



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Iohanna Deckmann

ALTERAÇÃO DE PERMEABILIDADE ENCEFÁLICA E EFEITO PROTETOR DO
RESVERATROL SOBRE ALTERAÇÕES NO PERFIL DE AQUAPORINAS NO
MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO
ÁCIDO VALPROICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

ALTERAÇÃO DE PERMEABILIDADE ENCEFÁLICA E EFEITO PROTETOR DO
RESVERATROL SOBRE ALTERAÇÕES NO PERFIL DE AQUAPORINAS NO
MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO
ÁCIDO VALPROICO

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.

IOHANNA DECKMANN

ORIENTADORA: Prof.^a. Dr.^a. Carmem Juracy Silveira Gottfried

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Deckmann, Iohanna

Alteração de Permeabilidade Encefálica e Efeito Protetor do Resveratrol sobre Alterações no Perfil de Aquaporinas no Modelo Animal de Autismo Induzido por Exposição Pré-Natal ao Ácido Valproico / Iohanna Deckmann. -- 2018.

65 f.

Orientadora: Carmem Gottfried.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Autismo. 2. Ácido valproico. 3. Resveratrol. 4. Aquaporinas. 5. Barreira hematoencefálica. I. Gottfried, Carmem, orient. II. Título.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Carmem por ter me recebido de braços abertos no grupo, me possibilitando um mundo de oportunidades e de aprendizado. Obrigada pelo teu entusiasmo com a pesquisa e por nos permitir ser livres enquanto pesquisadores. Obrigada por tornar o PNG minha segunda casa! Por extensão, agradeço também ao Victorio pela oportunidade de fazer parte do grupo.

Aos meus colegas de laboratório, por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido, leve e por estarem sempre ao meu lado me estendendo a mão. Aos queridos Marília, Giovanna, Rafael, Pedro, Tayssa e Bruna por toda ajuda. Ao Gui e o Brum por serem meus fiéis escudeiros. Ao Mauro por dividir comigo todos os momentos. Ao Júlio e à Mell que têm uma participação mais do que especial na realização desse trabalho. Obrigada por abraçarem a causa junto comigo!

Aos alunos do professor Guilhian, colegas do lab 27, por todos os momentos de contribuição e descontração. Em especial, meu muitíssimo obrigada à Bell!

Ao meu querido Mauro, por ser meu companheiro tanto na pesquisa quanto na vida. Por me ensinar, me ouvir, ser um grande parceiro para todas as horas e ser, acima de tudo, um grande incentivador.

À minha família, meus pais e minha irmã, por serem meu alicerce, por me darem todo suporte e estrutura financeira e afetiva. Obrigada pelo amor incondicional, pela paciência e por me incentivarem a não desistir.

Ao PPG Bioquímica e, por extensão, à secretaria do PPG pela excelente organização e agilidade, facilitando em muito nossa vida de pós-graduando;

Às agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em NeuroImunoModulação (INCT-NIM) e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA).

Aos animais, que não por escolha própria, contribuíram com suas vidas para realização desse trabalho.

“Nós não somos o que gostaríamos de ser.
Nós não somos o que ainda iremos ser.
Mas, graças a Deus,
Não somos mais quem nós éramos. ”

Martin Luther King

Resumo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada, segundo o DSM-V, por uma tríade comportamental: déficits de comunicação e interação social além de comportamentos repetitivos ou estereotipados. Uma observação de extrema importância na clínica é a de maior volume encefálico nos primeiros anos de vida do paciente com TEA, sendo esse aumento revertido ao longo da vida, tendo normalizado já no início da adolescência. Porém, durante o desenvolvimento é frequente uma maior permeabilidade de barreiras neurais. Apesar da etiologia do autismo ser desconhecida, tanto fatores genéticos quanto ambientais já foram associados à desordem, incluindo a utilização de ácido valproico (VPA) durante a gestação. Por isso, nosso grupo tem utilizado um modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA. Por meio desse modelo, demonstramos que o tratamento pré-natal com resveratrol (RSV) foi capaz de prevenir comportamentos do tipo autista na prole do grupo VPA. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a permeabilidade de barreiras encefálicas e a expressão e localização de aquaporina (AQP) 1, 4 e 9 em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) em modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA. A obtenção dos animais passou por um processo inicial de acasalamentos, onde a confirmação da fecundação foi através da identificação de espermatozoides no líquido vaginal na manhã posterior ao pareamento. O modelo animal foi obtido através de uma única injeção intraperitoneal de VPA (600mg/kg) no E12,5 nas fêmeas prenhes. O tratamento com RSV (3,6 mg/Kg) ocorreu dos dias E6,5 ao E18,5 via subcutânea. Para a obtenção do material biológico dos filhotes machos com 30 dias, diferentes procedimentos foram realizados, de acordo com cada técnica, mediante preceitos éticos de experimentação animal para obtenção do tecido a fresco e para fixação com paraformaldeído 4%. No ensaio de permeabilidade de barreira, os animais do grupo VPA apresentaram maior entrada do corante azul de Evans nas regiões do plexo coroide e na área somatossensorial. Na análise da expressão proteica por *western blotting*, o grupo VPA apresentou diminuição de AQP1 e aumento de AQP4 na área somatossensorial e diminuição da AQP9 na região da amígdala, sendo só o aumento de AQP4 prevenido pelo tratamento com RSV. Com a técnica de imunofluorescência, observou-se diminuição somente na marcação da AQP1 no plexo coroide, juntamente com alteração morfológica dessa estrutura em ambos os grupos que receberam VPA. Esses resultados de maior permeabilidade e de alteração em AQP corroboram com os dados clínicos de edema e de maior volume encefálico descritos na literatura. Os mecanismos envolvendo esse perfil de expressão alterado no contexto do TEA ainda permanecem desconhecidos. Podemos concluir com o presente trabalho que os animais do grupo VPA possuem maior marcação do corante azul de Evans e alteração na expressão proteica de AQP em diferentes regiões do SNC, indicando possíveis alterações na permeabilidade encefálica no modelo animal de autismo.

Palavras-chave: TEA, barreira hematoencefálica, aquaporina, permeabilidade encefálica, ácido valproico, resveratrol.

Abstract

Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by a behavioral dyad: communication and social interaction deficits, as repetitive or stereotyped behaviors. A clinical observation of extreme importance is the greater encephalic volume early in life of ASD patients, being this reverted throughout and normalized in the beginning of the adolescence. However, during development a greater permeability of neural barriers is frequent. Although the etiology of autism is unknown, both genetic and environmental factors have been associated with the disorder, including use of valproic acid (VPA) during gestation. Therefore, our group has used an animal model of autism induced by prenatal exposure to VPA. By this model, we demonstrated that prenatal treatment with resveratrol (RSV) was able to prevent autistic behaviors in offspring of VPA animals. The aim of the present study was to evaluate the permeability of brain barriers and the expression and location of aquaporin (AQP) 1, 4 and 9 in different regions of the Central Nervous System (CNS) in animal model of autism induced by prenatal exposure to VPA. Animals were mated overnight and the fertilization was confirmed by the identification of spermatozoa in the vaginal fluid in the next morning after the pairing. The animal model of autism was induced by a single intraperitoneal injection of VPA (600mg/kg) at E12.5 in pregnant females. Treatment with RSV (3.6 mg/kg) occurred from days E6.5 to E18.5 subcutaneously. In order to obtain the biological samples of 30-day-old male offspring, different procedures were performed according to each technique, using ethical precepts of animal experimentation to obtain fresh tissue and for fixation with 4% paraformaldehyde. In the barrier permeability assay, animals of the VPA group showed increased Evans blue dye labeling in choroid plexus and somatosensory area. In the Western blotting protein expression analyses, the VPA group showed decreased AQP1 and increased AQP4 in somatosensory area and decreased AQP9 in amygdala region, but the RSV treatment was able to prevent only the increase in AQP4 levels. According immunofluorescence assay, only the AQP1 labeling was observed in choroid plexus, together with morphological alteration of this structure in VPA-exposed animals. These results of increased permeability and alteration in aquaporins levels corroborate the clinical data of edema and of larger encephalic volume described in the literature. However, mechanisms involving this altered expression profile in the context of ASD remain unknown. We conclude with the present work that the animals of the VPA group presented an increased Evans blue dye labeling and alteration in protein expression of aquaporins in different regions of the CNS, indicating possible alterations in brain permeability in animal model of autism.

Key words: ASD, blood-brain barrier, aquaporin, brain permeability, valproic acid, resveratrol.

Lista de abreviaturas

ANOVA – Análise de Variância.

AQP – Aquaporina.

BSA – Albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumin*.

BHE – Barreira hematoencefálica

BHL – Barreira hematoliquórica.

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais.

CMM – Centro de Microscopia e Microanálises da UFRGS

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

DAPI – Corante nuclear, da sigla 4',6-Diamidino-2-Phenylindole.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

DSM-5 – 5ª Edição do Manual Estatístico e Diagnóstico dos Transtornos Mentais, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*.

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*.

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

LCR – Líquido cefalorraquidiano.

NIH – Institutos Nacionais da Saúde, do inglês *National Institutes of Health*.

PBS – Solução salina tamponada com fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*.

RSV – Resveratrol.

SNC – Sistema nervoso central.

TBS – Solução salina tamponada com Tris, do inglês *Tris-buffered saline*.

TEA – Transtorno do espectro autista.

TRIS – 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol ou tris(hidroximetil)aminometano.

TTBS – Solução salina tamponada com fosfato, contendo detergente Tween 20, do inglês *Tween-Tris-buffered saline*.

UEA – Unidade de Experimentação Animal

VPA – Ácido Valproico

Lista de figuras

Figura 1 – Barreiras presentes no sistema nervoso central	6
Figura 2 – Aquaporinas	8
Figura 3 – Linha temporal dos tratamentos aplicados aos animais.....	14
Figura 4 – Análise da barreira hematoencefálica por meio da permeabilidade ao corante azul de Evans	18
Figura 5 – Efeitos da exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA) e resveratrol (RSV) em aquaporinas na área somatossensorial primária, na região da amígdala e no hipocampo	21
Figura 6 – Distribuição das AQP1 e AQP4 em diferentes regiões do SNC	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transtorno do Espectro Autista (TEA).....	1
1.2. Desencadeamento de TEA.....	2
1.3. Modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico	3
1.4. Barreiras do Sistema Nervoso Central	4
1.4.1. Barreira hematoencefálica.....	7
1.4.2. Barreira hematoencefálica.....	7
1.4.3. Aquaporinas.....	8
1.4.4. Alterações de barreiras neurais no TEA	10
1.5. Resveratrol	11
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. Animais.....	13
3.2. Modelo animal de autismo e tratamento com RSV.....	13
3.3. Aspectos éticos	14
3.4. Eutanásia e preparação de amostras.....	14
3.5. Permeabilidade ao corante azul de Evans	15
3.6. Análise de imunoconteúdo de proteínas por <i>Western Blotting</i>	15
3.6.1. Anticorpos utilizados.....	16
3.7. Imunofluorescência	16
3.8. Cuidados de biossegurança e descarte de materiais e resíduos	17
4. RESULTADOS.....	18

4.1.	Permeabilidade ao corante azul de Evans	18
4.2.	Imunoconteúdo das aquaporinas 1, 4 e 9	20
4.2.1.	Área somatossensorial primária	20
4.2.2.	Região da amígdala.....	20
4.2.3.	Hipocampo.....	21
4.3.	Imunofluorescência	23
4.3.1.	Plexo coroide	23
4.3.2.	Região da amígdala.....	23
4.3.3.	Área somatossensorial primária	23
5.	DISCUSSÃO	28
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	34
7.	PERSPECTIVAS.....	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
	ANEXOS	53
	ANEXO 1 - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O autismo foi descrito primeiramente por Leo Kanner na década de 40 e caracterizado como “um distúrbio complexo definido por parâmetros comportamentais” (Leo Kanner, 1943). Atualmente, o Transtorno do Espectro Autista (TEA) se enquadra entre os Transtornos do Neurodesenvolvimento, os quais manifestam-se tipicamente durante a primeira infância resultando em alterações nas habilidades sociais, acadêmicas, pessoais e ocupacionais (DSM-5, 2013).

O TEA agrupa quatro transtornos anteriormente separados em uma única condição: o autismo clássico, a síndrome de Asperger, o transtorno desintegrativo da infância e os transtornos invasivos do desenvolvimento não especificados (DSM-5, 2013). Outra mudança significativa descrita na quinta edição do Manual Estatístico e Diagnóstico dos Transtornos Mentais (DSM-5) é que a caracterização do espectro, anteriormente dividida em três áreas (prejuízo na sociabilidade, na comunicação e presença de estereotípias e comportamentos repetitivos), passa a ser agrupada em dois domínios comportamentais:

a) Prejuízo na comunicação e interação social em múltiplos contextos, incluindo déficits em reciprocidade social, comunicação não-verbal utilizada para interação social e em habilidades para iniciar, manter e entender relacionamentos;

b) Comportamentos repetitivos, atividades e interesses restritos e estereotipados.

Além desses sintomas centrais, diversos outros sintomas e comorbidades associados são frequentes em indivíduos com TEA, como prejuízo intelectual (Bauman, 2010; Mefford et al., 2012), impulsividade, déficit de atenção/hiperatividade, transtornos de ansiedade, problemas de conduta, depressão, e do sono, e epilepsia (Geschwind, 2009; Klintwall et al., 2011; Silver & Rapin, 2012).

Além disso, problemas gastrointestinais, distúrbios hormonais e metabólicos podem estar presentes (Bauman, 2010). Alterações sensoriais também são frequentemente encontradas em pacientes com TEA, podendo haver hipo ou hiper-

responsividade a estímulos sonoros, luminosos e táteis (Grandin, 2009; Kern et al., 2007; Klintwall et al., 2011).

Segundo o último levantamento epidemiológico realizado no Estados Unidos em 2012 e publicado em 2014, a prevalência atual do TEA é de 1:68 (D. L. Christensen et al., 2016). Essa alta prevalência acarreta diversos investimentos públicos em saúde, com elevado custo econômico e social. Assim, o TEA vem atraído a atenção pública nos últimos anos.

1.2. Desencadeamento de TEA

Apesar de haver um padrão restrito para o diagnóstico, o TEA é uma desordem altamente complexa e heterogênea. O transtorno pode estar presente em indivíduos com manifestações distintas, de forma que dois indivíduos dificilmente compartilham o mesmo conjunto de sintomas (Gadia, Tuchman, & Rotta, 2004; Rapin & Tuchman, 2008). Apesar dos avanços na compreensão do TEA, seu diagnóstico é baseado em escalas comportamentais e relatos familiares e, como consequência, geralmente ocorre após dois ou três anos de idade, a medida que os prejuízos sociais gradualmente se tornam mais evidentes (Dover & Le Couteur, 2007). Embora escalas e entrevistas padronizadas auxiliem na caracterização, não há nenhum marcador clínico ou exame que possa ser utilizado para diagnosticar este transtorno (Huerta & Lord, 2012).

