



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

MELLANIE FONTES DUTRA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO PREVENTIVO DO RESVERATROL EM
COMPONENTES MORFOFUNCIONAIS INIBITÓRIOS E COMPORTAMENTAIS NO
PROCESSAMENTO SENSORIAL EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO**

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO PREVENTIVO DO RESVERATROL EM
COMPONENTES MORFOFUNCIONAIS INIBITÓRIOS E
COMPORTAMENTAIS NO PROCESSAMENTO SENSORIAL EM UM
MODELO ANIMAL DE AUTISMO**

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

MELLANIE FONTES DUTRA DA SILVA

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

COORIENTADORA: Prof.^a. Dr.^a. Maria Elisa Calcagnotto

Porto Alegre, 2019

Agradecimentos

Uma tese não nasce sozinha e não é uma jornada solitária. É fruto de uma jornada que se cria antes do próprio ingresso no doutorado. E, levando tudo isso em consideração, gostaria de expressar minha profunda gratidão a pessoas tão importantes tanto nessa jornada, como na minha vida.

Aos meus pais, minha irmã e ao Tommy, por serem a minha família. Obrigada por nunca medirem esforço algum para proporcionar todas as idas e vindas ao longo da minha jornada acadêmica, todos os espaços que precisei para poder trabalhar, por todo o amor incondicional nos momentos que eu mais precisei e talvez menos tenha merecido e por me darem a oportunidade de poder me dedicar integralmente ao estudo. Obrigada por acreditarem nas minhas escolhas e perseguirem e, frequentemente, viverem meus sonhos do meu lado.

A minha orientadora, Carmem, pelo acolhimento há quase uma década. Por, desde esse período até então, seguir me ensinando tanto e acreditando em mim. Por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, o qual foi meu berço científico. Obrigada por ter me auxiliado, por todos esses anos, a construir a pesquisadora que venho me tornando. Por ter sido, e sempre ser, meu exemplo.

A minha co-orientadora Maria Elisa, por ter aceitado, desde o começo, o pedido da co-orientação, pelo acolhimento em seu laboratório, por todos os ensinamentos, não só relacionados a eletrofisiologia, mas também por todas as vezes que tu compartilhou, entre sorrisos, teu entusiasmo pela neurociência. Obrigada por ter me ensinado o quanto eu gosto de eletrofisiologia e por toda a paciência nesse processo.

Aos meus colegas, Júlio, Iohanna, Brum, Bruna. Meu agradecimento não cabe nessas poucas páginas. Vocês me ensinaram que a felicidade, satisfação só é completa quando a gente compartilha. Eu compartilhei cada detalhe da minha jornada com vocês e me tornei uma pessoa infinitamente melhor nesse processo graças a vocês. Júlio, obrigada por ter me dado a oportunidade e a satisfação de ser tua co-orientadora nesse percurso. Obrigada por ter feito tantas lâminas lindas de imunofluorescência. Nós colorimos muitas células, mas tu coloriu a minha vida. Iohanna, obrigada por ser meu grande exemplo da mulher que eu gostaria de me tornar. Obrigada por toda a doçura e carinho, bem como

por cada vez que tu não descreditou em mim e brigou pelo meu crescimento. Obrigada por me receber todos os dias cedo (e é cedo mesmo) com um sorriso e, apesar de tu não saber, foi esse sorriso que muitas vezes me devolveu a esperança do dia. Brum, obrigada por ter me apoiado, ajudado e acima de tudo, apostado na eletrofisiologia comigo. Obrigada por todas as cirurgias, todas as vezes que ficamos cuidando dos animais e compartilhamos preocupações sobre eles. Obrigada por todas as conversas sobre diversos assuntos e por, sempre que possível, mostrado-me o valor da nossa amizade pra ti (com o teu jeitinho, claro). Bruna, obrigada por ter ido naquele curso de neurociências. Obrigada por ter me dado o privilégio de me aproximar de ti e conhecer essa pessoa incrível. Obrigada por todas as coquinhas que tu comprou pra me acalmar, por cada detalhe que tu proporcionou no meu dia, que significou tanto. Obrigada por ser minha gêmea ruiva. Ao Matheus, obrigada por compartilhar as loucuras da computação na neurociência e por todas as parcerias e shows que fomos e iremos ainda juntos. Obrigada pela amizade incrível que criamos. Gui, Outro Gui (Cordenonsi), obrigada por compartilharem sempre com muita alegria, e risadas-de-galpão no caso do Outro Gui, o ambiente do lab. Às ICs e ex-ICs, Gio, Wal, Bibi, obrigada por terem compartilhado dessa jornada comigo e tê-la enfeitado de forma tão bonita com a amizade de vocês. Aos ICs que me acompanharam na eletrofisiologia, Mari e Rafa, obrigada por terem apostado nisso e não medirem um esforço sequer para enviar vídeos, clampfit, ou o que fosse, sempre com entusiasmo e por compartilharem a alegria dos resultados comigo.

Ao Ruan, por ter sido muito além de um grande companheiro nessa jornada, juntamente com a Valentina, por estar do meu lado em todos os momentos e ter sido meu fim de tarde lilás nos dias mais escuros. Juntamente com o Valter, obrigada pela amizade incondicional ao longo desse período, pessoal. Por todas as vezes que vocês acreditaram no percurso e brigaram comigo me obrigando a não me exceder nas atividades extra-lab.

Tem tanta gente a agradecer. Tantos amigos, tantas pessoas que me acompanharam e me inspiram todos os dias. Gostaria de, então, finalizar, agradecendo a vida, por me dar tanto todos os dias.

“La estrella de la esperanza continuará siendo nuestra”

Victor Jara, “Vientos del Pueblo”, 1973.

SUMÁRIO

CONTEÚDO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
CAPÍTULO I	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Transtorno do Espectro Autista (TEA).....	16
1.1.1. Diagnóstico.....	17
1.1.2. Comorbidades associadas com o TEA.....	18
1.1.3. Fatores de risco	19
1.1.4. Ácido valproico.....	20
1.1.5. Mecanismos fisiopatológicos	21
1.2. Alterações sensoriais no TEA.....	27
1.2.1. Região da Amígdala.....	29
1.2.2. Área Somatossensorial Primária.....	31
1.3. Equilíbrio excitatório e inibitório	33
1.3.1. Interneurônios GABAérgicos	35
1.3.2. Interneurônios inibitórios que expressam parvalbumina (PV ⁺)	37
1.4. Resveratrol como estratégia de prevenção intraútero	39
2. JUSTIFICATIVAS E HIPÓTESES	42
3. OBJETIVOS.....	43
3.1. Objetivos gerais.....	43
3.2. Objetivos específicos.....	43
CAPÍTULO II	45
Artigo publicado:.....	45

<i>“Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid”</i>	45
CAPÍTULO III	58
Artigo publicado:.....	58
<i>“Abnormal empathy-like pro-social behaviour in the valproic acid model of autism spectrum disorder”</i>	58
CAPÍTULO IV.....	67
TRANSMISSÃO SINÁPTICA INIBITÓRIA CORTICAL: Resultados preliminares.....	67
1. Introdução.....	68
2. Materiais e Métodos.....	68
3. Resultados.....	72
CAPÍTULO V	78
Capítulo de livro aceito para publicação:.....	78
<i>“Maternal immune activation and neuropsychiatric disorders: the intricate puzzle in Autism Spectrum Disorder”</i>	78
CAPÍTULO VI.....	137
DISCUSSÃO GERAL	137
POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS.....	149
4. CONCLUSÕES.....	161
5. PERSPECTIVAS	163
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164
7. ANEXOS.....	184
7.1. Carta de aprovação ao CEUA (HCPA: 2016-0477).....	184

RESUMO

O transtorno do espectro autista é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por prejuízos de interação e comunicação social, bem como comportamentos repetitivos e/ou estereotipados. Apesar da crescente prevalência, a etiologia permanece desconhecida, embora se saiba que existam interações entre fatores genéticos e ambientais. O modelo animal de autismo por exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA) é consolidado por sua translacionalidade em relação aos indivíduos com TEA. Em todos os capítulos de dados, utilizou-se o modelo animal por injeção intraperitoneal de VPA (600 mg/kg) no dia embrionário (E) E12,5 nas ratas Wistar prenhes e avaliou-se o efeito de um tratamento pré-natal com resveratrol (RSV), através de injeções subcutâneas (3,6 mg/Kg) administradas nas ratas prenhes nos dias E6,5-E18,5. O RSV, por ser um polifenol com características anti-inflamatórias e neuroprotetoras, surge como uma importante ferramenta para estudo de vias biológicas envolvidas na fisiopatologia desse transtorno. No presente trabalho, avaliamos: questões relativas a alterações sensoriais em diferentes idades, bem como aspectos histológicos e eletrofisiológicos possivelmente envolvidos nos comportamentos alterados; prejuízos em diferentes parâmetros relacionados ao comportamento do tipo empático; e, por fim, revisão da literatura em forma de capítulo de livro sobre possíveis mecanismos neuroimunes desencadeados por ativação imune materna, os quais trazem pistas importantes sobre a fisiopatologia do TEA. Nesse contexto, foi possível observar: I) alterações em comportamentos sensoriais olfatórios e táteis nas idades pós-natais (P) 10 e P30, respectivamente; alteração na disposição de neurônios parvalbumina-positivos (PV⁺) nas camadas da área somatossensorial primária (ASSp); redução na proporção de PV⁺ na amígdala; redução na expressão da gefirina na ASSp; II) alterações em componentes associados ao comportamento do tipo empático como visto pelo atraso no dia de abertura e redução na porcentagem da abertura do aparato nos dias iniciais de teste; III) alterações *in vitro* em correntes inibitórias pós sinápticas espontâneas (redução na frequência e tempo de decaimento), além da presença *in vivo* de períodos de descargas de ondas lentas durante o ciclo de vigília em 40% dos animais VPA. Nesse contexto, o resveratrol foi capaz de estabelecer prevenção na maioria das alterações (exceto no imunoconteúdo de gefirina e no comportamento do tipo empático), demonstrando que a restauração da organização de componentes inibitórios, como os interneurônios PV⁺, possivelmente proporciona a normalização do componente eletrofisiológico que, por fim, restabelece o prejuízo sensorial. No caso dos parâmetros comportamentais associados à empatia, possivelmente outros substratos neurais, além dos sensoriais primários, estejam envolvidos (tais como mecanismos de tomada de decisão, processamento cognitivo e integração em regiões associativas), os quais possivelmente não são substratos da prevenção demonstrada pelo RSV. Finalmente, considerando as características intrínsecas do RSV (anti-inflamatória e neuroprotetora) e que esse tratamento preveniu diversos parâmetros analisados, hipotetiza-se que o VPA deixe sua impressão na prole por meio de mecanismos neuroimunes.

Palavras-chave: transtorno do espectro autista, modelo animal, ácido valproico, resveratrol, processamento sensorial, eletrofisiologia, desequilíbrio excitatório-inibitório, comportamento, ativação imune materna, interneurônio inibitório.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder is a neurodevelopmental disorder characterized by impairments of interaction and social communication, as well as repetitive and/or stereotyped behaviors. Although the increasing prevalence, the etiology remains unclear, despite it is known that there are interactions between genetic and environmental factors. The animal model of autism by prenatal exposure to valproic acid (VPA) is consolidated by its translationality in relation to individuals with ASD. In all data chapters, the animal model used was performed by intraperitoneal injection of VPA (600 mg/kg) at embryonic (E) day E12.5 in pregnant Wistar rats and the effect of prenatal treatment with resveratrol (RSV) was evaluated, (3.6 mg/kg) given in pregnant rats on 6.5-E18.5 days. RSV, a polyphenol with anti-inflammatory and neuroprotective properties, appears as an important tool for the study of biological pathways involved in the pathophysiology of this disorder. In the present work, we evaluated: questions related to sensory alterations at different ages, as well as histological and electrophysiological aspects possibly involved in the altered behaviors; impairments in different parameters related to empathic behavior; and, finally, a review of the literature in a book chapter format about possible neuroimmune mechanisms triggered by maternal immune activation, which provide important clues about the pathophysiology of ASD. In this context, it was possible to observe: I) alterations in olfactory and tactile sensorial behaviors at the postnatal ages (P) 10 and P30, respectively; alteration in the arrangement of parvalbumin-positive neurons (PV+) in the primary somatosensory area (ASSp) layers; reduction in the proportion of PV+ in the amygdala; reduction in the expression of gephyrin in ASSp; II) changes in components associated with the empathy-like behavior as seen by the opening day delay and reduction in percentage of apparatus opening on the initial test days; III) in vitro changes in spontaneous post synaptic inhibitory currents (reduction in frequency and decay time), in addition to in vivo presence of slow wave discharges during the wake cycle in 40% of the VPA animals. In this context, resveratrol was able to establish prevention in most of the alterations (except in the gephyrin immunoccontent and in the parameters of empathy-like behavior), demonstrating that the restoration of the organization of inhibitory components, such as PV⁺ interneurons, possibly provides the normalization of the component electrophysiology, which finally restores sensory impairment. In the case of the behavioral parameters associated with empathy, other neural substrates, besides the primary sensory ones, may be involved (such as decision-making mechanisms, cognitive processing and integration in associative regions), which possibly are not substrates of the prevention demonstrated by RSV. Finally, considering the intrinsic characteristics of RSV (anti-inflammatory and neuroprotective) and that this treatment prevented several parameters analyzed, it is hypothesized that the VPA leaves its impression in the offspring through neuroimmune mechanisms.

Keywords: autism spectrum disorder, animal model, valproic acid, resveratrol, sensory processing, electrophysiology, excitatory-inhibitory imbalance, behavior, maternal immune activation, inhibitory interneuron.

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP2 – Proteína ligante 2 do fator eucariótico de iniciação da tradução 4E

Ac – Acetilação

ADNP – proteína *homeobox* neuroprotetora atividade-dependente

Akt - Proteína cinase B

AP1 - Proteína ativadora 1

APC– Proteína relacionada a Adenomatose Poliposa Familiar

ARID1B – Domínio de interação rico em AT 1B

Arx - Fator de transcrição *homeobox* relacionado ao gene *aristaless* de *Drosophila*

ASSp – Área Somatossensorial primária

Axin – Axina

CA – Corno de Amon

CB – Calbindina

CBP - Proteína ligadora de CREB

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

Cdc42 - Proteína homóloga do controle de divisão celular 42

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CHD8 – Proteína ligante do cromodomínio da DNA helicase 8

CIPS – corrente inibitória pós-sináptica

CK1 - Caseína cinase 1

CNTNAP2 – Proteína associada a contactina do tipo 2

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX-2 – Ciclo-oxigenase 2

CPFm – Córtex pré-frontal medial

CR – Calretinina

CREAL – Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

CXCL12 – Ligante 12 do motivo C-X-C de quimiocinas

DIAPH3 – Gene da proteína Formina relacionada a *Diaphanous 3*

DKK1 – Proteína relacionada a *dickkopf 1*

Dlx – Fatores de transcrição *homeobox* relacionado ao gene *distal-less* de *Drosophila*

DSCAM – Molécula de adesão celular da síndrome de Down

DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

Dvl - Proteína intracelular relacionada a *dishvelled*

E – Dia embrionário

E/I – Excitatório/inibitório

EEG – Eletroencefalograma

Eph – Efrina

ERK – Cinase regulada por sinal extracelular

FAT1 – Gene da proteína Caderina Atípica FAT 1

Fmr1 – Gene relacionado ao retardo mental do X frágil 1

fMRI – Ressonância Magnética Funcional

GABA – Ácido gama aminobutírico

GAD – Glutamato descarboxilase

GAT – Transportador de GABA

Geph – Geferina

GETTEA – Grupo de Estudos Translacionais do Transtorno do Espectro Autista

GRIN2B – Subunidade do receptor ionotrópico de NMDA 2B

GSK3 β - Glicogeno-sintase-cinase 3-beta

H - Histona

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HDAC – Desacetilase de Histonas

ICBS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IL - Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

IS – Integração Sensorial

JNK - c-Jun N-terminal cinase

KCC2 – Trocador de potássio-cloreto 2

LA – Núcleo Lateral da Amígdala

Lef1 - Fator de ligação estimulador linfóide 1

Lhx - Fator de transcrição *homeobox* com domínio de ligação rico em zinco e cisteína

LPS – Lipopolissacarídeo

LTP – Potenciação de Longa Duração

MCP – Proteína quimioatrativa 1

Mecp2 – Proteína ligante de metil-CpG 2

MIA – Ativação Imune Materna

miR – microRNA

mTOR - Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC1 - Complexo 1 da mTOR

NF1 – Gene relacionado a Neurofibromatose 1

Nkx2.1 – Proteína do *homeobox* 1 da NK2

NLG – Neuroligina

NPY – Neuropeptídeo Y

NRX – Neurexina

NS – Teste de Busca pelo Ninho

OCTR - Receptor de Ocitocina

P – Dia pós-natal

P – Fosforilação

p21 – Inibidor da cinase ciclina-dependente 1

p300 - Histona acetil-transferase 300

PCP – Polaridade Celular Planar

PI3K -Fosfoinositídeo 3-cinase

Poly(I:C) – Ácido poli-inosínico:policitidílico

PRICKLE – Proteína Prickle da Polaridade Celular Planar

PSD-95 – Proteína da Densidade Pós-Sináptica 95

PTEN - Proteína fosfatase e tensina homóloga

PV⁺ – Parvalbumina-positivo

RAm – Região da Amígdala

Ras – Proteína relacionada ao sarcoma de rato

Rheb - Proteínas Ras homóloga encefálica

RhoA - Proteína da família do gene homólogo a Ras A
RNA – Ácido Ribonucleico
RNA – Ácido ribonucleico
Roc - Complexo proteico de Ras
RSV – Resveratrol
RTT – Síndrome de Rett
SCN2A – Subunidade alfa do canal de sódio dependente de voltagem 2
SCRIB1 – Proteína Scribble da Polaridade Celular Planar 1
sFRP – Proteína secretada relacionada ao *frizzle*
Shank – Domínios repetidos de múltiplas anquirinas e SH3
Sirt1 - Sirtuína 1
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SST – Somatostatina
SYNGAP1 – Proteína sináptica ativadora da Ras-GTPase 1
SYP – Sinaptofisina
TBR1 – Fator de transcrição T-*box* 1
TCF - Fator de células T
TEA – Transtorno do Espectro Autista
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TSC1/2 - Complexo esclerose tuberosa 1/2
Ub – Ubiquitina
UEA – Unidade de Experimentação Animal
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VPA – Ácido Valproico
WIF - Fator inibitória da Wnt
Wnt - Proteína do sítio relacionado à ausência de asas
WNT – Teste de Estimulação de Vibrissas
βCat - beta-catenina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Possíveis vias envolvidas no mecanismo fisiopatológico do VPA e na prevenção pelo RSV.....	158
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos interneurônios GABAérgicos PV+, CB+ e CR+.....	36
--	----

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVAS E HIPÓTESES, OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O termo “autismo” foi cunhado e usado pela primeira vez, em 1911, por Paul Eugen Bleuler para descrever um sintoma observado nos casos mais graves de crianças diagnosticadas com esquizofrenia na época: o distanciamento social (Ashok et al., 2012; Evans, 2013). Até pouco tempo atrás, acreditava-se que a primeira descrição de autismo tal como se conhece hoje havia sido feita na década de 40 por Leo Kanner, quando este descreveu um grupo de crianças com características em comum, tais como dificuldades severas de integração social, “desejo obsessivo pela manutenção da mesmice”, entre outros, compondo uma síndrome única (Kanner, 1943), que até então, considerava-se ainda não descrita. Da mesma forma, Hans Asperger caracterizou um grupo de crianças e as agrupou no que ele nomeou de “Síndrome de Asperger”, cujos sintomas incluíam déficits em habilidades sociais e de comunicação (Pearce, 2005), mas também alta inteligência não-verbal, diferentemente do observado por Kanner (Asperger, 1944).

Hoje, após inúmeros esforços da comunidade científica, sabe-se que a grande “mãe” do autismo foi a psiquiatra russa Grunya Efimovna Sukhareva que, em 1924, descreveu 6 meninos com características “do tipo introvertido, com uma tendência autista dentro de si” (Zeldovich, 2018). Os sintomas desses indivíduos incluíam “falta de expressividade facial e de movimentos expressivos, afastamento de seus semelhantes, com tendência à solidão, fala de maneira estereotipada e interesses exclusivos” (Ssucharewa, 1926).

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) dos Estados Unidos, o TEA se apresenta como uma desordem altamente prevalente e de incidência crescente ao longo dos anos; atualmente, uma a cada 59 crianças até 8 anos de idade é diagnosticada com o transtorno, sendo quatro vezes mais comum no sexo masculino do que no feminino (Baio et al., 2018).

O TEA gera muitos impactos socioeconômicos; uma vez que é um transtorno com início na infância, e, como ainda não há cura (persiste durante toda a vida), esse contexto influencia diretamente na capacidade de o indivíduo ser inserido no mercado de trabalho e de viver independentemente, requerendo

uma gama de serviços médicos e cuidados diários, o que gera grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos diagnosticados, seus familiares, cuidadores e comunidade, além de comprometer o orçamento público (Kałużna-Czaplińska et al., 2018). Os pacientes necessitam tanto de cuidado médico quanto educação especiais, medicamentos para o tratamento dos sintomas associados, dentre outros. Estima-se que os custos totais por ano com crianças com TEA nos Estados Unidos sejam de 11,5 a 60,9 bilhões de dólares (Buescher et al., 2014; Lavelle et al., 2014); assim, o TEA apresenta tanto custo emocional quanto financeiro.

1.1.1. Diagnóstico

Atualmente, a 5ª edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) unifica o autismo clássico, a síndrome de Asperger, o transtorno desintegrativo da infância e os transtornos invasivos do desenvolvimento não especificados em uma única condição chamada Transtorno do Espectro Autista (TEA), a qual é classificada como uma das desordens do neurodesenvolvimento e é caracterizada por uma tríade comportamental:

- 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 compreender relacionamentos;
- Comportamentos repetitivos, atividades e interesses restritos e estereotipados, tais como movimentos ou fala estereotipados e inflexibilidade na adesão de novas rotinas (American Psychiatric Association, 2013).

Esses sintomas podem aparecer isoladamente em outros transtornos psiquiátricos; no entanto, apenas a presença concomitante destes em um mesmo indivíduo é que caracteriza o TEA. Apesar da especificação dos critérios diagnósticos no DSM-5, ainda há certa dificuldade em sua determinação, pois o TEA se apresenta como uma desordem heterogênea e multifatorial (Gottfried et al., 2013). Dessa forma, o reconhecimento desses domínios comportamentais é de extrema importância para o diagnóstico dos pacientes, uma vez que o TEA ainda não possui biomarcadores conhecidos. Entretanto, embora possa haver

casos de diagnóstico em torno ou até mesmo antes dos 2 anos de idade, a maior parte das crianças com TEA é diagnosticada tardiamente, após os 4 anos de vida (Christensen et al., 2019) – à medida que os prejuízos sociais gradualmente se tornam mais evidentes (Dover and Le Couteur, 2007) e há um acompanhamento multiprofissional adequado.

Historicamente, as primeiras evidências científicas sobre o TEA apontam para uma alteração na percepção sensorial (Kanner, 1943) por parte dos indivíduos, apesar de não entrarem como critério chave para o diagnóstico (Leekam, 2016). Nos últimos anos, pesquisas focando nas alterações de nível sensorial agregaram diversos dados contundentes (Baum et al., 2015) de que prejuízos nesse domínio estão presentes em todas as idades e níveis de severidade (Leekam et al., 2007), afetando a qualidade de vida e as rotinas diárias dos indivíduos (Suarez, 2012), bem como a performance acadêmica (Howe and Stagg, 2016). Alterações em modalidades sensoriais variadas são documentadas em 95% dos relatos de pais de crianças diagnosticadas com TEA (Kientz and Dunn, 1997), os quais reportam algum tipo de atipia sensorial no comportamento da criança (aparente indiferença a dor, aversão a alguns tipos de sons e texturas, fixação por luzes ou objetos em movimento, por exemplo) (Rogers and Ozonoff, 2005). Dessa forma, o DSM-5 (APA, 2013) incluiu “hiper ou hiporresponsividades sensoriais a estímulos ou interesses não usuais a aspectos sensoriais do ambiente” como um dos componentes para os comportamentos repetitivos ou restritos, uma vez que há evidências comportamentais e neurofisiológicas da participação das alterações sensoriais como características prevalentes do TEA.

1.1.2. Comorbidades associadas com o TEA

Além dos prejuízos centrais citados acima, uma observação comum em crianças com TEA são as comorbidades associadas ao transtorno, as quais não são necessárias para o diagnóstico. A epilepsia é uma das comorbidades mais frequentes no TEA, afetando cerca de um terço dos indivíduos, com picos de ocorrência em diferentes fases da vida e diferentes graus de comprometimento (Lewis et al., 2018; Tuchman and Cuccaro, 2011). Além disso, destacam-se também prejuízo intelectual (Bauman, 2010; Christensen et al., 2019; Mefford et al., 2012), hiperatividade e agressividade (Canitano and Scandurra, 2011),

impulsividade, déficit de atenção/hiperatividade (Sokolova et al., 2017), transtornos de ansiedade e depressão também podem estar presentes (Croen et al., 2015; Geschwind, 2009a; Klintwall et al., 2011; Silver and Rapin, 2012).

Ainda, diversas alterações fisiológicas podem ser observadas nesses indivíduos, incluindo problemas gastrointestinais (Coury et al., 2012; Holingue et al., 2018), distúrbios do sono (Krakowiak et al., 2008), hormonais e metabólicos (Bauman, 2010), alterações sensoriais, tais como hipo ou hiperresponsividade a estímulos sonoros, visuais e táteis (Ben-Sasson et al., 2009a; Grandin, 2009; Kern et al., 2007), além de uma menor sensibilidade à dor (Klintwall et al., 2011). Além disso, doenças como Esclerose Tuberosa, Síndrome do X Frágil e Síndrome de Angelman são frequentemente associadas ao autismo (Silver and Rapin, 2012).

1.1.3. Fatores de risco

Apesar dos diversos estudos e do progresso alcançado na identificação de fatores de risco e na compreensão da fisiopatologia do TEA, a etiologia desse transtorno ainda não é conhecida. Dessa forma, o TEA se apresenta como um grande “quebra-cabeça” para a comunidade científica. No entanto, acredita-se que seja uma desordem de etiologia heterogênea e multifatorial (Beverdorf, 2016), cujo desencadeamento pode envolver tanto fatores genéticos quanto ambientais, bem como as suas interações (Gottfried et al., 2015).

Estudos com irmãos gêmeos e familiares são fortes evidências da contribuição genética para esse transtorno. Existe uma elevada herdabilidade no TEA com graus de concordância em torno de 70-90% (chegando a 95% em alguns estudos) para gêmeos monozigóticos e 10% para gêmeos dizigóticos (Colvert et al., 2015; El-Fishawy and State, 2010; Sandin et al., 2014). Outros achados apontam para mutações, variações no número de cópias (Bourgeron, 2015), além da identificação de importantes genes envolvidos, como SHANK3 (Li et al., 2012). Por fim, o TEA também é associado a algumas síndromes monogênicas, como a Síndrome do X frágil e a esclerose tuberosa (Devlin and Scherer, 2012).

Semelhantemente, diversos fatores ambientais já mostraram correlação com maior risco de desencadeamento de TEA, como a ativação imune materna devido a histórico familiar de doenças autoimunes e infecções por diversos

agentes durante a gestação (evidenciando o fator imunitário envolvido e não o agente patogênico em si) (Atladottir et al., 2009; Keil et al., 2010; Lee et al., 2015; Zerbo et al., 2015), bem como por exposição materna a diversos teratógenos durante a gestação, especialmente o ácido valproico (VPA) (Dietert et al., 2011; Rodier et al., 1996; Schneider et al., 2005, 2008), sendo que em 2013 se demonstrou que o VPA aumenta o risco de desenvolvimento de autismo quando usado durante a gestação, especialmente no primeiro trimestre (Christensen et al., 2013; Harden, 2013). Estudos posteriores consolidaram este medicamento como um importante fator de risco para o desenvolvimento do TEA.

1.1.4. Ácido valproico

Atualmente, existem diversos modelos animais de autismo amplamente utilizados em pesquisa, os quais são divididos didaticamente em 4 grupos:

- Genéticos, por exemplo por mutações nos genes *Fmr1*, *Mecp2*, *Shank2* e *Shank3* (Schroeder et al., 2015);
- Farmacológicos, como por exemplo, administração durante o período gestacional de antiepilépticos, como o ácido valproico; de agonistas β -2 adrenérgicos, como terbutalina; de análogos da prostaglandina, como misoprostol (Dietert et al., 2011; Schneider et al., 2005).
- Por lesão, como nos casos por ablação da amígdala (Amaral et al., 2003);
- Por ativação imune materna, causada por infecções como rubéola e influenza, além de administração de interleucina-6 (IL-6) e de lipopolissacarídeo - LPS (Dietert et al., 2011; Meyer, 2014);

O VPA (ácido 2-propilpentanoico), inicialmente sintetizado como um solvente orgânico (Burton, 1882), teve suas propriedades anticonvulsivantes descobertas na década de 60 (Meunier et al., 1963) e desde então vem sendo utilizado no tratamento de epilepsia, de transtorno bipolar como um estabilizador do humor e na profilaxia de crises de enxaqueca (Reynolds et al., 2007). Por ser um derivado lipídico, apresenta alta lipossolubilidade, podendo inclusive atravessar a barreira hematoencefálica e a placenta (Bruni and Wilder, 1979).

Dentro dos modelos farmacológicos, com base em diversos estudos já citados, foi estabelecido um modelo animal para auxiliar no estudo da neurobiologia do TEA por meio da exposição pré-natal de roedores ao VPA

(Rodier et al., 1997; Schneider et al., 2005). Embora existam hipóteses sobre como o VPA desencadeia as alterações presentes no TEA, ainda não se sabe exatamente como o gatilho ocorre (Nicolini and Fahnestock, 2018).

Filhotes machos expostos ao VPA intra-útero apresentam diversas alterações morfológicas, tanto no tronco encefálico, nos nervos cranianos quanto no cerebelo semelhantes às descritas em indivíduos com o transtorno (Ingram et al., 2000a; Rodier et al., 1996, 1997). Além disso, também foram descritos prejuízos comportamentais semelhantes aos pacientes, como atividade exploratória aumentada (Schneider et al., 2008; Tsujino et al., 2007), aumento de padrões comportamentais estereotipados (Schneider et al., 2008) e do tipo ansioso (Markram et al., 2008a; Schneider et al., 2008), rigidez comportamental (Bambini-Junior et al., 2011), menor sensibilidade a estímulos nocivos (Schneider et al., 2008; Wang et al., 2016) e déficits sociais (Bambini-Junior et al., 2011; Schneider et al., 2005; Yochum et al., 2008).

1.1.5. Mecanismos fisiopatológicos

Ao longo dos anos, diversas vias biológicas vêm sendo estudadas no TEA numa tentativa de elucidar alguns dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse transtorno. Estudos neuroanatômicos relataram macrocefalia e conectividade neuronal anormal, enquanto que estudos genéticos demonstraram uma gama de proteínas neuronais envolvidas e, mais recentemente, tem sido sugerido o importante papel de proteínas sinápticas (como as proteínas pós-sinápticas de ancoramento, subunidades de receptores glutamatérgicos e GABAérgicos) nos circuitos neurais e seu possível envolvimento no desencadeamento do TEA (Won et al., 2013).

1.1.5.1. Alterações neuroanatômicas

Diversas alterações na organização da citoarquitetura encefálica são observadas em pacientes com TEA, em regiões que incluem os lobos frontal, parietal e temporal, cerebelo e estruturas límbicas subcorticais (Won et al., 2013). Sabe-se que indivíduos com condições patológicas do cerebelo, como hipoplasias e atrofia cerebelares apresentam elevada incidência de TEA e comportamentos do tipo autista (Parisi and Dobyns, 2003). De fato, crianças com desordens cerebelares apresentam as mesmas alterações motoras observadas

em crianças com TEA, tais como apraxia motora e problemas no tônus muscular (Tsai, 2016). Além disso, alterações histológicas como mudanças na forma, no número e no volume das células de Purkinje cerebelares já foram descritas tanto em pacientes com TEA quanto em modelo animal (Ingram et al., 2000b; Wegiel et al., 2010). O cerebelo regula diversas funções e, por meio de circuitos do tálamo e dos gânglios basais, influencia as áreas pré-motora, pré-frontal e parietal do córtex cerebral, atuando sobre funções como linguagem, emoções e cognição (Buckner et al., 2011). Essa circuitaria apresenta-se alterada em pacientes com TEA (Crippa et al., 2016).

A amígdala é outra região bastante associada ao contexto do TEA. Estudos com ablação de amígdala em macacos *Rhesus* demonstraram que esses animais se tornaram incapazes de demonstrar resposta aos estímulos sociais e evitavam a presença de semelhantes; além disso, outras evidências do envolvimento dessa região nesse transtorno se deram a partir de observações de pacientes com lesão na amígdala, os quais desenvolviam prejuízos no julgamento social (Baron-Cohen et al., 2000), além de possuírem dificuldade no reconhecimento de expressões de medo (Dickie and Armony, 2008). Em pacientes com TEA também foi demonstrado menor conectividade funcional e menor volume da amígdala (Guo et al., 2016). Já em modelos animais, estudos apontaram para diversas anormalidades, entre elas alterações na atividade sináptica na amígdala basolateral (Hosie et al., 2018) e em células da glia (O'Loughlin et al., 2017).

O córtex cerebral é outra região frequentemente comprometida no TEA. Estudos com ressonância magnética relataram hiperplasia do córtex cerebral em crianças com TEA (Sparks et al., 2002). Em encéfalos *post-mortem* foi encontrado 67% mais neurônios no córtex pré-frontal em crianças com TEA em relação às típicas (Courchesne et al., 2011). Alterações na organização neuronal nas camadas corticais de neurônios e na citoarquitetura laminar, especialmente em córtex pré-frontal medial e córtex somestésico, já foram demonstradas no contexto do TEA (Casanova et al., 2002, 2006; Kataoka et al., 2013; Stoner et al., 2014). Anormalidades a nível de integração de regiões corticais podem ser um dos pontos chave no entendimento da fisiopatologia do TEA, uma vez que alterações tanto na densidade e morfologia neuronal, quanto na distribuição laminar e colunar podem afetar as conexões excitatórias e inibitórias, bem como

a circuitaria envolvida, influenciando todo o equilíbrio excitatório/inibitório (E/I), o qual também já se mostrou alterado (Snijders et al., 2013; Zikopoulos and Barbas, 2013).

1.1.5.2. Alterações genéticas

A maioria das alterações genéticas conhecidas que contribuem para o risco de TEA afetam a expressão ou função de proteínas com papéis estabelecidos na formação, função e manutenção de sinapses ou no remodelamento da cromatina (De Rubeis and Buxbaum, 2015). A ablação de tais genes em animais pode resultar em um fenótipo comportamental semelhante ao do TEA, como deficiências específicas na interação social, comunicação e comportamentos repetitivos (Varghese et al., 2017).

Atualmente, existem pelo menos 86 genes fortemente associados ao TEA e 933 com evidências de menor nível de associação com o transtorno (Tammimies, 2019). A escassez de estudos humanos post-mortem ligando a neuropatologia à etiologia subjacente foi parcialmente abordada usando modelos animais para explorar o impacto de fatores genéticos e não-genéticos clinicamente relevantes para o fenótipo do TEA. Modelos geneticamente modificados incluem aqueles baseados em genes já bem estudados no TEA estudados (NLGN3, NLGN4, NRXN1, CNTNAP2, SHANK3, MECP2, FMR1, TSC1/2, ADNP), genes de risco emergentes (CHD8, SCN2A, SYNGAP1, ARID1B, GRIN2B, DSCAM, TBR1), e variantes do número de cópias (deleção 15q11-q13, microdeleção 15q13.3, duplicação 15q11-13, deleção 16p11.2 e duplicação, deleção 22q11.2) (Tammimies, 2019; Varghese et al., 2017). Dentre estas as mais conhecidas são:

- Gene MECP2: a proteína MeCP2 (do inglês *Methyl-CpG binding protein 2*), codificada pelo gene MECP2, é uma proteína nuclear que se liga preferencialmente ao DNA metilado em relação ao DNA não metilado, levando à repressão transcricional global por meio do recrutamento de co-repressores, como HDAC e fatores de silenciamento transcricional. As mutações de perda de função na MECP2 são a principal causa da Síndrome de Rett (RTT), um distúrbio do neurodesenvolvimento progressivo ligado ao cromossomo X que afeta quase exclusivamente pacientes do sexo

feminino (Guang et al., 2018). Os pacientes com RTT experimentam um desenvolvimento pós-natal aparentemente normal até 6–18 meses de idade, e então aparecem sintomas neurológicos, incluindo características autistas, epilepsia e deterioração da função motora e sensitiva. As mutações de ganho de função no MECP2 estão associadas à síndrome de duplicação do transtorno de desenvolvimento neuronal MECP2, marcada por desenvolvimento motor atrofiado e epilepsia, assim como características de autismo e ansiedade. Além disso, essa proteína pode regular o desenvolvimento de sinapses e a função sináptica, o que é crucial para o equilíbrio normal de E/I (Guang et al., 2018).

