MAGLÓCZKY, Z. The vulnerability of calretinin-containing hippocampal interneurons to temporal lobe epilepsy. **Frontiers in Neuroanatomy**, v.8, n.100, p. 1-12, 2014.

TAVARES A.L.A. **Padrões de descarga neuronal na região de CA1 do hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal e de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina : um estudo comparativo.** 2006. 205f. Tese (Doutorado em Neurociências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2006.

TORDJMAN, S. et al. Advances in the research of melatonin in autism spectrum disorders: literature review and new perspectives. **Int J Mol Sci.**, v. 14, n.10, p. 20508-42, 2013.

TURNER, D. A. et al. Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. **Progress in Neurobiology**, v.55, n. 6, p. 537-62, 1998.

TURNER, T.N. et al. Loss of delta catenin function in severe autism. **Nature**, v.520, n.7545, p.51-56, 2015.

URAKUBO, et al. Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. **Schizophr Res.**, v.47, n.1, p.27-36, 2015.

VAN HOESEN, G. V.; HYMAN, B.T. Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. **Progress in Brain Research**, v. 83, p. 445-57, 1990.

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

VAROQUEAUX, F. et al. Neuroligins determine synapse maturation and function. **Neuron.**, v. 51, n.6, p.741-54, 2006.

VERLY, M. et al. Altered functional connectivity of the language network in ASD: Role of classical language areas and cerebellum. **NeuroImage : Clinical.** , v.4, p.374-82, 2014.

VERNES, S.C. et al. A functional genetic link between distinct developmental language disorders. **The New England journal of medicine**, v.359, n.22, p.2337-345, 2008.

VIVAR, C.; VAN-PRAAG, H. Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. **Frontiers in Neural Circuits**, v.7, n.15, p. 1-13, 2013.

VOICULESCU, S. et al. Role of melatonin in embryo fetal development. **J Med Life.**, v.7, n.4, p.488-92, 2014.

VOLKMAR, F.R. et al. Field trial for autistic disorder in DSM-IV. **Am J Psychiatry.**, v.151n.9, p.1361-7, 1994.

WALLACE, K.S.; ROGERS, S.J. Intervening in infancy: implications for autism spectrum disorders. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v.51, n.12, p.1300-20, 2010.

WANG, K. C. et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. **Neuroscience**, v.234, p.146-157, 2013.

WANG, Z. et al. Reelin gene variants and risk of autism spectrum disorders: an integrated meta-analysis. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.**, v.165, n.2, p.192-200, 2014.

WATANABE, M. A. E. et al. Gestação: Um desafio imunológico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 147- 162, 2014.

WATSON, N. et al. Melatonin as an antioxidant for stroke neuroprotection. **Cell Transplant.**, v.25, n.5, p.883- 91. 2016.

WEGIEL, J. et al. Stereological study of the neuronal number and volume of 38 brain subdivisions of subjects diagnosed with autism reveals significant alterations restricted to the striatum, amygdala and cerebellum. **Acta Neuropathologica Communications**, v.2, n.141, p. 1-18, 2014.

WEGIEL, J. et al. Neuronal nucleus and cytoplasm volume deficit in children with autism and volume increase in adolescents and adults. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 2, n.3, p.1-17 2015.

WEST, M.J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H.J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **Anat Rec.**, v. 231, n.4, p.482-97, 1991.

WILLIAMS, M.R. et al. Astrocyte decrease in the subgenual cingulate and callosal genu in schizophrenia. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.**, v.263, n.1, p.41-52, 2013.

WISCHHOF, L. et al. Prenatal LPS-exposure--a neurodevelopmental rat model of schizophrenia- differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.3, n.57, p.17-30, 2015.

WOLF, A. et al. A comprehensive behavioral test battery to assess learning and memory in 129S6/Tg2576 mice. **PLoS ONE**, v.11, n.1, p. 1-23, 2016.

WÖHR, M. et al. Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. **Translational Psychiatry.**, v.5, n.3, p.1-15, 2015.

WOUTERLOOD, F.G. Spotlight on the neurones (I): cell types, local connectivity, microcircuits, and distribution of markers. **Oxford University Press.**, p. 61-88, 2002.

WU, C.; SUN, D. GABA receptors in brain development, function, and injury. **Metabolic brain disease**, v.30, n.2, p.367-79, 2015.

YANG, Z.; WANG, K.K.W. Glial fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. **Trends in Neurosciences**, v.38, n.6, p.364-74, 2015.

YENKOYAN, K. et al. Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. **Behav Brain Res.**, v.28, n.331, p.92-101, 2017.

YOO, H. Genetics of autism spectrum disorder: current status and possible clinical applications. **Experimental Neurobiology**, v.24, n.4, p.257-72, 2015.

YOUNG, J.; DAVID, B.; NUNZIO, P. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v.169, p. 15-20, 2014.

ZALETEL, I.; FILIPOVIĆ, D.; PUŠKAŠ, N. Chronic stress, hippocampus and parvalbumin-positive interneurons: what do we know so far? **Rev Neurosci.**, v. 27, n.4, p.397-409, 2016.

ZHANG, T. et al. Alcohol suppresses IL-2–Induced CC Chemokine Production by Natural Killer Cells. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.29, n.9, p.1559-567, 2005.

ZHANG, Z.; VAN PRAAG, H. Maternal immune activation differentially impacts mature and adult-born hippocampal neurons in male mice. **Brain Behav Immun.**, v.45, p.60-70, 2015.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGEF, H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, n.4, p. 645-60, 2008.

ZIMMERMANN, B. et al. Expression of the calcium binding proteins Necab-1,-2 and -3 in the adult mouse hippocampus and dentate gyrus. **Brain Res.**,v.1528, p.1-7, 2013.

ZUCULO, G. M. et al. Melatonin and circadian rhythms in autism: Case report. **Chronobiol Int.** v.34, n.4, p.527-30, 2017.