Técnicas de diagnóstico por imagem como tomografia computadorizada e ressonância magnética mostram alterações eletrofisiológicas, anatômicas e funcionais no cérebro de pacientes com TEA e têm sido bastante úteis na pesquisa sobre o distúrbio (Tchaconas & Adesman, 2013). Alguns estudos utilizando imagens por ressonância magnética parecem mostrar um crescimento excessivo do encéfalo de crianças com TEA na infância, desacelerando no início da adolescência, de forma que na idade adulta essa característica já não é visivelmente observada (Courchesne, Carper, & Akshoomoff, 2003; Ha, Sohn, Kim, Sim, & Cheon, 2015; Lange et al., 2015; Lin, Ni, Lai, Isaac Tseng, & Shur-Fen Gau, 2015).

O TEA apresenta um forte componente genético. Estudo com gêmeos apresenta concordância de 60% no autismo clássico em monozigóticos contra 0% em dizigóticos (Muhle, Trentacoste, & Rapin, 2004). A alta concordância em

monozigóticos é um indicativo de que a herança genética é um fator determinante no desencadeamento do autismo. Algumas condições genéticas, como Síndrome do X-frágil e Esclerose Tuberosa, tem alta correlação com TEA (Belmonte & Bourgeron, 2006; Brown et al., 1982; Feliciano et al., 2013; Numis et al., 2011). A idade avançada dos genitores, independentemente do sexo, parece estar envolvida no desencadeamento do TEA (Durkin et al., 2008). Porém, fatores como, baixa fertilidade e mudança do estilo de vida em pessoas com mais de 40 anos também são possíveis explicações para esse achado (Olsen & Zhu, 2009).

Além disso, observações epidemiológicas sugerem que teratógenos poderiam estar intimamente relacionados com o desencadeamento do TEA, destacando-se o ácido valproico (VPA) (J. Christensen et al., 2013; Rouillet, Lai, & Foster, 2013; Smith & Brown, 2014) e a talidomida (Imai et al., 2014). Acredita-se que essas substâncias poderiam estar levando a uma modificação do substrato genético e aumentando assim o risco do desenvolvimento do TEA (Casanova, 2007).

1.3. Modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico

O ácido valproico (VPA) é um fármaco amplamente utilizado como anticonvulsivante e estabilizador do humor, sendo que o seu uso durante o período gestacional tem sido correlacionado com o desenvolvimento de TEA nos filhos das gestantes que utilizaram esse fármaco (Christianson et al., 1994; Moore et al., 2000; G. Williams et al., 2001; P. G. Williams & Hersh, 1997). Com base nestas observações, foi estabelecido um modelo animal para o estudo do autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA (Bambini-Junior et al., 2011; Tomasz Schneider & Przewlocki, 2005; Tomasz Schneider et al., 2008).

Filhotes machos expostos ao VPA durante o período de prenhez apresentaram várias características semelhantes às encontradas em pacientes com TEA (Bambini-Junior et al., 2011b; F I Rouillet, Wollaston, Decatanzaro, & Foster, 2010; T Schneider et al., 2008; Tomasz Schneider & Przewlocki, 2005). Os animais do modelo apresentam alguns prejuízos comportamentais correspondentes aos observados em pacientes, fato esse de extrema importância, visto que o diagnóstico de TEA é dado através da avaliação comportamental. Entre os comportamentos alterados, destacam-se atividade exploratória aumentada em campo aberto (T

Schneider et al., 2008; Tsujino et al., 2007), aumento de padrões comportamentais estereotipados (Tomasz Schneider et al., 2008) e do tipo ansioso (Markram, Rinaldi, La Mendola, Sandi, & Markram, 2008; Tomasz Schneider et al., 2008), rigidez comportamental (Bambini-Junior et al., 2011), aumento da memória de tarefas aversivas (Markram et al., 2008), menor sensibilidade a estímulos nocivos (Tomasz Schneider et al., 2008; Wang et al., 2016) e déficits sociais (Bambini-Junior et al., 2011b; Tomasz Schneider & Przewłocki, 2005; Yochum, Dowling, Reuhl, Wagner, & Ming, 2008).

Uma vez que atualmente os critérios para diagnóstico do TEA são exclusivamente clínicos e resultam de análises comportamentais, é impossível estudar esse transtorno em humanos antes da manifestação dos sintomas. Devido às suas peculiaridades, os modelos animais fornecem a oportunidade de análise de alterações do desenvolvimento que podem desencadear as características do TEA (Favre et al., 2013; Kataoka et al., 2013). Dessa forma, surge a possibilidade de estudo e manipulação de vias biológicas para compreensão e, até mesmo, prevenção/reversão do surgimento das alterações morfológicas, funcionais e comportamentais encontradas do TEA.

1.4. Barreiras do Sistema Nervoso Central

Anatomicamente, o Sistema Nervoso Central (SNC) é protegido pelo líquido cefalorraquidiano (LCR, ou líquido) e pelas meninges que cercam o encéfalo e a medula espinal. Além disso, ele também é protegido contra a entrada de agentes patogênicos, células imunes circulantes e fatores presentes na circulação sanguínea devido à presença de barreiras, em especial, a barreira hematoencefálica (BHE) (Louveau, Harris, & Kipnis, 2015).

Durante muito tempo, acreditou-se que o SNC fosse um local imunologicamente privilegiado (Tambur & Roitberg, 2005). Fala-se em “privilegio imune” quando órgãos que são capazes de tolerar a introdução de um antígeno sem desencadear uma resposta inflamatória, como por exemplo, no caso de transplante de córnea. Um aspecto que reforçava essa ideia de privilégio imune do SNC é a presença da BHE e a falta de vasos linfáticos no parênquima do SNC, o que contribui para que os agentes potencialmente prejudiciais não possam acessar facilmente o SNC (Engelhardt et al., 2016).

O primeiro experimento mostrando a presença de uma barreira e o SNC como um obstáculo intransponível a moléculas vindas de vasos sanguíneos periféricos foi o de Paul Ehrlich, em 1885, a partir da observação de que, após a injeção intravenosa de corantes hidrofílicos, o cérebro e a medula espinal permaneceram não corados, ao passo que os órgãos periféricos foram facilmente corados. Quinze anos depois, Lewandowski concluiu corretamente que "os capilares do cérebro devem impedir certas moléculas" de entrar no cérebro. No entanto, não estava claro quais propriedades tornavam a vasculatura cerebral impenetrável. Só com o surgimento da microscopia eletrônica na década de 50 que Reese e Karnovsky demonstraram a existência das junções de oclusão entre as células endoteliais e atribuíram a elas a dificuldade de acesso de moléculas circulantes ao SNC (Dyrna, Hanske, Krueger, & Bechmann, 2013; Palmer, 2010).

Com a observação da existência das junções de oclusão unindo uma célula endotelial a outra, dessa forma, então, selando a passagem de moléculas via paracelular, outros experimentos surgiram mostrando a passagem de macromoléculas de forma transcelular (por meio de transportadores, canais, etc) conferindo à BHE o caráter seletivo de passagem de moléculas. Assim, com o avanço das pesquisas, além do surgimento do conceito de barreira "física" contra metabólitos e patógenos provenientes do sangue, foi estabelecido o papel crucial da BHE na seletividade e na regulação do acesso de células do sistema imune ao SNC, ao contrário do papel de isolamento total do SNC da circulação sistêmica como anteriormente se acreditava.

Além da BHE, outras barreiras atuam na interface "sangue/tecido neural" e, em conjunto, são chamadas de barreiras neurais ou hemato-neurais. Estão incluídas também as barreiras hematoliquórica, hemato-retiniana, hematomedular, hemato-labiríntica e hemato-nervosa, como demonstrado na Figura 1 (Choi & Kim, 2008).

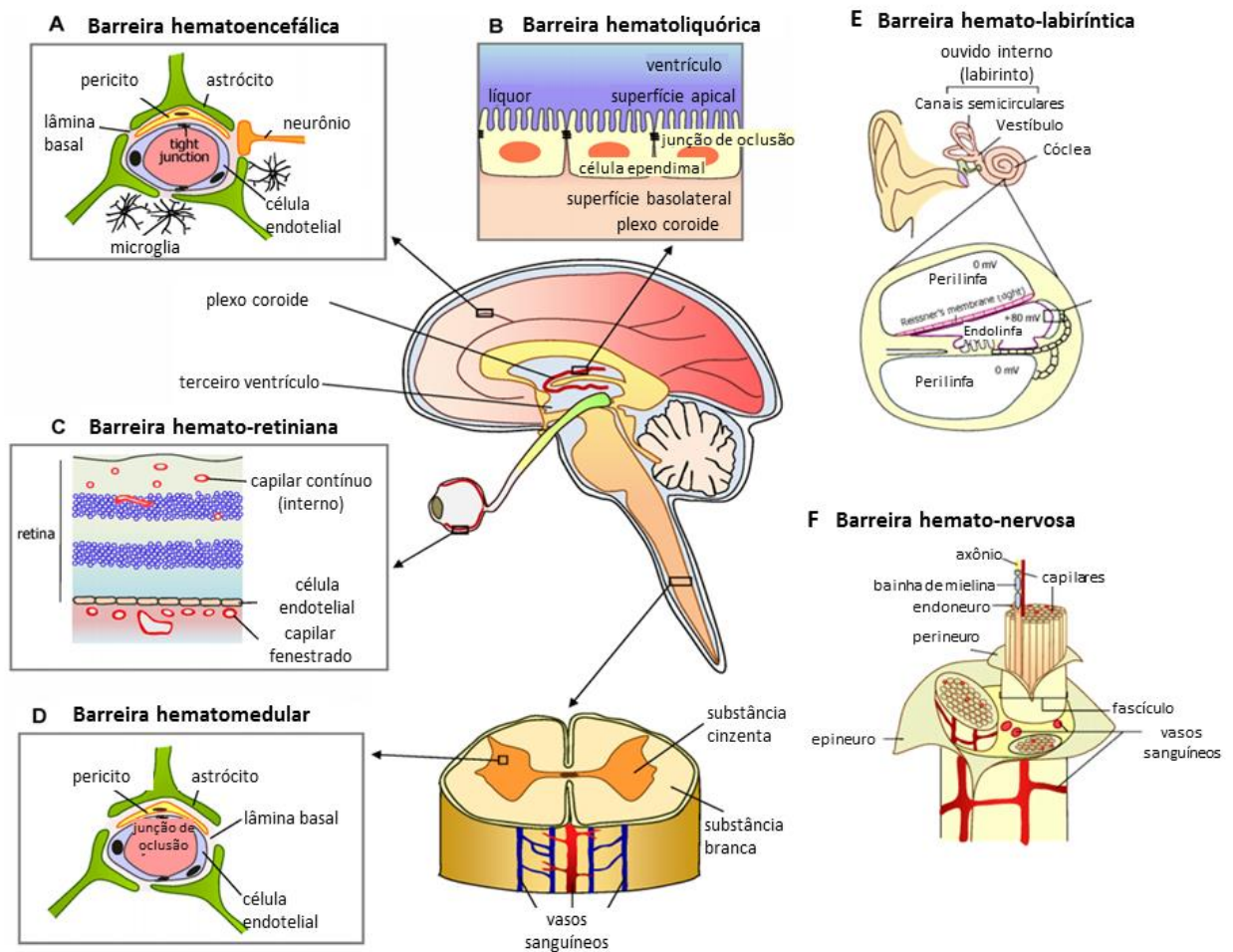


Figura 1 – Barreiras presentes no sistema nervoso central. (A) Células endoteliais especializadas são cercadas por uma membrana basal, pés astrocíticos e pericitos. Neurônios e microglia também são observados na região perivascular. (B) As células ependimárias do plexo coroide são unidas por junções de oclusão, formando a barreira hematoliquórica. (C) A barreira hemato-retiniana possui uma parte interna, que contém vasos contínuos, e uma externa, que contém vasos fenestrados, na retina. (D) Representação de um corte transversal da medula espinhal, mostrando as substâncias branca e cinzenta. A barreira hematomedular apresenta microvasos cercados por pericitos e pés astrocíticos. (E) O ouvido interno contém três regiões, canais semicirculares, vestíbulo e cóclea. A coclear consiste em três compartimentos cheios de líquido, os quais são separados por junções oclusivas, formando a barreira hemato-labiríntica. (F) A barreira hemato-nervosa consiste nos capilares endoneurais e na bainha perineural. Cada axônio é revestido por um endoneuro, os fascículos das fibras nervosas estão rodeados pela bainha perineural e todos os fascículos são revestidos pelo epineuro. Adaptado de Choi e colaboradores (Choi & Kim, 2008).

1.4.1. Barreira hematoliquórica

A barreira hematoliquórica (BHL) é formada monocamada de células epiteliais do plexo coroide, que está localizado nos ventrículos cerebrais e é o principal local de produção do LCR. Além do epitélio, o estroma do plexo coroide consiste em células imunes e capilares fenestrados. (Benarroch, 2016; Demeestere, Libert, & Vandenbroucke, 2015; Orešković, Radoš, & Klarica, 2017). A barreira e a função destas células epiteliais são mantidas pela presença de junções de oclusão na superfície apical e pela expressão de sistemas de transporte, permitindo a passagem direta de água, íons e nutrientes para dentro do LCR (Engelhardt & Sorokin, 2009). Dessa forma, o plexo coroide desempenha um papel fundamental na função neural auxiliando na manutenção da homeostase do cérebro (Demeestere et al., 2015).

As células epiteliais do plexo coroide expressam uma ampla gama de transportadores e outras moléculas que são diferencialmente expressas na membrana apical e basolateral e regulam a produção e a composição do LCR. Os principais transportadores são Na^+ , K^+ , -ATPase, cotransportador eletrogênico NBCe2 (transporte sódio/bicarbonato) e cotransportador 4 de potássio e cloreto KCC4. O gradiente osmótico criado pela secreção de Na^+ e Cl^- conduz o influxo transepitelial de água mediado por AQP1, contribuindo para a formação do LCR (Benarroch, 2016).

1.4.2. Barreira hematoencefálica

A BHE é uma barreira seletiva que limita o movimento de substâncias do sangue em direção ao tecido neural. Em situações normais, conseguem passar pela BHE apenas moléculas menores de 450 Da (Abbott, Patabendige, Dolman, Yusof, & Begley, 2010). É composta por pelo menos quatro elementos que formam a unidade neurovascular: células endoteliais especializadas, unidas por junções de oclusão; membrana basal; pericitos, que ficam em cima das células endoteliais compartilhando da mesma membrana basal; e pés astrocíticos (Abbott, 2013). Neurônios e microglia também podem estar próximos a região da unidade neurovascular, mas não contribuem diretamente para a manutenção da BHE (Choi & Kim, 2008). A perda da integridade da BHE permite que o encéfalo fique vulnerável a substâncias potencialmente danosas que podem perturbar a homeostase encefálica

e levar à disfunção e degeneração neuronal (Obermeier, Daneman, & Ransohoff, 2013).

1.4.3. Aquaporinas

As aquaporinas (AQP) compreendem uma família de proteínas de aproximadamente 30 kDa de peso molecular caracterizada por seis domínios transmembrana com as porções carboxila (C) e amino terminal (N) intracelulares. Uma característica comum entre todas as AQP é um motivo conservado ao longo da sequência de aminoácidos, o Asn-Pro-Ala (NPA ou asparagina-prolina-alanina), que é fortemente necessário para desempenhar o papel fundamental de formação de poros, conforme demonstrado na Figura 2 (Badaut, Fukuda, Jullienne, & Petry, 2014; Papadopoulos & Verkman, 2013).