- Gene SHANK3: o gene SHANK3 codifica as principais proteínas de ancoramento nas sinapses excitatórias, coordena o recrutamento de moléculas de sinalização e cria estruturas para o alinhamento apropriado dos receptores para neurotransmissores glutamatérgicos, o que promove o desenvolvimento e a maturação das sinapses excitatórias (Jiang and Ehlers, 2013; Naisbitt et al., 1999). Mutações de SHANK3 são responsáveis por cerca de 1% das formas idiopáticas do transtorno do TEA, e a interrupção do SHANK3 é uma das principais causas de déficits no neurodesenvolvimento na Síndrome de Phelan-McDermid (Aldinger et al., 2012; Betancur and Buxbaum, 2013; Moessner et al., 2007). Pacientes com uma mutação do gene SHANK3 frequentemente exibem uma variedade de comorbidades, que incluem atraso global no desenvolvimento, distúrbios graves do sono, falta de fala ou atraso na linguagem, e características do transtorno do espectro autista (como deficiências sociais e estereotipias) (Chen et al., 2015; Leblond et al., 2014). Avanços recentes em edição genica permitiram a criação de um modelo de mutação em SHANK3 em macacos-cinomolgos (*Macaca fascicularis*). Os animais mutantes exibiram distúrbios do sono, déficits motores e aumento de comportamentos repetitivos, bem como dificuldades sociais e de aprendizagem. Juntos, esses resultados trazem alguns aspectos das disfunções no gene e

circuitos SHANK3, bem como os fenótipos comportamentais, que caracterizam o transtorno do espectro do autismo (Zhou et al., 2019).

- Gene ADNP: o gene ADNP é altamente expresso em todas as principais áreas do encéfalo em desenvolvimento, com sua expressão mais alta sendo observada durante o primeiro e o segundo trimestre gestacional (Kang et al., 2011). A proteína produto do ADNP é parte de um complexo de cromatina que modifica o nucleossomo para deixar o DNA acessível durante a transcrição, replicação e reparo de DNA (Mandel and Gozes, 2007). Tem sido sugerido que o ADNP apresenta um papel essencial durante o desenvolvimento embrionário durante o fechamento do tubo neural e foi identificado uma o gene mais frequentemente mutado no TEA (De Rubeis et al., 2014; Gozes et al., 2006).

Ademais, alterações em vias de sinalização podem levar à expressão de certas características no encéfalo humano, incluindo macrocefalia, desregulação axonal, alteração no tamanho dos neurônios, conectividade de circuitos neuronais, proliferação de células cerebrais, síntese proteica e variação da densidade dendrítica em diferentes regiões encéfalo (Hutsler and Casanova, 2016; Subramanian et al., 2015). Entre as diversas vias de sinalização existentes, o alvo mamífero da rapamicina (mTOR) desempenha um papel importante como um centro de sinalização que pode levar à regulação de certas características fisiológicas do autismo. Especificamente, no encéfalo, a via mTOR está envolvida na regulação da sinaptogênese, corticogênese e funções associadas dos neurônios (Gilbert and Man, 2017). Estudos mostram que a via de Akt/mTOR regula a tradução nos espinhos dendríticos, o que é um potencial substrato molecular do autismo. De fato, mutações em genes que codificam os componentes da cascata de Akt-mTOR causam distúrbios com taxas mais altas de características autistas (Hutsler and Zhang, 2010; Nicolini et al., 2015).

Além disso, estudos mostraram que a hiperacetilação transitória das histonas H3 e H4 no encéfalo de embriões de camundongos, induzida pela exposição pré-natal ao VPA, está associada a deficiências comportamentais pós-natais semelhantes ao autismo (Kataoka et al., 2013; Moldrich et al., 2013).

Interessantemente, a exposição pré-natal a valpromida, um análogo de VPA sem atividade inibidora de histona deacetilase (HDAC), não causa um aumento transitório nos níveis de histonas acetiladas em encéfalos de embriões de camundongos e não afeta o comportamento (Kataoka et al., 2013). Esta evidência suporta a hipótese de que a inibição das HDAC durante uma janela crítica do desenvolvimento do SNC no embrião contribui para a patogênese do autismo (Nicolini and Fahnestock, 2018). Particularmente, o VPA poderia impactar a remodelação axonal no desenvolvimento de neurônios indiretamente inibindo a GSK3 β (Chen et al., 1999; Hall et al., 2002) e, assim, promovendo a sinalização Wnt (Hall et al., 2002). A via de sinalização Wnt regula a diferenciação de progenitores intermediários corticais em neurônios (Munji et al., 2011) e a padronização do córtex cerebral (Chenn, 2008). O VPA também pode afetar a diferenciação e a proliferação de progenitores de células neurais através da via β -catenina-Ras-ERK-p21 (Jung et al., 2008). Especificamente, o VPA promove a ativação da β -catenina, um mediador chave da sinalização Wnt (MacDonald et al., 2009), inibindo indiretamente a GSK3 β (Jung et al., 2008). A β -catenina ativada regula a Ras, que por sua vez aumenta os níveis de ERK fosforilada (Jung et al., 2008). A subsequente indução mediada por ERK de p21 modula a estimulação da diferenciação de progenitores de células neuronais e a inibição da sua proliferação (Jung et al., 2008). Embora a importância da atividade desacetilase de histonas apresentada pelo VPA para o desenvolvimento de comportamentos do tipo autista em modelos animais já tenha sido demonstrada, o envolvimento desses outros possíveis mecanismos de ação do VPA em comportamentos ser demonstrado.

1.1.5.3. Alterações Imunológicas

Estudos recentes destacam a ligação entre disfunções imunes e prejuízos comportamentais (Vijayakumar and Judy, 2016), evidenciando que modulações nos níveis de citocinas podem alterar significativamente o comportamento. Sinais de neuroinflamação e resposta inflamatória alterada são observados em indivíduos com TEA ao longo da vida (Lucchina and Depino, 2014), colocando os distúrbios neuroimunes em evidência e com importante papel desencadeador do TEA (Gottfried et al., 2015). Já foram descritas alterações em diversas citocinas tanto em pacientes como em modelos animais, destacando-se as

citocinas: IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α (Ashwood and Krakowiak, 2011; Jyonouchi et al., 2001; Lucchina and Depino, 2013; Ricci et al., 2013; Suzuki et al., 2011; Vargas et al., 2005);

Semelhantemente, estudos com modelos animais por administração de Poly(I:C) encontraram aumento significativo na densidade celular de microglia em diversas regiões, entre elas, o hipocampo (Juckel et al., 2011; Li et al., 2014; Zhu et al., 2014) e o córtex pré-frontal (Zhu et al., 2014), bem como de marcadores de ativação microglial (Borrell et al., 2002; Van den Eynde et al., 2014; Zhu et al., 2014). Além disso, astrocitose já foi observada na prole de modelos animais de ativação imune materna por IL-6 e LPS (Hao et al., 2010; Samuelsson et al., 2006).

1.2. Alterações sensoriais no TEA

Estudos clínicos têm apontado que anormalidades sensoriais são observadas em mais de 94% em pacientes diagnosticados com TEA (Geschwind, 2009b; Marco et al., 2011). No entanto, essas alterações sensoriais se manifestam de forma diversificada; ao passo que alguns indivíduos apresentam uma falta, baixa ou atraso na responsividade a estímulos auditivos, visuais ou táteis (Ben-Sasson et al., 2009b; Watson et al., 2011), cerca de 56 a 70% dos indivíduos apresentam uma aversão intensa ou uma sensação mais amplificada quando expostos a esses estímulos no dia-a-dia (Baranek et al., 2007; Ben-Sasson et al., 2009b; Jasmin et al., 2009; MacDonald et al., 2013; Matsushima and Kato, 2013; Schoen et al., 2008). Considerando estudos prévios, o DSM-5 adicionou hiper e hiporresponsividades a estímulos sensoriais foram incluídas como um dos critérios para diagnóstico do TEA (American Psychiatry Association (APA), 2013).

Além da divisão entre hiperresponsividades e hiporresponsividades, outras alterações sensoriais são vistas em pacientes com TEA, tais como o aumento da percepção e comportamentos repetitivos, de busca ou interesses sensoriais anormais (Ausderau et al., 2014). Os comportamentos repetitivos, de busca ou interesses sensoriais anormais são caracterizados pelo fascínio ou comportamento de busca compulsiva por estimulação sensorial, a qual é intensa e pode ser repetitiva por natureza, como por exemplo, o fascínio por luzes, frequentemente observado em crianças diagnosticadas com TEA (Ben-Sasson

et al., 2009b; Liss et al., 2006). Por fim, o aumento da percepção sensorial é caracterizado por uma acuidade superior na consciência de um estímulo sensorial específico e foco em elementos específicos de um estímulo, como por exemplo, o aumento da habilidade em reconhecer estímulos auditivos (Mottron et al., 2009).

No início dos anos 60, a terapeuta ocupacional A. Jean Ayres iniciou os primeiros estudos examinando as alterações sensoriais em diversas desordens do neurodesenvolvimento. A “Integração Sensorial de Ayres” (*Ayres Sensory Integration* (ASI)) tornou-se uma abordagem de intervenção para o tratamento de alterações sensório-motoras que são relevantes para a elaboração de comportamentos complexos, como planejamento e organização (Ayres, 1979; Cummins, 1991). Por meio da combinação de equipamentos que oportunizam uma melhor percepção da estimulação sensorial e da interação com o ambiente, essa intervenção deu fundamento a hipótese de que a alteração na integração sensorial (IS) e outras anormalidades a partir de seu processamento poderiam, em parte, ser resultado de uma alteração no funcionamento de regiões encefálicas relevantes para este processamento. Segundo a teoria de Ayres, os principais componentes alterados na integração sensorial seriam: 1) registro, ou detecção/percepção dos estímulos sensoriais pelo sistema nervoso central, 2) modulação, ou a habilidade do sistema nervoso em propagar ou inibir a transmissão da sensação e 3) motivação, ou o desejo/vontade de responder a um estímulo sensorial percebido (Kilroy et al., 2019).

Na tentativa de entender quais regiões poderiam estar influenciando nas alterações comportamentais a partir de gatilhos sensoriais no TEA, estudos de ressonância magnética funcional (fMRI) sugerem que as hiperresponsividades podem estar relacionadas com a atividade exacerbada em áreas encefálicas envolvendo o processamento sensorial primário, a regulação da emoção e as respostas a ameaças (Kleinhans et al., 2009; Tottenham et al., 2014). Esses dados vão ao encontro de alterações em estruturas como a amígdala e a ínsula, cuja ativação anormal é vista durante o processamento de informações relevantes sociais e sensoriais, como na redução do olhar fixo em indivíduos com TEA para informações de cunho social (Green et al., 2015; Pierce et al., 2004; Rudie et al., 2012). Ainda, quando mais de um gatilho sensorial é acionado, como no caso de estímulos sensoriais visuais e auditivos ocorrendo simultaneamente,

essa hiperresponsividades é ainda mais evidente, sugerindo que a integração multissensorial poderia estar prejudicada no TEA (Russo et al., 2010). Um exemplo pode ser observado quando indivíduos com TEA são apresentados a toques agradáveis e a toques desagradáveis, ocorrendo hipoativação de regiões relacionadas ao processamento somatossensorial e límbico e uma hiperativação dessas mesmas regiões, respectivamente. Essas alterações podem contribuir para a redução da recompensa social associada ao toque, levando a alterações no desenvolvimento e na manifestação do comportamento social (Cascio et al., 2012).

A redução da ativação de regiões de processamento primário no TEA, como o córtex somatossensorial primário, o córtex auditivo, bem como regiões de processamento secundário (como as regiões socialmente relevantes) dão suporte à teoria de Ayres de que a percepção da informação primária é diferente daquela que os indivíduos neurotípicos experienciam (Kilroy et al., 2019). As alterações nos centros primários levam a prejuízos na rede de processamento como um todo. Essa conectividade envolve regiões e redes conhecidamente alteradas no TEA, como a conectividade tálamo-cortical (Nair et al., 2015), bem como alterações de hiperconectividade entre regiões de processamento sensorial unimodal com regiões subcorticais (como tálamo e os núcleos basais), e de hipoconectividade entre regiões de processamento supramodal envolvendo atividades cognitivas complexas (como atenção, função executiva) com as mesmas regiões subcorticais anteriormente descritas (Maximo and Kana, 2019). De fato, estudos de conectividade funcional dentro do TEA sugerem um modelo de integração entre as redes reduzida (conectividade entre as redes integrativas participantes), com diminuição da diferenciação dessas redes (conectividade fora dos limites das redes), sendo, portanto, menos eficientes de uma forma geral (Keown et al., 2017), quando comparado com indivíduos neurotípicos.

Portanto, ao falar de integração multissensorial no autismo, é imprescindível levar em consideração a importância e participação de regiões de processamento primário, como o córtex somatossensorial, visual e auditivo, e sua integração com regiões límbicas importantes para a atribuição de respostas afetivas ou aversivas, como a região da amígdala e outras regiões subcorticais.

1.2.1. Região da Amígdala

As informações sensoriais ascendem pelo tronco encefálico vindas dos múltiplos receptores espalhados por todo o organismo até o tálamo, estrutura considerada como o “portão” para a retransmissão da informação sensorial para os córtices (Hardan et al., 2008). Regiões límbicas como a amígdala são ativadas em resposta a essa informação sensorial que passa por esse conjunto de núcleo do tálamo, o qual retransmite para essas regiões de processamento associativo, associando a esse estímulo sensorial um contexto de “ameaça” ou “aversivo” para a sua percepção (Zald, 2003). Estudos de correlação apontam que crianças com TEA, apresentando hiperresponsividades sensoriais, possuem um alto índice de sintomas de ansiedade (Ben-Sasson et al., 2008; Green and Ben-Sasson, 2010; Mazurek et al., 2013), bem como alterações anatômicas no tamanho da região da amígdala estão presentes em indivíduos com TEA (Aylward et al., 1999; Schumann and Amaral, 2006; Sparks et al., 2002).

Desde as primeiras hipóteses da participação da amígdala no TEA, essa estrutura vem, cada vez mais, sendo implicada quanto ao reconhecimento da valência em estímulos (Peck and Salzman, 2014), tendo uma relevância peculiar, principalmente, no comportamento social. Ao passo que alguns estudos relatam atividade atenuada da amígdala quando indivíduos com TEA realizam tarefas sociais em comparação com indivíduos típicos (Pierce et al., 2004; Rudie et al., 2012), outros estudos, por outro lado, demonstraram que a amígdala se ativa excessivamente em comparação com indivíduos neurotípicos, e que esta ativação nesses indivíduos está correlacionada ao olhar para os olhos, por exemplo (Dalton et al., 2005; Tottenham et al., 2014). Essa hiperativação da amígdala na realização do contato visual pode ter relação com a modulação de respostas motivacionais em indivíduos com TEA. Estudos de conectividade funcional demonstram uma redução geral da conectividade entre o sistema de recompensa e as regiões de processamento sensorial primário, sugerindo que os processos de recompensa social poderiam estar associados com anormalidades das vias de recompensa relacionadas com processamento sensorial (Gordon et al., 2016; Salimpoor et al., 2013). Ainda permanece inconclusivo se indivíduos com TEA apresentam, de fato, uma aversão a estímulos sociais (como ao contato visual) ou uma redução da ativação de vias envolvendo atenção e/ou motivação necessárias para a percepção desse estímulo (Klin et al., 2002; Moriuchi et al., 2017). Dada a heterogeneidade da

sintomatologia do TEA, é provável que ocorram variações dessas possibilidades entre os indivíduos.

No modelo animal de autismo por indução pré-natal ao VPA já foi evidenciado que existe uma alteração no fino balanço entre a excitação e a inibição na região da amígdala, especialmente no núcleo lateral (LA) dessa região. Os animais expostos ao ácido valproico apresentaram redução da interação social, aumento da ansiedade e aumento do aprendizado condicionado ao medo e prejuízos na extinção desse tipo de memória (Lin et al., 2013b; Markram et al., 2008b). Estudos de eletrofisiologia *ex vivo* de fatias encefálicas da região da amígdala revelaram um aumento dos potenciais de longa duração (LTP) enquanto se estimulava a via talâmica-amigdalar, uma via importante de retransmissão de estímulos sensoriais no encéfalo para a atribuição de valor afetivo no processamento (Lin et al., 2013b). Ainda, dados da literatura mostram que a exposição pré-natal ao ácido valproico reduziu significativamente os níveis do receptor $\alpha 5$ GABA_A no núcleo basolateral da amígdala (BLA), quando comparado ao grupo controle (Wang et al., 2018). No mesmo estudo, foi observado um aumento da expressão do transportador GAT1, o qual poderia estar levando a uma maior captação de GABA da fenda sináptica (Olexová et al., 2016; Wang et al., 2018). Alterações em comportamentos sociais, como *pinning*, foram observados em ratos da prole expostos continuamente a doses de 20 mg/kg de ácido valproico do dia embrionário (E) E12 até o fim da gestação, bem como uma redução da densidade dos níveis proteicos do receptor de ocitocina (OXTR) no núcleo central da amígdala de ratos Wistar (Bertelsen et al., 2017) e de ratos-da-pradaria (Sailer et al., 2019). No entanto, a administração de ocitocina é capaz de regular a inibição GABAérgica e atenuar características do tipo autista em ratos expostos ao ácido valproico no período pré-natal (Tyzio et al., 2014). Essa redução dos níveis de OXTR, bem como os efeitos da administração de ocitocina em períodos críticos do desenvolvimento parece exercer um papel importante na regulação de componentes críticos, como a inibição GABAérgica, para a construção de comportamentos complexos com integração de componentes sensoriais, como o comportamento social em transtornos como o TEA.

1.2.2. Área Somatossensorial Primária

A sensação e percepção de estímulos sensoriais é essencial para diversos aspectos da construção complexa dos comportamentos dos seres vivos, bem como para sua sobrevivência, uma vez que possibilita a interpretação acurada do ambiente externo e interno onde estão inseridos. Ao longo da evolução, diversas especializações ocorreram no sentido de aprimorar a função de regiões específicas no encéfalo, gerando, por exemplo, o córtex somatossensorial primário, responsável pelo processamento de estímulos somáticos, como a dor, o tato, a temperatura e a propriocepção. Essa região é situada no giro pós-central, correspondendo às Áreas de Brodmann 1, 2 e 3 em humanos. No caso dos roedores, essa estrutura não apresenta uma delimitação anatômica bem definida, porém a identificação pode ser realizada de maneira simples através da utilização de atlas padronizados, sendo chamada de área somatossensorial primária (Paxinos and Watson, 1997).

Em roedores, uma vez que a área somatossensorial processa majoritariamente os estímulos vindos das vibrissas faciais, essa área possui uma organização peculiar e complexa denominada “corpos em barril”. Essa estrutura especializada permite a interpretação temporo-espacial das informações contidas na exploração do ambiente, em que cada vibrissa é processada por um grupo específico de neurônios constituintes de um corpo em barril, finamente organizados em um mapa somatotópico correspondente à disposição das vibrissas na face. Esse mapeamento somatotópico pode ser visualizado através de técnicas de coloração (principalmente quando é realizada a marcação da enzima citocromo c oxidase) e fornece grandes informações sobre a qualidade do processamento sensorial desses animais.

Estudos de neuroimagem mostram uma resposta atípica em córtices sensoriais primários em indivíduos com TEA (Robertson and Baron-Cohen, 2017), com variabilidade entre as respostas evocadas após a estimulação tátil (Haigh et al., 2016; Khan et al., 2015) e uma razão entre sinal e ruído mais baixa quando analisadas sensações visuais, auditivas e somáticas (Dinstein et al., 2012), apontando não só a presença de uma alteração no balanço entre a excitação e a inibição, bem como que a redução dessa inibição pode estar levando a um aumento do ruído no processamento das informações sensoriais de diferentes modalidades (Milne, 2011; Puts et al., 2014). De fato, dados de espectroscopia de ressonância magnética demonstram uma redução de níveis

do neurotransmissor GABA no córtex somatossensorial de indivíduos com TEA (Puts et al.). Apesar de muitos estudos terem como foco o papel das alterações no processamento encefálico e suas consequências na periferia, é possível que também exista um papel relevante de *feedforward* pela rede periférica de processamento, uma vez que o silenciamento pré-natal da inibição GABAérgica nos neurônios somatossensoriais fora do SNC levam a uma alteração na percepção tátil e a prejuízos no comportamento social em camundongos (Orefice et al., 2016) Esses achados sugerem que as alterações sensoriais durante o desenvolvimento, por si só, são capazes de gerar déficits sociais importantes para o contexto do TEA.

Por fim, alterações na citoarquitetura cortical são observadas em indivíduos com TEA nas regiões do tecido cortical pré-frontal e temporal superior, principalmente nas camadas corticais profundas IV-V (Stoner et al., 2014b). Em modelos nocaute para contactina-5, uma molécula de adesão expressa exclusivamente no SNC com relevância para os transtornos do neurodesenvolvimento, observou-se um afinamento da área somatossensorial primária, acompanhado de uma redução da relação entre o tamanho dos campos em barril e do septo, tecido o qual fica entre os barris corticais, indicando uma redução do tamanho dessas estruturas (Kleijer et al., 2018). Dessa forma, alterações na citoarquitetura cortical e no estabelecimento de um balanço entre os componentes excitatórios e inibitórios de regiões chave, como o córtex somatossensorial primário, podem estar envolvidos nas alterações de processamento cortical de informações sensoriais, que por sua vez, podem contribuir como substrato de alterações comportamentais complexas, como os prejuízos sociais, vistos no TEA.

1.3. Equilíbrio excitatório e inibitório

As redes neurais funcionam de maneira finamente orquestrada, promovendo não só processamento local como também integração entre diferentes regiões encefálicas no contexto de processamento de estímulos (Yau et al., 2015). Essas características, entretanto, permitem que pequenas interrupções ou falhas possam causar prejuízos de alta magnitude e que acabam, por fim, comprometendo aspectos funcionais como os comportamentos típicos. As diferentes células do sistema nervoso operam em conjunto a fim de

garantir um ambiente equilibrado: células da glia atuam no metabolismo de neurotransmissores como GABA e glutamato, além de promoverem o tamponamento funcional de potássio (Mahan, 2019) e permitirem isolamento elétrico para transmissão do impulso nervoso (Fünfschilling et al., 2012); já os neurônios estabelecem circuitos autorregulados, onde excitação e inibição atuam de maneira equilibrada (Tosches, 2017).

Os desfechos práticos de desequilíbrios nesse aspecto podem ser observados em diferentes desordens psiquiátricas, sendo a epilepsia o exemplo mais representativo. Nessa condição, episódios recorrentes de sincronização anômala de atividade de diferentes populações neuronais ocasionam alterações de nível local a generalizado, as quais podem gerar crises epilépticas focais ou generalizadas (American Psychiatry Association (APA), 2013). Interessantemente, cerca de um terço dos indivíduos com TEA possui a epilepsia como comorbidade associada (Spence and Schneider, 2009) e, além disso, diversas outras evidências possivelmente associadas com o desequilíbrio E/I já foram identificadas em pacientes, tais como hiperconectividade local em contraponto à hipoconectividade entre diferentes regiões (Belmonte et al., 2004); alterações na plasticidade sináptica (incluindo prejuízos na poda sináptica ao longo do desenvolvimento) (Hansel, 2019; Tang et al., 2014); alteração nos padrões de oscilações gama (Rojas and Wilson, 2014); prejuízos na expressão das enzimas glutamato descarboxilase GAD65/GAD67 (Fatemi et al., 2002) e das subunidades GABR α 1 e GABBR1 dos receptores GABA_A GABA_B (Fatemi et al., 2009b, 2009a), respectivamente (condição já associada crises de ausência infantis); presença de displasias e de desorganização cortical focais (Casanova et al., 2013; Stoner et al., 2014), perda da estrutura minicolunar no córtex (Casanova et al., 2002) e prejuízo quantitativo de interneurônios inibitórios (Hashemi et al., 2016; Lawrence et al., 2010). Em conjunto, esses dados relativos ao TEA apontam principalmente para a presença de um desequilíbrio E/I marcado por prejuízos principalmente no componente inibitório.

Em modelos animais de autismo, diferentes evidências apontam para o papel crucial de alterações no balanço E/I em comportamentos associados ao TEA como déficits sociais, estereotípias e prejuízos sensoriais (Lee et al., 2017). Em animais nocaute para 4E-BP2, proteína associada à via da mTOR, foi possível observar alteração na expressão de neuroliquinas, ocasionando

aumento na razão de sinapses excitatórias hipocampais e o estabelecimento de comportamentos do tipo autista (Gkogkas et al., 2013). Em outros estudos utilizando modelos de TEA baseados na alteração em SHANK3, proteína essencial para estabilização de sinapses excitatórias, foi possível observar alteração na transmissão sináptica associada ao receptor AMPA em camundongos (Bozdagi et al., 2010), além de diferentes prejuízos de conectividade geral em análise de ressonância magnética funcional de macacos-cinomolgos (Zhou et al., 2019). Finalmente, no modelo animal de autismo por exposição pré-natal ao ácido valproico já foram observadas alterações de neurônios positivos para parvalbumina (PV⁺) em regiões corticais (CPFm) (Sousa, 2013), bem como uma redução no número de neurônios de Purkinje no cerebelo (Whitney et al., 2008).

Dessa forma, levando em consideração o conjunto de evidências observados tanto em pacientes quanto em modelos animais, se faz necessário elucidar possíveis mecanismos que ocasionam esse desequilíbrio no TEA, bem como buscar compreender sua influência nos aspectos comportamentais.

1.3.1. Interneurônios GABAérgicos

O encéfalo humano é composto por 86 bilhões de neurônios, sendo que 19% dessa população está distribuída no córtex (16,34 bilhões), 80% no cerebelo (69 bilhões) e o restante ~1% (66 milhões) em diferentes regiões subcorticais (Herculano-Houzel, 2009). Além disso, sabe-se que, no córtex especificamente, cerca de 85% da população neuronal é formada por neurônios piramidais excitatórios, restando somente cerca de 15% de interneurônios inibitórios (Kanari et al., 2018). Nesse sentido, apesar de se apresentarem em um número consideravelmente reduzido, os interneurônios se destacam por sua diversidade e multiplicidade de funções, funcionando como reguladores complexos da circuitaria neuronal.

Atualmente, existem diversas formas de classificar os interneurônios inibitórios GABAérgicos:

- De acordo com aspectos morfológicos, tais como a disposição axonal e o formato da arborização dendrítica (Markram et al., 2004; Tamás et al., 1998);

- De acordo com aspectos eletrofisiológicos, tais como padrões de excitabilidade e capacidade de gerar oscilações em frequências específicas (Connors and Gutnick, 1990; Markram et al., 2004; McCormick et al., 1985);
- De acordo com aspectos histológicos, tais como a presença de proteínas e peptídeos diferencialmente expressas (parvalbumina (PV), calbindina (CB), calretinina (CR), somatostatina (SST), neuropeptídeo Y (NPY), dentre outras) (DeFelipe, 1997; Kawaguchi and Kubota, 1997; Markram et al., 2004). No contexto do presente trabalho, especificamente, será utilizada a classificação conforme a imunorreatividade a proteínas ligadoras de cálcio, a qual apresenta três componentes: parvalbumina, calbindina e calretinina – os interneurônios que apresentam cada uma dessas proteínas serão identificados como PV⁺, CB⁺ e CR⁺, respectivamente. Apesar de haver relatos de sobreposição entre as marcações em algumas regiões como amígdala (Demeulemeester et al., 1989; Gulyás et al., 1991; McDonald and Betette, 2001), hipocampo e núcleo geniculado lateral dorsal em modelos animais, há um amplo consenso de que essa divisão permite uma adequada divisão em três subpopulações distintas.

Tabela 1: Características gerais dos interneurônios GABAérgicos PV⁺, CB⁺ e CR⁺

Interneurônio	Camada Cortical	Morfologia	Padrão de disparo
PV ⁺	Majoritariamente camadas 4/5	Células <i>chandelier</i> e <i>basket</i>	<i>fast spiking</i>
CB ⁺	Majoritariamente camadas 2/3 e 5	Células neurogliaformes e <i>double bouquet</i>	<i>burst spiking</i>
CR ⁺	Majoritariamente camadas 2/3 e 4	Células bipolares e <i>double bouquet</i>	<i>burst spiking</i>

(Retirado de Feldmeyer et al., 2018; Raghanti et al., 2004; Toledo-Rodriguez et al., 2004).

1.3.2. Interneurônios inibitórios que expressam parvalbumina (PV⁺)

Os neurônios PV⁺ compreendem a maior subpopulação de interneurônios no córtex encefálico (aproximadamente 40% do total em roedores e 25% em primatas (Condé et al., 1994; Rudy et al., 2011)), apresentando características eletrofisiológicas peculiares: I) baixa resistência a *inputs* sinápticos (Bartos and Elgueta, 2012) II) alta frequência de disparos de potencial de ação (*Fast-spiking neurons*) (Bartos and Elgueta, 2012) III) inervam a porção inicial do axônio (no caso das *chandelier*) ou o soma/dendritos proximais (no caso das *basket*) das células piramidais (Feldmeyer et al., 2018) IV). Apresentam sinapses elétricas entre si (Pangratz-Fuehrer and Hestrin, 2011). Além disso, estima-se que cada uma dessas células possa estabelecer contato com até aproximadamente 1400 neurônios piramidais no córtex somatossensorial (Packer and Yuste, 2011).

A origem embrionária dos interneurônios PV⁺ acompanha uma trajetória complexa onde uma miríade de fatores de transcrição, proteínas da matriz extracelular e outras moléculas de sinalização atua de maneira organizada a fim de garantir o correto posicionamento final. Nos roedores, os neurônios PV⁺ são gerados majoritariamente em uma estrutura transitória denominada eminência gangliônica medial, iniciando sua migração tangencial a partir do dia embrionário E12,5 (Kelsom and Lu, 2013). A especificação dos progenitores dessas células é realizada através da sinalização iniciada pela proteína *sonic hedgehog* e mantida por Nkx2.1 (nocautes para Nkx2.1 são capazes de ocasionar extensa redução nas populações de interneurônios no geral (Xu et al., 2010)). Na sequência, fatores de transcrição da família *homeobox* como *lhx6*, *lhx8*, *Sox6*, *Dlx1*, *Dlx2*, *Dlx5*, *Dlx6* e *Arx* (Anderson, 1997; Marsh et al., 2016; Volk et al., 2012; Volk and Lewis, 2014; Wang et al., 2010) desempenham diferentes papéis específicos no destino dessas células, promovendo a expressão de proteínas de migração celular através da transcrição de motogenes (Lunden et al., 2019) e realizando a manutenção da enzima GAD e das proteínas ligantes de cálcio (como a própria parvalbumina) (Le et al., 2017), essenciais para a maturação neuronal.

Aproximadamente no dia E19 esses interneurônios finalizam sua migração tangencial ao atingirem o córtex e estabelecem sua disposição ao

longo das diferentes camadas (Lavdas et al., 1999). Nesse momento, além dos fatores já citados, outros componentes demonstram extrema relevância, tais como a expressão da citocina CXCL12 sintetizada pelas meninges, a qual sinaliza o fim da rota tangencial (Abe et al., 2015), além da expressão do trocador de potássio-cloreto 2 (KCC2), o qual viabiliza a transição da característica excitatória para inibitória do neurotransmissor GABA – um sinal importante de parada para migração (Bortone and Polleux, 2009). Finalmente, o próprio microambiente estabelecido pelos neurônios piramidais, os quais já povoam essa região antes mesmo da migração dos interneurônios, fornece indicações determinantes para a finalização desse processo (Caronia-Brown and Grove, 2011).

A junção das características eletrofisiológicas específicas bem como a extensa capacidade de conectividade dos interneurônios PV⁺ permite que essas células (especialmente as *basket*) sejam capazes de gerar o padrão de oscilações gama (30-80Hz) (Cardin et al., 2009). Um ponto importante associado a essas oscilações é a sua relação com diversos fatores como memória de trabalho (Howard et al., 2003), atenção (Jia and Kohn, 2011) e, principalmente, integração de estímulos (Lundqvist et al., 2016), estabelecendo conectividade entre diferentes regiões encefálicas. O prejuízo no balanço das oscilações gama já foi descrito em pacientes com TEA (Snijders et al., 2013), esquizofrenia (Spencer et al., 2008), doença de Alzheimer (Ahnaou et al., 2017), porém seus efeitos diretos em aspectos comportamentais ainda são de complexo entendimento. Os avanços em modelos animais, entretanto, já contribuíram para elucidar importantes: no modelo animal autismo por modificação de neuroliquina 3, o re-estabelecimento optogenético da capacidade dos interneurônios PV⁺ (no córtex pré-frontal medial) de estabelecerem seu padrão de oscilações característico restaurou o prejuízo de preferência por novidade social, comportamento típico do TEA (Cao et al., 2018). Em modelo animal de esquizofrenia induzido por exposição à cetamina foi possível observar alterações diretas nas oscilações gama, as quais não foram atenuadas pelo tratamento concomitante com haloperidol, indicando a relevância de vias não necessariamente dopaminérgicas nesse contexto (Ehrlichman et al., 2009).

No contexto do TEA, especificamente, as alterações relativas a interneurônios PV⁺ já foram descritas em diferentes níveis. Em relação às

oscilações gama, por exemplo, já foram observados déficits nas oscilações gama em crianças com TEA expostas a tarefas de compreensão sonoro-visuais (Ortiz-Mantilla et al., 2019) e motoras (An et al., 2018). Além disso, descrições *post mortem* de prejuízos quantitativos de PV⁺ já foram realizadas em córtex pré-frontal medial de pacientes (redução no número de células (Hashemi et al., 2016)) e no hipocampo (aumento na densidade nas regiões CA1 e CA3 (Lawrence et al., 2010)). Em modelos animais de autismo (especificamente o induzido por ácido valproico), já foram descritas alterações no padrão de distribuição dessas células na área somatossensorial primária, córtex cingulado anterior e área pré-límbica, bem como diferentes alterações de proporção em relação a neurônios totais em diferentes sub-regiões do córtex pré-frontal medial (24, 25 26). Além disso, em modelos genéticos como os camundongos nocaute para *Mecp2*, *Shank1* ou *Shank3* (Lauber et al., 2018) a alteração na expressão da própria parvalbumina foi capaz de causar alterações de impacto relevante no TEA.

1.4. Resveratrol como estratégia de prevenção intraútero

Resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno-RSV) é um composto polifenólico de ocorrência natural, inicialmente isolado de raízes da planta heléboro-branco (*Veratrum album*) na década de 40. Atualmente, sabe-se que esta molécula também está presente em uvas, pinhos, amendoins e no vinho tinto, possuindo diversos efeitos biológicos (Fremont, 2000; Vang et al., 2011a). 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 (Filippi-Chiela et al., 2011; Gupta et al., 2011; Jang et al., 1997; Vang et al., 2011b) e diabetes (Huang et al., 2010; Ramadori et al., 2009; Szkudelska and Szkudelski, 2010; Thirunavukkarasu et al., 2007). Ainda, há estudos que ressaltam os efeitos neuroprotetores dessa molécula (Han et al., 2004; Quincozes-Santos and Gottfried; Tang, 2010; Vang et al., 2011b; Vieira de Almeida et al., 2008; Zamin et al., 2006).

A resposta inflamatória é um mecanismo bem conhecido para doenças tanto do sistema nervoso central, quanto da periferia. O RSV apresenta uma ação que modula a resposta inflamatória induzida por vários estímulos,

contrabalanceando os níveis de marcadores bioquímicos pró-inflamatórios como TNF α , IL-1 β , IL-6 após uma semana de exposição, tanto em ratos, quanto em camundongos (Vang et al., 2011). Além disso, faz uma regulação negativa das enzimas proteína quimioatrativa para monócitos 1 (MCP-1) MCP-1, ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase (iNOS) durante o estímulo pró-inflamatório (Vang et al., 2011).

Dados in vitro e in vivo, mostram que o RSV atua por diversos mecanismos de ação (Vang et al., 2011), entre eles:

- modulação da proliferação celular e apoptose,
- modulação da angiogênese,
- modulação de reação redox, supressão da adipogênese e estimulação da lipólise, estimulação da osteogênese,
- modulação da atividade mitocondrial,
- supressão da inflamação,
- modulação de danos no DNA,
- modulação do metabolismo do glutamato.

Trabalhos do nosso grupo demonstraram que a administração de RSV durante o período gestacional e ratas Wistar foi capaz de prevenir prejuízos sociais no modelo animal de autismo induzido pelo VPA através do teste Três Câmaras (Bambini-Junior et al., 2014). Ademais, ratos VPA apresentam uma redução nas interações sociais (*nose-to-nose* e *following*) no teste de sociabilidade recíproca e, embora as análises de comportamentos individuais não tenham sido estatisticamente significantes, o RSV foi capaz de prevenir os déficits em comportamentos pró-sociais combinados nos ratos VPA (Hirsch et al., 2018). O teste de sociabilidade recíproca envolve padrões de interações sociais mais complexos que aqueles observados no teste de Três Câmaras, uma vez que os animais se encontram livres e que a interação social pode ocorrer por uma iniciativa do animal que está sendo testado, ou ele pode ser estimulado a interagir após uma iniciativa do seu companheiro de caixa.

A hipótese do encéfalo social tenta explicar o extraordinário tamanho e complexidade do SNC humano, apelando para pressões particulares que uma espécie adaptada à interação social teria que enfrentar, indo desde a decepção à cooperação até as formas de obter comida e garantir a prole. O complexo

processamento de informações sociais é dividido em processos que são relativamente automáticos e orientados pelos estímulos, versus aqueles que são mais deliberativos e controlados e sensíveis ao contexto e à estratégia. No entanto, muito do nosso comportamento social surge de mecanismos neurobiológicos e psicológicos compartilhados com outras espécies de mamíferos (Adolphs, 2009). Dessa forma, as características do teste de sociabilidade recíproca podem estar envolvendo outros complexos mecanismos de comportamento social, causando alterações adicionais o que justifica o fato de o RSV ter prevenido a alteração somente na soma dos comportamentos sociais. Graças a essa complexa arquitetura evolvida nos comportamentos sociais, é importante saber em que outros comportamentos de socialização o VPA pode estar causando alterações e se o RSV também é capaz de preveni-las tão bem quanto o que nosso grupo já apresentou até o momento.

Além disso, em recentes trabalhos do nosso grupo, observou-se que além da ação preventiva comportamental do RSV no modelo VPA, ocorreu também alterações à níveis moleculares. Verificou-se que o micro RNA miR134-5p está significativamente aumentado no sangue total de animais expostos ao VPA durante o período neonatal, e que o RSV foi capaz de prevenir essa alteração. Neste mesmo trabalho também foi verificado um aumento de expressão dos miR134-5p e miR138-5p em crianças com TEA em relação aos controles (Hirsch et al., 2018).

Esses resultados possibilitam o uso dessa molécula como ferramenta crucial para a compreensão da fisiopatologia do TEA, com destaque para as alterações comportamentais, bem como no auxílio nos estudos de rotas biológicas e estruturas envolvidas em sua etiologia, tanto em embriões quanto em idades pós-natal.

2. JUSTIFICATIVAS E HIPÓTESES

Considerando que os primeiros estudos sobre o TEA iniciaram na década de 20, e que, apesar de uma crescente investigação nos últimos 20 anos, pouco se sabe ainda sobre os fatores etiológicos envolvidos no desencadeamento desse transtorno. Tendo isso em vista, o estabelecimento de estratégias que contemplem a investigação de mecanismos de indução e prevenção de comportamentos do tipo-autista, os modelos animais se tornam fundamentais para a elucidação desses aspectos no contexto do TEA. Dados do nosso grupo indicam que no modelo animal VPA, além das alterações comportamentais compatíveis com o TEA, os animais apresentam perda na delimitação das camadas corticais acompanhada de desorganização colunar e perda quantitativa de interneurônios GABAérgicos, especialmente em camadas profundas do córtex. Baseado na influência do sistema GABAérgico na migração e formação cortical durante o neurodesenvolvimento, nossa hipótese é que possíveis alterações nesse sistema durante o período embrionário, poderiam contribuir para uma organização cortical anormal. Essa desorganização resultaria em mudanças no processamento somestésico. Dessa forma nossos objetivos foram estabelecidos a partir dos seguintes argumentos:

- Dados que ressaltam a importância e presença do componente inibitório para a regulação do balanço entre a excitação e a inibição, bem como a importância desse balanço para o processamento de informações sensoriais em regiões corticais envolvidas com as sensações.
- A constatação de que, tanto pacientes com TEA quanto modelos animais apresentam alterações no balanço excitatório-inibitório, especialmente em regiões corticais, bem como uma prevalência de 30% dos indivíduos diagnosticados com TEA apresentarem como comorbidade a epilepsia.
- Resultados do nosso grupo que mostram que o RSV se apresenta como uma importante estratégia preventiva no modelo VPA, incluindo prevenção de características comportamentais sociais e sensoriais do tipo-autista em duas tarefas sensoriais importantes (busca pelo ninho e *Whisker Nuisance Task*).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar parâmetros comportamentais e morfofuncionais do componente inibitório na área somatossensorial primária em ratos expostos ao ácido valproico no período pré-natal em um modelo animal de autismo, bem como o possível efeito preventivo da administração pré-natal do resveratrol sobre parâmetros mesmos parâmetros propostos.

3.2. Objetivos específicos

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO CELULAR E COMPORTAMENTAL SENSORIAL:

Avaliar, em dois momentos do desenvolvimento da prole, o comportamento de busca pelo ninho (P10) e a resposta por estimulação das vibrissas (*Whisker Nuisance Task*, P30) em animais oriundos do modelo animal de autismo.

Avaliar no encéfalo da prole, os seguintes parâmetros:

- Número de sinapses excitatórias e inibitórias nas camadas corticais da área somatossensorial primária (P30).
- Distribuição, localização e número de neurônios GABAérgicos que expressam parvalbumina (PV⁺), bem como o número de neurônios totais (P30) na área somatossensorial primária e na região da amígdala.
- Arquitetura laminar e colunar cortical dessa região, pela marcação neuronal (P30).

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL PRÓ-SOCIAL:

Avaliar comportamento pró-social do tipo empático no modelo animal de autismo, bem como os efeitos da exposição pré-natal ao resveratrol sobre os mesmos parâmetros (P90).

CAPÍTULO IV – AVALIAÇÃO DA HIPEREXCITABILIDADE E TRANSMISSÃO

INIBITÓRIA CORTICAL: Avaliar a possível presença de crises epiléticas e alterações no sistema GABAérgico no modelo animal de autismo (P30-60), bem como o efeito do RSV, considerando os seguintes parâmetros:

- Alterações comportamentais e análises eletroencefalográficas *in vivo*

- Análise eletrofisiológica *in vitro* das correntes inibitórias pós-sinápticas na área somatossensorial primária.

CAPÍTULO V - ESTUDO DE MECANISMOS COMUNS PRÓ-INFLAMATÓRIOS ENTRE FATORES DE RISCO: revisar mecanismos envolvidos com a ativação imune materna (MIA) por meio da exposição a fatores ambientais de risco pró-inflamatórios e estabelecer vias comuns de ação da indução pré-natal ao VPA, bem como prevenção por um anti-inflamatório e antioxidante, como o RSV.

CAPÍTULO II

Artigo publicado:

“Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid”

Frontiers in Synaptic Neuroscience, 2018



Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid

Mellanie Fontes-Dutra^{1,2,3*}, Júlio Santos-Terra^{1,2,3}, Iohanna Deckmann^{1,2,3}, Gustavo Brum Schwingel^{1,2,3}, Gustavo Della-Flora Nunes^{1,3,4}, Mauro Mozael Hirsch^{1,2,3}, Guilherme Bauer-Negrini^{1,2,3}, Rudimar S. Riesgo^{1,3,5}, Victorio Bambini-Júnior^{1,3,6}, Cecília Hedin-Pereira^{3,7,8} and Carmem Gottfried^{1,2,3*}

¹Translational Research Group in Autism Spectrum Disorders (GETTEA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, ²Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, ³National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Department of Biochemistry, University of Buffalo, The State University of New York, New York, NY, United States, ⁵Child Neurology Unit, Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ⁶School of Pharmacology and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire, Preston, United Kingdom, ⁷Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho and Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ⁸VPPCB, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Per Jesper Sjöström,
McGill University, Canada

Reviewed by:

Marco Atzori,
Universidad Autónoma de San Luis
Potosí, Mexico
Luiz E. Mello,
Federal University of São Paulo, Brazil

*Correspondence:

Mellanie Fontes-Dutra
dutra.mellanie@gmail.com
Carmem Gottfried
carmem.gottfried@gmail.com

Received: 12 December 2017

Accepted: 02 May 2018

Published: 22 May 2018

Citation:

Fontes-Dutra M, Santos-Terra J, Deckmann I, Brum Schwingel G, Della-Flora Nunes G, Hirsch MM, Bauer-Negrini G, Riesgo RS, Bambini-Júnior V, Hedin-Pereira C and Gottfried C (2018) Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. *Front. Synaptic Neurosci.* 10:9. doi: 10.3389/fnsyn.2018.00009

Autism spectrum disorder (ASD) is characterized by impairments in both social communication and interaction and repetitive or stereotyped behaviors. Although its etiology remains unknown, genetic and environmental risk factors have been associated with this disorder, including the exposure to valproic acid (VPA) during pregnancy. Resveratrol (RSV) is an anti-inflammatory and antioxidant molecule known to prevent social impairments in the VPA animal model of autism. This study aimed to analyze the effects of prenatal exposure to VPA, as well as possible preventive effects of RSV, on sensory behavior, the localization of GABAergic parvalbumin (PV⁺) neurons in sensory brain regions and the expression of proteins of excitatory and inhibitory synapses. Pregnant rats were treated daily with RSV (3.6 mg/kg) from E6.5 to E18.5 and injected with VPA (600 mg/kg) in the E12.5. Male pups were analyzed in Nest Seeking (NS) behavior and in whisker nuisance task (WNT). At P30, the tissues were removed and analyzed by immunofluorescence and western blotting. Our data showed for the first time an altered localization of PV⁺-neurons in primary sensory cortex and amygdala. We also showed a reduced level of gephyrin in the primary somatosensory area (PSSA) of VPA animals. The treatment with RSV prevented all the aforementioned alterations triggered by VPA. Our data shed light on the relevance of sensory component in ASD and highlights the interplay between RSV and VPA animal model as an important tool to investigate the pathophysiology of ASD.

Keywords: animal model, GABA, inhibition, parvalbumin, resveratrol, sensory, synaptic proteins, VPA

INTRODUCTION

Autism spectrum disorder (ASD) is a highly prevalent neurodevelopmental condition affecting 1 in 68 children aged 8 years in the USA (American Psychiatry Association (APA), 2013) and is characterized, according to the DSM-5, by a behavioral dyad composed by impairments in communication and social interaction and repetitive or stereotyped behaviors (American Psychiatry Association (APA), 2013). Although many interesting theories have been recently proposed (Patterson, 2009; Lucchina and Depino, 2013; Sandin et al., 2014; Gottfried et al., 2015), the ASD etiology remains unknown. This in turn hinders the discovery of new biomarkers and treatments, making ASD a significant individual and societal challenge (Bambini-Junior et al., 2014a; Anderson, 2015; Hu et al., 2017; Masi et al., 2017).

Autism has a high genetic heritability, which can be demonstrated by the high agreement of ASD development in monozygotic twins (reaching values of up to 90%; Dietert et al., 2011), compared to a concordance rate of about 10% in dizygotic twins (Miles, 2011; Yoo, 2015). In addition, some environmental factors are also associated to ASD, including prenatal exposure to valproic acid (VPA; Rodier et al., 1997; Christensen et al., 2013; Smith and Brown, 2014). Thus, based on these clinical observations, an animal model of autism by prenatal exposure to VPA was developed. Since then, it has been extensively validated, demonstrating a myriad of behavioral (Schneider and Przewlocki, 2005; Haddad et al., 2009; Dendrinis et al., 2011; Favre et al., 2013; Gottfried et al., 2013; Rouillet et al., 2013; Mabunga et al., 2015), molecular (Rouillet et al., 2010; Gottfried et al., 2013), morphological (Rodier et al., 1997; Dendrinis et al., 2011; Favre et al., 2013; Gottfried et al., 2013) and electrophysiological autistic-like features (Dawson et al., 2005; Markram et al., 2008; Rinaldi et al., 2008).

Sensory impairments are one of the most prevalent comorbidities associated with ASD and are identified in more than 90% of patients (Geschwind, 2009). Indeed, hyper- or hyporeactivity to sensory input have been used as one of the four behavioral patterns observed to evaluate restricted, repetitive patterns of behavior, interests, or activities in ASD (American Psychiatry Association (APA), 2013). Common deficits include hyper-responsiveness to non-harmful stimuli (e. g., visual, tactile and auditory) and hypo-responsiveness to harmful (nociceptive) stimuli (American Psychiatry Association (APA), 2013). Studies investigating how sensory stimuli are processed and integrated in patients with ASD and animal models of autism are scarce. Yet, the impairments in the perception of the environment possibly affect both social and repetitive behaviors (Nienborg and Cumming, 2010; Dendrinis et al., 2011; Wöhr et al., 2015) and the sensory deficits can also be valuable for diagnostic purposes (Marco et al., 2011). The prompted Ayres proposed a Sensory integration (SI) theory to explain ASD and other neurological disorders (Cummins, 1991). Actually, previous studies showed correlations between sensory misprocessing in cortical and subcortical regions with altered excitatory/inhibitory balance and disorganization of cortical columnar and laminar pattern in autistic individuals

(Spence and Schneider, 2009; Stoner et al., 2014; Khan et al., 2015).

Given the abnormal sensory behaviors present in the animal model of autism induced by VPA, we asked if the neuronal organization in the primary somatosensory area (PSSA) was affected by exposure to VPA. Interneurons have a major role in brain circuits and organization, acting as either switches or pattern generators and providing refinement to the countless connections present in the brain (Xu et al., 2010; Chu and Anderson, 2015). GABAergic neurons expressing parvalbumin (PV⁺-neurons) are the most common interneurons in the cortex, comprising 40% of the total interneuron population (Staiger et al., 2009; Xu et al., 2010; Rudy et al., 2011) and playing important roles in social memory, attention, integration of different sensory areas (Gogolla et al., 2009; Unichenko et al., 2017) and notably providing a relevancy filter in sensory processing (Yang et al., 2017). Therefore, we addressed the question of whether the PV⁺-neuron distribution was altered in somatosensory cortex and amygdala in the VPA model and if there was a concomitant change in inhibitory and excitatory synaptic markers in this region.

We recently showed that prenatal treatment with resveratrol (RSV), a polyphenol compound presenting antioxidant and anti-inflammatory properties, prevents altered social behavior in the VPA animal model of autism (Bambini-Junior et al., 2014b). Considering that the social impairments of the VPA animals could be explained, at least partially, by excitatory/inhibitory imbalance in the sensory cortices and amygdala, we asked if RSV could prevent these alterations.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Wistar rats were obtained from Center of Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals (CREAL) and maintained under a standard 12/12-h light/dark cycle (light cycle starting at 7 am and ending at 7 pm) at a constant temperature of 22 ± 1°C. The animals had *ad libitum* access to food and water, and were handled in accordance with the guidelines established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) of Brazil. This project was approved by the ethics committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS #31872) and by the Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA-FIPE #160477).

Animals were mated overnight and pregnancy was verified by next morning through presence of spermatozoa in the vaginal smear. This was considered the embryonic day 0.5 (E0.5). Pregnant rats were divided into four groups according to the treatment they received: Control, RSV, VPA, or RSV+VPA. From E6.5 to E18.5, the pregnant females received a daily subcutaneously injection of RSV (Fluxome, Stenløse, Denmark) at 3.6 mg/kg or dimethyl sulfoxide (DMSO, equivalent volume of RSV injection) as previously described (Bambini-Junior et al., 2014b). On E12.5, rats received a single intraperitoneal injection with either

VPA at 600 mg/kg (Acros Organics, NJ, USA) or saline solution 0.9%.

Behavioral Tasks

Nest Seeking Behavior

We assessed the nest-seeking (NS) response mediated by olfactory discrimination as described previously (Schneider and Przewłocki, 2005) at the postnatal day 10 (P10). All litter (males and females) was evaluated, since sex is very difficult to determine during behavioral tests before P10 and one would have to manipulate the litter, which could introduce a stress component. The apparatus used was a plastic container (30 × 20 × 13 cm) that was divided in thirds and had the lateral sections covered with wood shavings, but leaving a clear uncovered center. One side is filled with the home-cage bedding (nest shavings) and in the other side with sterilized shavings. The pup was placed in the center of the apparatus and the latency to reach the nest shavings and the time to make any choice was registered. The total time of the test was limited to 60 s. In order to maintain the smell of the litter/mother, we did not change the shavings in the home-cage in the 2 days preceding the test.

Whisker Nuisance Task (WNT)

During this test, the animal behavioral response to direct vibrissae stimulation was observed in P30 animals. All tests and analyses were performed blindly. Since this is a sensory test, prior to testing, animals were familiarized with handling of the experimenter and habituated with the empty housing (57.1 × 39.4 × 15.2 cm) coated with an absorbent pad. To perform the test, the vibrissae are stimulated with a wooden toothpick for three consecutive periods of 5 min (15 min in total) with a 30 s interval between stimulation (**Figures 1E,F**). Animals were scored according to a scale developed by McNamara et al. (2010), in which freezing, stance and body position, breathing, whisker position, whisking response, evading stimulation, response to stick presentation and grooming are classified from 0 to 2 according to the response (0 = absent/typical, 1 = present/light response and 2 = profound/accentuated response; Supplementary Table S1). The sum of all scores is then calculated. Low scores (0–4) indicate normal responses, in which the animal is calm or indifferent to stimulation. High scores (8–16) indicate abnormal responses to stimulation, in which the animal freezes, shakes, or is aggressive (McNamara et al., 2010).

Tissue Preparation and Analysis

Transcardiac Perfusion

P30 male rats were anesthetized (75 mg/kg ketamine + 10 mg/kg xylazine) and subjected to transcardiac perfusion with 0.9%-NaCl solution followed by 1.5%-paraformaldehyde and 4%-paraformaldehyde solutions before the removal of the brain. The tissues were post-fixed for 4 h in a 4%-paraformaldehyde solution and subsequently cryoprotected by sequential immersion in 15% and 30%-sucrose solutions

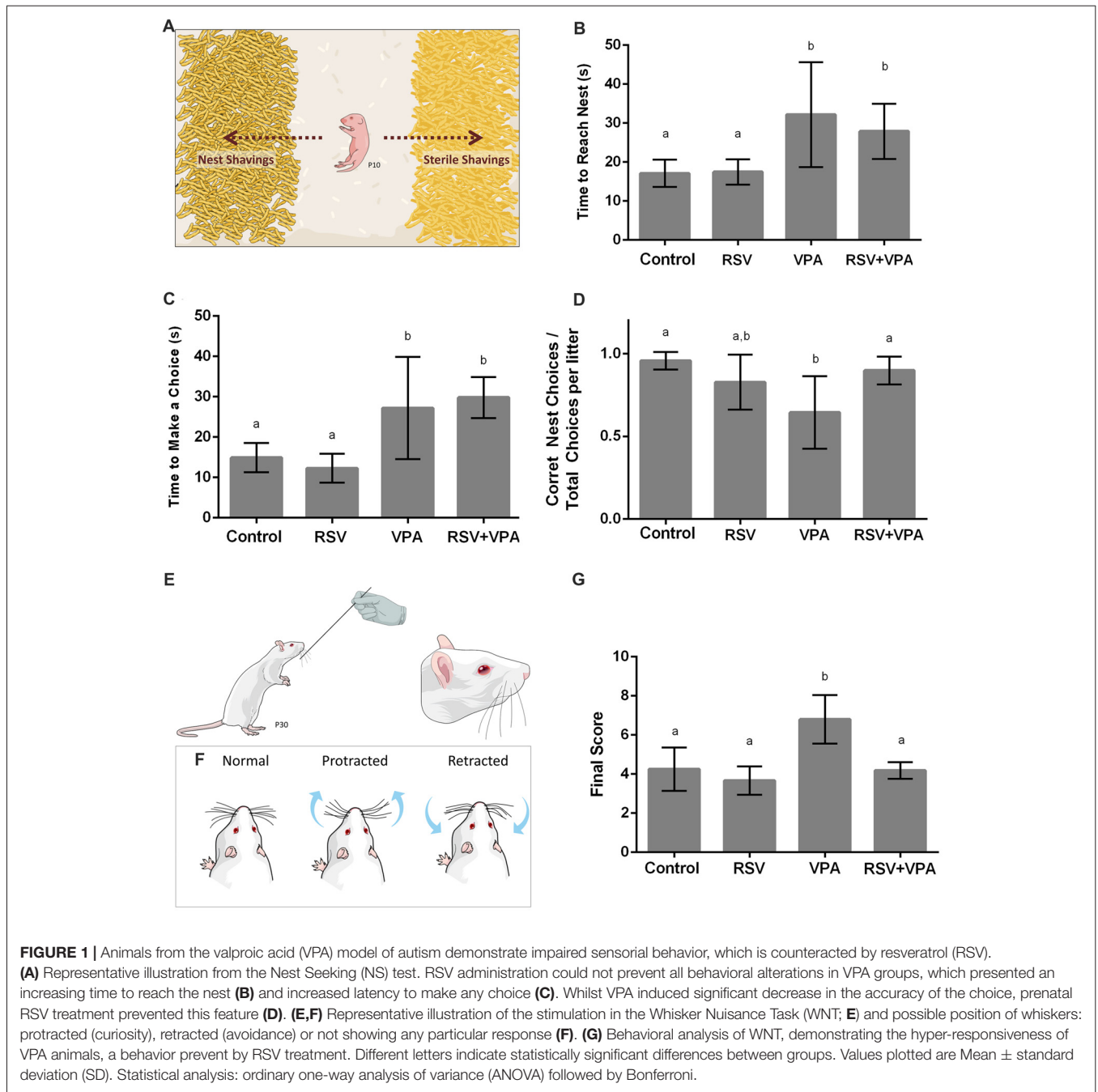
in PBS (the tissue was kept in each solution until complete submersion).

Immunofluorescence

Brains were embedded in Tissue-Tek[®] and kept in -80°C ultra-freezer until further processing. Coronal brain slices (25 μm) were obtained in cryostat (Leica Microsystems GmbH) and a rat brain atlas (Paxinos and Watson, 1997) was utilized to identify sections containing the PSSA and the amygdala. We obtained the slices both from PSSA and amygdalar region according to the Paxinos rat atlas, using the following markers: Bregma (anteroposterior): -3.48 mm, interaural: 5.52 mm (Figure 62 from Paxinos rat atlas). After the immunofluorescence protocol from these slices described above, we delimited the regions as it follows: for PSSA we first localized the CA2 hippocampal region. Then moved laterally from this region until finding cortical border, where we can find the barrel fields, a specific region for whisker sensory processing. We localized the layer II/III and IV/V examining the cytoarchitecture of neuronal composition positive to NeuN labeling, as described in literature (Narayanan et al., 2017). For amygdalar region, we first localized the external capsule, a white matter region easily identified by DAPI staining. Then, we moved dorsoventrally to the end of this white matter region and, medially to this point, we identified lateral amygdalar region. We consider the amygdalar region since the histological contour of lateral amygdalar complex is difficult to determine.

The immunostaining procedure was performed in the following steps: (1) exposure to vapors of 4%-paraformaldehyde (10 min); (2) three washes with PBS 0.1 M buffer (5 min each); (3) permeabilization with PBS-Triton 0.1% (10 min); (4) three washes with PBS 0.1 M buffer (5 min each); (5) antigen retrieval using citrate buffer at 60°C (1 h); (6) two washes with PBS-Triton 0.1% (5 min each); (7) blocking with BSA 5% in PBS-Triton 0.1% (1 h); (8) incubation with primary antibodies—diluted to 1:500 in blocking solution—for 48 h at 4°C ; (9) five washes with PBS 0.1 M buffer (3 min each); (10) incubation with both secondary antibodies anti-mouse and anti-rabbit—diluted to 1:2000 in blocking solution for 2 h at room temperature; (11) five washes with PBS 0.1 M buffer (3 min each); (12) incubation with DAPI solution (10 min); and (13) five washes with PBS 0.1 M buffer (3 min each) followed by addition of mounting medium with fluorshield and coverslip. The list of antibodies used in this work is available in the Supplementary Table S2.

Images were obtained with at least eight times per image (dimension: 635.9 × 635.9 microns) in a confocal microscope (Olympus FluoView FV1000 confocal laser scanning) of the Electron Microscopy Core. Processing and quantification of all tomes obtained from two to four tissue sections per glass slide were performed using the ImageJ software with the Cell Counter plug-in. The neuronal quantification results are shown in absolute number of NeuN⁺ labeled cells (total neuronal cells), PV⁺ and NeuN⁺ labeled cells (PV-neuronal cells) and in density of PV⁺-neuronal cells (which is the ratio between absolute number of PV⁺-neuronal cells by the total number of



neuronal cells) for layer II/III, layer IV/V and all layers (II/III and IV/V). The number of PV⁺-neurons, total neurons and total cells were counted by an observer blind to the animal group.

Eletrophoresis and Western Blotting

Amygdala region (AmR) and PSSA were surgically isolated and fresh tissues homogenates were prepared in lysis buffer. Protein concentration was measured by Lowry method (Lowry et al., 1951), equal amounts of protein (40 μ g) were loaded in SDS-polyacrylamide gels and

transferred to nitrocellulose membranes. After overnight incubation with the primary antibody at 4°C (Anti-PSD95, Anti-gephyrin, Anti-synaptophysin or Anti- β -actin; Supplementary Table S3), membranes were incubated with the proper secondary antibody conjugated to HRP (Donkey anti-mouse-IgG HRP or Goat anti-rabbit-IgG HRP) at room temperature for 1:30 h. No stripping of the membranes was performed (Supplementary Figures S1, S2). The SuperSignal West Pico reagent (Thermo Fisher Scientific) was used and its chemiluminescence was detected using the

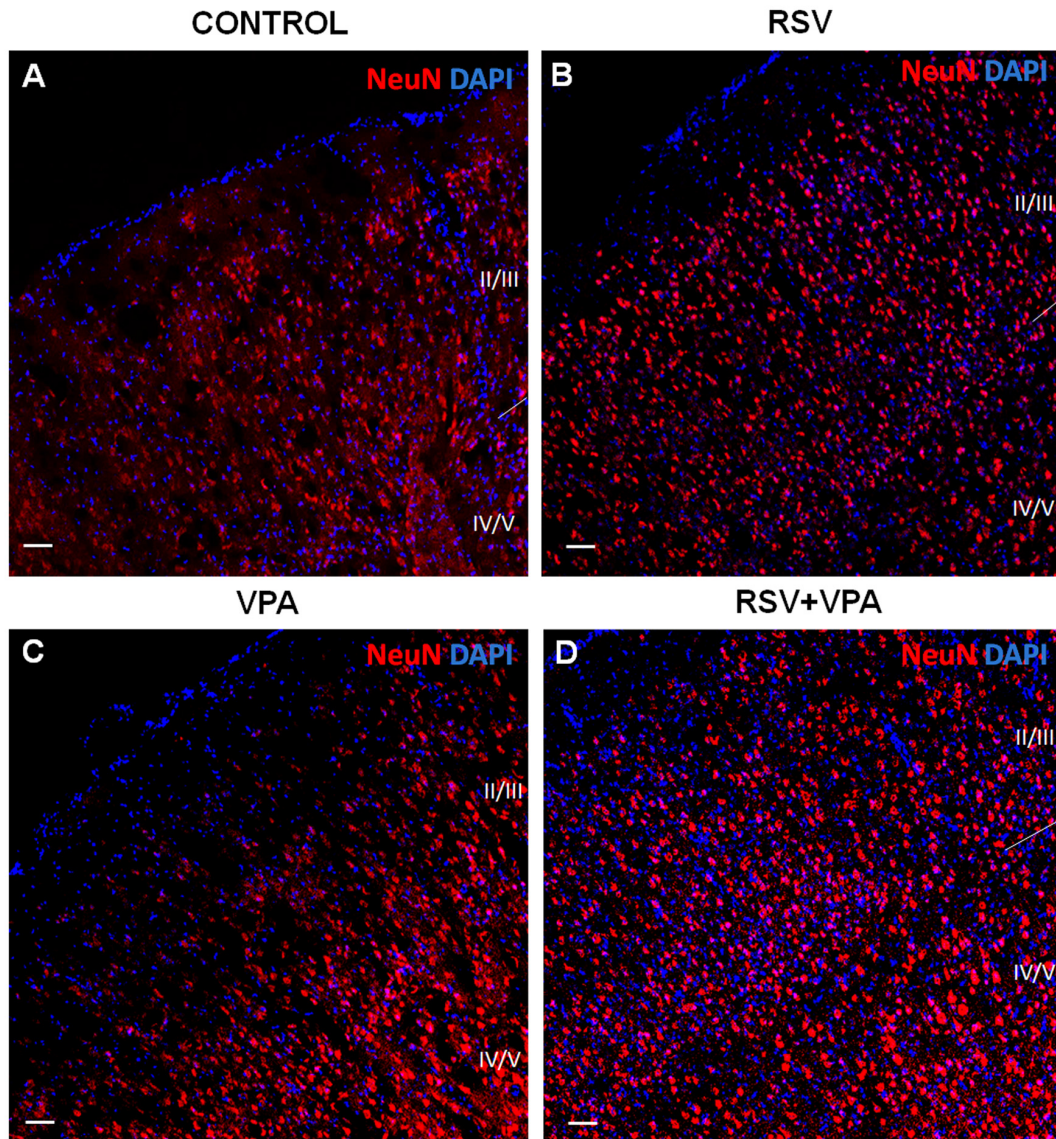


FIGURE 2 | RSV prevents the impairments in cortical organization of the primary somatosensory area (PSSA) induced by VPA. **(A–D)** Cell nuclei—blue (DAPI) and total neurons—red (NeuN⁺). Layers II-III and IV-V can be distinctly visualized by its specific cellularity, enabling a qualitative analysis of the cortical laminar organization between the groups. Scale bar = 50 μ m.

ImageQuant LAS 4000 immunodetector (GE HealthCare Life Sciences).

Statistical Analysis

One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post hoc* multi comparison test was performed using the IBM SPSS software (version 20.0). Data are reported as mean \pm standard deviation (SD), considering significant when $p < 0.05$. In graphic representation, different letters indicate statistically significant differences between the experimental groups. The total number of animals analyzed in each experiment was four animals from at least four different litters per group.

RESULTS

In the Nest Seeking Behavior, RSV Prevents the Reduction of Accuracy But Not the Increase in Latency for Choice Induced by VPA

In order to evaluate the effects of VPA and RSV on olfactory discrimination, P10 pups were tested for NS behavior (Figure 1A). The following parameters were evaluated: latency to reach the nest shavings, latency to make any choice (nest or sterile shavings) and percentage of correct choices (reach the nest shavings) per litter. The latency to reach the nest

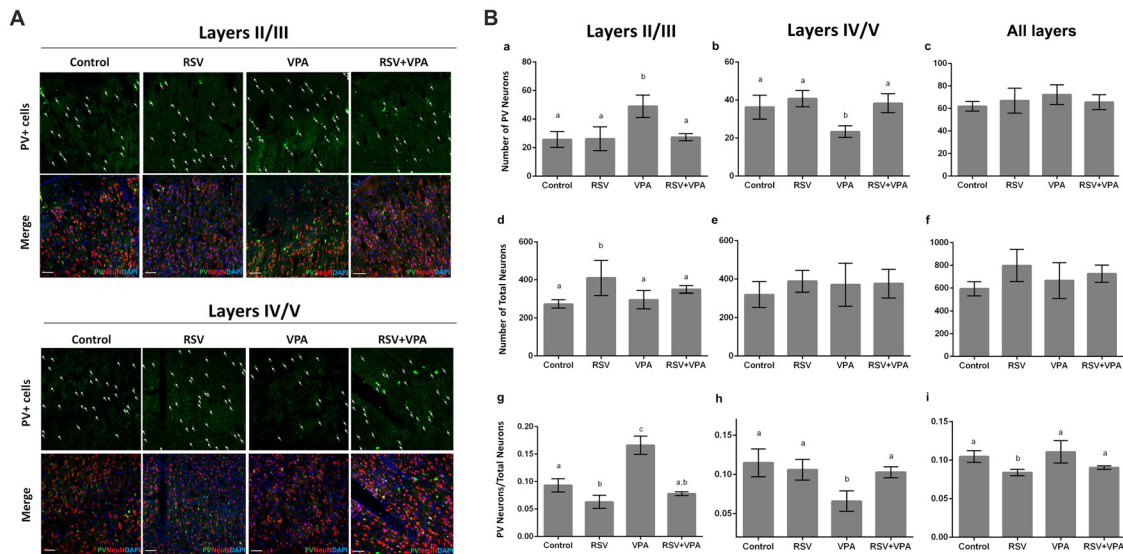


FIGURE 3 | RSV averts the abnormal distribution of PV+ GABAergic neurons in the PSSA of animals of the VPA model of autism. Cell nuclei—blue (DAPI), total neurons—red (NeuN⁺) and GABAergic parvalbumin (PV⁺) neurons—green. **(A)** Representative immunofluorescence images of PSSA. Layer II-III and IV-V are separated in order to improve visualization of cell distribution. In each case, the first micrograph presents the green channel showing PV⁺ cells distribution in the indicated groups, followed by the merge image of three channels below (green, red and blue). **(Ba–i)** Quantitative analysis of PV⁺ cells in layer II-III and IV-V. Different letters indicate statistically significant differences between groups. Values plotted are Mean \pm SD. Statistical analysis: ordinary one-way ANOVA followed by Bonferroni. Scale bar = 50 μ m.

shavings (**Figure 1B**) was increased in animals of the groups VPA ($p = 0.0063$) and RSV+VPA ($p = 0.0486$) when compared to the control group (Control: 17.1 ± 3.4 , RSV: 17.4 ± 3.2 , VPA: 32.1 ± 13.4 , RSV+VPA: 27.8 ± 7.0 , $F = 6.8$). In a similar way, the latency to make any choice (**Figure 1C**) was also increased in VPA ($p = 0.0116$) and RSV+VPA ($p = 0.0011$) groups compared to the control (Control: 14.8 ± 3.6 , RSV: 12.2 ± 3.5 , VPA: 27.2 ± 12.6 , RSV+VPA: 29.8 ± 5.1 , $F = 13.05$). Thus, VPA delayed the general response time of the animals, which was not prevented by RSV. There were no significant differences between groups in latency to reach sterile shavings and in the total time spent by the pups in either of the shavings (data not shown). However, prenatal administration of RSV successfully prevented the reduction of percentage of correct choices (**Figure 1D**) seen in the VPA group (Control: 0.95 ± 0.05 , RSV: 0.8 ± 0.16 , VPA: 0.6 ± 0.22 , RSV+VPA: 0.89 ± 0.08 , $F = 5.9$; $p = 0.0020$, VPA vs. Control and $p = 0.0252$, VPA vs. RSV+VPA).

RSV Prevents the Abnormal Response to Direct Whisker Stimulation Observed in Rats of the VPA Model of Autism

Since ASD is usually associated with several impairments in SI, we sought to investigate the behavioral response of rats of the VPA model of autism in the Whisker Nuisance Task (WNT; **Figure 1E**). Animals from the VPA group increased WNT scores (**Figure 1G**) as compared to the control group ($p = 0.0027$, VPA compared to the control group). Strikingly, prenatal treatment with RSV averted the over-responsiveness induced by VPA

(Control: 4.2 ± 1.1 , RSV: 3.6 ± 0.72 , VPA: 6.8 ± 1.2 , RSV+VPA: 4.2 ± 0.42 , $F = 12.4$; $p = 0.0006$, VPA vs. RSV+VPA group).

RSV Counteracts the VPA Effects on Neuronal Organization in the Primary Somatosensory Cortex, Promoting Typical Laminal Distribution and Localization of PV⁺-Neurons

As shown in **Figures 2A,B**, the control and RSV groups presented a typical cortical organization, with a high number of medium-sized pyramidal neurons in layer II-III and granular and largest pyramidal neurons in layer IV-V, and a low cellularity between these layers. However, the VPA exposure induced visible alterations in cellular organization, increasing the space between layer I and layer II-III while drastically reducing the spacing between layer II-III and layer IV-V (**Figure 2C**). Interestingly, prenatal RSV treatment was able to prevent the VPA effects on cortical organization (**Figure 2D**).

We then asked if there was any change in the number of PV⁺-neurons in layer II-III and layer IV-V of the PSSA. Representative micrographs of the layer II-III (**a–d**) and layer IV-V (**e–h**) are shown in **Figure 3A**. Our quantitative analysis revealed a significant increase in number of PV⁺ neurons in layer II-III of the VPA group, when compared to control animals ($p = 0.0029$). In addition, as showed in **Figure 3Ba**, RSV treatment successfully prevented this alteration (Control: 25.7 ± 5.5 , RSV: 26.2 ± 8.3 , VPA: 49 ± 7.8 , RSV+VPA: 27.3 ± 2.5 , $F = 11.1$; $p = 0.0087$, VPA compared to RSV+VPA

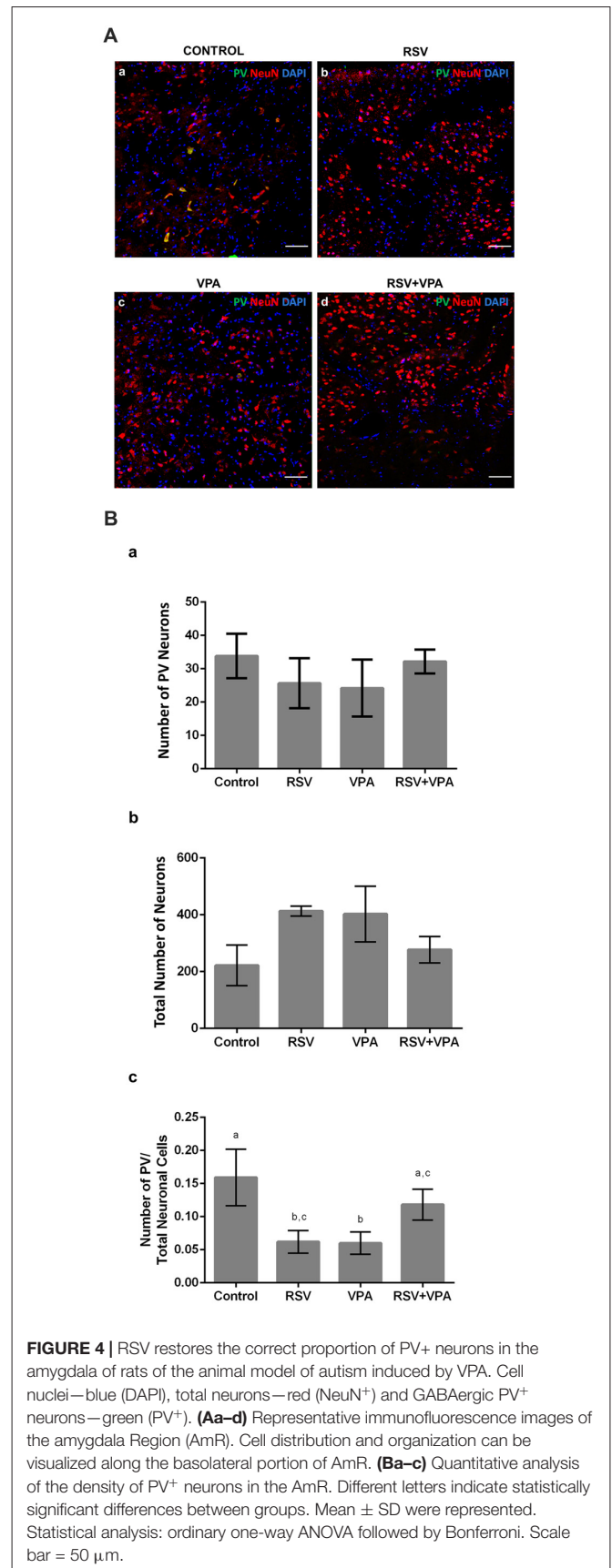
group). On the other hand, animals of the VPA group showed reduced numbers ($p = 0.0180$) of PV⁺-neurons in layer IV-V, as compared to the control group (**Figure 3Bb**). Interestingly, RSV was also able to prevent this change (Control: 36.2 ± 6.3 , RSV: 40.7 ± 4.2 , VPA: 23.3 ± 3.3 , RSV+VPA: 38.3 ± 5.03 , $F = 10.2$; $p = 0.0110$, VPA compared to the RSV+VPA group). No significant differences were found in the sum of PV⁺-neurons of all cortical layers, suggesting an impairment of neuron localization rather than overall quantity (**Figure 3Bc**).