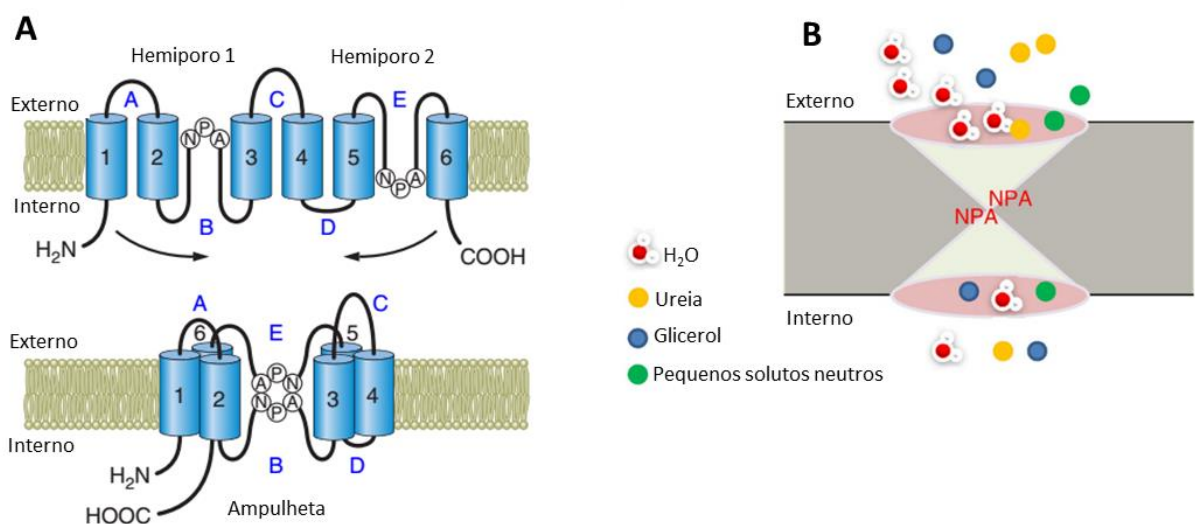


Figura 2 – Aquaporinas. (A) Representação da topologia da família de AQP. A estrutura primária compreende seis domínios transmembranares (1-6) conectados por cinco alças (A-E), com N- e C-terminal citoplasmáticos. O motivo NPA (Asn-Pro-Ala ou asparagina-prolina-alanina) altamente conservado está localizado nas alças B e E e forma hélices hidrofóbicas curtas que se dobram em direção à membrana para lados opostos. (B) Algumas AQP, como a AQP9, são permeáveis, além da água, a várias pequenas moléculas, como glicerol, ureia e pequenos solutos neutros e íons. Adaptado de Nagelhus e colaboradores (Nagelhus & Ottersen, 2013) na imagem da esquerda. Adaptado de Gomes e colaboradores (Gomes et al., 2009) na imagem da direita.

Já foram descritos 13 membros da família AQP que podem ser divididos em três subgrupos: i) As aquaporinas AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 e 8 são consideradas a "família de canais de água puros" por serem somente permeáveis à água, sendo as isoformas AQP1, 4, 5, 6 e 8 já descritas em roedores e primatas. ii) O segundo subgrupo, aquagliceroporinas (AQP3, 7, 9 e 10) contribui para a difusão de água, bem como glicerol, ureia e alguns monocarboxilatos que podem facilitar a difusão de lactato. iii) Finalmente, um novo subgrupo foi proposto como o Superaquaporinas, incluindo AQP11 e 12, que estão localizados no citoplasma e possivelmente envolvidos na regulação do transporte de água intracelular, volume de organelas e homeostasia intravesicular, mas seu papel ainda não é bem compreendido. A organização de AQP em homotetrâmeros dá o formato do poro central, através do qual é possível o fluxo de água, íons e/ou gases dependendo do subtipo de AQP (Badaut et al., 2014). As principais AQPs no SNC são a 1, 4 e 9.

A aquaporina 1 (AQP1) é expressa principalmente na membrana apical do plexo coroide e está envolvida na produção de LCR. Localizada nas membranas da glia, astrócitos e principalmente nas células ependimais (Benga & Huber, 2012; Oshio, Song, Verkman, & Manley, 2003).

A aquaporina 4 (AQP4) é o canal de água mais presente no SNC e constituinte essencial da BHE, presente em maior quantidade em pés terminais de astrócitos que envolvem os vasos sanguíneos (Nagelhus & Ottersen, 2013; Papadopoulos & Verkman, 2007, 2013; Xiao & Hu, 2014). Desempenha importante função na retirada de água do parênquima cerebral, além de auxiliar no tamponamento do potássio (Benga & Huber, 2012).

A aquaporina 9 (AQP9) é encontrada na membrana plasmática e nas mitocôndrias dos neurônios (Akashi, Miki, Kanamori, & Nakamura, 2015), células gliais e endoteliais (J. Badaut & Regli, 2004) e além de permeável à água, também medeia o trânsito de ureia, glicerol e outras moléculas, atuando não somente como um canal de água, mas também como um canal de metabólitos em virtude de sua capacidade de transferir substratos de energia, como o lactato, de astrócitos a neurônio e do citoplasma para as mitocôndrias dentro dos neurônios (Akashi et al., 2015).

1.4.4. Alterações de barreiras neurais no TEA

Como citado anteriormente, uma observação clínica bastante relevante na pesquisa do TEA é evidência de maior circunferência da cabeça em crianças com o transtorno nos primeiros anos de vida, sendo que, com o passar dos anos, esse crescimento tende a regredir e na adolescência e idade adulta já não se observam mais quaisquer alterações macroscópicas (Aylward, Minshew, Field, Sparks, & Singh, 2002; Bartholomeusz, Courchesne, & Karns, 2002; Cheung et al., 2011; Courchesne et al., 2003; Emerson et al., 2017; Hazlett et al., 2011; Lainhart et al., 1997; Mraz, Green, Dumont-mathieu, Makin, & Fein, 2007; Redcay & Courchesne, 2005).

Existem várias consequências funcionais dessa alteração da dinâmica do crescimento encefálico no TEA. O crescimento acelerado do cérebro nos primeiros anos de vida está ocorrendo no momento em que os sintomas e os sinais do autismo estão se apresentando como falha no desenvolvimento ou perda de habilidades de linguagem e sociais. Esta relação temporal sugere que a aceleração prematura no crescimento do cérebro interfere na formação da citoarquitetura que dá suporte ao surgimento dessas habilidades (Aylward et al., 2002). Nos anos seguintes, quando ocorre a desaceleração do crescimento craniano no TEA, é o momento em que deveria haver uma aceleração típica da adolescência, onde ocorre a maturação de habilidades principalmente relacionadas ao lobo frontal. Assim, embora o tamanho do cérebro tenha "normalizado" na idade adulta em indivíduos com TEA, houve um crescimento acelerado na infância durante a aquisição de habilidades sociais e linguísticas, ao passo que houve uma desaceleração durante a adolescência onde deveria ocorrer o amadurecimento das funções frontais (Aylward et al., 2002).

Através de ressonância magnética funcional, um estudo prospectivo avaliou 59 crianças de 6 meses de idade com alto risco para desenvolver o transtorno, sendo esse confirmado de forma comportamental aos 24 meses de idade dessas crianças. Um algoritmo previu corretamente que 9 de 11 crianças receberiam diagnóstico de TEA a 24 meses. Todos os outros 48 bebês de 6 meses de idade que não foram diagnosticados com TEA foram corretamente classificados (Emerson et al., 2017). Assim, as técnicas de diagnóstico por imagem se mostram como

importantes aliadas na tentativa de antecipar o diagnóstico de TEA, uma vez que ele é exclusivamente comportamental atualmente.

Em modelos animais, poucos estudos foram realizados com foco em alterações a nível de BHE no TEA e perfil de AQP. Fatemi e colaboradores observaram uma diminuição de AQP4 em cerebelo *post mortem* de indivíduos com TEA (Fatemi, Folsom, Reutiman, & Lee, 2008), ao passo que Kalra e colegas não observaram alterações nos níveis séricos de AQP4 (Kalra et al., 2015).

Em relação a alterações de permeabilidade encefálica, apenas três trabalhos do mesmo autor fazem essa avaliação através do corante azul de Evans no modelo VPA, evidenciando macroscopicamente um maior infiltrado do corante no cerebelo (Kumar, Sharma, & Sharma, 2015; Kumar & Sharma, 2016a, 2016b).

1.5. Resveratrol

O resveratrol (3,4,5'-trihidroxiestilbeno - RSV) é um composto polifenólico de ocorrência natural, produzido pelas plantas para protegê-las contra a radiação ultravioleta, ataques de fungos e outros danos (Philippe Jeandet et al., 2002; Schouten et al., 2002). O RSV foi primeiramente isolado de raízes da planta héleboro branca (*Veratrum grandiflorum* O. Loes) na década de 40. Desde então, soube-se que esta molécula também está presente em uvas, pinhos, amendoins e no vinho tinto, possuindo diversos efeitos biológicos (Frémont, 2000; Vang et al., 2011).

Nas últimas duas décadas, os polifenóis, especialmente o RSV, receberam atenção especial da comunidade científica, por meio de estudos mostrando seus papéis protetores e terapêuticos em diversas patologias, incluindo câncer (Gupta et al., 2011; Jang et al., 1997; Nutakul et al., 2011) e diabetes (Huang et al., 2010; Yao et al., 2015).

Além desses efeitos, diversos estudos já demonstraram o efeito anti-inflamatório (Lee, Ha, Cho, & Choi, 2015; Sánchez-Fidalgo, Cárdeno, Villegas, Talero, & de la Lastra, 2010) e antioxidante (Mohammadshahi, Haidari, & Soufi, 2014) dessa molécula. Ainda, estudos ressaltam seus efeitos neuroprotetores (Quincozes-Santos & Gottfried, 2011; Tang, 2010).

Em pesquisa recente de nosso grupo, um tratamento pré-natal com RSV foi capaz de prevenir os déficits de sociabilidade na prole no modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA (Bambini-Junior et al., 2014). Adicionado a isso, novos estudos ainda não publicados mostram que essa molécula também é capaz de prevenir prejuízos sensoriais neste mesmo modelo animal. Esses resultados possibilitam o uso dessa molécula como ferramenta crucial para a compreensão da fisiopatologia do TEA, bem como no auxílio nos estudos de rotas biológicas e estruturas envolvidas em sua etiologia, tanto em embriões quanto em idades pós-natal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar permeabilidade de barreiras encefálicas, expressão e localização de AQP 1, 4 e 9 em diferentes regiões do sistema nervoso central em modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar permeabilidade da barreira hematoencefálica através da técnica de Evans Blue.
- b) Avaliar a expressão proteica de AQP 1, 4 e 9 em hipocampo, área somatossensorial primária e região da amígdala e o possível efeito preventivo do tratamento pré-natal com resveratrol.
- c) Avaliar possíveis alterações em AQP 1, 4 e 9 em hipocampo, área somatossensorial primária e região da amígdala por imunofluorescência e o possível efeito preventivo do tratamento pré-natal com resveratrol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar obtidos pela Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com 60 dias de idade. Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério, com alimento e água *ad libitum*, ciclo claro:escuro de 12 horas, ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e em número máximo de quatro animais por caixa moradia.

3.2. Modelo animal de autismo e tratamento com RSV

Os animais foram acasalados durante a noite e, na manhã seguinte, foi verificada a prenhez das fêmeas por microscopia através da investigação do lavado vaginal e presença de *plug* (Bambini-Junior et al., 2011). Quando confirmada a fecundação das fêmeas, esse foi considerado o dia embrionário 0 (E0).

O modelo consiste na injeção intraperitoneal de 600 mg/Kg de VPA diluído em NaCl 0,9% no dia 12,5 de gestação, como previamente descrito (Bambini-Junior et al., 2014). Às fêmeas do grupo controle, somente a salina foi aplicada neste dia. Dois grupos receberam 3,6 mg/Kg de RSV dissolvido em DMSO (veículo), via administração subcutânea, diariamente entre os dias embrionários 6,5 e 18,5 (E6,5 e E18,5) (Figura 3). Assim, formam-se os quatro grupos experimentais:

- Controle: recebeu DMSO nos dias E6,5 a E18,5 e salina no dia E12,5;
- RSV: recebeu RSV nos dias E6,5 a E18,5 e salina no dia E12,5;
- VPA: recebeu DMSO nos dias E6,5 a E18,5 e VPA no dia E12,5;
- RSV + VPA: recebeu RSV nos dias E6,5 a E18,5 e VPA no dia E12,5;

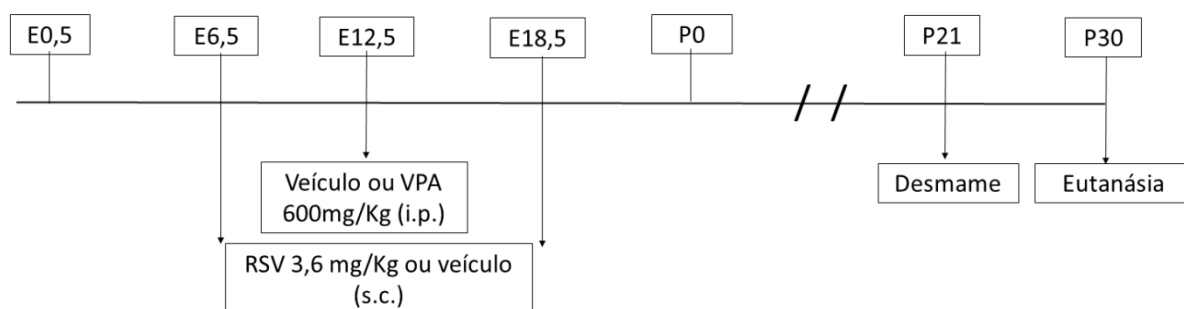


Figura 3 – Linha temporal dos tratamentos aplicados aos animais. Tanto o RSV quanto seu veículo (DMSO) foram administrados diariamente dos dias embrionários E6,5 a E18,5 via subcutânea na dose de 3,6 mg/Kg. Já a indução

do modelo com VPA na dose de 600 mg/Kg ou salina 0,9% se deu com uma única injeção intraperitoneal no dia E12,5. E: dia embrionário. P: dia pós-natal.

3.3. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados obedecendo aos preceitos éticos que competem à experimentação animal e estão de acordo com o NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, com as últimas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do HCPA (ANEXO 1). Toda a manipulação animal foi realizada com base na Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 e na Resolução Normativa N.30 de 2 de fevereiro de 2016 do CONCEA.

O procedimento de eutanásia dos animais seguiu as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Resolução Normativa N. 13, 2013). A eutanásia foi realizada por sobredose anestésica com cetamina e xilasina, fornecido em concentrações três vezes maiores (300 mg/Kg e 40 mg/Kg, respectivamente) que a concentração necessária para obtenção de plano anestésico-cirúrgico.

3.4. Eutanásia e preparação de amostras

Na idade de P30 os animais foram eutanasiados para a remoção de amostras biológicas. O hipocampo, a região da amígdala e a área somatossensorial foram dissecados e imediatamente congelados a -80°C até a análise de imunoconteúdo de proteínas. Já para análise de imunofluorescência, os animais foram perfundidos por via transcardíaca com solução salina seguida de paraformaldeído 4% e o encéfalo foi retirado. O tecido foi criopreservado em concentrações crescentes de sacarose (15% e 30%) e congelado a -80°C até a realização de cortes coronais de 25 μm de espessura a -20°C em criostato (Leica Microsystems GmbH).

Na mesma idade experimental, os animais foram injetados via intraperitoneal com uma solução de azul de Evans 2% diluído em salina (Kumar et al., 2015)(Kumar & Sharma, 2016b) e, após 2 horas, os animais foram profundamente anestesiados, perfundidos via transcardíaca com solução salina e fixados com paraformaldeído 4%. O tecido foi criopreservado em concentrações crescentes de sacarose (15% e

30%) e congelado a -80°C até a realização de cortes coronais de 25 μm de espessura a -20°C em criostato (Leica Microsystems GmbH).

3.5. Permeabilidade ao corante azul de Evans

Os cortes coronais previamente obtidos a partir do tecido encefálico dos animais que receberam a injeção do corante azul de Evans foram incubados com solução de DAPI na diluição de 1:10000 durante 10 minutos, seguida de 5 lavagens com tampão PBS 0,1 M durante 3 minutos cada. Posteriormente, se adicionou o meio de montagem e a lamínula. As imagens foram obtidas no microscópio confocal (Olympus FluoView 4.0) do Centro de Microscopia e Microanálises (CMM-UFRGS) e a fluorescência foi analisada usando o software Image J.

3.6. Análise de imunoconteúdo de proteínas por *Western Blotting*

As amostras de hipocampo, região da amígdala e área somatossensorial foram homogeneizadas e preparadas em tampão contendo SDS 10%, EDTA 100 mM, TRIS 500 mM e inibidor de protease, centrifugadas a 14000 g por 20 min a 4°C e tiveram o sobrenadante coletado. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951), as amostras foram preparadas em tampão contendo glicerol, azul de bromofenol e TRIS 500 mM, e β -mercaptoetanol. Iguais quantidades de proteínas (40 μg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, separadas por eletroforese unidimensional e transferidas para membranas de nitrocelulose para detecção do imunoconteúdo de diferentes AQP, conforme protocolo prévio (Bristot Silvestrin et al., 2013). Após as membranas foram bloqueadas em temperatura ambiente por 1 h, utilizando 5% de albumina sérica bovina (BSA) dissolvida em salina tamponada com tampão Tris (TBS) adicionada de 0,1% de Tween-20 (TTBS). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários anti-AQP1, anti-AQP4, anti-AQP9 e anti- β -actina (controle de aplicação). Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com TTBS e incubadas em temperatura ambiente por 1 h e meia com os anticorpos secundários, seguida de mais 3 lavagens de 10 minutos. Foi utilizado o substrato SuperSignal® West Pico (Thermo Fisher Scientific) nas membranas e o sinal quimioluminescente foi detectado utilizando sistema ImageQuant™ LAS 4000 (GE HealthCare Life

Sciences). A quantificação do imunoconteúdo relativa foi realizada com o *software* ImageJ (v. 1.51) e os dados foram normalizados pelo marcador endógeno.

3.6.1. Anticorpos utilizados

Anticorpos primários:

- anti-AQP1 produzido em camundongo, diluição de 1:50 em TTBS-BSA 5% (Santa Cruz Biotechnology, sc-32737);
- anti-AQP4 produzido em coelho, diluição de 1:50 em TTBS-BSA 5% (Santa Cruz Biotechnology, sc-20812);
- anti-AQP9 produzido em coelho, diluição de 1:50 em TTBS-BSA 5% (Santa Cruz Biotechnology, sc-28623);
- anti- β -actina produzido em camundongo, diluição de 1:3000 em TTBS (SIGMA Aldrich, A1978).

Anticorpos secundários:

- anti-IgG de camundongo produzido em burro, diluição de 1:1000 em TTBS-leite (Santa Cruz Biotechnology, sc2314);
- anti-IgG de coelho produzido em cabra, diluição de 1:1000 em TTBS (Santa Cruz Biotechnology, sc2004).

3.7. Imunofluorescência

O tecido encefálico previamente cortado e armazenado em lâminas a -20°C foi permeabilizado com solução de PBS (0,1M) adicionado de Triton X-100 (0,4%) por 10 min e em seguida lavado 5 vezes durante 3 minutos cada com PBS. O excesso de PBS foi limpo e então as lâminas foram bloqueadas com BSA 5% diluída em PBS-Triton X-100 (0,4%) por 1 hora. Após, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-AQP1 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, sc-32737) e anti-AQP4 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, sc-20812) por 48h, seguidas de 5 lavagens de 3 min com PBS. A incubação com os anticorpos secundários (AlexaFluor 488 de camundongo para AQP1 e AlexaFluor 488 de coelho para AQP4) ocorreu durante 2h a temperatura ambiente - ambos diluídos 1: 2000 na solução de bloqueio. Se realizou nova sequência de lavagens, 5 vezes de 3 minutos com PBS. Foram adicionados 30 μL do corante nuclear DAPI por 10 minutos e realizada nova

sequência de 5 lavagens de 3 min com PBS. Por fim, foram adicionadas duas gotas de meio de montagem, a lamínula foi colocada e a lâmina selada com esmalte nas laterais.

3.8. Cuidados de biossegurança e descarte de materiais e resíduos

Os equipamentos de proteção individual, tais como luvas, máscaras e jalecos, foram utilizados sempre que necessários. O descarte dos materiais perfurocortantes, bem como os cuidados de biossegurança necessários na manipulação animal e de resíduos químicos e biológicos foram realizados conforme as rotinas estabelecidas pela Comissão de Gestão Ambiental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

3.9. Análise estatística

Para análise do teste do Evans blue, por conter apenas dois grupos experimentais, foi utilizado o teste *t* de Student. Para o imunoconteúdo de cada AQP e a quantificação de fluorescência, que contemplaram quatro grupos experimentais, foi utilizado o teste ANOVA de uma via seguida pelo pós teste de Tukey. Foi considerado significativo $p < 0,05$ e todos os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 6.

4. RESULTADOS

4.1. Permeabilidade ao corante azul de Evans

No experimento de permeabilidade ao corante azul de Evans, foi observado um aumento significativo na fluorescência vermelha do corante em tecidos encefálicos no grupo VPA em comparação ao grupo controle: plexo coroide (controle: $58,02 \pm 63,11$, VPA: $265,7 \pm 131,8$, $F = 4,361$, $p=0,0295$) e área somatossensorial, tanto todas as camadas analisadas em conjunto (controle: $39,73 \pm 55,39$, $480,6 \pm 52,12$, $F = 1,129$, $p= 0,000025$), quanto isoladamente nas camadas II-III (controle: $110,4 \pm 128,8$, $827,3 \pm 220,3$, $F = 2,924$, $p= 0,0014$) e IV-V (controle: $124,7 \pm 125,1$, $461,3 \pm 136,3$, $F = 1,186$, $p= 0,0108$). Não foram observadas diferenças significativas na fluorescência do corante tanto no hipocampo (controle: $39,87 \pm 55,81$, $115,1 \pm 64,87$, $F = 1,351$, $p= 0,1292$) quanto na região da amígdala, apesar de nessa região ter sido observada uma tendência estatística de aumento de fluorescência (controle: $32,80 \pm 25,98$, $104,9 \pm 59,57$, $F = 5,259$, $p= 0,0684$) (Figura 4A e 4B).

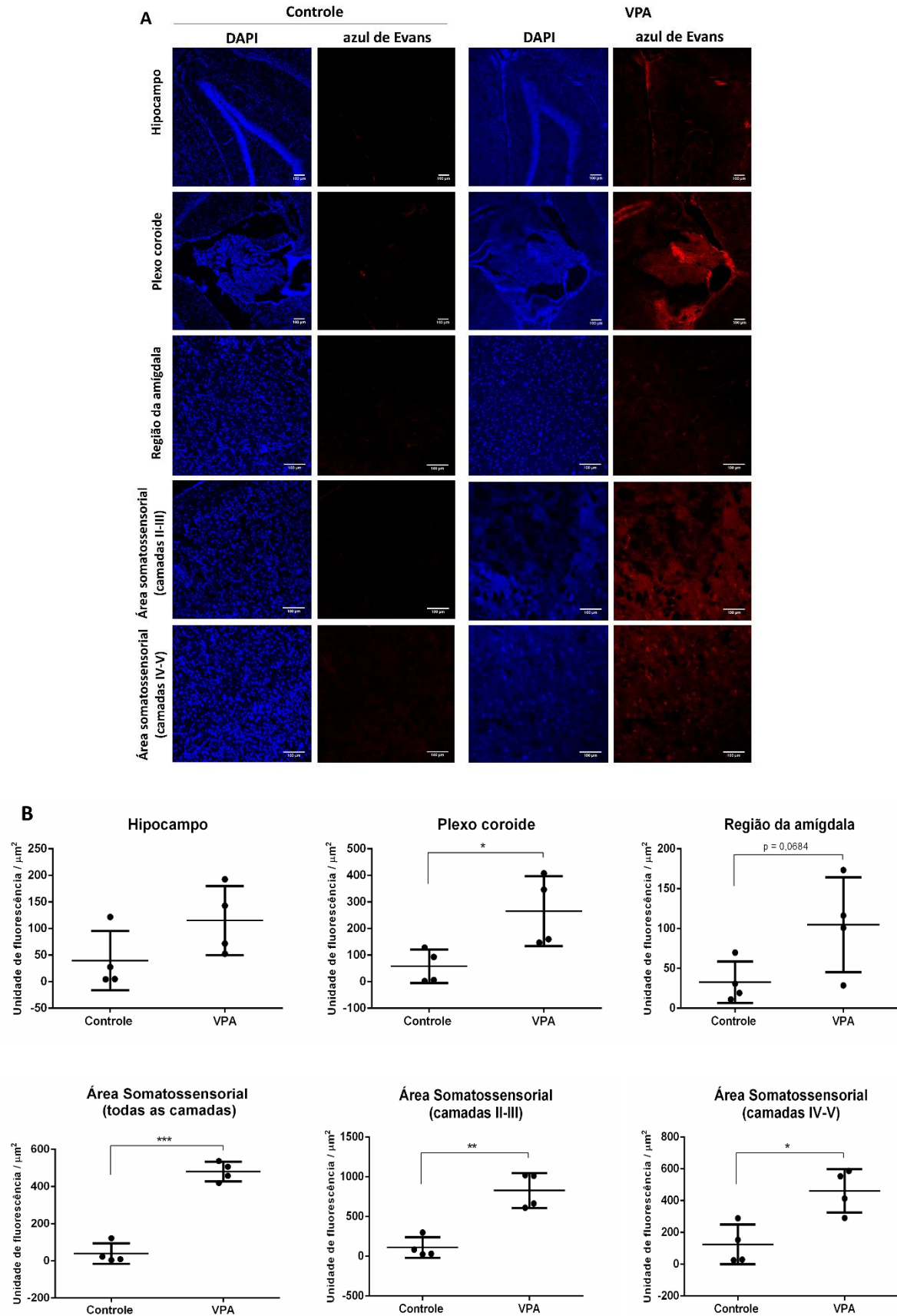


Figura 4 - Análise da barreira hematoencefálica por meio da permeabilidade ao corante azul de Evans. (A) Em azul, marcação com corante nuclear DAPI. Em

vermelho, fluorescência do corante azul de Evans. São mostradas imagens representativas de hipocampo, plexo coroide, região da amígdala, área somatossensorial primária – camadas II-II e camadas IV-V. (B) Quantificação da fluorescência do corante *Evans blue* em hipocampo, plexo coroide, região da amígdala, área somatossensorial primária (todas as camadas e separadamente camadas II-III e IV-V). Barra de escala: 100 μ m. Magnificação: 10x (hipocampo e plexo coroide) e 20x (região da amígdala e camadas da área somatossensorial). Os valores são mostrados em média \pm desvio padrão. Teste *t* de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.2. Imunoconteúdo das aquaporinas 1, 4 e 9

4.2.1. Área somatossensorial primária

Foi observada uma redução da AQP1 nos grupos que receberam VPA, não havendo prevenção após o tratamento com RSV (controle: $1,593 \pm 0,072$, RSV: $1,342 \pm 0,209$, VPA: $1,148 \pm 0,181$, RSV + VPA: $0,834 \pm 0,184$, $F = 14,19$, $p = 0,0003$) (Figura 5-a). Em relação a AQP4, houve um aumento significativo da expressão no grupo VPA, sendo esse efeito completamente prevenido pelo tratamento pré-natal com RSV (controle: $1,521 \pm 0,081$, RSV: $1,135 \pm 0,229$, VPA: $2,316 \pm 0,494$, RSV + VPA: $1,507 \pm 0,347$, $F = 9,3$, $p = 0,0019$) (Figura 5A-b). Não houve diferença significativa no conteúdo de AQP9 entre os grupos experimentais (controle: $0,965 \pm 0,413$, RSV: $0,432 \pm 0,028$, VPA: $0,637 \pm 0,241$, RSV + VPA: $0,585 \pm 0,168$, $F = 3,113$, $p = 0,066$) (Figura 5A-c).

4.2.2. Região da amígdala

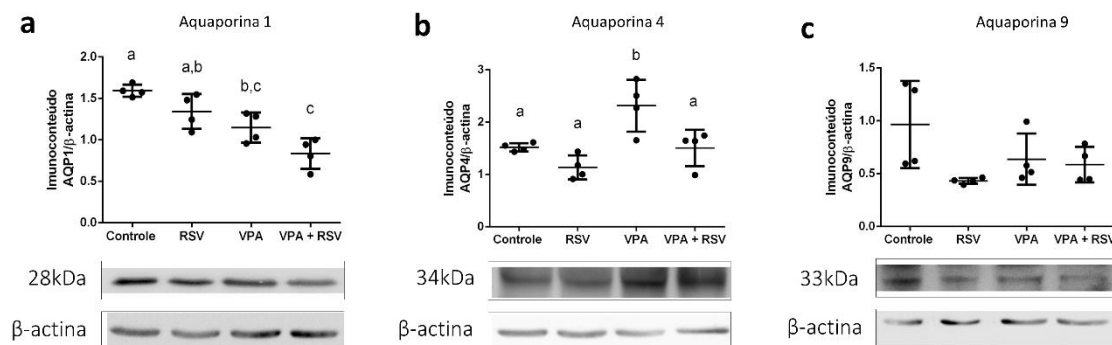
Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo tanto de AQP1 (controle: $0,918 \pm 0,213$, RSV: $1,089 \pm 0,339$, VPA: $0,871 \pm 0,112$, RSV + VPA: $0,842 \pm 0,276$, $F = 0,7813$, $p = 0,5268$) quanto de AQP4 (controle: $1,192 \pm 0,457$, RSV: $1,288 \pm 0,332$, VPA: $0,943 \pm 0,108$, RSV + VPA: $1,512 \pm 0,521$, $F = 1,474$, $p = 0,2710$) entre os grupos (Figuras 5B-a e 5B-b, respectivamente). Em relação a AQP9, observou-se que os grupos que receberam VPA apresentaram uma diminuição nos níveis proteicos em relação aos grupos que não receberam VPA, e que o RSV não preveniu essa alteração, apesar do grupo RSV ter diferido significativamente do grupo RSV + VPA (controle: $0,806 \pm 0,136$, RSV: $0,621 \pm$

0,190, VPA: $0,377 \pm 0,074$, RSV + VPA: $0,327 \pm 0,117$, $F = 10,69$, $p=0,0010$) (Figura 5B-c).