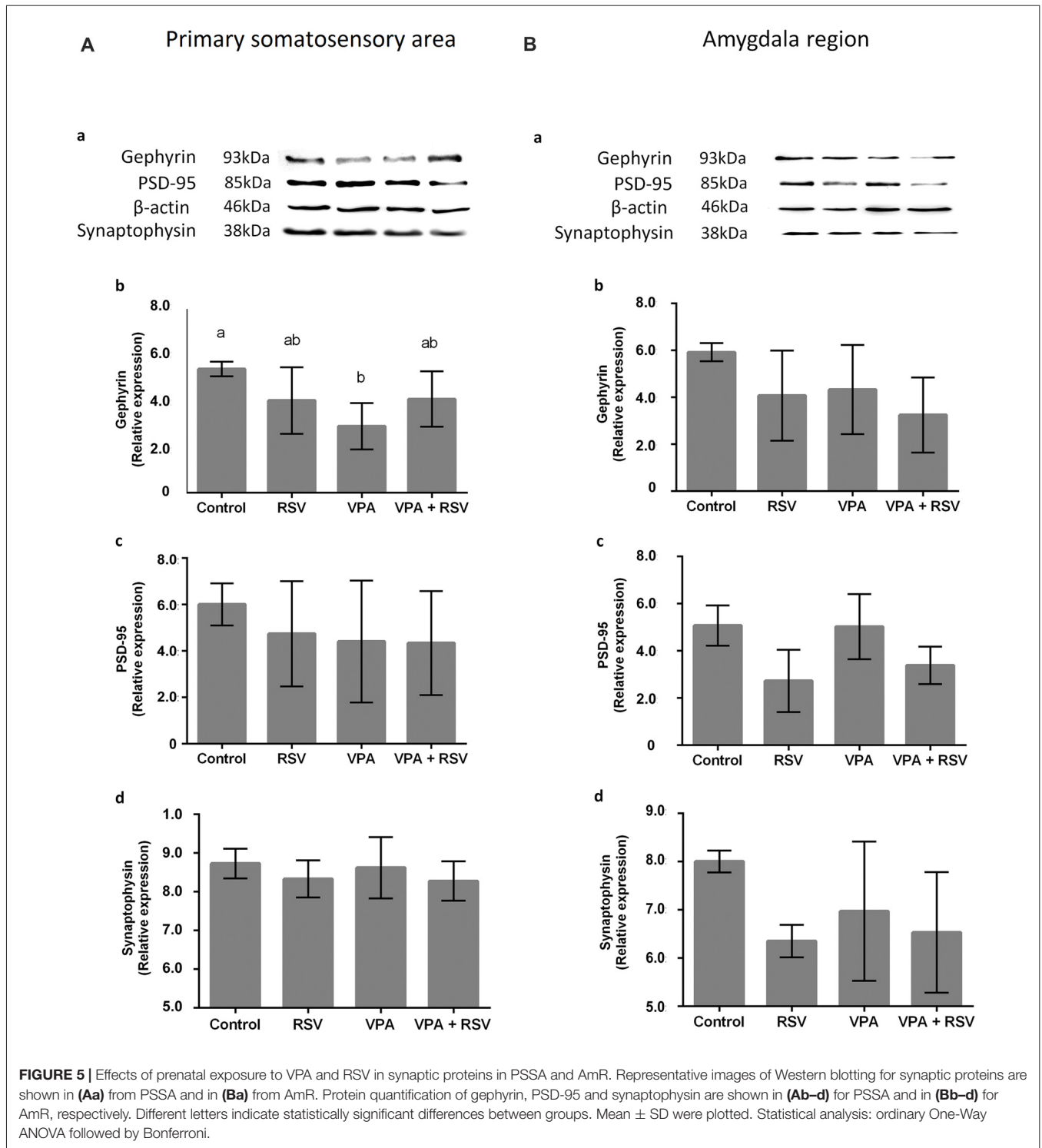
We also evaluated the total number of neurons in layer II-III and layer IV-V of PSSA using immunostaining with the NeuN marker. Our results pointed out for an effect of RSV exposure ($p = 0.0328$), increasing the total number of neurons in layer II-III (**Figures 3Bd-f**), in comparison to the control group (Control: 274.3 ± 21.8 , RSV: 410.5 ± 91.9 , VPA: 296.3 ± 47.5 , RSV+VPA: 350 ± 19.9 , $F = 4.7$).

When normalizing the number of PV⁺-neurons to the total number of neurons, the VPA group presented a significantly increased ratio in layer II/III ($p < 0.0001$), which was prevented by RSV ($p < 0.0001$, VPA compared to the RSV+VPA group). Surprisingly, the RSV treatment *per se* reduced the ratio PV⁺-neurons/total neurons (**Figure 3Bg**; $p = 0.0356$) in this same region when compared to control (Control: 0.09319 ± 0.01211 , RSV: 0.063 ± 0.01 , VPA: 0.16 ± 0.016 , RSV+VPA: 0.07 ± 0.003 , $F = 52.4$). We also observed a significant decrease in the PV⁺-neurons/total neurons ratio in the VPA group compared to controls (**Figure 3Bh**; $p = 0.0023$). Importantly, this alteration was also prevented by RSV (Control: 0.11 ± 0.02 , RSV: 0.11 ± 0.01 , VPA: 0.06 ± 0.01 , RSV+VPA: 0.1 ± 0.007 , $F = 9.8$; $p = 0.0290$ to VPA vs. RSV+VPA). When combining all layers, we only observed an effect of RSV (**Figure 3Bi**), reducing the PV⁺-neurons/total neurons ratio (Control: 0.10 ± 0.007 , RSV: 0.08 ± 0.004 , VPA: 0.11 ± 0.014 , RSV+VPA: 0.09 ± 0.002 , $F = 7.5$; $p = 0.0438$). Thus, our immunofluorescence data suggests a protective effect of RSV for the laminar organization and correct distribution of PV⁺-neurons in animals of the VPA model of autism.

RSV Reestablishes a Typical Proportion of PV⁺-Neurons in the Amygdala

Given the importance of the AmR to attribute affective content to sensory information, we also evaluated the quantity of PV⁺-neurons in this region. **Figures 4Aa-d** shows illustrative micrographs from PV⁺-neuron distribution in the amygdala of our four experimental groups. As showed in **Figure 4Ba**, no significant differences were observed in the number of PV⁺-cells (Control: 33.8 ± 6.6 , RSV: 25.6 ± 7.5 , VPA: 24.2 ± 8.5 , RSV+VPA: 32.1 ± 3.5 , $p = 26$, $F = 1.55$) or (**Figure 4Bb**) in the total number of neuronal cells (Control: 221.8 ± 71.6 , RSV: 413 ± 17.5 , VPA: 402.6 ± 97.9 , RSV+VPA: 277.3 ± 46.3 , $p = 0.2119$, $F = 1.79$). Nevertheless, we observed a significant reduction in the PV⁺-neurons/total neurons ratio (**Figure 4Bc**) in the RSV ($p = 0.0040$) and VPA groups ($p = 0.0015$), when compared to the control





group. Interestingly, RSV was able to totally prevent the VPA effect (Control: 0.16 ± 0.04 , RSV: 0.06 ± 0.017 , VPA: 0.059 ± 0.016 , RSV+VPA: 0.12 ± 0.02 , $F = 12.09$). Here, our results demonstrate interesting and complex effects of RSV and VPA exposures in the AmR in which the combined actions of VPA and RSV normalized the PV⁺/total neurons ratio.

VPA and RSV Modulate Synaptic Proteins in Primary Somatosensory Area (PSSA) and Amygdala Region (AmR)

Next, we asked if the neuronal reorganization promoted by VPA and prevented by RSV in PSSA and AmR influenced the overall expression of synaptic proteins. We evaluated proteins

from excitatory (PSD-95) and inhibitory (gephyrin) synapses, as well as synaptophysin, an ubiquitous pre-synaptic component. Illustrative western blot images are shown in **Figure 5Aa** (PSSA) and **Figure 5Ba** for (AmR). No significant differences were observed between groups in PSD-95 levels in PSSA (**Figure 5Ac**) or AmR (**Figure 5Bc**). On the other hand, gephyrin levels were reduced in the PSSA of VPA animals compared to the control group (Control: $5.306 \times 10^7 \pm 3.123 \times 10^6$, RSV: $3.959 \times 10^7 \pm 1.426 \times 10^7$, VPA: $2.859 \times 10^7 \pm 9.937 \times 10^7$, RSV+VPA: $4.020 \times 10^7 \pm 1.188 \times 10^7$, $F = 3.54$; $p = 0.0305$). In the PSSA of RSV+VPA animals, gephyrin is expressed at intermediate levels between the control and VPA groups, not being statistically different from either one (**Figure 5Ab**). No significant differences were observed in the expression of gephyrin in the AmR of our experimental groups (**Figure 5Bb**). The synaptophysin and PSD-95 expression levels are not significantly different between groups in PSSA (**Figure 5Ad**) or AmR (**Figure 5Bd**).

DISCUSSION

The response to sensory stimuli is altered in more than 90% of ASD patients resulting in great impairment in synaptic transmission and processing, affecting the health of these individuals (Coskun et al., 2009; Geschwind, 2009). These alterations include hyper-responsiveness to auditory, visual and tactile stimuli and hypo responsiveness to nociceptive stimuli. An interesting hypothesis suggests a perturbation in the processing and integration of the sensory information between different areas, resulting in local and global alterations, from neurotransmitter release, to the neural network, leading to disruption of sensory perception (Coskun et al., 2013; Supekar et al., 2013). Here we report, for the first time, that RSV prevented the alterations caused by VPA in the WNT, a behavioral test that evaluates quality of response to direct whisker stimulation. In addition to the striking result in the present work, RSV was able to preserve the cortical laminar patterning and the distribution of PV⁺-neurons affected by VPA in the PSSA, the brain area related to tactile processing of the whiskers (Chen-Bee et al., 2012). These results corroborate similar findings in the literature in other brain regions involved in sensory processing, such as the superior colliculus, presenting dysfunctional sensory processing characterized by an inability to filter sensory information and impairments in GABAergic synaptic transmission, particularly simultaneously arriving multimodal inputs (Dendrinis et al., 2011).

The behavior evaluated in the NS test is of extreme importance for the development of rats, which need major care from their mothers to survive. This attachment behavior is present in many species (Broad et al., 2006) and combines a sensory component (olfactory, in rodents) with an affective memory, creating a mother-offspring connection that allows young animals (who can barely see or hear at this age) to find the source of food and protection. The AmR is an important area for primary attachment behaviors and other emotional responses, such as aversive behavior (Landers and Sullivan, 2012; Rigon et al., 2016). In the context of ASD, it is known

that many alterations were already described in the amygdala, including hyper reactivity (Markram et al., 2008; Lin et al., 2013), enlargement and hyper cellularity (Markram et al., 2008; Ecker et al., 2015), elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation (LTP; Rinaldi et al., 2007). Therefore, our hypothesis highlights the possibility that an alteration in this region is causing the impairment identified in the NS task and can be related to the outcomes in social development. Interestingly, studies have demonstrated that the AmR seems to develop faster in animals of the VPA model of autism. It results in premature maturation of fear responses, caused by the hyper reactivity, hyper plasticity and deficits in inhibitory system found in the lateral amygdala, which could lead to an early termination of the attachment learning period (Markram et al., 2008; Landers and Sullivan, 2012; Barrett et al., 2017).

We report in our present work that RSV reestablishes the typical proportion of GABAergic PV⁺-neurons in the amygdala of VPA animals, which might be crucial for proper inhibition of responses in the amygdala (McDonald and Betette, 2001; Woodruff and Sah, 2007; Bocchio et al., 2015). The majority of PV⁺-neurons originate in the medial ganglionic eminence and migrate to their target regions in the brain (Guo and Anton, 2014). The ganglionic eminence is a temporary brain structure first observed at E11.5 in rodents (Lavdas et al., 1999; Anderson et al., 2001; Marín et al., 2001) with the first interneurons starting their tangential migration towards the cortex at E12.5 in mice (Kelsom and Lu, 2013). This coincides with our hypothesis of the time point of VPA administration and opens the intriguing possibility that VPA interferes either with GABAergic interneuron specification and proliferation or their migration to the cortical layers and their survival in the cortex, promoting the increase of PV⁺-neuronal density in layer II/III and the decrease of this subpopulation in layer IV/V. In fact, studies with 7 days old mice of the VPA model of autism present a reduced number of BrdU⁺ cells (generated at E12.5) in the deep layers of the somatosensory and prefrontal cortices, indicating several impairments in cortical migration related to cortical areas (Kataoka et al., 2013).

A decreased number of PV⁺-neurons and of PV mRNA was observed in several animal models related to ASD (Gogolla et al., 2009; Wöhr et al., 2015; Lauber et al., 2016) and a recent study demonstrated reduction in the number of PV⁺-neurons in the medial prefrontal cortex of individuals with autism (Hashemi et al., 2017). Even though the significance of the reduction of PV⁺-neurons in ASD remains unclear, PV knockout mice display behavioral phenotypes related to all the core symptoms present in ASD patients, such as abnormal reciprocal social interactions, altered ultrasonic vocalization and presence of repetitive/stereotyped patterns of behavior (Wöhr et al., 2015). Moreover, there is an increase of apoptosis in the developing neocortex 12 h and 24 h after VPA exposure, accompanied by a reduction in proliferation in the ganglionic eminences (Kataoka et al., 2013). This can likely have widespread and long-lasting consequences to brain organization, since, during development, GABAergic neurons are excitatory and promote the maturation of neural networks (Le Magueresse and Monyer, 2013).

Finally, in western blotting analysis, we observed in this work a significant alteration in the expression level of the protein gephyrin (a key scaffolding protein of inhibitory synapses) in PSSA: VPA decreased its levels and RSV treatment was able to prevent this impairment. These findings corroborate previous studies showing an excitatory/inhibitory imbalance in cortical regions of animal models of ASD (Rinaldi et al., 2008; Gao and Penzes, 2015; Nelson and Valakh, 2015). Since, VPA affects the PV⁺-neuron localization and distribution, this might lead to altered inhibitory synaptic distribution and organization, as seen in autistic individuals (Zikopoulos and Barbas, 2013; Gao and Penzes, 2015; Nelson and Valakh, 2015). Thus, the RSV prevention could be related to the excitation/inhibition balance restoration in the PSSA, leading to correct sensory perception/processing.

It is also possible that both RSV and VPA primarily exert independent actions in the developing nervous system, modulating neuronal proliferation, migration and establishment of synaptic connections. It is worth to mention that RSV is itself, a teratogen. Therefore, we are not proposing this approach as a “vaccine” to ASD but as a potential research tool, that could help to clarify specific mechanisms related to ASD etiology and pathophysiology.

Our results from behavioral, histological and protein analyses showed a relevant impact of RSV treatment in sensory aspects of the VPA animal model of autism. Thus, RSV can be used as a tool to study pathways related to ASD pathophysiology, and further investigation of VPA effects counteracted by RSV can help to shed light in molecular mechanisms involved in the etiology of ASD.

CONCLUDING REMARKS

Taken together, our data showed important deficits in the processing and integration of sensory information in the VPA animal model of autism, corroborating the face validity of this model. Furthermore, the prenatal treatment of RSV successfully prevented sensory deficits in behavioral analyses, possibly by correcting altered PV⁺-neuron localization and cortical organization impaired by VPA.

We suggest that not only the correct number, but also localization of PV⁺-neurons throughout the PSSA cortical layers, might play important roles in proper sensory processing, refining the excitatory inputs. Additionally, in AmR, the correct balance of this neuronal subpopulation might be necessary to attribute the correct emotional load to sensory information, providing a

refined and complex cognitive experience. Thus, the perturbation of PV by VPA may be an important player in the sensory behavioral deficits evaluated.

Since RSV appears as a promising molecule for investigation of ASD etiology and pathophysiology, it is important to explore whether these effects result from its anti-inflammatory or anti-oxidant properties or from previously unrecognized activities of this compound. Furthermore, it will be of utmost importance to investigate the opposite actions of VPA and RSV during embryonic development and in the pregnant female to characterize the molecular alterations involved in the triggering of autistic-like alterations in the VPA animal model of autism. Again, we think that our data support the possible therapeutic use of RSV, but future studies have to be done to show if RSV has any beneficial effect on the postnatal development of animals presenting autistic-like features.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF-D, CG, VB-J, RR and CH-P: experimental design and intellectual contribution. MF-D, JS-T, ID, GBS, GD-FN, MMH and GB-N: *in vivo* and *in vitro* analyses. MF-D, JS-T, ID, GBS, GD-FN, MMH, GB-N, CH-P, VB-J, RR and CG: data discussion and manuscript preparation.

FUNDING

This work was supported by National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation—INCT-NIM #465489/2014-1; National Council of Technological and Scientific Development (CNPq); Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Clinical Hospital of Porto Alegre (FIPE-HCPA) and PROPESQ-UFRGS.

ACKNOWLEDGMENTS

We would also like to thank Fluxome (Stenløse, Denmark) for the generous gift of resveratrol, and the online infographic maker, Mind the Graph (attribution share-alike 4.0 licensing) for the templates of schematic figures.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnsyn.2018.00009/full#supplementary-material>

REFERENCES

- American Psychiatry Association (APA). (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th Edn. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc.
- Anderson, G. M. (2015). Autism biomarkers: challenges, pitfalls and possibilities. *J. Autism Dev. Disord.* 45, 1103–1113. doi: 10.1007/s10803-014-2225-4
- Anderson, S. A., Marín, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J. L. R. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, 353–363.
- Bambini-Junior, V., Baronio, D., MacKenzie, J., Zanatta, G., dos Riesgo, R. S., and Gottfried, C. (2014a). “Prenatal exposure to valproate in animals and autism,” in *Comprehensive Guide to Autism*, eds V. B. Patel, V. R. Preedy and C. R. Martin (New York, NY: Springer), 1779–1793.
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., et al. (2014b). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci. Lett.* 583, 176–181. doi: 10.1016/j.neulet.2014.09.039
- Barrett, C. E., Hennessey, T. M., Gordon, K. M., Ryan, S. J., McNair, M. L., Ressler, K. J., et al. (2017). Developmental disruption of amygdala

- transcriptome and socioemotional behavior in rats exposed to valproic acid prenatally. *Mol. Autism* 8:42. doi: 10.1186/s13229-017-0160-x
- Bocchio, M., Fucina, G., Oikonomidis, L., McHugh, S. B., Bannerman, D. M., Sharp, T., et al. (2015). Increased serotonin transporter expression reduces fear and recruitment of parvalbumin interneurons of the amygdala. *Neuropsychopharmacology* 40, 3015–3026. doi: 10.1038/npp.2015.157
- Broad, K. D., Curley, J. P., and Keverne, E. B. (2006). Mother-infant bonding and the evolution of mammalian social relationships. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361, 2199–2214. doi: 10.1098/rstb.2006.1940
- Chen-Bee, C.-H., Zhou, Y., Jacobs, N. S., Lim, B., and Frostig, R. D. (2012). Whisker array functional representation in rat barrel cortex: transcendence of one-to-one topography and its underlying mechanism. *Front. Neural Circuits* 6:93. doi: 10.3389/fncir.2012.00093
- Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., et al. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* 309, 1696–1703. doi: 10.1001/jama.2013.2270
- Chu, J., and Anderson, S. A. (2015). Development of cortical interneurons. *Neuropsychopharmacology* 40, 16–23. doi: 10.1038/npp.2014.171
- Coskun, M. A., Loveland, K. A., Pearson, D. A., Papanicolaou, A. C., and Sheth, B. R. (2013). Functional assays of local connectivity in the somatosensory cortex of individuals with autism. *Autism Res.* 6, 190–200. doi: 10.1002/aur.1276
- Coskun, M. A., Varghese, L., Reddoch, S., Castillo, E. M., Pearson, D. A., Loveland, K. A., et al. (2009). How somatic cortical maps differ in autistic and typical brains. *Neuroreport* 20, 175–179. doi: 10.1097/WNR.0b013e32831f47d1
- Cummins, R. A. (1991). Sensory integration and learning disabilities: ayres' factor analyses reappraised. *J. Learn. Disabil.* 24, 160–168. doi: 10.1177/002221949102400304
- Dawson, G., Webb, S. J., Wijsman, E., Schellenberg, G., Estes, A., Munson, J., et al. (2005). Neurocognitive and electrophysiological evidence of altered face processing in parents of children with autism: implications for a model of abnormal development of social brain circuitry in autism. *Dev. Psychopathol.* 17, 679–697. doi: 10.1017/s0954579405050327
- Dendrinis, G., Hemelt, M., and Keller, A. (2011). Prenatal VPA exposure and changes in sensory processing by the superior colliculus. *Front. Integr. Neurosci.* 5:68. doi: 10.3389/fnint.2011.00068
- Dietert, R. R., Dietert, J. M., and DeWitt, J. C. (2011). Environmental risk factors for autism. *Emerg. Health Threats J.* 4:7111. doi: 10.3402/ehj.v4i0.7111-8
- Ecker, C., Bookheimer, S. Y., and Murphy, D. G. M. (2015). Neuroimaging in autism spectrum disorder: brain structure and function across the lifespan. *Lancet Neurol.* 14, 1121–1134. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00050-2
- Favre, M. R., Barkat, T. R., Lamendola, D., Khazen, G., Markram, H., and Markram, K. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Front. Behav. Neurosci.* 7:88. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00088
- Gao, R., and Penzes, P. (2015). Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Curr. Mol. Med.* 15, 146–167. doi: 10.2174/1566524015666150303003028
- Geschwind, D. H. (2009). Advances in autism. *Annu. Rev. Med.* 60, 367–380. doi: 10.1146/annurev.med.60.053107.121225
- Gogolla, N., LeBlanc, J. J., Quast, K. B., Südhof, T. C., Fagioli, M., and Hensch, T. K. (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *J. Neurodev. Disord.* 1, 172–181. doi: 10.1007/s11689-009-9023-x
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Baronio, D., Zanatta, G., Bristol, R., Vaccaro, T., et al. (2013). Valproic acid in autism spectrum disorder: from an environmental risk factor to a reliable animal model. *Recent Adv. Autism Spectr. Disord.* doi: 10.5772/54824 [Epub ahead of print].
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., and Savino, W. (2015). The impact of neuroimmune alterations in autism spectrum disorder. *Front. Psychiatry* 6:121. doi: 10.3389/fpsy.2015.00121
- Guo, J., and Anton, E. S. (2014). Decision making during interneuron migration in the developing cerebral cortex. *Trends Cell Biol.* 24, 342–351. doi: 10.1016/j.tcb.2013.12.001
- Haddad, P. M., Das, A., Ashfaq, M., and Wieck, A. (2009). A review of valproate in psychiatric practice. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 5, 539–551. doi: 10.1517/17425250902911455
- Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S. C., and Martínez-Cerdeño, V. (2017). The number of parvalbumin-expressing interneurons is decreased in the medial prefrontal cortex in autism. *Cereb. Cortex* 27, 1931–1943. doi: 10.1093/cercor/bhw021
- Hu, Y., Ehli, E. A., and Boomsma, D. I. (2017). MicroRNAs as biomarkers for psychiatric disorders with a focus on autism spectrum disorder: current progress in genetic association studies, expression profiling, and translational research. *Autism Res.* 10, 1184–1203. doi: 10.1002/aur.1789
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., and Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 91–103. doi: 10.1017/s1461145711001714
- Kelsom, C., and Lu, W. (2013). Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell Biosci.* 3:19. doi: 10.1186/2045-3701-3-19
- Khan, S., Michmizos, K., Tommerdahl, M., Ganesan, S., Kitzbichler, M. G., Zetino, M., et al. (2015). Somatosensory cortex functional connectivity abnormalities in autism show opposite trends, depending on direction and spatial scale. *Brain* 138, 1394–1409. doi: 10.1093/brain/awv043
- Landers, M. S., and Sullivan, R. M. (2012). The development and neurobiology of infant attachment and fear. *Dev. Neurosci.* 34, 101–114. doi: 10.1159/000336732
- Laubert, E., Filice, F., and Schwaller, B. (2016). Prenatal valproate exposure differentially affects parvalbumin-expressing neurons and related circuits in the cortex and striatum of mice. *Front. Mol. Neurosci.* 9:150. doi: 10.3389/fnmol.2016.00150
- Lavdas, A. A., Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J. G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 19, 7881–7888. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-18-07881.1999
- Le Magueresse, C., and Monyer, H. (2013). GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex. *Neuron* 77, 388–405. doi: 10.1016/j.neuron.2013.01.011
- Lin, H. C., Gean, P. W., Wang, C. C., Chan, Y. H., and Chen, P. S. (2013). The amygdala excitatory/inhibitory balance in a valproate-induced rat autism model. *PLoS One* 8:e55248. doi: 10.1371/journal.pone.0055248
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lucchina, L., and Depino, A. M. (2013). Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. *Autism Res.* 7, 273–289. doi: 10.1002/aur.1338
- Mabunga, D. F. N., Gonzales, E. L. T., Kim, J.-W., Kim, K. C., and Shin, C. Y. (2015). Exploring the validity of valproic acid animal model of autism. *Exp. Neurobiol.* 24, 285–300. doi: 10.5607/en.2015.24.4.285
- Marco, E. J., Hinkley, L. B. N., Hill, S. S., and Nagarajan, S. S. (2011). Sensory processing in autism: a review of neurophysiologic findings. *Pediatr. Res.* 69, 48R–54R. doi: 10.1203/PDR.0b013e3182130c54
- Marín, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J. L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293, 872–875. doi: 10.1126/science.1061891
- Markram, K., Rinaldi, T., La Mendola, D., Sandi, C., and Markram, H. (2008). Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 33, 901–912. doi: 10.1038/sj.npp.1301453
- Masi, A., DeMayo, M. M., Glozier, N., and Guastella, A. J. (2017). An overview of autism spectrum disorder, heterogeneity and treatment options. *Neurosci. Bull.* 33, 183–193. doi: 10.1007/s12264-017-0100-y
- McDonald, A. J., and Betette, R. L. (2001). Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and co-localization of Calbindin-D28k. *Neuroscience* 102, 413–425. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00481-4
- McNamara, K. C. S., Lisembee, A. M., and Lifshitz, J. (2010). The whisker nuisance task identifies a late onset, persistent sensory sensitivity in diffuse brain-injured rats. *J. Neurotrauma* 27, 695–706. doi: 10.1089/neu.2009.1237
- Miles, J. H. (2011). Autism spectrum disorders—a genetics review. *Genet. Med.* 13, 278–294. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba

- Narayanan, R. T., Udvarý, D., and Oberlaender, M. (2017). Cell type-specific structural organization of the six layers in rat barrel cortex. *Front. Neuroanat.* 11:91. doi: 10.3389/fnana.2017.00091
- Nelson, S. B., and Valakh, V. (2015). Excitatory/inhibitory balance and circuit homeostasis in autism spectrum disorders. *Neuron* 87, 684–698. doi: 10.1016/j.neuron.2015.07.033
- Nienborg, H., and Cumming, B. (2010). Correlations between the activity of sensory neurons and behavior: how much do they tell us about a neuron's causality? *Curr. Opin. Neurobiol.* 20, 376–381. doi: 10.1016/j.conb.2010.05.002
- Patterson, P. (2009). Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav. Brain Res.* 204, 313–321. doi: 10.1016/j.bbr.2008.12.016
- Paxinos, G., and Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd Edn. San Diego, CA: Academic Press.
- Rigon, A., Duff, M. C., and Voss, M. W. (2016). Structural and functional neural correlates of self-reported attachment in healthy adults: evidence for an amygdalar involvement. *Brain Imaging Behav.* 10, 941–952. doi: 10.1007/s11682-015-9446-9
- Rinaldi, T., Kulangara, K., Antonello, K., and Markram, H. (2007). Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 13501–13506. doi: 10.1073/pnas.0704391104
- Rinaldi, T., Silberberg, G., and Markram, H. (2008). Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. *Cereb. Cortex* 18, 763–770. doi: 10.1093/cercor/bhm117
- Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., and Croog, V. J. (1997). Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod. Toxicol.* 11, 417–422. doi: 10.1016/s0890-6238(97)80001-u
- Roullet, F. I., Lai, J. K. Y., and Foster, J. A. (2013). *In utero* exposure to valproic acid and autism—a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 36, 47–56. doi: 10.1016/j.ntt.2013.01.004
- Roullet, F. I., Wollaston, L., Decatanzaro, D., and 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, 514–522. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.069
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., and Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 45–61. doi: 10.1002/dneu.20853
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., and Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA* 311, 1770–1777. doi: 10.1001/jama.2014.4144
- Schneider, T., and Przewlocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30, 80–89. doi: 10.1038/sj.npp.1300518
- Smith, V., and Brown, N. (2014). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed* 99:198. doi: 10.1136/archdischild-2013-305636
- Spence, S. J., and Schneider, M. T. (2009). The role of epilepsy and epileptiform eegs in autism spectrum disorders. *Pediatr. Res.* 65, 599–606. doi: 10.1203/PDR.0b013e31819e7168
- Staiger, J. F., Zuschmitter, W., Luhmann, H. J., and Schubert, D. (2009). Local circuits targeting parvalbumin-containing interneurons in layer IV of rat barrel cortex. *Brain Struct. Funct.* 214, 1–13. doi: 10.1007/s00429-009-0225-5
- Stoner, R., Chow, M. L., Boyle, M. P., Sunkin, S. M., Mouton, P. R., Roy, S., et al. (2014). Patches of disorganization in the neocortex of children with autism. *N. Engl. J. Med.* 370, 1209–1219. doi: 10.1056/NEJMoa1307491
- Supekar, K., Uddin, L. Q., Khouzam, A., Phillips, J., Gaillard, W. D., Kenworthy, L. E., et al. (2013). Brain hyperconnectivity in children with autism and its links to social deficits. *Cell Rep.* 5, 738–747. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.001
- Unichenko, P., Yang, J.-W., Kirischuk, S., Kolbaev, S., Kilb, W., Hammer, M., et al. (2017). Autism related neuroligin-4 knockout impairs intracortical processing but not sensory inputs in mouse barrel cortex. *Cereb. Cortex* doi: 10.1093/cercor/bhx165 [Epub ahead of print].
- Wöhr, M., Orduz, D., Gregory, P., Moreno, H., Khan, U., Vörckel, K. J., et al. (2015). Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. *Transl. Psychiatry* 5:e525. doi: 10.1038/tp.2015.19
- Woodruff, A. R., and Sah, P. (2007). Networks of parvalbumin-positive interneurons in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 27, 553–563. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3686-06.2007
- Xu, X., Roby, K. D., and Callaway, E. M. (2010). Immunohistochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J. Comp. Neurol.* 518, 389–404. doi: 10.1002/cne.22229
- Yang, J.-W., Prouvot, P.-H., Reyes-Puerta, V., Stüttgen, M.-C., Stroth, A., and Luhmann, H. J. (2017). Optogenetic modulation of a minor fraction of parvalbumin-positive interneurons specifically affects spatiotemporal dynamics of spontaneous and sensory-evoked activity in mouse somatosensory cortex *in vivo*. *Cereb. Cortex* 27, 5784–5803. doi: 10.1093/cercor/bhx261
- Yoo, H. (2015). Genetics of autism spectrum disorder: current status and possible clinical applications. *Exp. Neurobiol.* 24, 257–272. doi: 10.5607/en.2015.24.4.257
- Zikopoulos, B., and Barbas, H. (2013). Altered neural connectivity in excitatory and inhibitory cortical circuits in autism. *Front. Hum. Neurosci.* 7:609. doi: 10.3389/fnhum.2013.00609

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

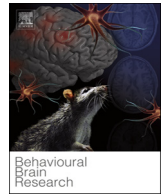
Copyright © 2018 Fontes-Dutra, Santos-Terra, Deckmann, Brum Schwingel, Della-Flora Nunes, Hirsch, Bauer-Negrini, Riesgo, Bambini-Júnior, Hedin-Pereira and Gottfried. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CAPÍTULO III

Artigo publicado:

“Abnormal empathy-like pro-social behaviour in the valproic acid model of autism spectrum disorder”

Behavioural Brain Research, 2019



Research report

Abnormal empathy-like pro-social behaviour in the valproic acid model of autism spectrum disorder

Mellanie Fontes-Dutra^{a,b,c,1}, Gustavo Della-Flora Nunes^{a,c,d,1}, Júlio Santos-Terra^{a,b,c},
Walquíria Souza-Nunes^{a,b,c}, Guilherme Bauer-Negrini^{a,b,c}, Mauro Mozael Hirsch^{a,b,c}, Lily Green^e,
Rudimar Riesgo^{a,b,f}, Carmem Gottfried^{a,b,c}, Victorio Bambini-Junior^{a,c,e,*}

^a Translational Research Group in Autism Spectrum Disorders-GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos street, 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Ramiro Barcelos street, 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

^c National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Brasil avenue, 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Department of Biochemistry, University at Buffalo, The State University of New York, 955 Main Street, Suite 4102, NY, USA

^e School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire, PR1 2HE, Lancashire, Preston, England, UK

^f Child Neurology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Animal models
Valproate
Empathy
Autism
Pro-social behaviour

ABSTRACT

Impairments in social behaviour are a defining feature of autism spectrum disorder (ASD). Individuals with ASD also usually present some difficulty to recognize or understand another person's feelings. Therefore, it is possible that altered empathy processing could hinder typical social interaction in ASD. Recently, robust paradigms confirmed that rodents show primordial forms of empathy-like behaviour. Therefore, in this work, we used one of these new protocols to test pro-social behaviour in the rat model of autism induced by Valproic Acid (VPA). We also evaluated possible beneficial effects of Resveratrol, since it can prevent social deficits in the VPA model. Rats were tested on their ability to open a restrainer to release a trapped conspecific. Exposure to VPA precludes the timely manifestation of this empathy-like behaviour, but does not affect its continuation after its first expression. We also found a significant correlation between average speed during the first day of test and becoming an Opener. Similarly, rats able to open the restrainer on the first day had an increased likelihood of repeating this behaviour in the later days of the testing programme. We did not find any protective effects of Resveratrol. Further investigation of empathy-like behaviour in the VPA model and in other models of autism could help to clarify the behavioural and neural processes underpinning the basic aspects of empathy alterations in autistic individuals.

1. Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental disorder characterized by social communication impairments, restricted interests and repetitive behaviours [1]. In addition, individuals with ASD often present several associated comorbidities such as epilepsy, sleep disturbances, immune alterations and impairments in emotional and empathy-driven responses [18,38]. The aetiology and molecular basis of ASD are still unknown. However, different genetic alterations and environmental risk factors can contribute to the development of ASD [19].

Valproic Acid (VPA), or 2-propylpentanoic acid, is a fatty acid with

anticonvulsant [28] and mood stabilizing [8] properties and it is a relevant drug for the treatment of epilepsy, bipolar disorder and other neuropsychological disorders. Epidemiological studies have demonstrated a strong link between the prenatal exposure to VPA and the onset of ASD in the offspring [9,37]. Considering this association, an animal model for the study of ASD was established based on prenatal exposure to VPA [43,46].

Accumulating evidence demonstrates that the VPA model presents face validity (strong phenomenological similarities and related pathophysiology), construct validity (the same aetiology; in this case, exposure to VPA) and predictive validity (same response to treatments aiming to prevent or reverse symptoms) [30]. Therefore, this model has

* Corresponding author at: School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire, PR1 2HE, Lancashire, Preston, England, UK.
E-mail addresses: vbambini-junior@uclan.ac.uk, victoriobambini@gmail.com (V. Bambini-Junior).