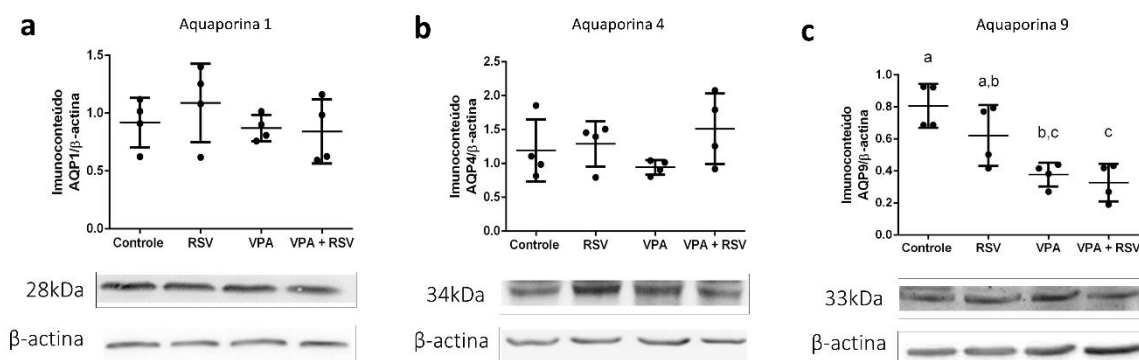
4.2.3. Hipocampo

. Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de AQP1 (controle: $1,031 \pm 0,274$, RSV: $0,927 \pm 0,273$, VPA: $0,941 \pm 0,214$, RSV + VPA: $0,976 \pm 0,238$, $F = 0,9365$, $p=0,9365$), de AQP4 (controle: $0,533 \pm 0,271$, RSV: $0,422 \pm 0,221$, VPA: $0,291 \pm 0,105$, RSV + VPA: $0,359 \pm 0,116$, $F = 1,156$, $p=0,3666$) e AQP9 (controle: $0,599 \pm 0,328$, RSV: $0,362 \pm 0,188$, VPA: $0,341 \pm 0,183$, RSV + VPA: $0,459 \pm 0,151$, $F = 1,106$, $p=0,3846$) entre os grupos estudados (Figura 5C-a, 5C-b e 5C-c, respectivamente).

A Área somatossensorial primária



B Região da amígdala



C Hipocampo

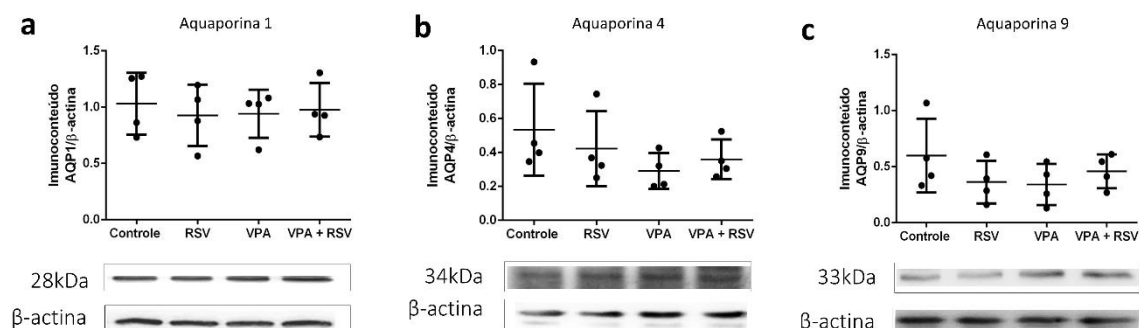


Figura 5 - Efeitos da exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA) e resveratrol (RSV) em aquaporinas na área somatossensorial primária, na região da amígdala e no hipocampo. As imagens representativas de *Western blotting* para AQP 1, 4 e 9 e as análises quantitativas são mostradas respectivamente para área somatossensorial (A-a, A-b e A-c), para região da amígdala (B-a, B-b e B-c) e para hipocampo (C-a, C-b e C-c). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os valores são mostrados em média \pm desvio padrão. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido por pós teste de Tukey. N=4. * $p < 0,05$.

4.3. Imunofluorescência

4.3.1. Plexo coroide

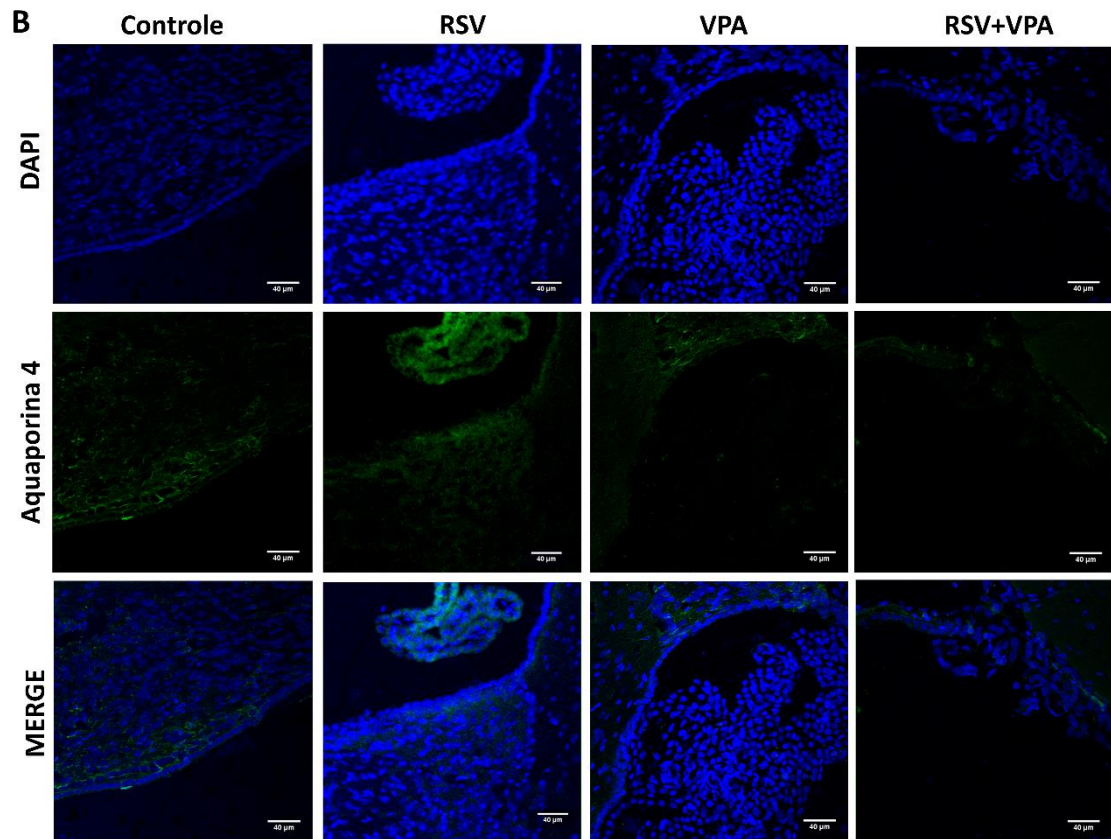
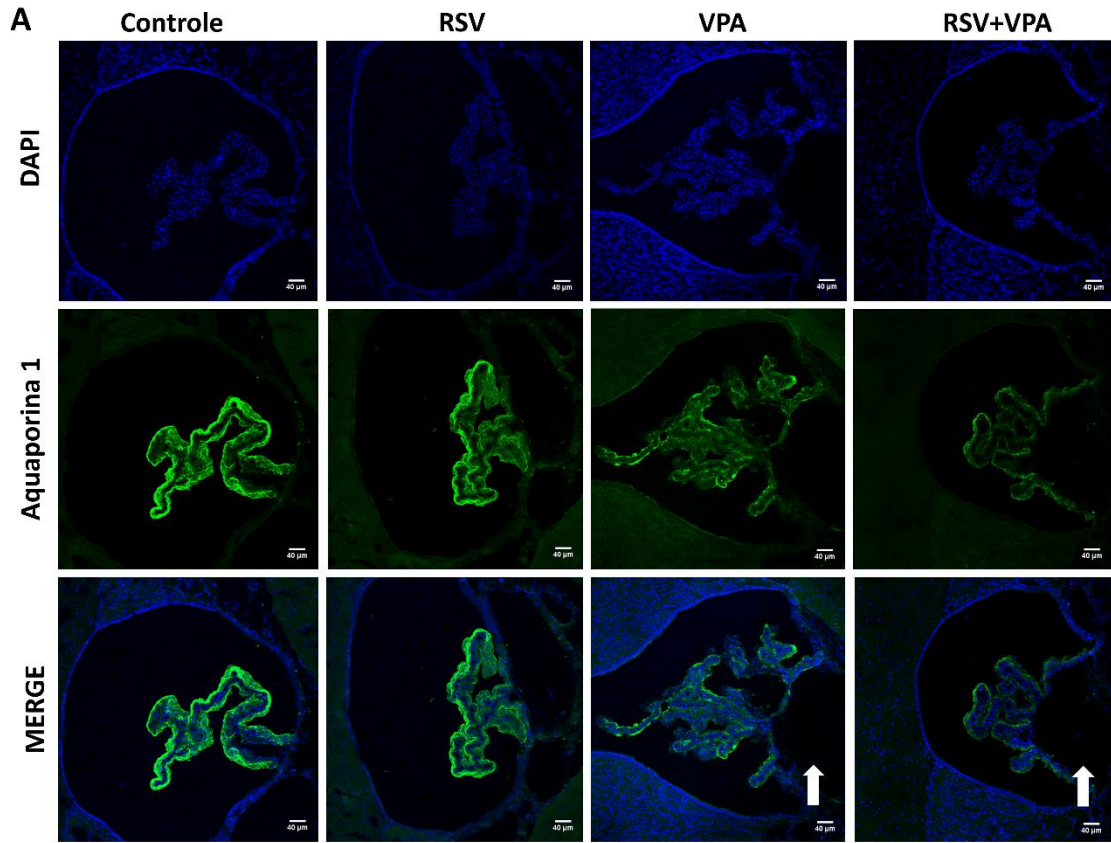
Em relação a AQP1, observou-se uma redução da fluorescência em ambos os grupos que receberam VPA, não havendo prevenção pelo tratamento com RSV (controle: $1347,75 \pm 182,011$, RSV: $1175,35 \pm 71,419$, VPA: $939,21 \pm 179,562$, RSV + VPA: $965,786 \pm 47,916$, $F = 6,476$, $p = 0,0126$) (Figura 6A e 6F). Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de AQP4 nessa região (controle: $70,458 \pm 21,118$, RSV: $170,948 \pm 107,846$, VPA: $41,690 \pm 34,676$, RSV + VPA: $144,338 \pm 75,010$, $F = 2,967$, $p = 0,0788$) (Figura 6B e 6F).

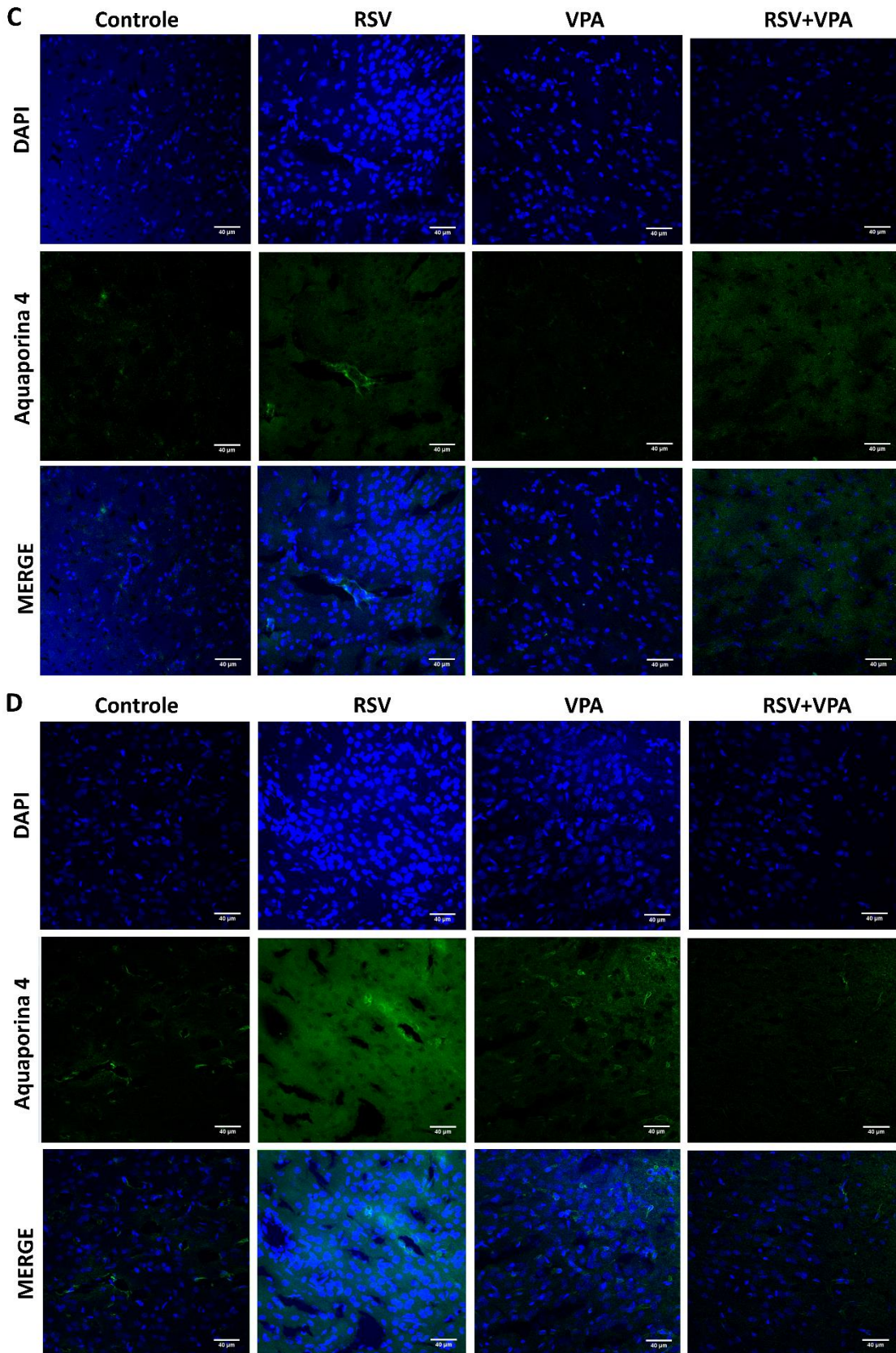
4.3.2. Região da amígdala

Não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de AQP4 na região da amígdala (controle: $133,265 \pm 155,924$, RSV: $269,923 \pm 121,554$, VPA: $140,988 \pm 137,069$, RSV + VPA: $291,620 \pm 160,674$, $F = 0,7661$, $p = 0,5412$) (Figura 6C e 6F).