¹ These authors contributed equally to this work.

the potential to elucidate targets for pharmacological treatment optimization, and for the prevention or reversal of ASD-like symptoms [48]. For instance, our group demonstrated that resveratrol (RSV), an antioxidant and anti-inflammatory molecule, prevents VPA-induced social impairments in a three-chambered test [3] and in a reciprocal social interaction test [20], which lead us to use this approach to elucidate the underlying pathways associated with ASD and social behaviour.

Empathy is a complex phenomenon that could be understood in humans as the ability to understand and share the internal states of others, while generating an emotional response more appropriate to someone else's situation than to one's own. Therefore, empathy is frequently demonstrated through caring and helping behaviour toward others [49]. Several studies have indicated that individuals with ASD have impaired empathy behaviour, as manifested by the reduced ability of ASD subjects to recognize facial features [44], lower scores in the empathy quotient self-report questionnaire [5] and difficulties in identifying/understanding what another individual is thinking or feeling [27].

Despite the need for higher cognitive processing for the manifestation of some aspects of empathy behaviour in humans, it has been increasingly accepted that other animals also present primordial forms of empathy [23,39]. For example, many species show emotional contagion, the capacity to mimic someone else's emotions [13], and an ability that could be at the foundation of empathy behaviour. In addition, it has long been known that rats can engage in pro-social acts to help conspecifics in distress [10,41], which is a behaviour that was recently further investigated [6,45].

In a landmark paper, Bartal et al. showed that rats intentionally opened a restraining door to release a trapped cage-mate, but did not open an empty restrainer or a restrainer containing a toy rat [6]. In addition, animals continued to manifest this helping behaviour even when the trapped rat was released in a different arena, supporting the hypothesis that social reward was not necessary to release the trapped rat. Interestingly, when rats had the option to open a restrainer containing chocolate or a restrainer with a cage-mate, they showed no preference and shared the chocolate. In a follow up study, the same group demonstrated that this behaviour is socially acquired since rats did not release trapped animals of an unfamiliar strain. However, when reared with animals of this different strain, rats helped strangers of the fostering strain but not rats of their own strain [7].

The development of these new robust paradigms can now allow the first investigation of pro-social behaviour in an animal model of autism. Therefore, we aimed to evaluate the expression of empathy-like behaviours in the VPA model of autism. In addition, given the preventive actions of RSV on the social impairments shown by VPA rats, we also studied the effects of RSV on empathy-like behaviour.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult Wistar rats (200–300 g) from the local breeding colony (ICBS-Federal University of Rio Grande do Sul) were housed in plastic cages (four to five per cage), under a 12 h light/dark cycle, controlled temperature (22 ± 1 °C) and humidity at 40–60%. Water and food *ad libitum*. Animals were mated overnight and if in the morning spermatozoa were found in vaginal secretion, this day was designated as the first day of pregnancy [2]. Pregnant rats were housed in pairs until one day before the birth. The offspring were weaned at 21 days old and housed separately by sex. Only the male rats were included in the behavioural experiment. The empathy-like behaviours were evaluated in 69–81 days old animals from at least three pregnant female Wistar rats per treatment group, with two animals per litter tested. Test animals were housed with their brothers, respecting the aforementioned housing conditions. The same is valid for animals utilized as “trapped” animals. The behavioural test was conducted in a specialized room.

Animals were taken in their home cage to this room 30 min before testing and were immediately reconnected to their original room after each daily trial. All animal experiments were approved by the local ethics committee (CEUA # 23884) and followed the regulations of the Brazilian national committee for the control of animal experimentation (CONCEA) and the NIH guidelines for care and use of laboratory animals.

2.2. The animal model

At E12.5 pregnant female rats received a single intraperitoneal injection of 600 mg/kg VPA (Acros Organics, NJ, USA) or physiological saline. VPA was dissolved in 0.9% saline with a concentration of 250 mg/mL [2].

Prenatal treatment with resveratrol (Fluxome, Stenløse, Denmark) was administered from E6.5 to E18.5. Resveratrol (RSV) was dissolved in 100% DMSO (Merck, New Jersey, USA) for a concentration of 36 mg/mL. Pregnant female rats received a daily subcutaneous injection of 3.6 mg/kg of RSV solution or correspondent volume of DMSO, as previously described [3]. Based on treatment received the pregnant rats were separated in 4 experimental groups: control (received only DMSO injections from E6.5 to E18.5); RSV (received only RSV injections from E6.5 to E18.5); VPA (received DMSO from E6.5 to E18.5 plus VPA injection at E12.5); RSV + VPA (received RSV from E6.5 to E18.5 plus VPA injection at E12.5). Two male rats of each litter were subjected to the behavioural analysis, resulting in the following sample sizes: Control (16), RSV (10), VPA (14) and VPA + RSV (10).

2.3. Restrainer tube and empathy-like behaviour

We used a modified protocol based on Bartal et al. [6]. In short, the test consisted of the evaluation of the willingness of rats to open a restrainer where a conspecific was trapped. The apparatus was constructed in Plexiglas ($25 \times 8.75 \times 7.5$ cm; length, width, height) and had a customized door that only opened from the outside. A schematic figure of the restrainer is shown in Supplementary Fig. 5. The restrainer was placed inside a black wooden box ($50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$), and was cleaned and disinfected with alcohol (70%) after each trial. Room luminosity was set to 60 lx.

Before the test, animals were habituated in the apparatus according to the following schedule (not recorded in video):

Day 1: two animals from the same litter were handled by an investigator for 5 min and placed in the black box containing the acrylic tube (open and empty) for 60 min.

Day 2: two animals from the same litter were handled by an investigator for 10 min and placed in the black box containing the acrylic tube (open and empty) for 60 min.

Day 3: the animals were handled for 5 min and placed individually in the black boxes containing the acrylic tubes (open and empty) for 60 min.

Before every procedure during the test days, animals were placed inside the test room for 30 min in order to get habituated to the new environment. The trials were completed over 12 days, with an hour for each trial on each day. All trial days were recorded using a full HD webcam (Logitech C920 pro full HD 1920×1080 pixels, with a maximum frame rate of 30fps-1080p). The restrained animal was placed in the restraining tube and the door closed. The restraining tube was then placed in the centre of the wooden box. The free rat was placed next to the restraining tube and recording began. The animals restrained in the acrylic tube were 60 days old male Wistar rats that had not been previously submitted to any intervention and were smaller (10% less body weight, at least) and unknown to the test animals. Trapped animals were also randomly rotated between each trial session, so that test animals had to release different trapped animals in different days of the test. This strategy was used in order to minimize the effect of the trapped animal on the behaviour of the test subjects.

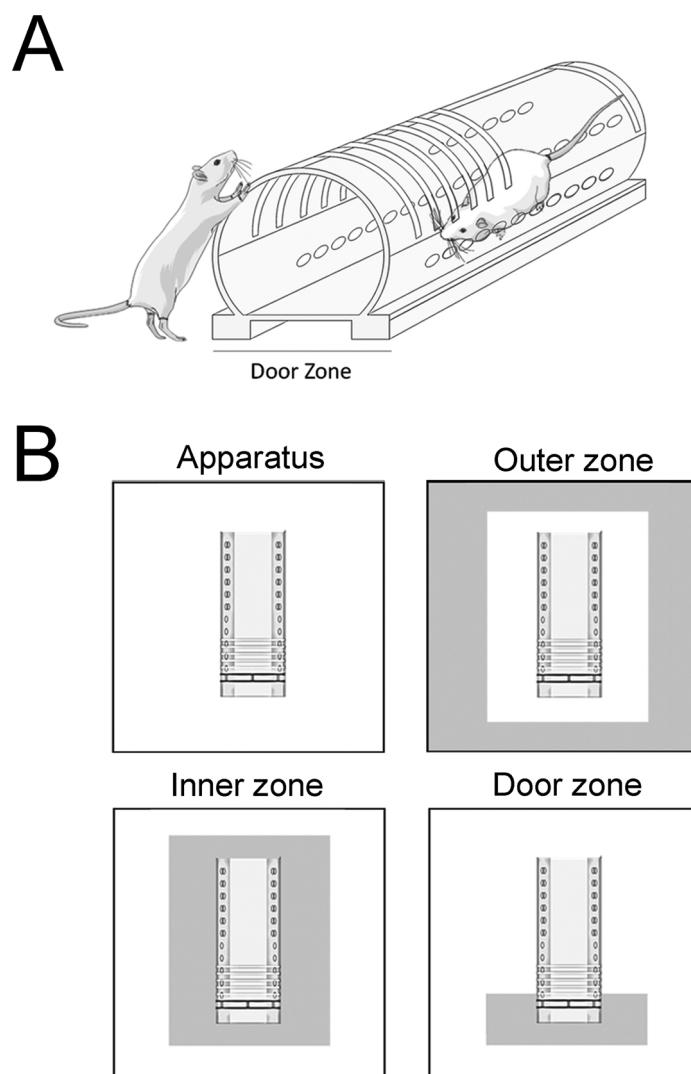


Fig. 1. Schematic representation of the test apparatus (A) and the regions considered in the analyses (B). The inner zone was determined so that its boundaries are at half the distance between the edge of the apparatus and the wooden box. The door zone is the part of the inner zone surrounding the front of the apparatus.

If the door was not opened within the first 40 min of the trial, the door was lifted halfway in a 45° angle, and a Plexiglas blocker was inserted to prevent door opening by the trapped rat. Any openings that occurred after this point were not included in analysis. Animals were not taught how to open the door or rewarded for that task in any moment. The opening occurrence and latency were registered and movements were tracked using ANYmaze 5.

Animals were defined as openers if they were able to open the restrainer for two consecutive days and to do so at least 3 times [7]. For example, if a rat opens the restrainer for four consecutive days or more, it is considered an opener (three sequences of 2 days: 1st and 2nd, 2nd and 3rd; 3rd and 4th days).

The acrylic tubes were set up to indicate an inner zone (where the free rat could be interested in the restrained rat), an outer perimeter zone (where the free rat could then be considered not showing interest) and a door zone (where the free rat could be considered to be demonstrating active interest in the door of the restraining tube) (Fig. 1). The zones were discriminated in ANYmaze 5 and the position of the head of the free rats was tracked, allowing the automated calculation of time spent and distance travelled in each zone. Speed values were calculated by dividing distance and time parameters for each individual. Group values were calculated as averages of the individuals. For each trial, tracking was terminated when the trapped animal was released. Therefore, test duration is not the same across

individuals/days and most results are reported as percentages. When rats were inside the door or inner zone, we observed the presence of exploratory behaviours, such as sniffing, following alongside the restrainer cage, rearing and climbing in the restrainer cage. A representative video of the behavioural task is available in the supplemental material.

All the data was gathered and analysed attempting to minimize subjective bias. Original videos were renamed and had all identification erased before analysis in order to avoid the chance of bias. In addition, most parameters analysed were calculated in an automated way using the ANYmaze software.

2.4. Statistical analysis

All behavioural parameters were analysed using Generalized Estimating Equations (GEE) and were adjusted by litter. The GEE is a flexible method based on general linear models, allowing the analyses of data with different distribution patterns. The GEE was utilized to allow for the evaluation of the effect of the many correlated variables in our analysis (VPA treatment, RSV treatment, opener outcome and their interactions). One of the main advantages of GEE is the reduced sample size required to detect a same size effect as compared to similar methods. The GEE was modelled using gamma distribution for all the following parameters: average speed, average speed in inner zone and

in door zone, distance travelled, percentage distance travelled in inner zone and in door zone, percentage time in inner and in door zone, litter size and percentage of males and females per litter. For the comparison of littermates, we modelled the GEE using gamma distribution for all average speeds and percentages. We used Poisson distribution for quantitative analyses of number of openings, day of first opening and percentage of miscarriages in each group and Normal distribution for total distance travelled. The Wald test was used as inference test. For analyses of correlation with the opener outcome, we used a Binomial distribution. *Post-hoc* analyses were performed and the p-value was adjusted for multiple comparisons using Bonferroni correction. All the estimated means were described as mean \pm SEM and results were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of prenatal exposure to VPA and RSV on rat pregnancy

We first analysed the pregnancy outcomes for a larger cohort of animals that included the animals in this study (Control $n = 24$, RSV $n = 22$, VPA $n = 23$, VPA + RSV $n = 27$). VPA significantly increased the percentage of miscarriages (Control: 12.50 ± 0.72 , RSV: 22.73 ± 1.02 , VPA: 47.83 ± 1.44 , VPA + RSV: 44.44 ± 1.28 , $p = 0.017$, Supplementary Fig. 1A). Miscarriages were defined as events in which females that had a vaginal plug detected did not give birth to a single pup. The percentage of miscarriages is almost identical to data previously reported [15]. Prenatal exposure to VPA or RSV had no effect on litter size (Supplementary Fig. 1B). There was also no difference in the percentage of males/females in each litter (Supplementary Fig. 1C and D). Pup mortality was a rare event and only happened in 2 litters of the VPA group.

3.2. Prenatal exposure to VPA delayed the timely manifestation of empathy-like behaviour in Wistar rats

Animals exposed to VPA demonstrated a delay in the day of first opening in relation to the Control and RSV groups (Control: 3.15 ± 0.64 , RSV: 3.14 ± 0.91 , VPA: 5.92 ± 0.98 , VPA + RSV: 6.62 ± 1.04 , $p = 0.001$) and RSV treatment was incapable of preventing this alteration (Fig. 2A). Consequently, animals of the VPA and VPA + RSV groups demonstrated a tendency for reduction in the total number of openings ($p = 0.056$), which was also not prevented by RSV treatment (Fig. 2B). The Supplementary Fig. 2A illustrates each individual opening event. There was no difference in the percentage of animals of each group that matched the opener criteria (Supplementary Fig. 2B). We also calculated the percentage of openings, defined as the percentage of trial sessions in which the test animals were able to release the trapped conspecific. The percentage of openings on each day is illustrated on Supplementary Fig. 2C. When the data for the percentage of openings was arranged in groups of 4 days, animals exposed to VPA showed a reduced percentage of openings in days 1–4 (Control: 35.93 ± 8.53 , RSV: 35 ± 11.9 , VPA: 14.28 ± 6.79 , VPA + RSV: 5 ± 3.33 , $p = 0.009$) (Fig. 2C). Interestingly, once animals opened the restrainer for the first time, they continued to open it at the same rate, regardless of the experimental group (Fig. 2D). Animals that were unable to open the restrainer at least once were excluded from this last analysis.

3.3. Average speed increases in the day of first opening

With the hope of gaining valuable insights on the behavioural patterns important for the expression of this empathy-like prosocial behaviour, we analysed the day of first opening of rats and compared this with the behaviour of littermates that did not open the restrainer on that day. We observed a significant increase in the average speed of animals that opened the restrainer when compared to their littermates

(Con-O: 6.57 ± 0.9 , Con-NO: 1.78 ± 0.25 , RSV-O: 6.86 ± 0.9 , RSV-NO: 1.9 ± 0.49 , VPA-O: 5.35 ± 0.33 , VPA-NO: 1.8 ± 0.47 , VPA + RSV-O: 4.6 ± 0.58 , VPA + RSV-NO: 2.22 ± 0.70 , $p < 0.001$, Fig. 3A). Regions of the test box were also analysed separately and the resulting data pointed out to differences in the average speed when in the door zone (Con-O: 4.5 ± 0.6 , Con-NO: 2.7 ± 0.4 , RSV-O: 6.6 ± 1.1 , RSV-NO: 2.0 ± 0.7 , VPA-O: 4.5 ± 1.0 , VPA-NO: 2.2 ± 1.1 , VPA + RSV-O: 3.5 ± 0.4 , VPA + RSV-NO: 2.8 ± 0.7 ; $p = 0.004$, Fig. 3B). Similar results were also found for the inner zone of the apparatus (Con-O: 5.88 ± 0.8 , Con-NO: 2.65 ± 0.42 , RSV-O: 7.56 ± 0.71 , RSV-NO: 2.26 ± 0.67 , VPA-O: 5.27 ± 0.67 , VPA-NO: 2.35 ± 0.84 , VPA + RSV-O: 5.37 ± 0.83 , VPA + RSV-NO: 3.57 ± 0.99 , $p < 0.001$, Supplementary Fig. 3A).

There were no significant differences in the percentage time (Fig. 3C) and distance travelled (Fig. 3D) in the door zone and in the inner zone (Supplementary Fig. 3C and B, respectively). The animals that did not open the restrainer demonstrated an increased total distance travelled (Con-O: 1810.55 ± 561.91 , Con-NO: 4280.82 ± 618.28 , RSV-O: 2777.63 ± 702.96 , RSV-NO: 4596.10 ± 1157.95 , VPA-O: 2837.52 ± 791.57 , VPA-NO: 4329.37 ± 1101.45 , VPA + RSV-O: 1469.5 ± 446.61 , VPA + RSV-NO: 5301.62 ± 1686.4 , $p < 0.001$, Supplementary Fig. 3D). This likely reflects the differences in test length as the test ended after the release of the trapped rat.

3.4. Parameters of the first day of test correlate with the opener outcome

Since our data revealed important behavioural differences in the first days of test (Fig. 2C), we aimed to investigate the possibility of the parameters on the first day of test correlating with the opener outcome. Opener animals were defined as animals that were able to open the restrainer for two consecutive days and to do so at least 3 times during the 12 days of test. We observed a significant increase in the average speed of opener rats, compared to non-openers (Con-OP: 4.50 ± 1.31 , Con-NP: 4.38 ± 0.62 , RSV-OP: 4.66 ± 1.29 , RSV-NP: 2.77 ± 0.76 , VPA-OP: 4.19 ± 0.67 , VPA-NP: 1.89 ± 0.18 , VPA + RSV-OP: 2.76 ± 0.32 , VPA + RSV-NP: 2.34 ± 0.51 , $p = 0.021$, Fig. 4A). There is also a significant effect of VPA ($p = 0.002$), indicating that VPA exposure leads to reduction of the overall speed of both opener and non-opener animals in the first day of test. When taking into account the different regions of the apparatus, our data revealed that opener rats showed increased average speed in the door zone (Con-OP: 4.68 ± 1.58 , Con-NP: 3.6 ± 0.35 , RSV-OP: 4.51 ± 0.56 , RSV-NP: 2.26 ± 0.35 , VPA-OP: 4.32 ± 0.68 , VPA-NP: 1.55 ± 0.22 , VPA + RSV-OP: 2.04 ± 0.34 , VPA + RSV-NP: 1.56 ± 0.29 , $p < 0.001$, Fig. 4B). There is also an effect of VPA and RSV treatments ($p < 0.001$ and $p = 0.003$, respectively). We also identified differences in average speed in the door zone of opener rats from RSV and VPA groups, compared to the VPA + RSV group ($p < 0.001$ and $p = 0.017$, respectively) and non-opener rats from the VPA and VPA + RSV groups, compared to the Control group ($p < 0.001$). Openers also showed an elevated average speed in the inner zone (Con-OP: 4.47 ± 1.44 , Con-NP: 4.44 ± 0.52 , RSV-OP: 5.08 ± 1.07 , RSV-NP: 2.46 ± 0.75 , VPA-OP: 4.84 ± 0.44 , VPA-NP: 1.92 ± 0.17 , VPA + RSV-OP: 2.80 ± 0.54 , VPA + RSV-NP: 2.14 ± 0.38 , $p < 0.001$, Fig. 4C). There is also an effect of VPA treatment, regardless of RSV treatment or opener outcome ($p = 0.003$). We also identified differences in non-opener rats from RSV and VPA when compared to the Control group ($p = 0.002$, $p < 0.001$, respectively). Nonetheless, there were no significant differences between groups in the percentages of distance travelled in the door or inner zones (Supplementary Fig. 4A and 4B). Interestingly, animals exposed to VPA (regardless of RSV treatment or opener outcome) show a reduction in the distance travelled in the door zone (VPA effect, $p = 0.017$, Supplementary Fig. 4A), suggesting a possibly reduced investigation of the restrainer door in the first day of test.

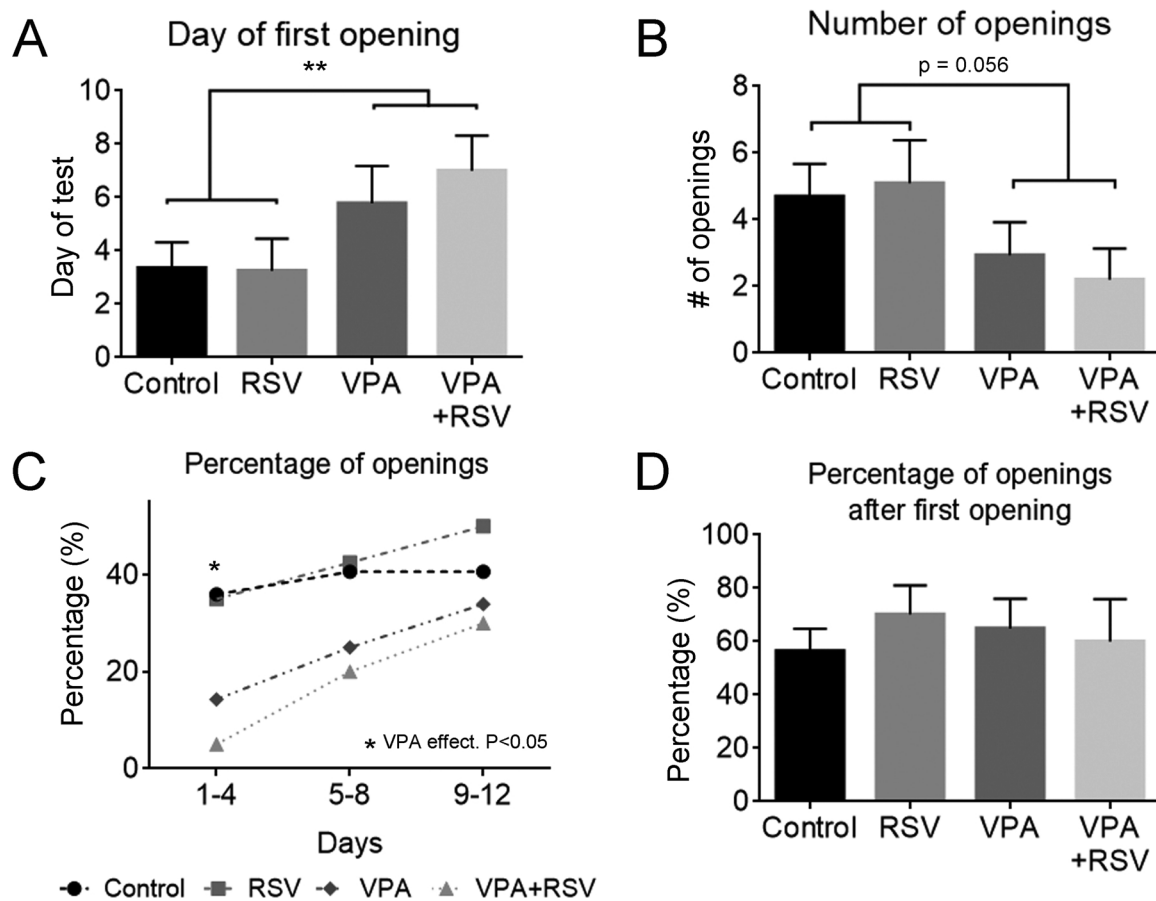


Fig. 2. Prenatal exposure to VPA hinders the timely manifestation of empathy-like behaviour. The day of first opening is delayed (A) and total number of openings shows a tendency towards reduction (B) in animals prenatally exposed to VPA (regardless of treatment with RSV). VPA leads to a diminished percentage of openings on days 1–4 of test, but does not affect the percentage of openings in the later days of test (C) or the percentage of openings after the day of first opening (D). Control $n = 16$, RSV $n = 10$, VPA $n = 14$, VPA + RSV $n = 10$. In “D”, Control $n = 14$, RSV $n = 8$, VPA $n = 9$, VPA + RSV $n = 7$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

The analysis of time spent in the door zone revealed that opener rats from Control group presented an increase in the percentage of time spent in the door zone compared to non-opener rats of the same experimental groups ($p = 0.004$). On the other hand, opener animals of the VPA and VPA + RSV groups showed a reduced percentage of time spent in the door zone compared to non-openers of the same group ($p = 0.029$ and $P = 0.005$, respectively, Supplementary Fig. 4C). Conversely, there was no significant differences between groups in the time spent in the inner zone (Supplementary Fig. 4D) nor total distance travelled (Supplementary Fig. 4E).

The previous data indicated important differences between groups that persisted not only on the first day of opening but also on the first day of test (Figs. 3A and B and 4 A–C, respectively). Therefore, we investigated a correlation between parameters of the first day of test and the opener outcome. We found an important positive correlation between opening the restrainer in the first day of test and the opener outcome ($p = 0.004$), with a relative risk (Exp (B)) of 4.83. In addition, our data revealed a significant positive correlation between the average speed and the opener outcome ($p = 0.024$, (Exp (B)) = 1.351), with the correlation also maintained in the door zone ($p = 0.021$, (Exp (B)) = 1.545), and inner zone ($p = 0.022$, (Exp (B)) = 1.436) (Table 1).

4. Discussion

The ability to understand another’s feelings and perceptions, and the desire to improve the well-being of others, is crucial for successful social interactions and the survival of social groups [12]. Thus, empathy is an integral part of social behaviour. Individuals within the

autism spectrum show impairments in social interaction and communication and are usually thought to present an altered experience or expression of empathy. Cognitive empathy (the ability to understand what others are feeling or thinking) appears to be primarily impaired in those with ASD, while affective empathy (the capacity to share other people’s feelings while understanding they are different from one’s own) is either preserved [14,21,27] or impaired only when emotions of negative valence are involved [32].

Although empathy is a complex behaviour in humans, simplified models could be useful to investigate the behavioural and neural processes that constitute the primal emotional foundation of empathy [34]. In the past years, rodents have been recognized as a reliable model to study empathy-like pro-social behaviour and new experimental protocols have been developed [23,39]. In the present work, we proposed to use one of these new methods to evaluate pro-social behaviour in the animal model of autism induced by VPA. We showed that VPA animals are able to open a restrainer to release a trapped conspecific, and continue to do so at the same frequency as controls once they learn this behaviour. This suggests that VPA rats also present pro-social behaviour and take action to alleviate the suffering of another animal in distress.

Interestingly, rats of the VPA and VPA + RSV groups showed a delay in the expression of this helping behaviour, opening the restrainer for the first time on average 3 days later than Controls. Thus, it is possible that VPA animals are less able to express an adequate response to the distress of the trapped animal. This is supported by a study using the BTBR T (+) Itpr3(tf)/J mouse model of autism, in which mice successfully recognize stress in a conspecific, but fail to express the typical response (increased social interaction with the stressed mouse)

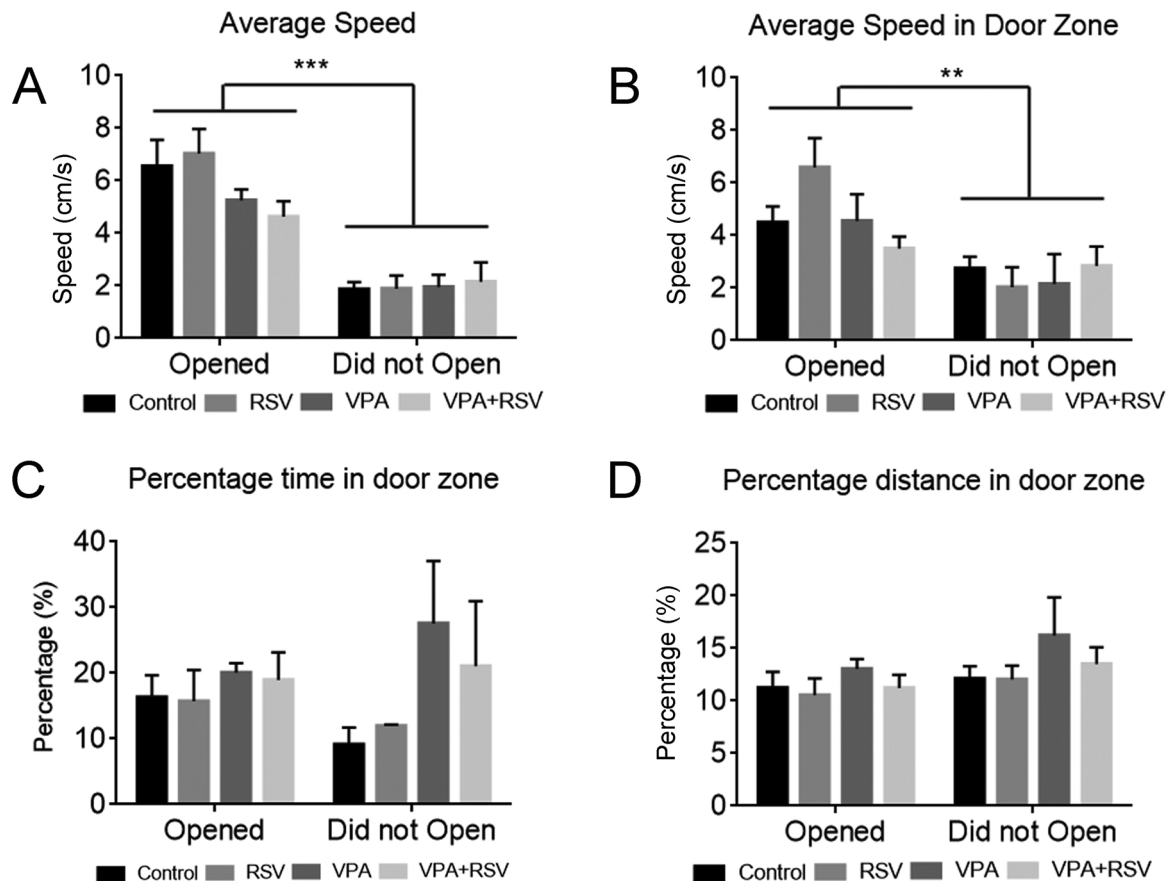


Fig. 3. The speed of animals during the day of first opening is higher compared to littermates that were unable to open the apparatus. We evaluated the behaviour of 2 animals of the same litter on the day of first opening of one of them. Animals were excluded from this analysis if both animals opened the apparatus on the same day. On the day of first opening, rats moved faster in the entire apparatus (A) and in the door zone (B) compared to littermates that did not open the apparatus on that day (regardless of treatment). However, there are no differences in the percentage of time spent in the door zone (C) or percentage of distance travelled in the door zone (D). Opened: Control n = 7, RSV n = 3, VPA n = 4, VPA + RSV n = 4. Did not open: Control n = 7, RSV n = 3, VPA n = 4, VPA + RSV n = 4 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

[33]. An intriguing hypothesis is that the emotional response of animal models of autism is abnormal. Indeed, both VPA rats and BTRB mice show impaired emotional learning in a fear conditioning task [4,31], indicating alterations in their neural processing of emotions. An alternative explanation for the delay of VPA animals to open the restrainer is that they have an impaired communication and, as a consequence, show difficulties to recognize that the trapped animal is in distress. In that case, it is likely that ultrasonic vocalizations emitted by the rat in the restrainer would be essential to communicate its distress [25]. It is possible that VPA animals do not recognize this call, since they present an aberrant pattern of ultrasonic vocalization in situations of stress [26] and an altered auditory processing of these vocalizations [17]. Animals

exposed to VPA could also have decreased attention towards the restrainer or reduced motivation to interact with it. Our data shows no differences between groups in the time spent near the door or other regions of the apparatus, indicating that exploration of the apparatus seems to be similar between groups. However, our behavioural paradigm does not allow for the direct assessment of attention or motivation.

Anxiety is a major comorbidity in ASD with a prevalence in individuals with autism that varies from 42% to 79%, which is significantly higher than the general population [22]. Anxiety is also widely identified in animal models of autism, including the VPA model [15]. Therefore, anxious behaviour of rats exposed to VPA could

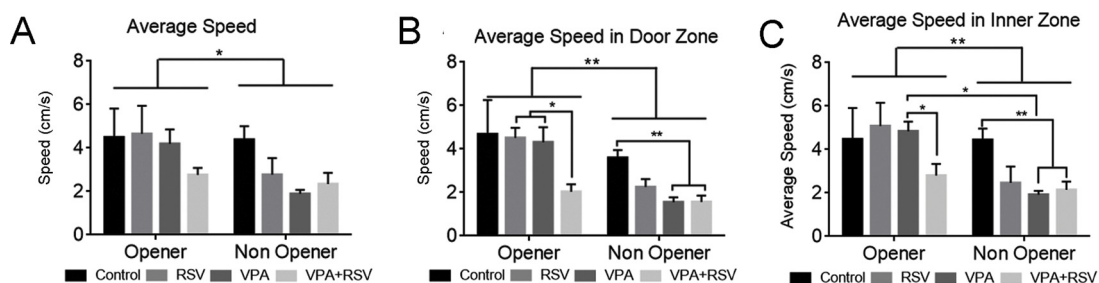


Fig. 4. Opener animals move faster than non-openers on the first day of test. Opener and non-openers present a significant difference in the average speed (A) speed in the door zone (B) and speed in the Inner zone (C) on the first day of test. There is also a significant effect of VPA treatment, causing reduced average speed (regardless of RSV treatment or opener outcome). VPA effect: $p < 0.01$ in A and C and $p < 0.001$ in B. Openers: Control n = 7, RSV n = 4, VPA n = 4, VPA + RSV n = 2. Non-openers: Control n = 9, RSV n = 6, VPA n = 10, VPA + RSV n = 8 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 1
Correlation between parameters of the first day of test and the opener outcome.

Parameter of the first day	Relative risk – Exp (B)	p-value
Average speed	1.351	0.024 [*]
Average speed in door zone	1.545	0.021 [*]
Average speed in inner zone	1.436	0.022 [*]
Distance travelled	1	0.866
Percentage distance in inner zone	1.050	0.419
Percentage distance in door zone	1.015	0.834
Percentage time in inner zone	1.021	0.327
Percentage time in door zone	0.991	0.757
Releasing trapped animal	4.83	0.004 ^{**}

Average speed and releasing the trapped animal on the first day of test are positively correlated with the opener outcome.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

hamper the initial interaction with the restrainer and result in a delayed first opening. In fact, animals exposed to VPA showed a significant reduction in the distance travelled in the door zone in the first day of test (Supplementary Fig. 4A), which could reflect an effect of different levels of anxiety. Our behavioural paradigm does not allow for the direct evaluation of anxiety during the test. Studying the impact of anxiety on the expression of pro-social behaviour could be a focus of future research.

Empathy-like behaviours in animals can be a very complex social phenomenon. The degree of affiliation between rats likely modulates this behaviour, and may involve complex cognitive processes [11,34]. Rats have a natural tendency (not conditioned) to express empathy-like behaviours [6,45]. In humans, observation of other people's states activates many of the same motor, sensory and limbic brain regions involved in experiencing this state in of itself [24,35]. Studies have shown that the anterior cingulate cortex (ACC), medial orbitofrontal cortex (mOFC) and medial prefrontal cortex (mPFC), might be related to social behaviours associated with the perception of others' feelings and empathy in both rats and humans [36]. In order to express pro-social behaviours, animals and humans also likely need to combine information of different sensory modalities over time [11,40]. The VPA model shows deficits in somatosensory processing that are prevented by RSV [16]. Therefore, it is unlikely that the delayed expression of empathy-like behaviour in VPA animals is caused by impaired primary sensorial processing. However, it is possible that integration of the sensorial information in other cognitive process could be affected. Indeed, there are many reports suggesting impairments in decision making processes in ASD [29,42] due, at least in part, to a reduced tendency to incorporate emotional information [47]. Therefore, the deficits seen in VPA animals in the present work might be reflecting alterations in cognitive processes such as the integration of sensory information in the decision making process and the interpretation of emotional states.

In our analyses, we also investigated which parameters were associated with the act of opening the restrainer. We found that on the day of opening, animals moved faster compared to littermates that did not open the apparatus. In the first day of test, this increased speed was also present in the group of animals that later became openers when compared to non-openers. Thus, it seems that animals that actively investigate the restrainer, moving faster during the duration of the test, have a higher propensity to open the apparatus. Specifically, a generalized linear model detected a significant association between the opener outcome and average speed, average speed in the door zone and average speed in the inner zone in the first day of test (35%, 54% and 44%-increased odds, respectively). In the same analysis, we found that animals that opened the apparatus on the first day of test had a higher chance of becoming an opener (383%-increased odds). This result suggests that learning to release the trapped animal early, specifically on the first day of test, impacts the later manifestation of this behaviour. However, whether this result is a cause or consequence of this

behaviour is not clarified by our approach.

Finally, prenatal RSV treatment showed no significant effect with regards to preventing the deficits of empathy-like behaviour in VPA animals. Since RSV can prevent social impairments in the VPA model of autism [3,20], the pro-social behaviour evaluated in our paradigm could require a different neural substrate, indicating that social and empathy-like behaviours are distinct from one another. According to our results, it is also possible that VPA does not directly affect circuits related to empathy, but modulates processes such as decision-making or anxiety, which may not be affected by RSV. We also cannot rule out that dose and treatment regimen of RSV are not enough to show any beneficial effect on empathy.

5. Conclusions

In conclusion, we investigated empathy-like pro-social behaviour in an animal model of autism for the first time. We showed that VPA hinders the timely manifestation of empathy-like behaviour, but does not affect the continuation of this behaviour after its first expression. Moreover, learning to release a conspecific from the restrainer seemed to be facilitated by being able to open the apparatus in the first day of test and by higher speeds in this same day. Further investigation of empathy-like behaviour in the VPA model and in other models of autism could help to clarify the behavioural and neural processes underpinning the basic aspects of empathy alterations in autistic individuals.