4.3.3. Área somatossensorial primária

Analisando-se essa região em diferentes camadas, observou-se um efeito *per se* do RSV nas camadas II-III (controle: $140,636 \pm 51,613$, RSV: $407,497 \pm 117,419$, VPA: $229,252 \pm 64,510$, RSV + VPA: $203,833 \pm 84,86$, $F = 7,771$, $p = 0,0032$) (Figura 6D e 6F), e nenhuma diferença significativa entre os grupos nas camadas IV-V (controle: $310,770 \pm 149,298$, RSV: $388,360 \pm 81,398$, VPA: $142,140 \pm 9,517$, RSV + VPA: $184,910 \pm 106,255$, $F = 4,088$, $p = 0,0570$) (Figura 6E e 6F).





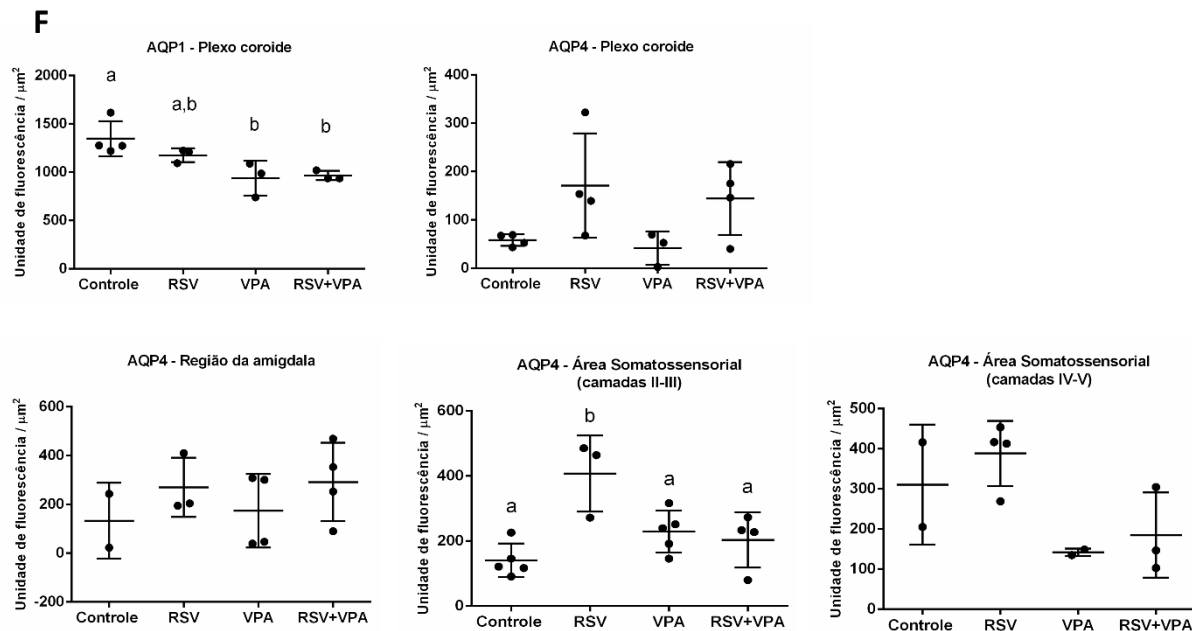
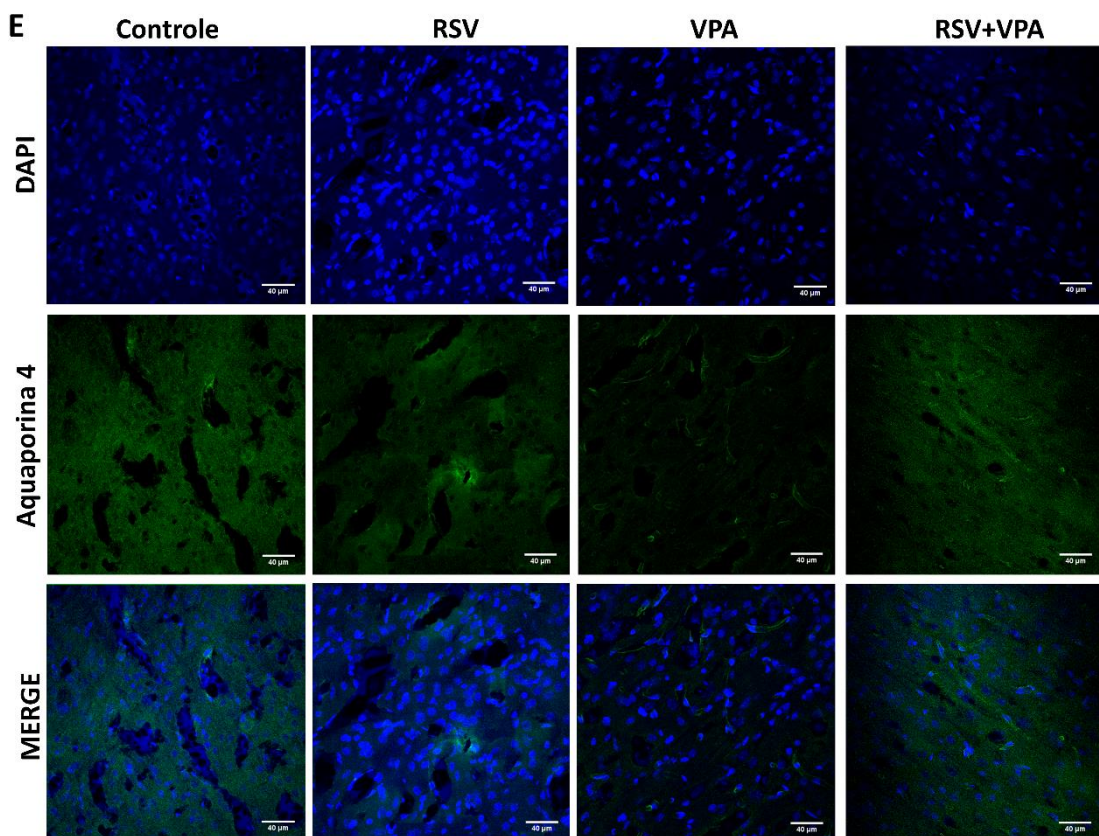


Figura 6 – Distribuição das AQP1 e AQP4 em diferentes regiões do SNC. (A-B) Imagens representativas da marcação imunofluorescente no plexo coroide tanto de (A) AQP1 quanto de (B) AQP4; (C) de AQP4 na região da amígdala; (D-E) e de AQP4 na área somatossensorial primária tanto (D) nas camadas II-III quanto (E) na IV-V; (F) Quantificação da marcação imunofluorescente das AQP 1 e 4. Barra de

escala: 40 μ m. Magnificação: 20x (AQP1) e 40x demais imagens. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Os valores são mostrados em média \pm desvio padrão. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido por pós teste de Tukey. N=4-5. * $p < 0,05$. AQP são marcadas em verde, corante nuclear DAPI em azul. Na imagem A, as setas brancas nas imagens representativas dos grupos VPA e RSV+VPA indicam uma região desprovida de marcação tanto de AQP1 quando de núcleos de células, sendo, possivelmente, uma região de acúmulo de água (edema).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos a permeabilidade encefálica e realizamos um *screening* no perfil das AQP 1, 4 e 9 em diversas regiões encefálicas que possuem papel chave no estudo do TEA, buscando entender a sua contribuição em comorbidades relatadas na clínica ao longo dos anos, tais como edema, aumento de volume encefálico, entre outros. Foram utilizados ratos Wistar devido à facilidade no manuseio e na reprodutibilidade do modelo animal por exposição pré-natal ao ácido valproico e no tratamento pré-natal com RSV.

Iniciamos a investigação através do experimento permeabilidade ao corante azul de Evans, uma vez que há relatos na literatura de maior volume encefálico e presença de edema em indivíduos com TEA nos primeiros anos de vida (Aylward et al., 2002; Bartholomeusz et al., 2002; Cheung et al., 2011; Courchesne et al., 2003; Emerson et al., 2017; Hazlett et al., 2011; Lainhart et al., 1997; Mraz et al., 2007; Redcay & Courchesne, 2005). Através desse experimento em animais de 30 dias de vida, foi possível observar que nos animais do modelo animal de autismo houve uma maior passagem de corante (visto pela intensidade da fluorescência vermelha nas imagens) nas regiões encefálicas do plexo coroide, área somatossensorial e uma tendência estatística de aumento de permeabilidade na região da amígdala, apontando que, mesmo em uma idade mais avançada se comparada ao descrito em humanos, alterações nesse parâmetro ainda são identificáveis.

Havendo entrada do corante no tecido encefálico, esse é, a grosso modo, um indício de afrouxamento da BHE e um bom indicativo de maior permeabilidade para macromoléculas, que, pelo seu tamanho, não deveriam ter acesso ao SNC. Uma vez que estas macromoléculas conseguem entrar no SNC em maior quantidade, um mecanismo que poderia estar ocorrendo é o influxo de água por osmose, podendo levar a um quadro de edema e de maior tamanho encefálico, o que corrobora com os achados da literatura. O azul de Evans é um corante com alta afinidade de ligação pela albumina sérica, uma macromolécula com peso molecular em torno de 66 kDa, cuja única forma de acesso ao SNC é através de transportadores especializados. Pode-se dizer, então, que quando o azul de Evans, ligado a albumina, consegue entrar no SNC, a BHE está comprometida. Nosso achado está em concordância com os únicos três trabalhos que fazem avaliação através do

corante azul de Evans em modelo animal de autismo, coincidentemente, no modelo VPA (Kumar et al., 2015; Kumar & Sharma, 2016a, 2016b). Porém, os artigos citados apresentam apenas uma avaliação macroscópica, mostrando somente a presença ou não da coloração azul no tecido encefálico. Não há, até nosso conhecimento, estudos que avaliem microscópica e quantitativamente essas alterações em diferentes regiões do SNC como descrito no presente trabalho, sendo a nossa descrição inédita na literatura. Esse importante resultado descrito acima não só evidencia a existência de uma maior permeabilidade da BHE, como também a severidade da mesma.

A partir disso, considerando que existe uma maior quantidade de líquido no SNC e que o edema relatado na literatura é em decorrência disso, investigamos se existem alterações em canais de água expressos abundantemente no SNC (AQP1, AQP4 e AQP9) a fim de compreender esse maior influxo de água para o parênquima encefálico. Foi realizada a análise do imunoconteúdo das AQP por *western blotting* nas regiões encefálicas área somatossensorial primária, região da amígdala e hipocampo, uma vez que são regiões já descritas como alteradas em diversos parâmetros no estudo do TEA.

Na área somatossensorial foi observada uma diminuição do imunoconteúdo de AQP1. Essa AQP é principalmente expressa no plexo coroide (em contraste com o resto do corpo, onde quase não é expressa), mas também há estudos mostrando sua expressão em alguns processos neuronais, além de já ter sido observada no corno dorsal da medula espinal e nos gânglios sensoriais do trigêmeo, locais onde especula-se que a AQP1 tenha um papel em vias de nocicepção, mas não no processamento da dor (Shields et al., 2007). Para excluir completamente a contribuição de AQP1 no processamento nociceptivo, seria necessário trabalhar com animais *knockout* para AQP1 ou com bloqueadores seletivos desse canal em neurônios aferentes primários; porém, esse dado é particularmente importante no contexto do TEA, pois há relatos de hipossensibilidade a estímulos nociceptivos tanto no modelo animal quanto em pacientes (T Schneider et al., 2008; Tomasz Schneider et al., 2001). Somado a isso, Dolman e colaboradores mostraram que a expressão de RNA mensageiro de AQP1 é reduzida em cultura de astrócitos, demonstrando que a influência astrocítica é importante na manutenção dos baixos níveis de AQP1 característico do endotélio da BHE. Sabe-se que os pés astrocíticos

expressam AQP4; dessa forma, podemos inferir há uma regulação inversamente proporcional na expressão dessas AQP, o que corrobora com o nosso achado de diminuição de AQP1 na área somatossensorial e aumento da AQP4 na mesma região (dado que será discutido a seguir).

A AQP4 é a aquaporina mais abundante no SNC e constituinte da BHE devido à sua expressão nos pés astrocíticos (Nagelhus & Ottersen, 2013; Papadopoulos & Verkman, 2007, 2013; Xiao & Hu, 2014). Observamos um aumento da expressão na área somatossensorial, sendo esse aumento totalmente prevenido pelo tratamento com RSV. Esse aumento pode ser explicado por uma maior expressão de astrócitos ancorando a AQP4, o que já foi demonstrado no contexto do autismo em diversos estudos (Laurence & Fatemi, 2005; Vargas, Nascimbene, Krishnan, Zimmerman, & Pardo, 2005), incluindo no nosso grupo de pesquisa no cerebelo e na região CA1 do hipocampo em ratos de 15 dias de vida (dados não publicados). Em um estudo com cultura de células foi observado que a interleucina 6 (IL-6) derivada da microglia estimulou a diferenciação de astrócitos (Nakanishi et al., 2007). Frequentemente, relaciona-se o aumento de interleucina 6 (IL-6, uma citocina pró-inflamatória) com os sintomas clássicos do TEA. Dessa forma, esse poderia ser um mecanismo envolvido no aumento da expressão de astrócitos no modelo animal e, conseqüentemente, de AQP4.

Uma vez que a exposição ao VPA causou uma alteração no perfil das AQP 1 e 4 na área somatossensorial e que houve prevenção pelo RSV somente no imunoconteúdo da AQP4, sugerimos que mais estudos sejam feitos a fim de elucidar o papel regulatório tanto do RSV, quanto de cada uma das AQP citadas. Outros trabalhos desenvolvidos no nosso grupo já demonstraram o papel preventivo do RSV na área somatossensorial primária em parâmetros inibitórios, não somente na prevenção de moléculas de ancoramento e organização de sinapses inibitórias, como também na própria organização cortical dessa região como um todo (Fontes-Dutra, et al – *under review*), indicando um possível substrato de ação dessa molécula na prevenção de características chave do tipo autista, como os déficits sensoriais. Outros trabalhos na mesma linha tem mostrado que há rupturas na organização cortical que geram alterações importantes no processamento dessas regiões, em especial na área somatossensorial (Stoner et al., 2014). Sabendo disso, podemos supor que é possível que esses “*patches*” ou rupturas nessas regiões

possam ser acompanhadas de uma formação alterada da BHE, uma vez que é plausível que ela dependa da integridade da estrutura para sua formação.

Além disso, anteriormente no nosso grupo de pesquisa, demonstramos que há uma alteração no metabolismo do glutamato em astrócitos dos animais do grupo VPA, com maior captação de glutamato, menor atividade de glutamina sintetase e aumento de glutatona (Bristot Silvestrin et al., 2013). Sabe-se também, a partir do presente trabalho, que o RSV foi capaz de prevenir a alteração na expressão da AQP4. Esse conjunto de achados nos leva a pensar que, uma vez que o glutamato é desviado no metabolismo astrocítico no sentido de formação de glutatona em animais do grupo VPA, pode representar uma condição aumentada de estresse oxidativo, já observado em pacientes (Ashwood et al., 2011; Emanuele et al., 2010; Enstrom, Onore, Van de Water, & Ashwood, 2010; Gottfried, Bambini-Junior, Francis, Riesgo, & Savino, 2015) – podendo afetar a permeabilidade da BHE (Theoharides, Stewart, Panagiotidou, & Melamed, 2016). Paralelamente, foi observado um efeito preventivo do RSV sobre comportamentos do tipo autista (Bambini-Junior et al., 2014) e sobre a desorganização cortical dos neurônios inibitórios na área somatossensorial (Fontes-Dutra et al., - *under review*) em animais do modelo VPA. Dessa forma, podemos inferir esses mecanismos citados acima como proposta para explicar o achado de prevenção do aumento da expressão de AQP4 na área somatossensorial primária.

Por fim, na região da amígdala, o único efeito observado foi uma diminuição do imunocontéudo de AQP9. A aquaporina 9 é encontrada na membrana plasmática e nas mitocôndrias dos neurônios (Akashi et al., 2015), células gliais e endoteliais (J. Badaut & Regli, 2004), participando metabolismo energético da glicose nos astrócitos devido ao seu papel de facilitação do transporte de glicerol, além de ser permeável à água, ureia e outras moléculas (Badaut et al., 2014). Há uma crescente evidência do papel das disfunções mitocondriais no TEA (Filipek et al., 2003; Tsao & Mendell, 2007), sendo que um comprometimento do metabolismo energético mitocondrial tem sido proposto para desempenhar um papel no desencadeamento do TEA (Lombard, 1998; Pastural et al., 2009; Patowary, Nesbitt, Archer, Bernier, & Brkanac, 2017). Uma vez que um dos locais de expressão da AQP9 são as mitocôndrias, essa disfunção poderia estar relacionada com a diminuição do imunocontéudo dessa AQP na região da amígdala.

Considerando que o resultado mais promissor obtido no *western blotting* foi o imunoconteúdo de AQP4 devido ao papel preventivo do RSV, seguimos a análise dessa AQP na imunofluorescência. O único efeito observado através dessa técnica foi um possível efeito *per se* do RSV na área somatossensorial. Olhando para esse resultado isoladamente, é possível que o RSV esteja modulando funções astrogliais e, dessa forma, aumentando a expressão de AQP4 nos pés astrocíticos. Porém, analisando-se o conjunto de imagens obtidas pela imunofluorescência, nota-se em diversas imagens, principalmente do grupo RSV, um acentuado *background* nas imagens que pode ter prejudicado o sinal da real marcação durante a quantificação, mesmo utilizando uma função do programa de redução de *background*. Dessa forma, esse resultado de AQP4 por imunofluorescência precisa ser revisto.

A fim de avaliar também a integridade da barreira hematoliquórica, investigamos o perfil de AQP1 no plexo coroide. Esses canais de água são expressos principalmente na superfície apical das células cúbicas do plexo e sua principal função é o transporte de água do estroma do plexo em direção à luz do ventrículo (no caso desse estudo, terceiro ventrículo) para formação do ultrafiltrado do plasma – o líquido cefalorraquidiano. Foi possível observar uma redução na expressão de AQP1 em ambos os grupos que receberam VPA, indicando que a exposição pré-natal ao VPA alterou a formação embrionária desses canais. Fazendo a interpretação desse importante resultado, podemos supor que, uma vez que tenha uma diminuição nos canais que fazem o transporte de água no sentido tecido/ventrículo, é possível que haja um acúmulo de líquido no estroma, o qual não está sendo drenado corretamente para formação do LCR, acarretando assim, na formação de edema encefálico. Essa hipótese poderia explicar a formação de edema que é relatada na literatura e também nosso achado de alteração morfológica que possivelmente indica uma região com acúmulo de líquido (indicado pelas setas brancas na Figura 6A).

Sabe-se que o plexo coroide é um dos locais de liberação de mastócito no SNC, além de hipotálamo e outras regiões, como tálamo e dura-máter. Quando a liberação de mastócitos é estimulada, há liberação de histamina, a qual já é descrita por provocar aumento de permeabilidade nos vasos sanguíneos e no SNC é considerado um neurotransmissor excitatório (C. M. Smith, Marks, & Lieberman, 2007). Já foi descrito que o tratamento com um antagonista de receptor

histaminérgico foi capaz de reverter comportamentos do tipo autista (Baronio et al., 2015), evidenciando o envolvimento do sistema histaminérgico no TEA e, em última análise, um possível papel do plexo coroide nessa sinalização.

Recentemente, se mostrou pela primeira vez, através de exames de imagem, uma possível correlação entre alterações no plexo coroide e o TEA (Chaddad, Desrosiers, & Toews, 2017). Em modelos animais, ainda não foi demonstrado na literatura; portanto, o nosso resultado de expressão de AQP1 no plexo coroide é inédito e inovador, além de ser promissor para futuras análises.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

No presente trabalho, avaliamos a permeabilidade da BHE através do corante azul de Evans e a expressão dos canais de água do tipo aquaporina em diferentes tecidos encefálicos a fim de compreender e tentar elucidar alguns dos mecanismos envolvidos na formação de edema e acúmulo de água no SNC de indivíduos com TEA.

Primeiramente, em relação à permeabilidade ao corante azul de Evans, observou-se maior fluorescência vermelha nas imagens dos animais do grupo VPA, principalmente nas regiões do plexo coroide, área somatossensorial e região da amígdala (apesar de nessa região só ter sido observado uma tendência de diferença estatística). Coincidentemente, essas regiões são as mesmas em que demonstramos alteração no perfil de 3 tipos de AQP: i) por *western blotting*, mostramos a diminuição da expressão de AQP1 e aumento da expressão de AQP4 (que foi prevenido pelo tratamento pré-natal com RSV) na área somatossensorial primária, e diminuição da expressão de AQP9 na região da amígdala, e ii) por imunofluorescência, mostramos diminuição da marcação fluorescente de AQP1 no plexo coroide, além da alteração morfológica observada em ambos os grupos que receberam VPA. Já a marcação de AQP4 não confirmou o resultado obtido no *blotting*, além de parecer ter bastante *background*. Dessa forma, podemos traçar um paralelo entre a maior permeabilidade e o perfil de AQP vistos no presente trabalho com os dados descritos na literatura de edema e maior volume encefálico em indivíduos com TEA.

Coincidentemente também, mostramos diminuição na AQP1 tanto na área somatossensorial quanto no plexo coroide (por diferentes técnicas) e aumento de AQP4 na área somatossensorial. Esse fato corrobora com estudos mostrando essa modulação inversamente proporcional dessas AQP (Dolman, Drndarski, Abbott, & Rattray, 2005). Os mecanismos envolvendo esse perfil de expressão alterado no contexto do TEA permanecem desconhecidos.

Por fim, tomando os dados obtidos nesse trabalho em conjunto, concluímos que os animais do grupo VPA possuem um evidente aumento de permeabilidade encefálica e um perfil alterado na expressão de distintas AQP em diferentes regiões do SNC.

7. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados obtidos nesse trabalho e evidências de que todo o sistema de barreiras neurais está comprometido nos animais do modelo animal de TEA, surgem algumas perspectivas para que se continue a investigação dos mecanismos envolvidos:

- Analisar a marcação fluorescente de AQP1 e AQP9 nas mesmas estruturas que foram analisadas por *western blotting* como foi feito com a AQP4;
- Analisar parâmetros de BHE, incluindo marcação de pericitos, endotélio, astrócitos e AQP4, a fim de investigar a cobertura de vasos constituintes da BHE e fazer uma reconstrução 3D;
- Analisar AQP4 e AQP9 no epêndima do terceiro ventrículo e no plexo coroide, buscando entender completamente de que forma se organiza a barreira hematoliquórica no TEA;
- Analisar possíveis alterações de microglia, uma vez que se sabe do envolvimento dela na secreção de IL-6, que por sua vez estimula a diferenciação de astrócitos;
- Analisar a expressão gênica e proteica de IL-6 e do seu receptor (IL6_R);
- Analisar presença de células sanguíneas no SNC, incluindo leucócito, linfócito T, macrófago, mastócito e linfócito B para entender se há infiltrado inflamatório e de que forma ele contribui para a formação do edema e do aumento do volume encefálico;
- Analisar medidas de edema cerebral, a fim de visualizar no modelo animal o achado clínico;
- Por fim, realizar novas imunofluorescências para melhorar o resultado obtido nesse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, N. J. (2013). Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(3), 437–449. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Akashi, A., Miki, A., Kanamori, A., & Nakamura, M. (2015). Aquaporin 9 expression is required for l-lactate to maintain retinal neuronal survival. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.063>
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I. N., & Van de Water, J. (2011). Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders. *Journal of Neuroimmunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.025>
- Aylward, E. H., Minshew, N. J., Field, K., Sparks, B. F., & Singh, N. (2002). Effects of age on brain volume and head circumference in autism. *Neurology*, 59(2), 175–183. <https://doi.org/10.1212/WNL.59.2.175>
- Badaut, J., Fukuda, A. M., Jullienne, A., & Petry, K. G. (2014). Aquaporin and brain diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.10.032>
- Badaut, J., & Regli, L. (2004). Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.035>
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G. A., Moreira, J. C. F., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2011a). Animal model of autism induced by prenatal exposure to

valproate: Behavioral changes and liver parameters. *Brain Research*.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.015>

Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G. A., Moreira, J. C. F., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2011b). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Research*, 1408, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.015>

Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., ... Gottfried, C. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>

Baronio, D., Castro, K., Gonchoroski, T., de Melo, G. M., Nunes, G. D. F., Bambini-Junior, V., ... Riesgo, R. (2015). Effects of an H3R Antagonist on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. *PLOS ONE*, 10(1), e0116363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116363>

Bartholomeusz, H. H., Courchesne, E., & Karns, C. M. (2002). Relationship Between Head Circumference and Brain Volume in Healthy Normal Toddlers, Children, and Adults. *Neuropediatrics*, 33, 232–238.

Bauman, M. L. (n.d.). Medical Comorbidities in Autism: Challenges to Diagnosis and Treatment. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5084236/pdf/13311_2011_Article_70300320.pdf

Belmonte, M. K., & Bourgeron, T. (2006). Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1221–1225. <https://doi.org/10.1038/nn1765>

Benarroch, E. E. (2016). Choroid plexus-CSF system: Recent developments and clinical correlations. *Neurology*, 86(3), 286–296.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002298>

- Benga, O., & Huber, V. J. (2012). Brain water channel proteins in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.03.008>
- Bristot Silvestrin, R., Bambini-Junior, V., Galland, F., Daniele Bobermim, L., Quincozes- Santos, A., Torres Abib, R., ... Gottfried, C. (2013). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.11.048>
- Brown, W. T., Jenkins, E. C., Friedman, E., Brooks, J., Wisniewski, K., Raguthu, S., & French, J. (1982). Autism is associated with the fragile-X syndrome. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 12(3), 303–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7153204>
- Casanova, M. F. (2007). The Neuropathology of Autism. *Brain Pathology*, 17(4), 422–433. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00100.x>
- Chaddad, A., Desrosiers, C., & Toews, M. (2017). Multi-scale radiomic analysis of sub-cortical regions in MRI related to autism, gender and age. *Scientific Reports*, 7(February), 1–17. <https://doi.org/10.1038/srep45639>
- Cheung, C., McAlonan, G. M., Fung, Y. Y., Fung, G., Yu, K. K., Tai, K. S., ... Chua, S. E. (2011). Mri study of minor physical anomaly in childhood autism implicates aberrant neurodevelopment in infancy. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020246>
- Choi, Y. K., & Kim, K.-W. (2008). Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Reports*, 41(5), 345–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510863>

- Christensen, D. L., Baio, J., Braun, K. V. N., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., ... Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2016). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR. Surveillance Summaries*, 65(3), 1–23. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6503a1>
- Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (n.d.). Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
- Christianson, A. L., Chester, N., & Kromberg, J. G. R. (1994). Fetal Valproate Syndrome: Clinical and Neuro-developmental Features in Two Sibling Pairs. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 36(4), 361–369. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1994.tb11858.x>
- Courchesne, E., Carper, R., & Akshoomoff, N. (2003). Evidence of Brain Overgrowth in the First Year of Life in Autism. *Jama*, 290(3), 1–8. <https://doi.org/10.1001/jama.290.3.337>
- Demeestere, D., Libert, C., & Vandenbroucke, R. E. (2015). Therapeutic implications of the choroid plexus-cerebrospinal fluid interface in neuropsychiatric disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 50, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.010>
- Dolman, D., Drndarski, S., Abbott, N. J., & Rattray, M. (2005). Induction of aquaporin 1 but not aquaporin 4 messenger RNA in rat primary brain microvessel endothelial cells in culture. *Journal of Neurochemistry*, 93(4), 825–833. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03111.x>
- Dover, C. J., & Le Couteur, A. (2007). How to diagnose autism. *Arch Dis Child*, 92, 540–545. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.086280>

- DSM-5 Diagnostic Classification. (2013). In *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.x00DiagnosticClassification>
- Durkin, M. S., Maenner, M. J., Newschaffer, C. J., Lee, L.-C., Cunniff, C. M., Daniels, J. L., ... Schieve, L. A. (n.d.). Original Contribution Advanced Parental Age and the Risk of Autism Spectrum Disorder. *American Journal of Epidemiology*^a, 168(11). <https://doi.org/10.1093/aje/kwn250>
- Dyrna, F., Hanske, S., Krueger, M., & Bechmann, I. (2013). The blood-brain barrier. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(4), 763–773. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9473-5>
- Emanuele, E., Orsi, P., Boso, M., Broglia, D., Brondino, N., Barale, F., ... Politi, P. (2010). Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neuroscience Letters*, 471(3), 162–165. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2010.01.033>
- Emerson, R. W., Adams, C., Nishino, T., Hazlett, H. C., Wolff, J. J., Zwaigenbaum, L., ... Piven, J. (2017). Functional neuroimaging of high-risk 6-month-old infants predicts a diagnosis of autism at 24 months of age. *Science Translational Medicine*, 9(393). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag2882>
- Engelhardt, B., Carare, R. O., Bechmann, I., Flügel, A., Laman, J. D., Roy, .-, & Weller, O. (2016). Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, 132, 317–338. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1606-5>
- Engelhardt, B., & Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*, 31(4), 497–511. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0>
- Enstrom, A. M., Onore, C. E., Van de Water, J. A., & Ashwood, P. (2010). Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders.

Brain, Behavior, and Immunity, 24(1), 64–71.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.08.001>

Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Reutiman, T. J., & Lee, S. (2008). Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synapse*. <https://doi.org/10.1002/syn.20519>

Favre, M. R., Barkat, T. R., Lamendola, D., Khazen, G., Markram, H., & Markram, K. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 88. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00088>

Feliciano, D. M., Lin, T. V., Hartman, N. W., Bartley, C. M., Kubera, C., Hsieh, L., ... Bordey, A. (2013). A circuitry and biochemical basis for Tuberous Sclerosis symptoms: From Epilepsy to Neurocognitive deficits. *Int J Dev Neurosci*, 31(7). <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.02.008>

Filipek, P. A., Juranek, J., Smith, M., Mays, L. Z., Ramos, E. R., Bocian, M., ... Gargus, J. J. (2003). Mitochondrial dysfunction in autistic patients with 15q inverted duplication. *Annals of Neurology*, 53(6), 801–4. <https://doi.org/10.1002/ana.10596>

Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66(8), 663–673. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00410-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00410-5)

Gadia, C. A., Tuchman, R., & Rotta, N. T. (2004). Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. *Jornal de Pediatria*, S83–S94. Retrieved from <http://www.jped.com.br/conteudo/04-80-S83/port.pdf>

Geschwind, D. H. (n.d.). Advances in Autism. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.053107.121225>

Gomes, D., Agasse, A., Thiébaud, P., Delrot, S., Gerrens, H., & Chaumont, F.