Funding and disclosure

This work was supported by the National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation—INCT-NIM #465489/2014-1; National Council of Technological and Scientific Development (CNPq); Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Clinical Hospital of Porto Alegre (FIPE-HCPA), PROPEQS-UFRGS.

Prof Gottfried and Dr Bambini-Junior would like to disclose they are inventors of a patent related to the methodology used in this work, however they do not own it (it is deposited and owned by the Universidade Federal do Rio Grande do Sul), and would not have any financial benefit from it. All other authors declare no potential conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank the statistical support group from the HCPA, the engineering group from HCPA for the technical drawings for building the restrainers, Fluxome (Stenløse, Denmark) for the generous gift of resveratrol, and the online infographic maker, Mind the Graph (attribution share-alike 4.0 licensing) for the templates of schematic figures.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.01.034>.

References

- [1] APA, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, American Psychiatric Association, 2013.
- [2] V. Bambini-Junior, L. Rodrigues, G.A. Behr, J.C. Moreira, R. Riesgo, C. Gottfried, Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters, *Brain Res.* 1408 (2011) 8–16.
- [3] V. Bambini-Junior, G. Zanatta, G. Della Flora Nunes, G. Mueller de Melo, M. Michels, M. Fontes-Dutra, V. Nogueira Freire, R. Riesgo, C. Gottfried, Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid, *Neurosci. Lett.* 583 (2014) 176–181.
- [4] A. Banerjee, C.T. Engineer, B.L. Sauls, A.A. Morales, M.P. Kilgard, J.E. Ploski,

- Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero, *Front. Behav. Neurosci.* 8 (2014) 387.
- [15] S. Baron-Cohen, S. Wheelwright, The empathy quotient: an investigation of adults with Asperger syndrome or high functioning autism, and normal sex differences, *J. Autism Dev. Disord.* 34 (2004) 163–175.
- [16] I. Ben-Ami Bartal, J. Decety, P. Mason, Empathy and pro-social behavior in rats, *Science* 334 (2011) 1427–1430.
- [17] I. Ben-Ami Bartal, D.A. Rodgers, M.S. Bernardez Sarria, J. Decety, P. Mason, Pro-social behavior in rats is modulated by social experience, *eLife* 3 (2014) e01385.
- [18] C.T. Chiu, Z. Wang, J.G. Hunsberger, D.M. Chuang, Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder, *Pharmacol. Rev.* 65 (2013) 105–142.
- [19] J. Christensen, T.K. Gronborg, M.J. Sorensen, D. Schendel, E.T. Parner, L.H. Pedersen, M. Vestergaard, Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism, *JAMA* 309 (2013) 1696–1703.
- [20] R.M. Church, Emotional reactions of rats to the pain of others, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 52 (1959) 132–134.
- [21] F.B. de Waal, Putting the altruism back into altruism: the evolution of empathy, *Annu. Rev. Psychol.* 59 (2008) 279–300.
- [22] J. Decety, M. Svetlova, Putting together phylogenetic and ontogenetic perspectives on empathy, *Dev. Cogn. Neurosci.* 2 (2012) 1–24.
- [23] U. Dimberg, M. Thunberg, Empathy, emotional contagion, and rapid facial reactions to angry and happy facial expressions, *Psych J.* 1 (2012) 118–127.
- [24] I. Dziobek, K. Rogers, S. Fleck, M. Bahnemann, H.R. Heekeren, O.T. Wolf, A. Convit, Dissociation of cognitive and emotional empathy in adults with Asperger syndrome using the Multifaceted Empathy Test (MET), *J. Autism Dev. Disord.* 38 (2008) 464–473.
- [25] M.R. Favre, T.R. Barkat, D. Lamendola, G. Khazen, H. Markram, K. Markram, General developmental health in the VPA-rat model of autism, *Front. Behav. Neurosci.* 7 (2013) 88.
- [26] M. Fontes-Dutra, J. Santos-Terra, I. Deckmann, G. Brum Schwingel, G. Della-Flora Nunes, M.M. Hirsch, G. Bauer-Negrini, R.S. Riesgo, V. Bambini-Junior, C. Hedin-Pereira, C. Gottfried, Resveratrol prevents cellular and behavioral sensory alterations in the animal model of autism induced by valproic acid, *Front. Synaptic Neurosci.* 10 (2018) 9.
- [27] M.J. Gandall, J.C. Edgar, R.S. Ehrlichman, M. Mehta, T.P. Roberts, S.J. Siegel, Validating gamma oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism, *Biol. Psychiatry* 68 (2010) 1100–1106.
- [28] D.H. Geschwind, Advances in autism, *Annu. Rev. Med.* 60 (2009) 367–380.
- [29] C. Gottfried, V. Bambini-Junior, F. Francis, R. Riesgo, W. Savino, The impact of neuroimmune alterations in autism spectrum disorder, *Front. Psychiatry* 6 (2015) 121.
- [30] M.M. Hirsch, I. Deckmann, M. Fontes-Dutra, G. Bauer-Negrini, G. Della-Flora Nunes, W. Nunes, B. Rabelo, R. Riesgo, R. Margis, V. Bambini-Junior, C. Gottfried, Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA, *Food Chem. Toxicol.* 115 (2018) 336–343.
- [31] A.P. Jones, F.G. Happe, F. Gilbert, S. Burnett, E. Viding, Feeling, caring, knowing: different types of empathy deficit in boys with psychopathic tendencies and autism spectrum disorder, *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Disc.* 51 (2010) 1188–1197.
- [32] R. Kent, E. Simonoff, Prevalence of Anxiety in Autism Spectrum Disorders, (2017).
- [33] S. Keum, H.S. Shin, Rodent models for studying empathy, *Neurobiol. Learn. Mem.* 135 (2016) 22–26.
- [34] C. Keysers, J.H. Kaas, V. Gazzola, Somatosensation in social perception, *Nat. Rev. Neurosci.* 11 (2010) 417–428.
- [35] E.J. Kim, E.S. Kim, E. Covey, J.J. Kim, Social transmission of fear in rats: the role of 22-kHz ultrasonic distress vocalization, *PLoS One* 5 (2010) e15077.
- [36] H.Y. Kuo, F.C. Liu, Valproic acid induces aberrant development of striatal compartments and corticostriatal pathways in a mouse model of autism spectrum disorder, *FASEB J.* 31 (2017) 4458–4471.
- [37] P.L. Lockwood, G. Bird, M. Bridge, E. Viding, Dissecting empathy: high levels of psychopathic and autistic traits are characterized by difficulties in different social information processing domains, *Front. Hum. Neurosci.* 7 (2013) 760.
- [38] W. Loscher, Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy, *CNS Drugs* 16 (2002) 669–694.
- [39] L. Luke, I.C. Clare, H. Ring, M. Redley, P. Watson, Decision-making difficulties experienced by adults with autism spectrum conditions, *Autism* 16 (2012) 612–621.
- [40] D.F. Mabunga, E.L. Gonzales, J.W. Kim, K.C. Kim, C.Y. Shin, Exploring the validity of valproic acid animal model of autism, *Exp. Neurobiol.* 24 (2015) 285–300.
- [41] P. MacPherson, R. McGaffigan, D. Wahlsten, P.V. Nguyen, Impaired fear memory, altered object memory and modified hippocampal synaptic plasticity in split-brain mice, *Brain Res.* 1210 (2008) 179–188.
- [42] M. Mazza, M.C. Pino, M. Mariano, D. Tempesta, M. Ferrara, D. De Berardis, F. Masedu, M. Valenti, Affective and cognitive empathy in adolescents with autism spectrum disorder, *Front. Hum. Neurosci.* 8 (2014) 199.
- [43] K. Meyza, T. Nikolaev, K. Kondrakiewicz, D.C. Blanchard, R.J. Blanchard, E. Knapka, Neuronal correlates of asocial behavior in a BTBR T (+) Itr3(tf)/J mouse model of autism, *Front. Behav. Neurosci.* 9 (2015) 199.
- [44] K.Z. Meyza, I.B. Bartal, M.H. Monfils, J.B. Panksepp, E. Knapka, The roots of empathy: through the lens of rodent models, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 76 (2017) 216–234.
- [45] P. Molenberghs, R. Cunnington, J.B. Mattingley, Brain regions with mirror properties: a meta-analysis of 125 human fMRI studies, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36 (2012) 341–349.
- [46] T.J. Mony, M. Hong, H.J. Lee, Empathy study in rodent model of autism Spectrum disorders, *Psychiatry Investig.* 15 (2018) 104–110.
- [47] S.J. Moore, P. Turnpenny, A. Quinn, S. Glover, D.J. Lloyd, T. Montgomery, J.C. Dean, A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes, *J. Med. Genet.* 37 (2000) 489–497.
- [48] C. Onore, M. Careaga, P. Ashwood, The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism, *Brain Behav. Immun.* 26 (2012) 383–392.
- [49] J. Panksepp, J.B. Panksepp, Toward a cross-species understanding of empathy, *Trends Neurosci.* 36 (2013) 489–496.
- [50] D. Raposo, J.P. Sheppard, P.R. Schrater, A.K. Churchland, Multisensory decision-making in rats and humans, *J. Neurosci.* 32 (2012) 3726–3735.
- [51] G.E. Rice, P. Gainer, "Altruism" in the albino rat, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55 (1962) 123–125.
- [52] S. Robic, S. Sonie, P. Fonlupt, M.A. Henaff, N. Touil, G. Coricelli, J. Mattout, C. Schmitz, Decision-making in a changing world: a study in autism spectrum disorders, *J. Autism Dev. Disord.* 45 (2015) 1603–1613.
- [53] P.M. Rodier, J.L. Ingram, B. Tisdale, V.J. Croog, Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism, *Reprod. Toxicol.* 11 (1997) 417–422.
- [54] K.M. Rump, J.L. Giovannelli, N.J. Minshew, M.S. Strauss, The development of emotion recognition in individuals with autism, *Child Dev.* 80 (2009) 1434–1447.
- [55] N. Sato, L. Tan, K. Tate, M. Okada, Rats demonstrate helping behavior toward a soaked conspecific, *Anim. Cogn.* 18 (2015) 1039–1047.
- [56] T. Schneider, R. Przewlocki, Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism, *Neuropsychopharmacology* 30 (2005) 80–89.
- [57] P. Shah, C. Catmur, G. Bird, Emotional decision-making in autism spectrum disorder: the roles of interoception and alexithymia, *Mol. Autism* 7 (2016) 43.
- [58] R. Tyzio, R. Nardou, D.C. Ferrari, T. Tsintsadze, A. Shahrokhi, S. Eftekhari, I. Khalilov, V. Tsintsadze, C. Brouchoud, G. Chazal, E. Lemonnier, N. Lozovaya, N. Burnashev, Y. Ben-Ari, Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring, *Science* 343 (2014) 675–679.
- [59] H. Walter, Social cognitive neuroscience of empathy: concepts, circuits, and genes, *Emot. Rev.* 4 (2012).

CAPÍTULO IV

HIPEREXCITABILIDADE TRANSMISSÃO SINÁPTICA INIBITÓRIA

CORTICAL:

Resultados preliminares

HIPEREXCITABILIDADE E TRANSMISSÃO SINÁPTICA INIBITÓRIA CORTICAL

1. Introdução

Muitos estudos atualmente focam nas alterações na inibição como causa primária do desbalanço entre excitação e inibição no TEA (Banerjee et al., 2012; Casanova et al., 2003; Coghlan et al., 2012; Hoshino, 2012; Lin et al., 2013a; Rubenstein, J.L.R & Merzenich, 2003; Selby et al., 2007; Zikopoulos and Barbas, 2013). O presente trabalho mostrou alterações importantes na organização cortical da área somatossensorial primária de roedores expostos ao VPA no período pré-natal, com destaque para a localização anormal dos interneurônios GABAérgicos que expressam parvalbumina (PV⁺). Esta anormalidade de localização dos interneurônios PV⁺ e as alterações comportamentais sensoriais induzidas pelo VPA foram ambas prevenidas pela administração de RSV (Fontes-Dutra et al., 2018).

Uma vez que os interneurônios PV⁺ apresentaram uma disposição anormal nas camadas corticais da área somatossensorial primária do modelo VPA, nossa hipótese foi que as sinapses inibitórias sobre as células piramidais das diferentes camadas corticais estejam alteradas, levando à hiperexcitabilidade e a prejuízos no processamento das informações sensoriais, que podem estar relacionadas com as alterações comportamentais observadas no modelo VPA.

Portanto, o presente capítulo apresenta o estudo do padrão eletrofisiológico *in vivo* do modelo animal VPA, bem como o estudo da transmissão sináptica inibitória cortical em fatias cerebrais destes animais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e Cálculo do Tamanho Amostral

Foram utilizados ratos Wistar alocados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), nascidos de genitores adquiridos de fornecedores cadastrados junto ao HCPA (CREAL). Os genitores de 45-60 dias, no caso das fêmeas e 60-90 dias, no caso dos machos (94 fêmeas e 15 machos) passaram por um período de aclimação/quarentena de 15 dias antes do início dos procedimentos experimentais. Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*, sendo colocados no máximo quatro animais por caixa (machos ficarão separados das fêmeas) e mantidos em ambiente climatizado (22°C ± 2°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, bem como em condições padrão de umidade (40-60%).

O pareamento de machos e fêmeas (duas fêmeas para cada macho) ocorreu durante 12 horas do ciclo escuro. Na manhã seguinte, os animais foram separados e a

fecundação foi verificada através do uso de uma solução salina aplicada e subsequentemente recolhida do canal vaginal das ratas, seguida da investigação em lâmina sob microscópio para a presença de espermatozoides no fluido vaginal. Após a confirmação da cópula, fêmeas prenhes foram mantidas em duplas até o 18º dia de gestação, seguido por alojamento em gaiolas individuais até o nascimento da prole.

Os tratamentos a seguir descritos foram aplicados às ratas prenhes. O modelo consiste na injeção intraperitoneal de 600 mg/Kg de solução de valproato de sódio (250 mg/mL) diluído em solução salina (NaCl 0,9%) no dia 12,5 de gestação, como previamente descrito (Bambini-Junior et al., 2011). Aos grupos controle, somente a salina foi aplicada. Dois grupos receberam, via a administração subcutânea, 3,6 mg/Kg de RSV (Bambini-Junior et al., 2014) dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) entre os dias embrionários 6,5 e 18,5 (E6,5 e E18,5), formando assim os quatro grupos experimentais:

Grupo controle: administração IP de salina no dia E12,5 e tratamento com DMSO dos dias E6,5 a E18,5. A proporção de DMSO foi dada é equivalente à do RSV. Uma vez que a administração de RSV é o valor, em uL, equivalente a 10% do peso do animal, a dose de DMSO seguiu a mesma proporção, via subcutânea (SC). Ex.: para um animal controle no dia E7,5, pesando 300 g, foi administrado 30 uL de DMSO.

Grupo VPA: administração IP de VPA no dia E12,5, na dose de 250 mg/mL ou 600 mg/kg. Para um rato em torno de 300g, o volume, em uL, seria de 720 uL (exemplo).

Grupo RSV: administração SC de RSV na dose 3,6 mg/kg dissolvido em DMSO. Ex.: para um animal RSV no dia E7,5, pesando 300 g, foi administrado 30 uL de RSV.

Grupo RSV+VPA: administração IP de VPA no dia E12,5 e administração SC de RSV dos dias E6,5 ao E18,5. Ex.: para um animal de 300 g no dia E12,5, foi administrado 30 uL de RSV (10% do peso) via SC e 720 uL de VPA, via IP.

Estudos epidemiológicos mostram que a incidência do TEA é maior no sexo masculino e a utilização de ambos os sexos poderia gerar um viés na obtenção dos resultados, uma vez que muitas alterações moleculares encontradas no TEA podem ser diferentes dependendo do sexo. Sendo assim, somente filhotes machos foram utilizados em nossos estudos. Após a finalização de todos os pareamentos e a obtenção do número amostral, os genitores machos foram eutanasiados após o nascimento do número de filhotes machos necessários para o estudo. As genitoras fêmeas, bem como os filhotes fêmeas foram eutanasiadas 21 dias após o nascimento dos filhotes. As eutanásias foram por meio de dose letal de isoflurano (6-9%). A prole macho foi eutanasiada conforme os protocolos experimentais a seguir.

2.2. Eletrofisiologia *in vivo*

Para avaliar o padrão eletroencefalográfico, os animais (P30) dos grupos Controle (n=5), RSV (n=5), VPA (n=10) e RSV+VPA (n=6) foram implantados com eletrodos subdurais para a realização de registros de vídeo-eletroencefalograma (vídeo-EEG). Os animais serão anestesiados (cetamina 100mg/kg: xilazina 10mg/kg i.p, com adição de tramadol 20mg/kg ou morfina 3mg/kg como analgésico à mistura, quando necessário) disponível em: <http://www.research.psu.edu/arp/anesthesia/injectable-anesthesia>), com as doses preconizadas pelo CONCEA. Desde a anestesia e durante todo o procedimento de implantação dos eletrodos os animais foram mantidos aquecidos e seus olhos foram protegidos contra ressecamento com uso de lubrificante.

2.2.1. Cirurgia e implantação dos eletrodos

Para implantação dos eletrodos, cada animal foi anestesiado com uma dose fixa inalatória de isoflurano, a qual foi mantida por todo o procedimento. Uma dose de sulfato de morfina foi administrada imediatamente após a entrada no plano anestésico do animal. Após a verificação da perda do reflexo de dor e, confirmado o plano anestésico pelo padrão ventilatório, o animal foi cuidadosamente posicionado em um aparelho estereotáxico e o crânio foi exposto por incisão com um bisturi na região dorsal central da cabeça, com infiltração local de bupivacaína 5 mg/kg com vasoconstritor (adrenalina). Quatro pequenas aberturas foram realizadas no crânio com o auxílio de uma broca odontológica seguindo coordenadas pré-determinadas. Dois eletrodos subdurais de registro de aço inox (diâmetro=1mm) foram colocados sob o córtex parietal bilateralmente (Bregma -4,16mm, $\pm 3,0$ mm lateral e profundidade DV $\pm 3,0$ mm) (Paxinos and Watson, 1997). O eletrodo de referência foi colocado no osso occipital. Dois parafusos foram inseridos na parte ventral e dorsal do crânio para fixação e aterramento. Os eletrodos foram fixados com cimento acrílico dentário. Ao final deste procedimento (duração de 20 -30 min) o animal foi retirado do estereotáxico. Foram administrados analgésicos e anti-inflamatórios (Dipirona 300 mg/Kg imediatamente após o procedimento, Sulfato de Morfina 2,5 mg/kg, 4h após o procedimento, com dose repetida quando necessário, Tramadol 20 mg/kg i.p. 24h após o procedimento, por 7 dias) e antibiótico quando necessário (Enrofloxacino, 5 mg/kg 1x ao dia por 5 dias, via subcutânea, indicado pela UEA HCPA).

Os animais foram alocados individualmente em caixas-moradia e foram monitorados até o fim do efeito da anestesia e durante os dias seguidos e os dias de registro. Os procedimentos acima citados foram realizados na sala de cirurgia da UEA HCPA. Sete dias após o implante dos eletrodos, os animais foram transferidos em caixas arejadas e protegidas do ambiente externo, pelo pesquisador, para a sala de registro de Eletrofisiologia *in vivo* do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os

registros de vídeo-EEG foram realizados em cada animal individualmente através de um sistema de aquisição de sinais e amplificador (MAP-32, Plexon Inc.), onde os eletrodos foram conectados e registrados no período de 6h/d em dias alternados durante 30 dias, no turno da tarde (Média de dias de registro por grupo: Controle: $1,8 \pm 1,09$; RSV: $2,6 \pm 1,81$; VPA: $4,2 \pm 1,68$; RSV+VPA: $2,6 \pm 0,81$). Os dados dos registros foram filtrados, digitalizados e armazenados juntamente com os vídeos para posterior análise comportamental e dos padrões do EEG.

Após os 30 dias, os animais foram decapitados sob guilhotina com anestesia de cetamina (300 mg/Kg) e xilasina (40 mg/Kg), e o encéfalo foi extraído para confirmação de que os eletrodos não entraram perfuraram a superfície do tecido nervoso.

2.3. Eletrofisiologia *in vitro*

Cada animal (P30 a P60), oriundo dos grupos experimentais Controle, RSV, VPA e RSV+VPA, foi conduzido ao laboratório de eletrofisiologia *in vitro* do Departamento de Bioquímica-UFRGS onde foi eutanasiado sob decapitação por guilhotina, de acordo com a “RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 20 DE SETEMBRO DE 2013, 8.2.4”. A técnica de registro por eletrofisiologia *in vitro* foi realizada pela doutoranda Joseane Marafiga, orientanda da Profa. Dra. Maria Elisa Calcagnotto. O encéfalo removido foi rapidamente submerso numa solução de líquido cefalorraquidiano artificial de corte (LCRAc), oxigenada e mantida a 4°C contendo 220 mM de sacarose, 3 mM de KCl, 1,25 mM de NaH₂PO₄, 2 mM de MgSO₄, 26 mM de NaHCO₃, 2 mM de CaCl₂ e 10 mM de dextrose (295-305 mOsm). As fatias foram cortadas em um vibrátomo (VTS-1000, Leica, Alemanha), obtendo-se cortes de espessura de 300 µm. As fatias foram imediatamente transferidas para um recipiente contendo solução LCRA de registro (LCRAr) oxigenada composta de 124 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 1,25 mM de NaH₂PO₄, 2 mM de MgO₄, 26 mM de NaHCO₃, 2 mM de CaCl₂ e 10 mM de dextrose (295-305 mOsm). Os cortes permaneceram nesta solução a uma temperatura de 37°C por 45 minutos e, posteriormente, foram mantidos à temperatura ambiente até o registro. Para cada experimento uma fatia foi transferida individualmente para uma câmara de submersão onde os registros eletrofisiológicos foram realizados. As correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) foram registradas por *patch-clamp* no modo *voltage-clamp*, em neurônios piramidais visualizados por sistema de vídeo microscopia com contraste diferencial de interferência (IR-DIC). Os eletrodos utilizados para a técnica de *patch-clamp* foram preenchidos com (em mM): 117.5 Cs-Gluconato, 11 CsCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 11 EGTA, 2 Na₂ATP, 0,5 Na₂GTP, e 1,25 QX-314 (285–290 mOsm, pH 7.2). Os eletrodos utilizados para a técnica de *patch-clamp* foram preenchidos com (em mM): 117.5 Cs-Gluconato, 11 CsCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 11 EGTA, 2 Na₂ATP, 0,5 Na₂GTP,

e 1,25 QX-314 (285–290 mOsm, pH 7.2). Para os registros das CIPS espontâneas (CIPSS), a fatia foram perfundida com LCRAr contendo ácido quinurênico (Sigma-Aldrich®), e em seguida para o registro das CIPS miniaturas (CIPSm), foi adicionado 1 μ M de tetrodotoxina (TTX, Interprise®). Estes registros foram realizados de acordo com protocolo descrito previamente (Calcagnotto et al., 2005, Cobos et al., 2005)). Voltagem e corrente foram registradas usando o amplificador Multiclamp 700B (Molecular Devices). Frequência, amplitude e cinética das CIPS foram avaliadas pelo software Minianalysis 6.0.

2.4. Análise estatística

A análise do vídeo-EEG foi realizada utilizando o teste qui-quadrado e, para a análise das CIPS, foi realizada através da análise de variâncias (ANOVA) de duas vias, considerando as administrações VPA e RSV como fatores. A múltipla comparação entre grupos foi realizada utilizando o teste de Tukey. Para toda as análises, foi considerado um $p < 0,05$ para diferenças estatisticamente significativas.

3. Resultados

3.1. Eletrofisiologia *in vivo*

A avaliação dos dados do vídeo-EEG mostrou a presença de episódios de descargas de ondas lentas de aproximadamente 5 a 6 Hz, na área somatossensorial primária, associadas à parada comportamental observadas durante os períodos de vigília em 4 dos 10 animais (40%) VPA registrados. Estas alterações não foram vistas nos controles, nos animais do grupo RSV e nem nos animais VPA que receberam RSV que foram analisados até o presente momento ($p < 0,0001$), (Figura 1A), A média de eventos foi de $7,25 \pm 5,05$ por animal ao longo de uma média de 20 horas de registro. A Figura 1B mostra um traçado de EEG ilustrativo de uma animal VPA e de um animal VPA tratado com RSV. O tratamento pré-natal com RSV foi capaz de prevenir as alterações no traçado de ondas lentas observadas no grupo VPA.

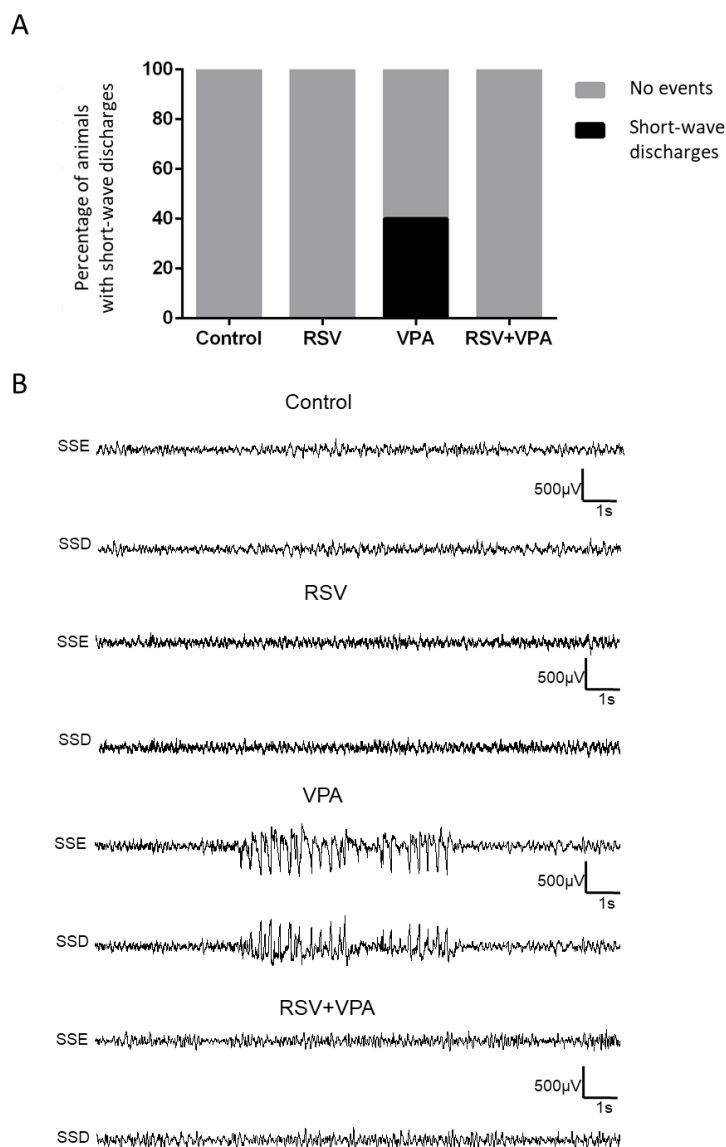


Figura 1: Porcentagem de descargas de ondas lentas de 5 a 6 Hz durante a vigília nos grupos experimentais VPA. A, porcentagem de animais que apresentaram eventos de ondas lentas, nControl=5, nRSV=5, nVPA=10, nRSV+VPA=6. B, traçado de EEG ilustrativo da atividade de ondas lentas no grupo VPA, com a prevenção pelo tratamento pré-natal com RSV no grupo RSV+VPA. SSE: área somatossensorial esquerda, SSD: Área somatossensorial direita

3.2. Eletrofisiologia *in vitro*

3.2.1. Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (CIPSS)

As CIPSS são devidas à liberação de neurotransmissores dependentes ou não de potenciais de ação (Pinheiro and Mulle, 2008). Ao analisar as CIPSS nas células piramidais, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas

camadas II/III da área somatossensorial primária quanto a amplitude e na constante de tempo de decaimento. No entanto o tempo de subida, das CIPs nos neurônios piramidais nas camadas II/III do grupo RSV+VPA foi menor que os demais grupos experimentais (Controle: $3,38 \pm 0,62$; VPA: $3,77 \pm 0,88$; RSV: $3,46 \pm 0,46$; RSV+VPA: $2,51 \pm 0,55$, Figura 2C). A frequência das CIPs foi menor no grupo RSV quando comparado com o grupo Controle (Control: $3,87 \pm 1,12$; VPA: $3,06 \pm 1,04$; RSV: $2,05 \pm 0,90$; RSV+VPA: $2,51 \pm 1,25$, Figura 2D).

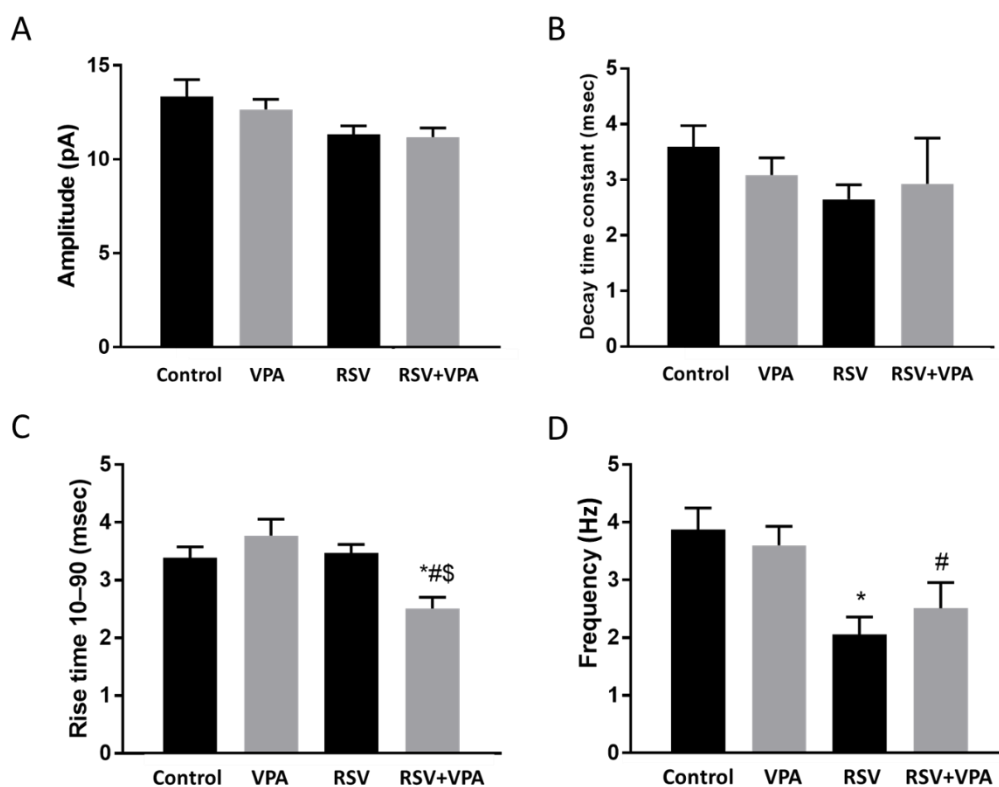


Figura 2: Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (CIPs) nos neurônios piramidais das camadas II/III da área somatossensorial primária. A, amplitude (pA); B, Constante do tempo de decaimento (em milissegundos); C, Tempo de subida (10-90 milissegundos) *VPA vs RSV+VPA, $p=,0016$, #RSV vs RSV+VPA, $p=0,0259$, \$Control vs RSV+VPA $p= 0,0342$; e D, frequência (em Hertz), *Control vs RSV $p=0,0061$, #VPA vs RSV, $p=0,0194$.

Nas camadas IV/V, observou-se uma redução no tempo de decaimento das CIPs nos neurônios piramidais do grupo VPA em comparação com o grupo controle, com a prevenção desta redução pelo tratamento com RSV (grupo RSV+VPA) (Control: $3,83 \pm 1,48$; VPA: $2,25 \pm 0,58$; RSV: $3,68 \pm 1,79$; RSV+VPA: $3,95 \pm 1,49$, Figura 3B). Os neurônios piramidais do grupo VPA apresentaram uma redução na frequência das CIPs quando comparado ao grupo controle e, novamente, o tratamento com RSV foi capaz de prevenir essa alteração induzida pela exposição pré-natal ao VPA no grupo RSV+VPA (Control: $2,45 \pm 1,05$; VPA: $1,35 \pm 0,75$; RSV: $3,52 \pm 1,00$; RSV+VPA: $3,27 \pm 0,85$, Figura 3D).

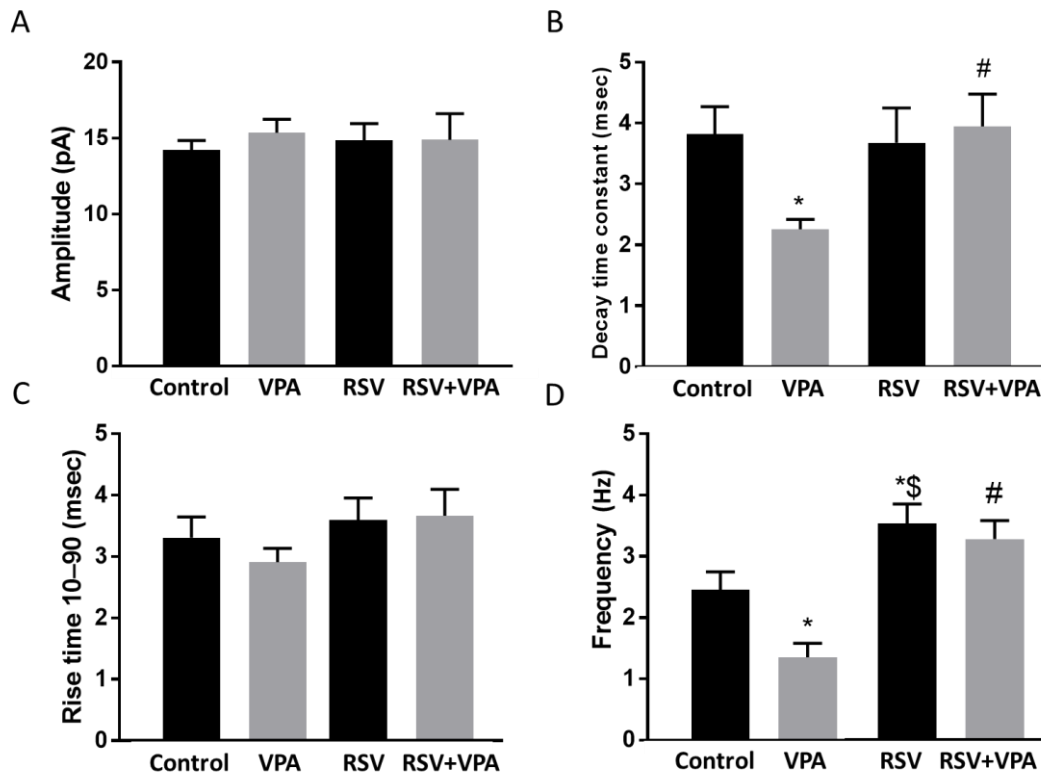


Figura 3: Correntes inibitórias pós-sinápticas espontâneas (CIPs) nos neurônios piramidais das camadas IV/V da área somatossensorial primária. A, amplitude (pA); B, Constante do tempo de decaimento (em milissegundos), *Control vs VPA $p=0,0379$, #VPA vs RSV+VPA $p=0,0418$; C, Tempo de subida (10-90 milissegundos); e D, frequência (em Hertz), *Control vs VPA $p=0,0315$, *Control vs RSV $p=0,0469$, \$VPA vs RSV $p=0,0001$, #VPA vs RSV+VPA $p=0,0004$.

3.2.2. Correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura (CIPSm)

Utilizando a mesma abordagem anterior, as correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura foram analisadas nas camadas II/III e IV/V da área somatossensorial. A análise dessa corrente reflete a liberação quantal de neurotransmissores e, conseqüentemente, a funcionalidade pós-sináptica (Pinheiro and Mulle, 2008). Ao analisar as CIPSm nos neurônios piramidais das camadas II/III, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, em todos os parâmetros avaliados.