- (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.009>
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., & Savino, W. (2015). The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 6, 121. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00121>
- Grandin, T. (2009). Visual Abilities and Sensory Differences in a Person with Autism. *Biological Psychiatry*, 65(1), 15–16. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.11.005>
- Gupta, S. C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J. H., & Aggarwal, B. B. (2011). Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215, 150–60. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05852.x>
- Ha, S., Sohn, I.-J., Kim, N., Sim, H. J., & Cheon, K.-A. (2015). Characteristics of Brains in Autism Spectrum Disorder: Structure, Function and Connectivity across the Lifespan. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 273–84. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.273>
- Hazlett, H. C., Poe, M., Gerig, G., Styner, M., Chappell, C., Smith, R. G., ... Piven, J. (2011). Early Brain Overgrowth in Autism Associated with an Increase in Cortical Surface Area Before Age 2 years. *Archives of General Psychiatry*, 68(5), 467–476. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.39.Early>
- Huang, J.-P., Huang, S.-S., Deng, J.-Y., Chang, C.-C., Day, Y.-J., & Hung, L.-M. (2010). Insulin and resveratrol act synergistically, preventing cardiac dysfunction in diabetes, but the advantage of resveratrol in diabetics with acute heart attack is antagonized by insulin. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), 1710–1721. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.08.032>
- Huerta, M., & Lord, C. (n.d.). Diagnostic Evaluation of Autism Spectrum Disorders.

<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2011.10.018>

Imai, K., Iida, T., Yamamoto, M., Komatsu, K., Nukui, Y., & Yoshizawa, A. (2014). Psychological and mental health problems in patients with thalidomide embryopathy in Japan. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, *68*(6), 479–486. <https://doi.org/10.1111/pcn.12152>

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., ... Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (New York, N.Y.)*, *275*(5297), 218–20. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5297.218>

Kalra, S., Burbelo, P. D., Bayat, A., Ching, K. H., Thurm, A., Iadarola, M. J., & Swedo, S. E. (2015). No evidence of antibodies against GAD65 and other specific antigens in children with autism. *BBACLI*, *4*, 81–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.08.001>

Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(01), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>

Kern, J. K., Trivedi, M. H., Grannemann, B. D., Garver, C. R., Johnson, D. G., Andrews, A. A., ... Schroeder, J. L. (2007). Sensory correlations in autism. *Autism*, *11*(2), 123–134. <https://doi.org/10.1177/1362361307075702>

Klintwall, L., Holm, A., Eriksson, M., Carlsson, L. H., Olsson, M. B., Hedvall, Å., ... Fernell, E. (2011). Sensory abnormalities in autism: A brief report. *Research in Developmental Disabilities*, *32*(2), 795–800. <https://doi.org/10.1016/J.RIDD.2010.10.021>

Kumar, H., & Sharma, B. (2016a). Memantine ameliorates autistic behavior,

biochemistry & blood brain barrier impairments in rats. *Brain Research Bulletin*.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.013>

Kumar, H., & Sharma, B. (2016b). Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.052>

Kumar, H., Sharma, B. M., & Sharma, B. (2015). Benefits of agomelatine in behavioral, neurochemical and blood brain barrier alterations in prenatal valproic acid induced autism spectrum disorder. *Neurochemistry International*.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.10.007>

Lainhart, J. E., Piven, J., Wzorek, M., Landa, R., Santangelo, S. L., Coon, H., & Folstein, S. E. (1997). Macrocephaly in children and adults with autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 36(2), 282–290.
<https://doi.org/10.1097/00004583-199702000-00019>

Lange, N., Travers, B. G., Bigler, E. D., Prigge, M. B. D., Froehlich, A. L., Nielsen, J. A., ... Lainhart, J. E. (2015). Longitudinal volumetric brain changes in autism spectrum disorder ages 6-35 years. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 8(1), 82–93.
<https://doi.org/10.1002/aur.1427>

Laurence, J. A., & Fatemi, S. H. (2005). Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *The Cerebellum*, 4(3), 206–210. <https://doi.org/10.1080/14734220500208846>

Lee, J.-A., Ha, S. K., Cho, E., & Choi, I. (2015). Resveratrol as a Bioenhancer to Improve Anti-Inflammatory Activities of Apigenin. *Nutrients*, 7(11), 9650–61.
<https://doi.org/10.3390/nu7115485>

Leo Kanner. (1943). Autistic disturbance of affective contact. *Nervous Child*, 2, 217–250. Retrieved from <https://simonsfoundation.s3.amazonaws.com/share/071207->

leo-kanner-autistic-affective-contact.pdf

- Lin, H.-Y., Ni, H.-C., Lai, M.-C., Isaac Tseng, W.-Y., & Shur-Fen Gau, S. (2012). Regional brain volume differences between males with and without autism spectrum disorder are highly age-dependent. <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0022-3>
- Lombard, J. (1998). Autism: a mitochondrial disorder? *Medical Hypotheses*, *50*(6), 497–500. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710323>
- Louveau, A., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends in Immunology*, *36*(10), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.006>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–75.
- Markram, K., Rinaldi, T., La Mendola, D., Sandi, C., & Markram, H. (2008). Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *33*(4), 901–12. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301453>
- Mefford, H. C., Batshaw, M. L., & Hoffman, E. P. (n.d.). Genomics, Intellectual Disability, and Autism. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1114194>
- Mohammadshahi, M., Haidari, F., & Soufi, F. G. (2014). Chronic resveratrol administration improves diabetic cardiomyopathy in part by reducing oxidative stress. *Cardiology Journal*, *21*(1), 39–46. <https://doi.org/10.5603/CJ.a2013.0051>
- Moore, S. J., Turnpenny, P., Quinn, A., Glover, S., Lloyd, D. J., Montgomery, T., & Dean, J. C. S. (2000). A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant

- syndromes. *J Med Genet*, 37, 489–497. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1734633/pdf/v037p00489.pdf>
- Mraz, K. D., Green, J., Dumont-mathieu, T., Makin, S., & Fein, D. (2007). Correlates of Head Circumference Growth, 7–9. <https://doi.org/10.1177/0883073807304005>
- Muhle, R., Trentacoste, S. V, & Rapin, I. (2004). The genetics of autism. *Pediatrics*, 113(5), e472–86. <https://doi.org/10.1542/PEDS.113.5.E472>
- Nagelhus, E. A., & Ottersen, O. P. (2013). Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain. *Physiological Reviews*, 93(4), 1543–1562. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>
- Nakanishi, M., Niidome, T., Matsuda, S., Akaike, A., Kihara, T., & Sugimoto, H. (2007). Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *European Journal of Neuroscience*, 25(3), 649–658. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05309.x>
- Numis, A. L., Major, P., Montenegro, M. A., Muzykewicz, D. A., Pulsifer, B. M. B., & Thiele, E. A. (n.d.). Identification of risk factors for autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3271577/pdf/znI981.pdf>
- Nutakul, W., Sobers, H. S., Qiu, P., Dong, P., Decker, E. A., McClements, D. J., & Xiao, H. (2011). Inhibitory effects of resveratrol and pterostilbene on human colon cancer cells: a side-by-side comparison. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 10964–70. <https://doi.org/10.1021/jf202846b>
- Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature Medicine*, 19(12), 1584–96. <https://doi.org/10.1038/nm.3407>

- Olsen, J., & Zhu, J. L. (2009). RE: "ADVANCED PARENTAL AGE AND THE RISK OF AUTISM SPECTRUM DISORDER"; *American Journal of Epidemiology*, 169(11), 1406–1406. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp064>
- Orešković, D., Radoš, M., & Klarica, M. (2017). Role of choroid plexus in cerebrospinal fluid hydrodynamics. *Neuroscience*, 354, 69–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.04.025>
- Oshio, K., Song, Y., Verkman, A. S., & Manley, G. T. (2003). Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 86, 525–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14753499>
- Palmer, A. M. (2010). The blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*, 37(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.09.023>
- Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2007). Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatric Nephrology*. <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0411-0>
- Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2013). Aquaporin water channels in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(4), 265–277. <https://doi.org/10.1038/nrn3468>
- Pastural, E., Ritchie, S., Lu, Y., Jin, W., Kavianpour, A., Khine Su-Myat, K., ... Goodenowe, D. B. (2009). Novel plasma phospholipid biomarkers of autism: mitochondrial dysfunction as a putative causative mechanism. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 81(4), 253–64. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.06.003>
- Patowary, A., Nesbitt, R., Archer, M., Bernier, R., & Brkanac, Z. (2017). Next Generation Sequencing Mitochondrial DNA Analysis in Autism Spectrum Disorder. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 10(8), 1338–1343. <https://doi.org/10.1002/aur.1792>

- Philippe Jeandet, *,†, Anne-Céline Douillet-Breuil, ‡, Roger Bessis, ‡, Sylvain Debord, ‡, Mohamed Sbaghi, §. and, & Adrian‡, M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. <https://doi.org/10.1021/JF011429S>
- Quincozes-Santos, A., & Gottfried, C. (2011). Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 72–78. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05857.x>
- Rapin, I., & Tuchman, R. F. (2008). Autism: Definition, Neurobiology, Screening, Diagnosis. *Pediatric Clinics of North America*, 55(5), 1129–1146. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2008.07.005>
- Redcay, E., & Courchesne, E. (2005). When is the brain enlarged in autism? A meta-analysis of all brain size reports. *Biological Psychiatry*, 58(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.03.026>
- Rodier, P. M., Bryson, S. E., & Welch, J. P. (1997). Minor malformations and physical measurements in autism: Data from Nova Scotia. *Teratology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9926\(199705\)55:5<319::AID-TERA4>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9926(199705)55:5<319::AID-TERA4>3.0.CO;2-U)
- Roullet, F. I., Lai, J. K. Y., & Foster, J. A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism — A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 47–56. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2013.01.004>
- Roullet, F. I., Wollaston, L., Decatanzaro, D., & Foster, J. A. (2010). Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience*, 170(2), 514–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.069>
- Sánchez-Fidalgo, S., Cárdeno, A., Villegas, I., Talero, E., & de la Lastra, C. A. (2010). Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic

inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*, 633(1-3), 78–84.
<https://doi.org/10.1016/J.EJP HAR.2010.01.025>

Schneider, T., Łabuz, D., & Przewłocki, R. (2001). Nociceptive changes in rats after prenatal exposure to valproic acid. *Polish Journal of Pharmacology*, 53, 531–534. Retrieved from http://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2001/5_531.pdf

Schneider, T., & Przewłocki, R. (n.d.). Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>

Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>

Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., & Przewłocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6), 728–740. [https://doi.org/S0306-4530\(08\)00061-9](https://doi.org/S0306-4530(08)00061-9) [pii]10.1016/j.psyneuen.2008.02.011

Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., & Przewłocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.011>

Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F. L., Kaaij, R. M. van der, & Kan, J. A. L. van. (2002). Resveratrol acts as a natural antifungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Molecular Microbiology*, 43(4), 883–894. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02801.x>

Shields, S. D., Mazario, J., Skinner, K., & Basbaum, A. I. (2007). Anatomical and

functional analysis of aquaporin 1, a water channel in primary afferent neurons. *Pain*, 131(1-2), 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.11.018>

Silver, W. G., & Rapin, I. (2012). Neurobiological Basis of Autism. *Pediatric Clinics of North America*, 59(1), 45–61. <https://doi.org/10.1016/J.PCL.2011.10.010>

Smith, C. M., Marks, A. D., & Lieberman, M. (2007). *Bioquímica médica básica de Marks : uma abordagem clínica* (2nd ed.). Artmed.

Smith, V., & Brown, N. (2014). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 99(5), 198. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-305636>

Stoner, R., Chow, M. L., Boyle, M. P., Sunkin, S. M., Mouton, P. R., Roy, S., ... Courchesne, E. (2014). Patches of disorganization in the neocortex of children with autism. *The New England Journal of Medicine*, 370(13), 1209–1219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1307491>

Tambur, A. R., & Roitberg, B. (2005). Immunology of the central nervous system. *Neurological Research*, 27(7), 675–678. <https://doi.org/10.1179/016164105X49544>

Tang, B. L. (2010). Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1—A hypothesis. *Brain Research Bulletin*, 81(4-5), 359–361. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2009.12.007>

Tchaconas, A., & Adesman, A. (2013). Autism spectrum disorders: a pediatric overview and update. *Current Opinion in Pediatrics*, 25(1), 130–143. <https://doi.org/10.1097/mop.0b013e32835c2b70>

Theoharides, T. C., Stewart, J. M., Panagiotidou, S., & Melamed, I. (2016). Mast

cells, brain inflammation and autism. *European Journal of Pharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.086>

Tsao, C.-Y., & Mendell, J. R. (2007). Autistic Disorder in 2 Children With Mitochondrial Disorders. *Journal of Child Neurology*, 22(9), 1121–1123.
<https://doi.org/10.1177/0883073807306266>

Tsujino, N., Nakatani, Y., Seki, Y., Nakasato, A., Nakamura, M., Sugawara, M., & Arita, H. (2007). Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. *Neuroscience Research*, 57(2), 289–295. <https://doi.org/10.1016/J.NEURES.2006.10.018>

Vang, O., Ahmad, N., Baile, C. A., Baur, J. A., Brown, K., Csiszar, A., ... Wu, J. M. (2011). What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol. *PLoS ONE*, 6(6), e19881.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019881>

Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology*, 57(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>

Wang, L., Almeida, L. E. F., Nettleton, M., Khaibullina, A., Albani, S., Kamimura, S., ... Quezado, Z. M. N. (2016). Altered nocifensive behavior in animal models of autism spectrum disorder: The role of the nicotinic cholinergic system. *Neuropharmacology*, 111, 323–334.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.09.013>

Williams, G., King, J., Cunningham, M., Stephan, M., Kerr, B., & Hersh, J. H. (2001). Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 43(3), 202–206.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2001.tb00188.x>

Williams, P. G., & Hersh, J. H. (1997). A male with fetal valproate syndrome and

autism. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 39(9), 632–634.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1997.tb07500.x>

Xiao, M., & Hu, G. (2014). Involvement of Aquaporin 4 in Astrocyte Function and Neuropsychiatric Disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics*.
<https://doi.org/10.1111/cns.12267>

Yao, L., Wan, J., Li, H., Ding, J., Wang, Y., Wang, X., & Li, M. (2015). Resveratrol relieves gestational diabetes mellitus in mice through activating AMPK. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13, 118.
<https://doi.org/10.1186/s12958-015-0114-0>

Yochum, C. L., Dowling, P., Reuhl, K. R., Wagner, G. C., & Ming, X. (2008). VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice. *Brain Research*, 1203, 126–132. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.01.055>

ANEXOS

**ANEXO 1 - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)**



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

Projeto: 130047

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

RUDIMAR DOS SANTOS RIESGO

CARMEM GOTTFRIED

DIEGO MOURA BARONIO

VICTORIO BAMBINI JUNIOR

Título: DOSAGEM DE AQUAPORINAS EM MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPRÓICO

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

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

Porto Alegre, 30 de setembro de 2013.

Dr. Alessandro Osvaldt
Coordenador CEUA/HCPA