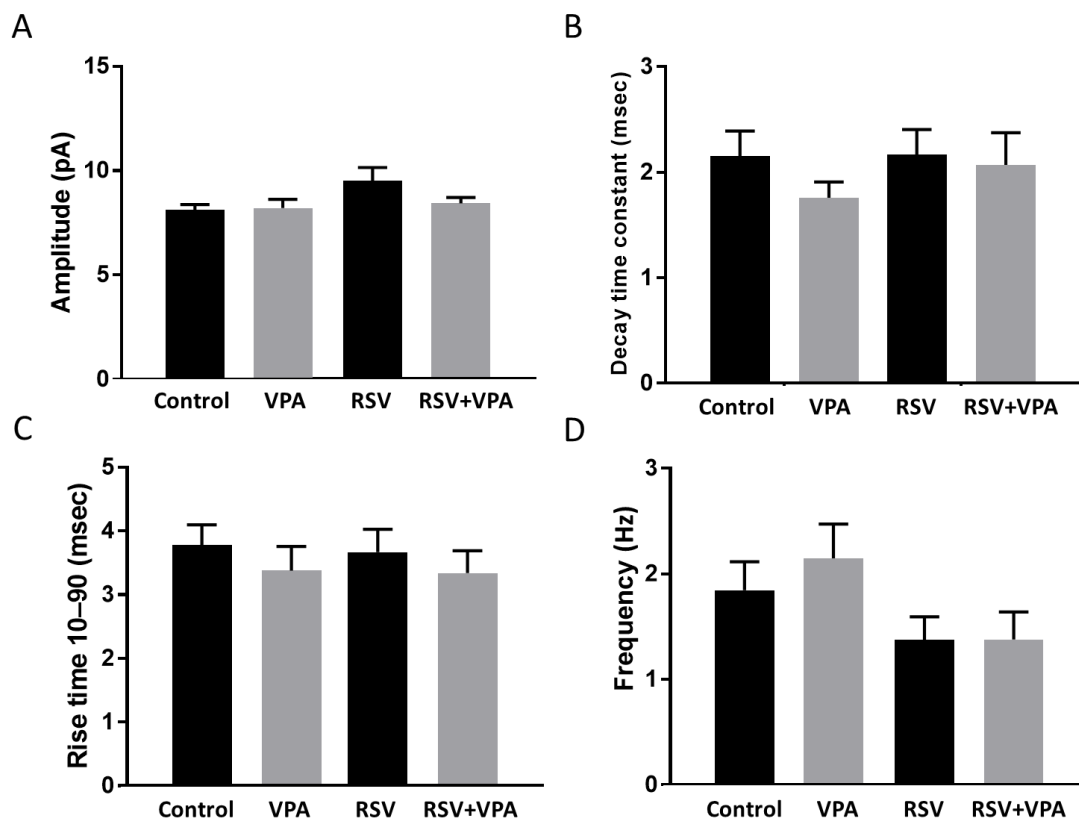


Figura 4: das Correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura (CIPSm) nos neurônios piramidais das camadas II/III da área somatossensorial primária. A, amplitude (pA); B, Constante do tempo de decaimento (em milissegundos); C, Tempo de subida (10-90 milissegundos); e D, frequência (em Hertz).

No entanto, ao avaliar as CIPSm nos neurônios piramidais das camadas IV/V, observou-se uma redução na frequência todos os grupos experimentais, quando comparados com o grupo Controle (Control: $2,32 \pm 0,69$; VPA: $1,50 \pm 0,66$; RSV: $1,31 \pm 0,33$; RSV+VPA: $1,49 \pm 0,63$, Figura 5D).

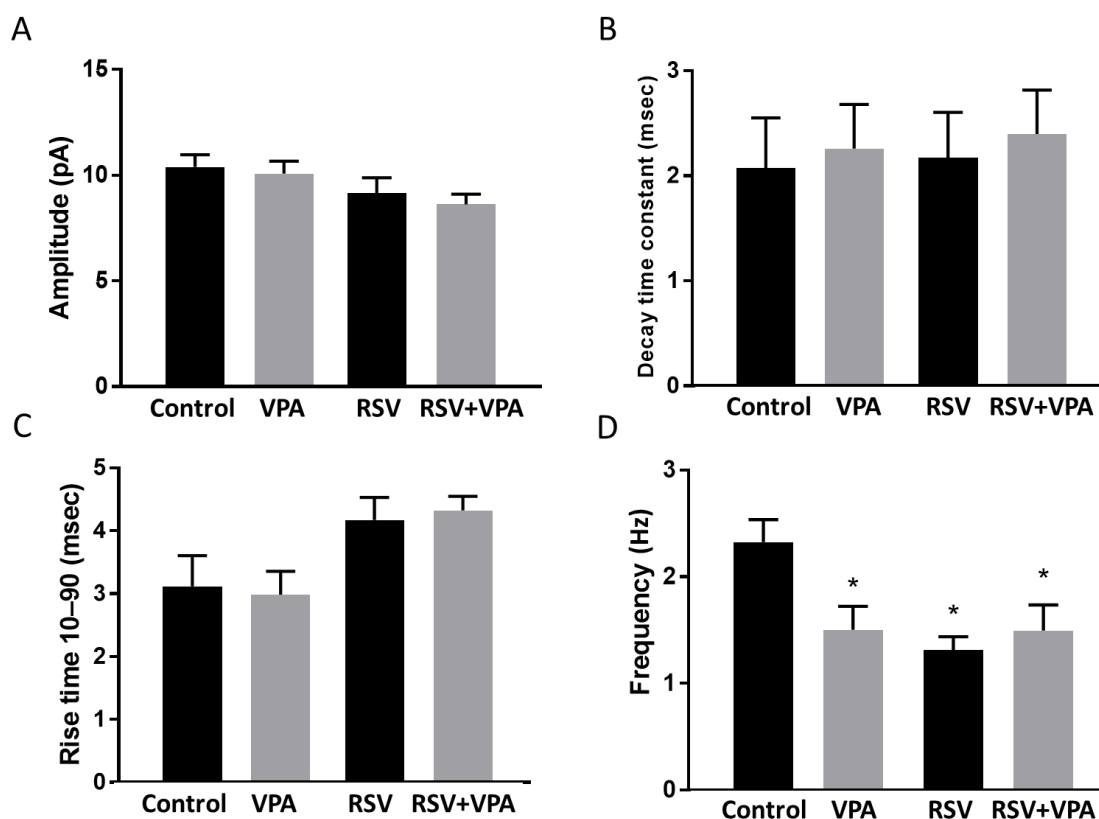


Figura 5: Parâmetros eletrofisiológicos de registro *in vitro* das Correntes inibitórias pós-sinápticas em miniatura (CIPSm) da camada IV/V da área somatossensorial primária. A, amplitude (pA); B, Constante do tempo de decaimento (em milissegundos); C, Tempo de subida (10-90 milissegundos); e D, frequência (em Hertz), *Control vs VPA $p=0,0279$, *Control vs RSV $p=0,0095$, *Control vs RSV+VPA $p=0,0420$.

Os dados desse capítulo mostram alterações importantes da exposição pré-natal ao VPA nas alterações do padrão de oscilações cerebrais com a presença de episódios de descargas de ondas lentas e alteração comportamental semelhante a crises de ausência e na cinética e na frequência das CIPSm registradas em neurônios piramidais das camadas IV/V da área somatossensorial primária. Esses dados sugerem uma reorganização sináptica cortical e um menor *input* sináptico inibitório sobre essas células, por meio da redução da frequência que podem contribuir para a hiperexcitabilidade cortical. No entanto, a redução no tempo de decaimento pode sugerir alterações na distribuição ou expressão de determinadas subunidades de receptores GABA_A no neurônio piramidal, (Otis and Mody, 1992; Włodarczyk et al., 2013). Surpreendentemente, o tratamento pré-natal com RSV foi capaz de prevenir tanto essas alterações funcionais associadas a realocação dos interneurônios PV⁺, como vimos no capítulo anterior (Fontes-Dutra et al., 2018) como as alterações observadas no vídeo-EEG, as quais se assemelham a crises de ausência, indicando um substrato importante da ação dessa molécula sobre a rede inibitória cortical. A redução global, em relação ao

grupo controle, da frequência das CIPSm nos neurônios piramidais das camadas IV/V pode refletir uma alteração na liberação quantal de neurotransmissores induzida tanto pela exposição pré-natal ao RSV, quanto ao VPA.

CAPÍTULO V

Capítulo de livro aceito para publicação:

“Maternal immune activation and neuropsychiatric disorders: the intricate puzzle in Autism Spectrum Disorder”

Série “Perinatal inflammation and adult psychopathology: From preclinical models to humans.” do livro “Progress in Inflammation Research”, Springer 2019

Maternal immune activation and neuropsychiatric disorders: the intricate puzzle in Autism Spectrum Disorder

Mellanie Fontes-Dutra^{a,b,c}, Bruna Frizzo Rabelo^{a,b,c}, Júlio Santos-Terra^{a,b,c}, Iohanna Deckmann^{a,b,c}, Gustavo Brum Schwingel^{a,b,c}, Carmem Gottfried^{a,b,c}

^aTranslational Research Group in Autism Spectrum Disorders - GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;

^bNeuroglial Plasticity Group, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ^cNational Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Rio de Janeiro, Brazil;

Abstract

Pregnancy is a complex phenomenon in which several physiological changes are orchestrated to provide appropriate fetal development. In this context, the immune system plays important roles, oscillating between many states in the spectrum of tolerance and inflammation in order to balance the maternal-fetal interface. Infections caused by different agents are capable to trigger countless alterations in immune profile, which are especially harmful during the gestational period, being already linked to important development impairments. Regarding this, numerous evidence has pointed out the relation between maternal immune activation (MIA) and neurodevelopmental disorders like schizophrenia and autism spectrum disorder (ASD). Specifically, ASD is a highly prevalent disorder that stands out as a field of study because of its extensive complexity and relatively poorly known etiological mechanisms. Several animal models of MIA already helped to understand possible pathways by which immune activation could increase ASD risk, clarifying important roles of immune-related factors in the modulation of fetal development. Therefore, the main objective of this chapter is to compile and comment evidence that may improve the knowledge between immune system and ASD in the context of MIA.

1. Introduction

Current knowledge has brought the immune system to a new scenario for the interplay between neurons and immune mediators, not only in disease but also in brain homeostasis. In the past, the Central Nervous System (CNS) was called “an immune-privileged region” with the blood-brain barrier controlling the crosstalk between the brain and the periphery. Nevertheless, recent findings had shed some light that this privilege is not due to the absence of immune modulation in brain activity and homeostasis, but rather an intimate relationship with time-dependent specific modulation in different regions during brain development.

The idea that altered neuroimmune mechanisms might play a role in neurodevelopmental disorders gained popularity in recent years. The first pieces of evidence supporting this mechanism date more than a century ago, when Karl A. Menninger revealed an association between influenza exposure followed by psychotic disorder in patients who were admitted to the Boston Psychopathic Hospital after the outbreak of the 1918 influenza pandemic.

This early neuroimmune hypothesis of psychotic disorder was only brought back by Torrey et al., in the 1970s, suggesting that latent viruses might be involved in the development of schizophrenia (SZ). The field has been expanding ever since and nowadays various infectious agents are considered to play an important role in the development of SZ and related disorders.

Considering this, substantially interest has been bearing upon the possible contributions of infections in gestational life. The prenatal period seems highly sensitive to alterations induced by an immunological threat, such as infections. Indeed, infection-induced insults directed at dams can lead to not only pathophysiological changes in the fetal environment but also to long-lasting consequences in postnatal life, in both brain and behavior. These immunological processes seem relevant for autism and other neurodevelopmental disorders, including SZ and bipolar disorder (BD), which are all believed to be associated with alterations in early developmental processes. Whilst these associations provide a rationale for suggesting that prenatal infection might contribute to the cause of these disorders, they do not prove causation.

Therefore, the main aim of the present chapter is to present an overview of the risk factors in prenatal life that may lead to neurodevelopmental disorders; considering (a) the physiology of immune system during gestational period; (b) the outcomes of prenatal immune challenge, in both CNS and peripheral body and (c) the relationship between maternal immune activating (MIA) and the development of autistic-like behaviors in animal models.

2. Risk factors associated with MIA

Pregnancy is an intricate moment regarding the functionality of immune system. Not only the risk of infections of different natures, such as bacterial, viral, parasitic sources, is elevated, but also the severity of the presented symptoms (Sappenfield et al., 2013; Vermillion & Klein, 2018). The mechanisms underlying the increased susceptibility are related to the physiological adaptations assumed by the female body in order to provide an ideal environment for embryo and fetal development. The increase of cardiac rate and decrease of pulmonary residual capacity in order to provide blood supply to the fetus may contribute to the development of respiratory infections, especially by influenza virus (Cervantes-Gonzalez & Launay, 2010). Therefore, it is important to understand the possible outcomes of these conditions and the pathways by which they interfere in neuroimmune parameters.

Fever itself, a common symptom observed in infections, is a known risk factor for neurodevelopmental disorders like autistic spectrum disorder (ASD) (Hornig et al., 2018) and SZ (Edwards, 2007). In ASD, specifically, some studies using large cohorts from different countries (USA, Denmark and Norway) (Atladdottir et al., 2012; Brucato et al., 2017; Hornig et al., 2018; Zerbo et al., 2013) demonstrated that fever episodes, in the first and, especially, in the second trimester increased significantly the risk of autism in a time and dose-dependent manner: early febrile episodes were associated with ASD with severe intellectual disability, whereas recurrent fever was related to increased risk of ASD. Although the mechanisms of fever are relatively well known, the use of antipyretics during pregnancy demonstrated controversial results in this context: in the USA cohort, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) seemed to reduce the autism risk factor when used to mitigate fever associated with influenza

infection, but, in the Norway cohort, the use of acetaminophen demonstrated only slight protective effects.

Few clues were proposed to explain the mechanisms by which fever triggers these important outcomes. Animal models had already demonstrated that hyperthermia may be a teratogenic factor: agonists of transient receptor potential (TRP) ion channels induced several craniofacial alterations in neural crest from chicken and zebrafish embryos (Cawdell-Smith et al., 1992; Hutson et al., 2017; M. S. Smith et al., 1992) mice and rats fetus (Sasaki et al., 1995; Webster & Edwards, 1984), as well as leading to cellular apoptosis in cerebral cortex of adult rats (Khan & Brown, 2002). The animal models of maternal immune activation, regardless the induction factor, demonstrated that the increased temperature itself in critical periods of pregnancy may be involved in the mechanisms underlying the risk of developmental disorders associated with fever during pregnancy, alongside alterations in chemokine, interleukin, and immune cell profiles.

2.1 Bacterial infections during pregnancy

Balance is a key concept in the context of bacteria infections and their effects on human health, especially during pregnancy. In one hand, microbiome plays important roles regarding adaptations of the body to sustain properly the gestation. In the other hand, dysbiosis could lead to many infections – mostly with unknown influences in the development of the fetus. Moreover, several infections have subclinical symptoms, difficulting both diagnosis and treatment.

Regarding ASD, some studies demonstrated that bacterial infections, regardless the pathogen source, may be particularly deleterious during pregnancy: a Taiwanese study demonstrated that bacterial infections in the third trimester increased in 24% the risk of ASD development, whilst genital infections, which were mostly related to bacteria, increased the risk in 34% (Fang et al., 2015). Similar results were previously reported in a USA study that observed a two-fold increased risk of ASD in children whose mothers had bacterial infections, mostly in the genitourinary tract, during the second and third trimester of gestation (Zerbo et al., 2015) and in a Danish study that found similar relations in the second trimester (Atladóttir et al., 2010). Interestingly, the species of the pathogens themselves do not appear to be determinant of increasing risks. Nonetheless, the common immune system alterations triggered by bacteria seemed to be the key to the harms. For example, elevated levels

of interleukin (IL) 4, IL-10, tumor necrosis factor (TNF) α and TNF β in amniotic fluid were related to increased risk of autism in a Danish cohort (Abdallah, Larsen, Grove, Rgaard-pedersen, et al., 2013). Beyond that, the concentrations of interferon (IFN) γ , IL-4 and IL-5 in maternal serum were associated with a 50% increased risk of ASD (Goines et al., 2011). Moreover, this kind of alterations – specifically increase in IL-1 β and IL-4 - were observed in the serum of neonatal children posteriorly diagnosed with ASD (Krakowiak et al., 2017). However, some specificities must be considered, for example the presence of endotoxins like lipopolysaccharide (LPS) and *staphylococcal* enterotoxin A notably elicits a stronger immune response that has, in consequence, more severe outcomes. In this case, some hypothesis have already been proposed regarding the cytokine profile alteration and other mechanisms, as the production of antibodies against both LPS and growth factors in the fetus which share the presence of sialic acid modifications (Nahmias et al., 2006). Nevertheless, studies using MIA animal models (see more in “*Animal models of MIA*”) are crucial to bring clarity to these mechanisms.

2.2 Viral infections during pregnancy

Vaccination schedules all around the world provide important prophylaxis against several viral infections, such as measles, rubella, influenza and many others. However, the combination of both fake associations between vaccines and the increase in ASD development and the lack of accessibility to basic health resources in many countries is a great challenge in eradicating infections that may cause important outcomes, especially in pregnancy.

Interestingly, the earlier registers of a possible relationship between viral infection during pregnancy and increase in ASD risk came out in the 1970s, when it was observed that the prevalence of ASD in children with congenital rubella syndrome (CRS) was 200 times higher than the general US population (Chess, 1971, 1977). Other studies from that time demonstrated similar results (Desmond et al., 1970), showing a major concern about the rubella outbreak in the 1960s (in one year, 20,000 cases of CRS were identified in the USA). Although nowadays rubella infections appeared to be controlled in the USA, it is important to notice that this situation does not apply for many other places.

The biological pathways by which rubella induces neurodevelopmental alterations combine MIA and the action of the virus itself which can trespass barriers

and infect the fetus, causing direct damages. Conclusive studies evaluating biological tissues of ASD individuals with previously CRS are unavailable, but several similarities can be observed in the 1970s studies and the recent ones with aborted fetus with CRS. Starting with phenotype similarities, both CRS and ASD share higher rates of heart, ophthalmological and hearing impairments; besides the behavioral alterations like absent or delayed language and sensorial hypersensitivity (Hutton, 2016).

Little is known about the maternal immune response to rubella since the tools to perform this type of analysis were unavailable in 1970s. The presence in the fetus infected with rubella of elevated IFN α , proliferation of natural killer (NK) and T lymphocytes (T cells) (Lee & Bowden, 2000) and microglial activation (Townsend et al., 1975) draws a parallel with ASD, which is marked by a chronic status of inflammation with the presence in blood and CNS of several cytokines like IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α and IFN- γ as reviewed by Deckmann *et al.* (Deckmann et al., 2018a). Although the relationship between rubella infection during pregnancy and ASD are undeniable, the immune background involved is still poorly understood.

More recently, several other viral infections during pregnancy started to have relationships with ASD demonstrated. The critical window seems to be the first trimester of gestation (Atladóttir et al., 2010) and the outcomes of infections are extensively diverse.

Cytomegalovirus (CMV) infection during pregnancy is capable to cause important teratogenic effects like deafness and visual impairments (Stagno et al., 1977). The relations with ASD were first described in the 1980s. Recently, studies demonstrated an increased prevalence of CMV congenital infections in ASD children, being 10-fold higher than the general population (Gentile et al., 2017) and a relationship between CMV infection and higher severity of ASD symptoms (DEYKIN & MACMAHON, 1979). In addition to the classical viral mechanisms, rodents exposed to CMV increased TNF α and IL-6 secretion in fetal CNS, both molecules already associated to the ASD pathophysiology (Slavuljica et al., 2015).

Finally, other infections with no major association with teratogenic effects have been related to the ASD triggering. Some evidence demonstrates that measles and mumps (Ornoy et al., 2015), Herpes (HSV) (Mahic et al., 2017) and even influenza infections during pregnancy (Atladóttir et al., 2010; Atladottir et al., 2012) may induce neurodevelopmental disorders. Concerning HSV, the only evidence available shows an association between maternal antibodies against herpes simplex virus 2 (HSV-2)

at mid-pregnancy and the risk of ASD in boys (Mahic et al., 2017). In addition to the epidemiological data, animal models of influenza infection demonstrated several autistic-like alterations in many levels (see more in “*Animal models of MIA*”).

Taken together, these data lead us to two major concerns about viral infections during pregnancy: fetal infection associated with teratogenicity and MIA in order to eliminate the pathogen. Extensive studies are necessary to elucidate the biological pathways involved in order to promote strategies to mitigate these deleterious effects and improve health care in new epidemics, such as Zika and chikungunya infections.

2.3 Genetic factors related to MIA

Fetal development is marked by a highly complex and time-dependent transcription factor expression, which can be altered by environmental interferences leading to multiple outcomes. Pathogen interactome, a term to describe the protein network related to host-parasite interaction during pregnancy, is an emergent study field in MIA context.

A study using LPS-induced model of MIA demonstrated dysregulation of 3,285 genes in the offspring, which also presented autistic-like behaviors. Strikingly, most of these genes are related to proteins of cell cycle processes and GABAergic neurons development (Oskvig et al., 2012). Genome-wide DNA methylation study performed in mice from MIA model demonstrated altered methylation in GABA related genes (*Dlx1*, *Lhx5*, and *Lhx8*), *wnt* pathway genes (*Wnt3*, *Wnt8a*, *Wnt7b*) and neural and synaptic development genes (e.g., *Efnb3*, *Mid1*, *Nlgn1*, *Nrxn2*) (Richetto et al., 2017). This can be combined to the evidence of altered methylation patterns in genes related to synaptic integrity, GABAergic metabolism (leading to a decrease in *GAD65* and *GAD67* protein expression) (Labouesse et al., 2015) and G-protein cell signaling (Basil et al., 2018). Together these findings suggest that the alterations promoted by MIA in several sets of genes already related to ASD may be associated with epigenetic mechanisms. Besides MIA can modulate maternal care and depressive-like behaviors in the offspring in a transgenerational manner, helping to sustain the epigenetics hypothesis (Ronovsky et al., 2017).

Beyond that, another study demonstrated the “fetal programming” feature of MIA in genetic alterations related to ASD, such as the downstream pathway of *FMR* and *CHD8* genes. In this case, the consequent alteration in *Tsc2*–*mTor*–*Eif4e* axis signaling, which is directly related to translation initiation, seems to be impaired in both

MIA and ASD. Moreover, a study comparing bioinformatics data from several interactomes between infections and ASD observed that 206 genes related to ASD may be also modified by several types of infections (Carter, 2019).

Finally, a study demonstrating larger effects of MIA in BTBR T(+)/J mice, a genetic animal model of ASD, highlights the importance of genetic background in this context (Schwartz et al., 2013). The haploinsufficiency *mpk27* gene (an animal model of MIA in mice, targeting c-Jun N-terminal kinases - JNK) elicited an altered expression of cytokines in fetal brain, bringing attention to JNK signaling during these processes (Openshaw et al., 2019).

The accumulated data regarding genetic factors influenced by MIA leads us to think about an integrated system in which the protein interactions in both dams and offspring in response to environmental stimuli, work in a dynamic way promoting alterations at the epigenetic, translational and transcriptional levels. The expression profiles in several contexts seem to point towards known related ASD pathways, however further studies are needed in order to improve and clarify the genetic-environmental network in MIA and ASD.

3. Typical immune physiology and pregnancy

3.1 Innate and adaptive immunity

The immune system refers to a complex interplay between cells and molecules that trigger together processes in order to protect an organism against microorganisms and other external macromolecules. These processes can be divided into two approaches (known as "lines of defense"): innate immunity and adaptive immunity (Marshall et al., 2018).

3.1.1 Innate immunity

Innate immunity is the first-line defense, acting even before the establishment of infection, due to its antigen-independent defense mechanism (non-specific), which is recruited immediately after the antigen recognition by the host. Therefore, it is well known as the immediate response against an invading pathogen (Aristizábal & González, 2013; Marshall et al., 2018). The innate responses do not present memory mechanisms, unlike adaptive response, regardless of previous exposure to pathogens (Gasteiger et al., 2017) .

The main components of innate immunity (Aristizábal & González, 2013; Turvey & Broide, 2010) are:

(1) Anatomical/physical and chemical barriers, such as epithelium and antimicrobial agents produced on epithelial surfaces;

(2) Physiological barriers, such as temperature and pH alteration;

(3) Phagocytic and effector cells (neutrophils, macrophages), dendritic cells and natural killer (NK) cells and other lymphoid cells; and

(4) Inflammatory molecules (blood proteins or “soluble mediators”), including members of the complement system and other mediators of inflammation.

3.1.2 Adaptive immunity

Innate and adaptive immunity are distinct concepts for didactic purposes. However, they are not mutually exclusive considering the normal immunological defense of the host, acting in a "synergic manner" in order to covering failures in both systems. Unlike the innate, adaptive immunity is antigen-dependent and -specific, taking more time from pathogen exposure to the response be triggered. The major difference from innate immunity is the ability of the adaptive immunity to ‘memorize’, through different regulatory mechanisms, the pathogens when the first exposure occurs in order to make immunological responses to subsequent exposures to the same pathogen more rapid and efficient (Bonilla & Oettgen, 2010).

In this way, the adaptive immune has a coordinated repertoire to recognize the self- and nonself-antigens (Bonilla & Oettgen, 2010; Marshall et al., 2018), to generate responses towards specific immunological pathways for the elimination of pathogens or cells infected by them and to develop immunological memory to optimize the response to a subsequent threat (Bonilla & Oettgen, 2010). The adaptive immune cells are tightly regulated by each other, including antigen-presenting cells (APCs) and T and B lymphocytes (Bonilla & Oettgen, 2010; Marshall et al., 2018).

3.2 Placental barrier

The placenta is an organ considered a barrier that protects the fetus against the invasion of external pathogens in maternal body (Perez-Muñoz et al., 2017).

During pregnancy, several immunologic alterations and adaptations occur in which placenta has a pivotal participation in order to ensure the fetal development, such as redistribution of nutrients and oxygen (Díaz et al., 2014; Kourtis et al., 2014). The placenta is formed after the blastocyst implantation in maternal endometrium which becomes the decidua, a specialized tissue playing important roles, such as being a maternal interface. During decidua formation, the maternal blood surrounds the placenta in order to promote the adequate exchange of nutrients through both maternal and fetal circulation, remodeling the spiral arteries. These vascular modifications occur by means of NK cells and macrophages, allowing higher maternal blood bathing the placenta (Ander et al., 2019).

The fetal interface is represented by two layers of trophoblast: an inner formed by cytotrophoblast (CTB) and an outer composed by syncytiotrophoblast (SYN). In this way, this interface is formed by a continuous barrier that physically separates the mother from the fetus, despite allowing the selective passage of soluble molecules (Ander et al., 2019; Bulla et al., 2004).

A set of villi composes human placenta. A single layer of SYN coats the outermost surface, forming the main cellular barrier between the fetus and maternal blood. The CTBs are progenitor trophoblast cells, subjacent to SYN, and they can differentiate into mononucleated extravillous trophoblasts (EVTs) which are located at the edge of the villi. The SYN transports nutrients, gases and waste, in addition to the production of human chorionic gonadotropin (hCG) and progesterone during the first 8 weeks of gestation, having an endocrine function until the placenta is able to produce progesterone by itself. EVT's are a physical anchor to the human placenta in the decidua. In the transition from 1st to 2nd trimester, EVT's allow the direct contact of maternal blood with placenta in intervillous space (IVS), facilitating the efficient exchange, separating the early and later stages of pregnancy. In the 1st trimester of pregnancy, the IVS is bathed with uterine gland secretions which contain growth factors that regulate placental development, including epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor- β (TGF- β) (Ander et al., 2019).

Thus, the placenta is a pivotal maternal-fetal interface. In this way, despite of not every infection leads to miscarriage, placental infection triggers the production of inflammatory cytokines which can activate not only the maternal immune system and leading to placental damage, but also that of the fetus. This immunological activation

may lead to inadequate neurodevelopment, including diseases in the offspring in adulthood stage (Kourtis et al., 2014).

3.3 Immunological system influence in pregnancy and neurodevelopment

Pregnancy is a unique condition in maternal body that ensures fetus growth and development (protecting them from pathogens) whereas maintaining immunological response to the mother against infections, environmental stressors and even the presence of the fetus itself in the uterus (not recognizing them as a 'foreign body'). Thus, this specific switch in maternal immunity guarantees fetal development and preserves the gestation (Sisti et al., 2016). Modifications in maternal physiology include: changes in cardiac output in order to redistribute the maternal blood in placental circulation; maternal hyperventilation towards an adequate exchange of respiratory gases across the placental barrier, and insulin resistance in the 3rd semester of pregnancy which directs the flows of glucose, amino acids, and lipids to fetus in the stage when fetus growth is more accentuated (Díaz et al., 2014; Kourtis et al., 2014).

The immune system evolved in the sense to protect organisms against pathogen threats. The uterus, for example, is capable to release IL-15 to promote NK cells maturation; NK cells induce a decidua remodeling by means the secretion of cytokines, such as IFN γ , VEGF and TNF α , whereas Treg cells modulate the activities of APCs cells. Beyond that, it seems to be necessary a refined balance in memory T cells to maintain the delicate stability of pregnancy; thus, this mechanism works together allowing maternal tolerance to the fetus (Ander et al., 2019; Kieffer et al., 2019; Martínez-Varea et al., 2014).

Despite the immune tolerance in pregnancy, inflammatory events occur in several stages, like implantation, which is characterized by increased levels of pro-inflammatory chemokines, cytokines and growth factors. In the first phase of pregnancy, the immune system recruits a set of APCs, including mast cells, dendritic cells, monocytes and macrophages. During placental development, M1-macrophages pattern is dominant, shifting to M2 in the second and third trimester (with anti-inflammatory profile), which is crucial to fetus development (Bränn et al., 2019; Robinson & Klein, 2012). Moreover, the placenta is able to transport antibodies to the fetus via expression of the immunoglobulin G (IgG) receptors, creating, a transplacental via of maternal humoral immunity (Robinson & Klein, 2012).

Furthermore, the Th2 and Treg cells participate in the maintenance of pregnancy, inhibiting the fetal rejection (mediated by T helper type 1 (Th1) and Th17 responses) by production not only IL-4 and IL-10, but also TGF- β . Another mechanism is the negative regulation of a specific B cells population, avoiding autoimmunity against the fetus, while stimulate other B cells subset responsible for antibodies production against pathogens (Bränn et al., 2019; Robinson & Klein, 2012).

4. Central and peripheral alterations in MIA offspring

4.1 Central markers

4.1.1 Neuronal abnormalities and cortical disorganization

The neurodevelopment covers a complex organization of processes under genetic, environmental and immune regulation, being vulnerable to a variety of insults in critical biological windows. For example, GABAergic neuronal populations might be differentially altered during MIA. Studies have demonstrated an increase in density of somatostatin-positive neurons (SST) in white matter corpus callosum (Duchatel et al., 2016), while parvalbumin (PV) and reelin-positive (RLN) neurons are decreased in hippocampus and cerebral cortex (Bergdolt & Dunaevsky, 2019; Wischhof et al., 2015; Zhang & van Praag, 2015). This neuronal population decrease is differentially observed in a time-dependent manner according to the time precursor neurons migrate from the medial ganglionic eminence (MGE) to the early cerebral cortex (Canetta et al., 2016; Urs Meyer et al., 2008; Wischhof et al., 2015). In adult life, rodents exposed to MIA protocols present an increase in the number of PV neurons in prefrontal cortex (PFC), such as medial prefrontal cortex (mPFC) (Boksa et al., 2016). Several markers of GABAergic phenotype are altered in offspring of rats exposed to MIA, such as a decrease in the relative expression of mRNA from GAD₆₇ and a shifted pattern of chloride channels (NKCC1 and KCC2) involved with GABA receptor activity during development, pointing to immature GABAergic phenotype related to MIA exposure (Shin Yim et al., 2017).

Similar to PV neurons, time-dependent embryonic exposure during MIA in rodents affects cell content, resulting in decreased cerebellar density of Purkinje cells in lobule VII (Naviaux et al., 2013), and increased cerebellum size and number of Purkinje cells after the mitosis phase (Aavani et al., 2015).

Alterations in pyramidal neurons and cortical organization are seen in MIA animal models as well. Studies have demonstrated that after MIA induction with Poly(I:C) (Choi et al., 2016) or LPS (Wischhof et al., 2015), respectively, a loss in specific neuronal populations are seen, reflecting in altered layer-specific neuronal markers, such as TBR1. These altered number and localization of neurons reflect in patches of cortical disorganization in MIA offspring, described in the primary somatosensory cortex, secondary motor cortex and temporal association cortex (Bergdolt & Dunaevsky, 2019; Shin Yim et al., 2017). These patches were sensitive to the time of MIA and the size of patches in the primary somatosensory cortex was correlated with behaviors characteristic of MIA offspring, possibly affecting neuronal migration. Moreover, prenatal human influenza viral infection in embryonic day 9 (E9) of pregnancy by a neurotropic strain of influenza A virus (H1N1) led to abnormal corticogenesis by decreasing Reelin expression, as well as inducing a reduction in cerebral cortex thickness in the brains of neonatal offspring (Fatemi et al., 1999).

These neuronal alterations in MIA models might be key for underlying alterations in synchronicity and brain oscillations. Significant reductions in electroencephalograms (EEG) coherence are seen in mPFC to hippocampus, with changes in synchrony occurred within delta (2–4 Hz), theta (4–12 Hz), beta (12–30 Hz) and low-gamma (30–48 Hz) frequency bands from MIA-induced by Poly(I:C) during pregnancy (Dickerson & Bilkey, 2013; Dickerson et al., 2010). These alterations were correlated to behavioral abnormalities, such as decreased prepulse inhibition of startle (Dickerson et al., 2010).

4.1.2 Glial cell activation

Many psychiatric disorders, such as SZ (Fillman et al., 2013; Inta et al., 2016; Tang et al., 2012), BD (Haarman et al., 2014; Hercher et al., 2014; Muneer, 2016), major depression (MD) (Torres-Platas et al., 2014) and ASD (Lombardo et al., 2018; Nardone & Elliott, 2016; Parker-Athill & Tan, 2010) present inflammatory responses accompanied by microglial activation in central nervous system. Therefore, it has been proposed that changes in microglia phenotype can be an important aspect of prenatal immune activation, leading to altered course in the developing brain and behavioral and neuronal deficits detected in MIA models in postnatal life (Smolders et al., 2018).

4.1.2.1 Microglia

Microglial cells are immune-derived cells resident in CNS playing important roles in modulating cell maturation and establishing proper neuronal connection during development and promoting tissue repair and homeostasis. Once in postnatal period, microglial cells can alter their gene expression profile and shape in response to minor pathological perturbations in the CNS environment, changing their status from “resting” to “activated” (Deckmann et al., 2018b; Kreutzberg, 1996). Since microglial cells are never inactive and show highly dynamic surveillance functions in the CNS, many authors suggest that this surveillance state of the microglial cells should be renamed “surveying microglia” instead of “resting microglia” (Q. Li & Barres, 2017; Nimmerjahn et al., 2005; Wake et al., 2009).

In order to investigate the role of microglia in MIA processes, many authors proposed to analyze the pattern of microglial markers related to its activity. Nonetheless, in a recent review (Smolders et al., 2018), the authors pointed divergences among these studies. Poly(I:C) models found out significant increase in cellular density of microglia in hippocampus (Juckel et al., 2011; W.-Y. Li et al., 2014; Zhu et al., 2014), striatum (Juckel et al., 2011; Zhu et al., 2014) and prefrontal and primary visual (V1) and motor (M1) cortex (Zhu et al., 2014). Besides, classic microglial activation markers (Borrell et al., 2002; Van den Eynde et al., 2014; Zhu et al., 2014) are found in both LPS and Poly(I:C) models, as well as in the shifting to less arborized microglial (Juckel et al., 2011). However, other studies did not find any significant alterations (Garay et al., 2013; Giovanoli et al., 2015, 2016). This controversy of MIA effects on the offspring of rodents exposed to similar MIA protocols might be a consequence of considering only one parameter for microglia activation, i.e. density or morphology or expression of specific markers or cytokines, as well as the technical limitations regarding the sensitivity to detect these alterations and particularities of protocols to induce MIA (Smolders et al., 2018).

4.1.2.3 Astrocytes

Astrocytes also play important roles in propagating and regulating neuroinflammation (Farina et al., 2007; Liu et al., 2011; Norden et al., 2014) by releasing inflammatory mediators and cytokines, including IL-1 β (Carpentier et al., 2005; John et al., 2004). Activated astrocytes produce many regulatory factors that may influence CNS immunity and provide negative feedback to activated microglia (Min et al., 2006). Brain inflammation involving astrogliosis (characterized by

overexpression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and/or astrocyte hypertrophy) has been observed in the offspring of MIA Models in IL-6 or LPS-treated mothers (Hao et al., 2010; Samuelsson et al., 2006). Taken together data indicate that astroglial changes induced by MIA are dependent on sex and brain region and that these changes could reflect astroglial dysfunction. The S100B protein exhibited an age-dependent pattern of expression, being increased in the frontal cortex and hippocampus of the MIA group at postnatal day (PND) 60, while at PND 30, male rats presented increased S100B levels only in the frontal cortex (de Souza et al., 2015). Furthermore, a significantly increased number of activated astrocytes, characterized by a rounded shape with large cellular body and fewer processes, was observed in the white matter and amygdala of the offspring exposed to LPS (Imai et al., 2018; Mouihate et al., 2017).

4.1.2.4 Oligodendrocytes

Numerous evidence has indicated the participation of oligodendrocytes after MIA induction. Histological studies targeting myelin-basic protein (MBP) have shown that loss of myelination in polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)) mice is not accompanied by loss of oligodendrocytes (Makinodan et al., 2008). In fact, axonal diameters were significantly smaller in juvenile poly(I:C) mice with reversion of this pattern in adult life in the same study. Moreover, changes in oligodendrocytes population are also seen in embryonic rat spinal cord following MIA (McDermott et al., 2017).

4.1.3 Cytokine expression

Alterations in maternal serum and fetal brain cytokines are evidenced in animal models exposed to MIA during the gestational period (M. L. Estes et al., 2018; M. L. Estes & McAllister, 2016). After a few hours of exposure, alterations in fetal brain cytokine expression can be observed, specifically increase of several pro-inflammatory cytokines in Poly(I:C) model, such as IL-1 β , IL-6 and TNF α (U. Meyer et al., 2006; U Meyer et al., 2008). Besides that, increases in maternal IL-17a lead to elevations in fetal neuronal IL-17 receptor expression which is related to social and repetitive behavioral alterations in postnatal life (Choi et al., 2016; M. L. Estes et al., 2018).

Studies have investigated the E12.5 Poly(I:C) effects of cytokine profiles in different time points of neurodevelopment in brain regions, such as frontal cortex, hippocampus, cingulate cortex (CC) (Garay et al., 2013). After birth and in adulthood (PND 7 to PND 30), four cytokines were significantly higher in frontal cortex: IL-1 β , IL-10, IL-12 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), while IL-1 α , IL-6, IL-9 and IL-10 in adult life. Conversely, many cytokines are significantly decreased in frontal cortex in animals exposed to Poly(I:C) at PND7, a critical period of synaptic remodeling in rodents, such as IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 and IL-12. In CC, IFN γ , IL-12 and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) are significantly increased at birth, but only IFN γ and IL-10 remain increased in adulthood. In frontal cortex from PND 7 MIA animals, five cytokines are lower, including IL-2, IL-5, IL-6, IL-10 and eotaxin, while IL-17 is higher in CC. At birth, when analyzing hippocampus, MIA exposure leads to altered cytokine levels of IL-6, while IL-1 β , IL-2, IL-4, keratinocyte chemoattractant (KC or (C-X-C motif) ligand 1 - CXCL1), MCP-1 and macrophage inflammatory protein (MIP-1 α) are lower. In synaptic remodeling period (PND 7), IL-4 remains lower, while KC and MIP-1 α reverse their pattern, being elevated. In addition to these cytokines, IL-3, IL-5 and IL-10 are decreased, while IL-9 is increased in the same brain region. In adult life, only IL-6 and MIP-1 α are altered in hippocampus from MIA exposed animals (Garay et al., 2013).

A recent report analyzing the genetic expression of cytokine receptors indicates: (a) an overall increase in cytokine signaling at PND 7, (b) a dramatic decrease at PND 14 during periods of postnatal synaptic remodeling, and (c) an increase during periods of plasticity (PND 30) and early adulthood (PND 60) in frontal cortex from Poly(I:C) offspring (M. L. Estes et al., 2018).

Changes of cytokine and chemokine profile are also seen in cerebellum and persist throughout the development. As demonstrated previously, analyzing tissues from cerebellum from the MIA model induced by Poly(I:C), at first day of life (PND 1), the levels of Fas (CD95) ligand (Fas-L) and IL-6 are increased, while only a downward trend is seen in basic fibroblast growth factor (bFGF). After the first week of life (PND 7), the levels of IL-2, IL-3 and TNF receptor I (TNFRI) are increased, while eotaxin-2 was decreased. At the peak in synaptogenesis (P14), a significant increase in the levels of MIP-1 γ , TNFRI and its ligand TNF α are increased, while the levels of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1 or CD54) and IL-10 are decreased in MIA

offspring. At early adult life (PND 30), the levels of MIP-1 γ are increased, while the levels of IFN γ and IL-17 are decreased (Pendyala et al., 2017).

4.2 Peripheral markers

4.2.1 Peripheral blood cells

Numerous evidence has indicated immune dysfunction in individuals with neurodevelopmental disorders, but a relationship between *in utero* MIA exposure and long term immune dysfunction has not been well established yet. Macrophages play a key role as first responders to infection as phagocytes and orchestrators of adaptive responses. Studies sampling macrophages from MIA offspring's bone-marrow, a source for circulating macrophages, showed a shift of macrophage profile to M1 pro-inflammatory phenotype (Onore et al., 2014), indicating a potential relationship between long-term outcomes *in utero* MIA and macrophage function in the offspring.

Furthermore, LPS models of MIA during fetal development presented significantly increased levels of peripheral Gr-1+ CD11b+ neutrophilic and monocytic cells in adult offspring (Hsiao et al., 2012; Rose et al., 2017). Curiously, MIA during pregnancy demonstrated no effect on neutrophil activity as measured by the production of reactive oxygen species (oxidative burst) and phagocytosis of *S. aureus*, indicating that this manipulation has no or minor impact on neutrophil-mediated innate immunity (Zager et al., 2013). However, other aspects of the innate immunity such as monocyte/macrophage activity were not analyzed in the same study.

4.2.2 Cytokines and proteins related to immune response

There are many studies investigating the effect of MIA on cytokine levels from serum of pregnant rodents, shedding some light on the intricate relationship between cytokine levels of MIA-dams and behavioral phenotypes in MIA-exposed offspring (Ballendine et al., 2015; Lins et al., 2018, 2019; Parker-Athill & Tan, 2010). As pointed by Beumer *et al.*, both LPS- and poly I:C- induced MIA models in rat and mouse have been associated with elevated protein circulating levels of TNF α , IL1 β , IL- 6, inducible NOS (nitric oxide synthase - iNOS), IL10, MCP1 and both protein and mRNA levels of VEGF (Ashdown et al., 2006; Beumer et al., 2012; Boksa, 2010; Cai et al., 2000; Golan et al., 2005; Liverman et al., 2006; Patterson, 2009; Urakubo et al., 2001).

Many important cytokines have already been detected in fetal brain and serum of MIA offspring after the first postnatal week. According to a study performed by

Garay *et al.*, IL-12 and “regulated on activation, normal T cell expressed and secreted” (RANTES) are increased at birth (PND 0), whilst the levels of IL-3, GM-CSF and MIP α are decreased. After the first week of postnatal life (P7), the levels of IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-12, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), IFN γ , KC, RANTES and TNF α are all higher in serum, while IL-1 α , IL-2 and IL-12 are in lower levels at the same age. Strikingly, at PND 14, a period related to synaptic remodeling, only MIP-1 β remains significantly higher. In early adult life (PND 30), IL-1 β , IL-6 and IL-9 are higher (1.2-fold), while IL-3 is lower in serum from MIA offspring. In adult life (PND 60), no alterations in cytokine levels were found between MIA and control offspring (Garay *et al.*, 2013).

The course of cytokines oscillation in periphery does not reflect the pattern observed in brain regions (frontal, CC and Hippocampus), indicating that both processes might have different pathways and cellular components to maintain these differential patterns. Only six cytokines presented a constant level in the serum throughout development (PND 0 - PND 60), such as TNF α , IL-2, -5, -9, -12, -17, which were not observed in any brain region analyzed (Garay *et al.*, 2013).

5. Maternal immune activation and ASD

5.1 Autistic Spectrum Disorder

Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by a behavioral dyad consisting in social and communication deficits and stereotyped behaviors with restricted activities and interests (APA - American Psychiatric Association, 2013). The ASD is a high prevalent disorder, affecting 1:59 children, causing a great impact in different ways, such as economic costs for both families and society (Buescher *et al.*, 2014). The neuropediatric/psychiatric diagnosis is established when the child presents social deficits around the third year of life, commonly due to the exposure to new contexts that demands complex social behavior (Baio *et al.*, 2018). Another factor in ASD is the heterogeneity of the symptoms, which implies a spectrum formed by not only the variety of behavioral manifestations, but also the severity of the alterations.

There is no biomarker that could be used for early diagnosis of ASD yet (Huerta & Lord, 2012). Even though there are many well-accepted surveys for behavioral diagnosis, ASD is a highly complex and heterogeneous disorder (Gadia *et al.*, 2004;

Rapin & Tuchman, 2008), and this heterogeneity could be potentially explained by the individual's background, for example, the particularities of immune system.

In the last decades, the research community credited to Leo Kanner and Hans Asperger the first descriptions of ASD-like behaviors in early 1930s. Recently, many studies have pointed out that the first description of ASD-like behavioral alterations was described by Grunya Sukhareva, a Soviet child psychiatrist who was the first to publish a detailed description of autistic symptoms in 1925. The description included many abnormalities in social behavior and sensory deficits in six boys. The original description was in Russian followed by the publication in German a year later, being translated to English only in 1996.

5.2 Sensory alterations in ASD

The sensory alterations manifest early in the neurodevelopment and contribute to the diagnostic criteria of autism. These abnormalities could be clinically observed in the first six months of life (Baranek et al., 2013). Those symptoms could be assessed from six months of life through six years of life using questionnaires like Sensory Experiences Questionnaire and with a behavior-observing tool like Sensory Processing Assessment (Baranek et al., 2006; Little et al., 2011).

The cortical and subcortical alterations in excitability commonly seen in autistic patients affect the process of neural adaptation, being related to a sensory hypersensitivity or a hyposensitivity (Takarae & Sweeney, 2017). Decreased olfactory cortex activity is associated with impaired odor perception (Koehler et al., 2018) and may help elucidating some cases of sensory perturbation in ASD children (Baranek et al., 2013, 2006). Thus, the sensory impairment precedes the behavioral alterations of autism and could be helpful to an early intervention (A. Estes et al., 2015). Furthermore, sensory-related behavioral alterations were reported in ASD animal models like impairment in tactile response and olfactory behavior related to nest recognition (Fontes-Dutra et al., 2018; Schneider & Przewłocki, 2005); in sensorimotor gating (Markram et al., 2008) and nociceptive response (Baronio et al., 2015). Recently, strategies using prenatal interventions with antioxidant and anti-inflammatory molecules were performed in ASD animal models, being a reliable tool to investigate the molecular mechanisms involved in cortical organization of both excitatory and inhibitory cells that might be related to the behavioral alterations seen in ASD animal models (Fontes-Dutra et al., 2018).

5.3 Cytokines alterations in neurodevelopmental disorders

Alterations in the immunological environment during the gestational period may lead to several abnormalities in the offspring behavior, as seen in disorders like ASD and SZ. Here we summarize some alterations in relevant cytokines which imbalance affects pathways and mechanisms substantial to the typical brain machinery.

IL-1 β is an important cytokine that promotes inflammation by activating macrophages and enhancing lymphocyte function. It also has the capacity to support the infiltration of the inflammatory cells into peripheral tissues, increasing the production of adhesion molecules like vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1) and ICAM-1 (Dinarello, 2009; Gray & Bloch, 2012). Findings of IL-1 β in ASD patients include both increasing and decreasing in their levels, demonstrating that perturbations in this cytokine may contribute to a vast range of alterations (Manzardo et al., 2012; Suzuki et al., 2011). In an animal model of ASD, LPS exposure induced higher levels of IL-1 β in hippocampus (Lucchina & Depino, 2013), and the same pattern of alteration was also related to stereotypy, a core symptom of ASD (Paul Ashwood et al., 2011).

IL-2 is a cytokine secreted by CD8+ and CD4+ T cells, and controls the survival of mature and immature T cells (Kelly et al., 2002; Malek, 2003). Few studies evaluated IL-2 in ASD, but one showed a decreased level in neonatal dried blood samples (Abdallah et al., 2012).

Produced by T cells, IL-4 is the main cytokine of the Th2 response, contributing to proliferation of B cells and cytotoxic T cells, and stimulating IgG and IgE production (Turner et al., 2014). Data in ASD subjects showed reduced levels of IL-4 in neonatal dried blood samples (Abdallah et al., 2012), while the levels in the amniotic fluid were increased (Abdallah, Larsen, Grove, Nørgaard-Pedersen, et al., 2013).

IL-5 is produced by T cells and plays important roles in activating eosinophils (Greenfeder et al., 2001). This cytokine promotes the proliferation and maturation of eosinophils and also stimulates the production of IgA and IgM (Turner et al., 2014). Data in ASD showed decreased levels in neonatal dried blood samples and increased levels in plasma (Abdallah et al., 2012; Suzuki et al., 2011).

IL-6 is mainly produced by the T helper cells, macrophages and fibroblasts, activating plasma cells and B cells and stimulating them to produce IgG (Turner et al., 2014). IL-6 have a dual effect, pro and anti-inflammatory (Dinarello, 2009), and it has

been largely studied in ASD, being related to both the development of core symptoms of ASD and to the pro-inflammatory response in MIA models of autism (S. E. P. Smith et al., 2007).

IL-8 is produced mostly by macrophages, targeting neutrophils and activating them (Bickel, 1993). Therefore, this cytokine has a chemotactic role and pro-inflammatory activities (Turner et al., 2014). Data have associated higher levels of IL-8 with stereotypy and hyperactivity, symptoms commonly seen in neurodevelopmental disorders (Paul Ashwood et al., 2011). In ASD subjects, scientists found elevated levels of IL-8 in plasma (Suzuki et al., 2011), cerebrospinal fluid (Vargas et al., 2005) and frontal cortex (X. Li et al., 2009).

IL-10 has a primary anti-inflammatory activity, being produced by many cells types, including macrophages, NK cells, eosinophils, neutrophils, mast cells and B cells (Ma et al., 2015). It also regulates the differentiation and the growth of B cells, NK cells, Th cells, mast cells, granulocytes and keratinocytes (Ma et al., 2015; Turner et al., 2014). Hence, this cytokine plays a central role in controlling the immune response when the organism faces pathogens, acting in order to maintain the homeostasis (Ma et al., 2015). Many studies have reported an increased level of IL-10 in ASD subjects in the anterior cingulate gyrus and in the amniotic fluid (Turner et al., 2014; Vargas et al., 2005) while decreased levels were found in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (P. Ashwood et al., 2006).

IL-12 is produced by T cells and plays roles in the activation of naïve T cells and NK cells (Turner et al., 2014), also inducing IFN- γ production, Th1 cell profile (Gee et al., 2009). Higher levels of IL-12 were found in plasma, PBMC and serum of ASD subjects (Ricci et al., 2013; Suzuki et al., 2011). Those higher levels were also associated with lethargy and stereotypy in ASD subjects (P. Ashwood et al., 2006).

IL-13 is produced by T cells, basophils, eosinophils and NK cells. Synergistically with IL-4, IL-13 participates in the type 2 immunity (Bao & Reinhardt, 2015). However, little is known about the role of IL-13 in ASD; there is only one study showing increased plasma levels of IL-13 (Suzuki et al., 2011).

IL-17 is produced by NK cells and innate lymphoid cells, presenting a key role in the immunity against pathogens in both intra- and extracellular compartments. Moreover, IL-17 also plays a significant role in inflammation-associated diseases, like tumors and infections (Kuwabara et al., 2017; Zhong et al., 2015). Few studies have

shown elevated levels of IL-17 in the serum and plasma in ASD subjects (AL-Ayadhi & Mostafa, 2012; Suzuki et al., 2011).

IL-23 is produced by macrophages, keratinocytes and antigen presenting cells after a pathogen is recognized, being significantly important to autoimmune disease responses (Fischer et al., 2017; Toussiro, 2012; Ziblat et al., 2018). Increased levels of IL-23 were reported in serum of ASD patients (Ricci et al., 2013).

6. Animal models of MIA

Preclinical studies using animal models have explored the relationship between MIA and neurodevelopment by inducing inflammation in pregnant mice, rats and nonhuman primates. It is well known that the maternal immune response, but not a specific pathogen, increases the risk factor for neuropsychiatric disorders including SZ, ASD, MD and BD (Brown & Derkits, 2010; Brown & Meyer, 2018; M. L. Estes & McAllister, 2016; Hagberg et al., 2012). These models provide an opportunity to uncover pathogenic mechanisms and explore potential therapeutic interventions against MIA-induced neurodevelopmental disorders (Careaga et al., 2017; Harvey & Boksa, 2012; Urs Meyer, 2014; Urs Meyer et al., 2009). Thus, different agents have been used to induce maternal immune response during gestation in animal models (Urs Meyer, 2014).

6.1 Induced by biological compounds

The most commonly used agents are poly(I:C), LPS and IL-6.

6.1.1 Poly(I:C)

Poly(I:C) is a commercially available synthetic analog of double-stranded RNA (dsRNA), which is generated during viral infection as a replication intermediate for single-stranded RNA or as a by-product of symmetrical transcription in DNA viruses (Akira & Takeda, 2004). It is recognized as foreign by the mammalian immune system through the transmembrane protein toll-like receptor 3 (TLR3) (Akira & Takeda, 2004). During pregnancy, Poly(I:C) is given systemically at a specific gestational stage, accurately mimicking the acute phase response to viral infection (Kimura et al., 1994b) and leads to significant inflammatory responses in the fetal brain. The array of these responses involves the production and release of many pro-inflammatory cytokines,

including IL-1 β , IL-6 and TNF α (Cunningham et al., 2007) also inducing the production of type 1 IFNs, such as IFN α and IFN β (Kimura et al., 1994b).

Many neurochemical and brain morphological alterations have been detected in adult mice and rats after maternal gestational exposure to Poly(I:C) (Urs Meyer & Feldon, 2010, 2012; Urs Meyer et al., 2009). A great number of rodent studies further provided robust evidence for the emergence of behavioral, cognitive and pharmacological dysfunctions after prenatal Poly(I:C)-induced immune activation (Urs Meyer, 2014). This treatment protocol has been shown to induce several cognitive and social features of ASD (Urs Meyer, 2014), such as abnormal vocalization, deficits in social interaction and communication (Pendyala et al., 2017). Furthermore, since their initial establishment, animal models induced with Poly(I:C) have repeatedly documented structural and functional phenotypes that are implicated in SZ and related psychotic disorders (M. L. Estes & McAllister, 2016; Urs Meyer, 2014; Urs Meyer & Feldon, 2010).

One intriguing feature of the prenatal Poly(I:C) model is that the full spectrum of behavioral, cognitive and pharmacological abnormalities only appears after the offspring have reached late adolescence or early adulthood (Ozawa et al., 2006; Piontkewitz et al., 2011; Vuillermot et al., 2010; Zuckerman et al., 2003). This maturational delay is indicative of progression of pathological symptoms from pubescence to adulthood, which is consistent with the post-pubertal onset of full-blown psychotic behavior in SZ and related disorders (Tandon et al., 2009). Compared to live pathogens like influenza virus, the use of Poly(I:C) mimics the immune activation while conferring control over time course and dose of immunogen exposure. This allows to design a protocol with precise time of maternal immune response according to specific periods of fetal development (Boksa, 2010).

6.1.2 LPS

Maternal administration of the bacterial endotoxin LPS is a widely used model system to mimic an innate acute phase response to bacterial infection in the absence of live bacteria exposure (Urs Meyer, 2014). LPS is a gram-negative bacterial cell wall component, which is recognized mainly by the pathogen recognition receptor transmembrane protein TLR4 (Akira & Takeda, 2004). Binding to TLR4, LPS stimulates the expression of a wide range of innate immune responses that includes

the synthesis and release of various pro-inflammatory cytokines (Akira & Takeda, 2004).

There are some notable similarities between the responses triggered by LPS and poly(I:C) (Akira & Takeda, 2004; Kimura et al., 1994a), therefore the prenatal LPS treatment also triggers several behavioral and neurochemical changes relevant to neuropsychiatric disorders, such as ASD (Urs Meyer, 2014). Despite the similarities between LPS and Poly(I:C) induced effects, there are also some differences between the two models related to the nature of brain and behavioral changes. Such differences in the long-term outcomes between prenatal exposures to bacterial-like and viral/viral-like immunogens might support the idea that different pathogens can induce a distinct set of neuroimmune abnormalities across brain development (Urs Meyer, 2014). As in the Poly(I:C) model, in LPS, the immunological threat is given to the pregnant animals at a critical gestational stage and also allows the time and intensity of MIA to be more precisely controlled (Urs Meyer et al., 2009). The most remarkable methodological disadvantages of LPS is marked fetal losses due to spontaneous abortion in higher doses (Urs Meyer, 2014).

6.1.3 IL-6

During pregnancy, infection or immune responses induce cytokine release, influencing fetal neurodevelopment and leading to neurological conditions in adulthood (Samuelsson et al., 2006). Smith *et al.* have examined several pro-inflammatory cytokines as potential mediators of the effects of MIA on fetal brain development. They identified IL-6 as a key immunological mediator of the link between maternal immune activation and altered brain development (S. E. P. Smith et al., 2007). When IL-6 is administered to pregnant animals, it induces long-lasting functional and structural alterations in the adult offspring, some of these abnormalities are highly comparable to those induced by prenatal exposure to Poly(I:C) and LPS (Samuelsson et al., 2006; S. E. P. Smith et al., 2007). Strikingly, the offspring of pregnant mice treated with IL-6 during midgestation also demonstrated core behavioral features associated with ASD including impaired social interaction, decreased communication and more repetitive behavior (Minakova et al., 2019).

Interestingly, if IL-6 is eliminated from the maternal immune response by genetic interventions or if IL-6 blocking antibodies are used, the maternal immune challenge by Poly(I:C) is no longer efficient in inducing behavioral changes as well as

brain alterations in the resulting offspring (Urs Meyer, 2014). Studies showed that blocking IL-6 prevents >90% of the changes seen in offspring of Poly(I:C)-injected females (S. E. P. Smith et al., 2007).

6.2 Induced by pharmacological drugs

6.2.1 Valproic acid

Valproic acid (VPA) is a fatty acid and widely-used as anticonvulsant and mood-stabilizer in the treatment of epilepsy and BD (Ranger & Ellenbroek, 2015; Florence I. Rouillet et al., 2013). Clinical studies over the years have shown that intrauterine exposure to VPA is associated with birth defects, cognitive impairments and an increased risk of autism (Florence I. Rouillet et al., 2013). Based on these observations, a prenatal injection of VPA has been used to induce autistic-like features in animal models in rodents (Bambini-Junior et al., 2011; Schneider & Przewłocki, 2005).

A single administration of VPA in utero during a critical immunological window leads to developmental delays and lifelong deficits in motor performance, social behavior and anxiety-like behavior in rat offspring (Bambini-Junior et al., 2011; Kolozsi et al., 2009; Schneider & Przewłocki, 2005). In addition to the behavioral alterations, molecular (Gottfried et al., 2013; F I Rouillet et al., 2010), morphological (Dendrinos et al., 2011; Favre et al., 2013; Gottfried et al., 2013; Rodier et al., 1997) and electrophysiological autistic-like features (Dawson et al., 2005; Markram et al., 2008; Rinaldi et al., 2008) were also seen in this model.

Even though the mechanism underlying the teratogenicity of this drug is still unknown, histone deacetylase (HDAC) inhibition by VPA and changes in gene expression may explain part of the immunological alterations as well as the outcomes in psychiatric disorders (Deckmann et al., 2018b; Gottfried et al., 2013).

6.3 Non-infectious models

6.3.1 Maternal obesity

Maternal obesity during pregnancy has been associated with a low-grade inflammation from chronic activation of the innate immune system (Bastard et al., 2006; Christian & Porter, 2014; Das, 2002). It is also a risk factor for chronic behavioral

and neurodevelopmental disorders in the offspring, including ASD (Minakova & Warner, 2018). Studies that have examined behavioral changes in mice born from dams fed with a high-fat diet (MHFD) compared to dams fed with a regular diet (MRD) have shown that MHFD induces a shift in microbial ecology that negatively impacts offspring social behavior. Thus, offspring of MHFD dams had fewer social interactions, no preference for social novelty and impaired sociability compared to MRD controls (Buffington et al., 2016).

6.3.2 Prenatal stress (PNS)

Similarly to MIA, PNS also contributes to psychiatric risk and aberrant offspring behavior. Prenatal stress exposure has been identified as a risk factor for the development of neuropsychiatric disorders in offspring including ASD (Holloway et al., 2013; Khashan et al., 2008; Kinney et al., 2008). In animal models, research has linked PNS to heightened levels of anxiety, decreased sociability and deficits in cognitive and motor function (Akatsu et al., 2015; Said et al., 2015). The mechanisms underlying these outcomes are still not clear. Offspring microglia and the pro-inflammatory cytokine IL-6, known to influence microglia, may serve as common a mechanism between PNS and MIA. Delay in GABAergic progenitor migration is also seen in PNS models. Behavioral effects of prenatal stress in offspring, including increased anxiety-like behavior, decreased sociability and locomotor inhibition, may be related to these GABAergic delays (Gumusoglu et al., 2017).

6.4 Others

6.4.1 Influenza

Strains of influenza have also been used to induce MIA phenotypes, with the main advantage of eliciting a full spectrum of immune responses (Urs Meyer, 2014; S. Smith et al., 2010). In this model, the dams received intranasal infusion with a sublethal dose of a mouse-adapted human influenza strain (Urs Meyer, 2014). A pioneering study in 2003 showed that the offspring of virus-infected dams exhibited highly significant changes in exploratory behavior, social interaction and sensorimotor tests (Shi et al., 2003). These alterations in behavior are observed in several mental illnesses, including ASD (McAlonan et al., 2002). The striking behavioral changes in mice born from infected dams suggest that brain development was altered by this perturbation of the fetal environment (Shi et al., 2003). By exposing pregnant dams to

influenza virus at different gestational stages, the prenatal influenza model has also been used to explore the impact of the precise prenatal timing (Kneeland & Fatemi, 2013). It is important to note that in these experiments, maternal viral infection acts through the maternal inflammatory response to alter fetal brain development. However, viral RNAs are not detectable in fetal brains from infected dams the exposed offspring display striking behavioral and histological abnormalities (Shi et al., 2005).

6.4.2 CMV

Many pieces of evidence suggest that maternal CMV infection may be associated with neurodevelopmental disorders in the offspring, including ASD (M. L. Estes & McAllister, 2015; Yamashita et al., 2003). To further understand the mechanisms underlying these viral infections an animal model was created to investigate whether murine CMV (MCMV) infection causes alterations in placental IL-6/10 and TLR2/4 levels and also to determine if this infection could be associated with the neurodevelopmental disorders in progeny (Liao et al., 2018). Unlike human CMV, MCMV does not cross mouse placenta to infect the embryo. Thus, it can be used as a model to naturally exclude the direct impact of MCMV-related MIA on the offspring (Liao et al., 2018). The study demonstrated that a MCMV infection can lead to a significant reduction of the weight of placenta and fetal brain. The increased gene expression of placental TLR2 and TLR4 in the MCMV group might be involved in placental inflammation and production of pro-inflammatory cytokine IL-6. Unbalanced expression (either increase or decrease) of IL-6 in placenta might be associated with the neurodevelopmental disorders in offspring (Liao et al., 2018).

7. Final considerations

The evidence and discussions brought up in this chapter demonstrated the high level of complexity involving MIA and consequent neurodevelopmental alterations in the offspring. It is important to notice that the underlying mechanisms of maternal-fetal interactions are still beginning to be understood, although the hypothesis of long-term postnatal effects associated with MIA goes back to the 1970s. Several epidemiological studies demonstrated time-dependent and, sometimes, pathogen-dependent relations regarding MIA and the increased risk of neurodevelopmental disorders, besides interesting genetic factors, which can provide more insights about maternal-

fetal interaction and the possible impaired outcomes provided by an imbalance in this relation.

Pregnancy is a condition characterized by a diverse expression of soluble markers of inflammation and differential immune cell pattern. This immune profile shift is essential to assure the natural physiology of the process. However, immune challenges during pregnancy may confer a susceptible factor regarding to neuropsychiatric diseases due to the interactions of immune response with maternal-fetal features.

Fetal impairments following MIA can be observed at several levels: cytokine alterations in both serum and CNS; microglial and astrocyte activation and increased risk of postnatal psychiatric disorders onset. In order to clarify these mechanisms in the context of neurodevelopmental alterations, several animal models with different approaches emerged. Especially for ASD, those models were very useful to elucidate key mediators in this context, as the pivotal role of IL-6 and TLR receptors, besides neuroglial and immune pattern modifications already related to the classic set of behaviors identified in ASD.

List of abbreviations

APC	antigen-presenting cell
ASD	autistic spectrum disorder
BD	bipolar disorder
CC	cingulate cortex
CMV	cytomegalovirus
CNS	Central Nervous System
CRS	congenital rubella syndrome
CTB	cytotrophoblast
CXCL1	(C-X-C motif) ligand 1 or keratinocyte chemoattractant (KC)
DNA	deoxyribonucleic acid
DSM-5	5th edition of Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
dsRNA	double-stranded RNA
EEG	electroencephalograms

EVT	extravillous trophoblasts
GABA	gamma-aminobutyric acid
GAD	glutamic acid decarboxylase
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
hCG	human chorionic gonadotropin
HDAC	histone deacetylase
Hip	hippocampus
HSV	herpes virus
ICAM	intercellular adhesion molecule 1 or cluster differentiation (CD54)
IFN	interferon
IL	interleukin
iNOS	inducible NOS (nitric oxide synthase)
IVS	intervillous space
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LPS	lipopolysaccharide
M1	motor cortex
MBP	myelin-basic protein
MCMV	murine cytomegalovirus
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MD	major depression
MGE	medial ganglionic eminence
MHFD	mice born from dams fed a high-fat diet
MIA	maternal immune activation
MIP-1 α	inflammatory protein 1 alpha
mPFC	medial prefrontal cortex
MRD	mice born from dams fed a regular diet
mRNA	messenger ribonucleic acid
NK cell	natural killer cell
PBMC	peripheral blood mononuclear cell

PFC	prefrontal cortex
PND	postnatal day
PNS	prenatal stress
poly(I:C)	polyinosinic:polycytidylic acid
PV	parvalbumin-positive neurons
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RLN	reelin-positive neurons
SST	somatostatin-positive neurons
SYN	syncytiotrophoblast
SZ	schizophrenia
TGF- β	transforming growth factor- β
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNFR1	tumor necrosis factor receptor I
TRP	transient receptor potential
VCAM-1	vascular cell adhesion protein 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
V1	primary visual cortex
VPA	valproic acid

References

- Aavani, T., Rana, S. A., Hawkes, R., & Pittman, Q. J. (2015). Maternal Immune Activation Produces Cerebellar Hyperplasia and Alterations in Motor and Social Behaviors in Male and Female Mice. *The Cerebellum*, *14*(5), 491–505.
<https://doi.org/10.1007/s12311-015-0669-5>
- Abdallah, M. W., Larsen, N., Grove, J., Rgaard-pedersen, B. N. Ø., Thorsen, P., Mortensen, E. L., & Hougaard, D. M. (2013). Amniotic fluid inflammatory cytokines: Potential markers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *The World Journal of Biological Psychiatry*, (May), 528–538.
<https://doi.org/10.3109/15622975.2011.63>

- Abdallah, M. W., Larsen, N., Mortensen, E. L., Atladóttir, H. Ó., Nørgaard-Pedersen, B., Bonfeld-Jørgensen, E. C., Grove, J., & Hougaard, D. M. (2012). Neonatal levels of cytokines and risk of autism spectrum disorders: An exploratory register-based historic birth cohort study utilizing the Danish Newborn Screening Biobank. *Journal of Neuroimmunology*, *252*(1–2), 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.07.013>
- Akatsu, S., Ishikawa, C., Takemura, K., Ohtani, A., & Shiga, T. (2015). Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice. *Neuroscience Research*, *101*, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.07.002>
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, *4*(7), 499–511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- AL-Ayadhi, L. Y., & Mostafa, G. A. (2012). Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism. *Journal of Neuroinflammation*, *9*(1), 595. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-158>
- Ander, S. E., Diamond, M. S., & Coyne, C. B. (2019). Immune responses at the maternal-fetal interface. *Science Immunology*, *4*(31), eaat6114. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat6114>
- APA - American Psychiatric Association. (2013). DSM-5 Diagnostic Classification. In *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.x00DiagnosticClassification>
- Aristizábal, B., & González, Á. (2013). Chapter 2: Innate immune system. In El Rosario University Press (Ed.), *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. Bogotá (Colombia). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459455/>
- Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P., & Luheshi, G. N. (2006). The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, *11*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001748>
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., & Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.003>

- Ashwood, P., Wills, S., & Van de Water, J. (2006). The immune response in autism: a new frontier for autism research. *Journal of Leukocyte Biology*, *80*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1189/jlb.1205707>
- Atladottir, H. O., Henriksen, T. B., Schendel, D. E., & Parner, E. T. (2012). Autism After Infection, Febrile Episodes, and Antibiotic Use During Pregnancy: An Exploratory Study. *PEDIATRICS*, *130*(6), e1447–e1454. <https://doi.org/10.1542/peds.2012-1107>
- Atladóttir, H. Ó., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D. E., Lemcke, S., Abdallah, M., & Parner, E. T. (2010). Maternal Infection Requiring Hospitalization During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *40*(12), 1423–1430. <https://doi.org/10.1007/s10803-010-1006-y>
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D. L., Maenner, M. J., Daniels, J., Warren, Z., Kurzius-Spencer, M., Zahorodny, W., Robinson, C., Rosenberg, T., White, T., Durkin, M. S., Imm, P., Nikolaou, L., Yeargin-Allsopp, M., Lee, L.-C., Harrington, R., Lopez, M., Fitzgerald, R. T., Hewitt, A., Pettygrove, S., Constantino, J. N., Vehorn, A., Shenouda, J., Hall-Lande, J., Van, K., Naarden, Braun, & Dowling, N. F. (2018). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR. Surveillance Summaries*, *67*(6), 1–23. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6706a1>
- Ballentine, S. A., Greba, Q., Dawicki, W., Zhang, X., Gordon, J. R., & Howland, J. G. (2015). Behavioral alterations in rat offspring following maternal immune activation and ELR-CXC chemokine receptor antagonism during pregnancy: Implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *57*, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.11.002>
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G. A., Moreira, J. C. F., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2011). 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>
- Bao, K., & Reinhardt, R. L. (2015). The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. *Cytokine*, *75*(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.05.008>

- Baranek, G. T., David, F. J., Poe, M. D., Stone, W. L., & Watson, L. R. (2006). Sensory Experiences Questionnaire: discriminating sensory features in young children with autism, developmental delays, and typical development. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, *47*(6), 591–601. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2005.01546.x>
- Baranek, G. T., Watson, L. R., Boyd, B. A., Poe, M. D., David, F. J., & McGuire, L. (2013). Hyporesponsiveness to social and nonsocial sensory stimuli in children with autism, children with developmental delays, and typically developing children. *Development and Psychopathology*, *25*(2), 307–320. <https://doi.org/10.1017/S0954579412001071>
- Baronio, D., Castro, K., Gonchoroski, T., de Melo, G. M., Nunes, G. D. F., Bambini-Junior, V., Gottfried, C., & 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>
- Basil, P., Li, Q., Gui, H., Hui, T. C. K., Ling, V. H. M., Wong, C. C. Y., Mill, J., McAlonan, G. M., & Sham, P.-C. (2018). Prenatal immune activation alters the adult neural epigenome but can be partly stabilised by a n-3 polyunsaturated fatty acid diet. *Translational Psychiatry*, *8*(1), 125. <https://doi.org/10.1038/s41398-018-0167-x>
- Bastard, J.-P., Maachi, M., Lagathu, C., Kim, M. J., Caron, M., Vidal, H., Capeau, J., & Feve, B. (2006). Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine Network*, *17*(1), 4–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16613757>
- Bergdolt, L., & Dunaevsky, A. (2019). Brain changes in a maternal immune activation model of neurodevelopmental brain disorders. *Progress in Neurobiology*, *175*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2018.12.002>
- Beumer, W., Gibney, S. M., Drexhage, R. C., Pont-Lezica, L., Doorduyn, J., Klein, H. C., Steiner, J., Connor, T. J., Harkin, A., Versnel, M. A., & Drexhage, H. A. (2012). The immune theory of psychiatric diseases: a key role for activated microglia and circulating monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, *92*(5), 959–975. <https://doi.org/10.1189/jlb.0212100>
- Bickel, M. (1993). The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of Periodontology*, *64*(5 Suppl), 456–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8315568>

- Boksa, P. (2010). Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(6), 881–897. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.005>
- Boksa, P., Zhang, Y., Nouel, D., Wong, A., & Wong, T. P. (2016). Early Development of Parvalbumin-, Somatostatin-, and Cholecystokinin-Expressing Neurons in Rat Brain following Prenatal Immune Activation and Maternal Iron Deficiency. *Developmental Neuroscience*, 38(5), 342–353. <https://doi.org/10.1159/000454677>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Borrell, J., Vela, J. M., Arévalo-Martin, A., Molina-Holgado, E., & Guaza, C. (2002). Prenatal Immune Challenge Disrupts Sensorimotor Gating in Adult Rats Implications for the Etiopathogenesis of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 26(2), 204–215. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00360-8](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00360-8)
- Bränn, E., Edvinsson, Å., Rostedt Punga, A., Sundström-Poromaa, I., & Skalkidou, A. (2019). Inflammatory and anti-inflammatory markers in plasma: from late pregnancy to early postpartum. *Scientific Reports*, 9(1), 1863. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38304-w>
- Brown, A. S., & Derkits, E. J. (2010). Prenatal Infection and Schizophrenia: A Review of Epidemiologic and Translational Studies. *American Journal of Psychiatry*, 167(3), 261–280. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.09030361>
- Brown, A. S., & Meyer, U. (2018). Maternal Immune Activation and Neuropsychiatric Illness: A Translational Research Perspective. *American Journal of Psychiatry*, 175(11), 1073–1083. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2018.17121311>
- Brucato, M., Ladd-Acosta, C., Li, M., Caruso, D., Hong, X., Kaczaniuk, J., Stuart, E. A., Fallin, M. D., & Wang, X. (2017). Prenatal exposure to fever is associated with autism spectrum disorder in the boston birth cohort. *Autism Research*, 10(11), 1878–1890. <https://doi.org/10.1002/aur.1841>
- Buescher, A. V. S., Cidav, Z., Knapp, M., & Mandell, D. S. (2014). Costs of Autism Spectrum Disorders in the United Kingdom and the United States. *JAMA Pediatrics*, 168(8), 721. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.210>
- Buffington, S. A., Di Prisco, G. V., Auchtung, T. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., &

- Costa-Mattioli, M. (2016). Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*, *165*(7), 1762–1775. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001>
- Bulla, R., Fischetti, F., Bossi, F., & Tedesco, F. (2004). Feto-maternal immune interaction at the placental level. *Lupus*, *13*(9), 625–629. <https://doi.org/10.1191/0961203304lu2010oa>
- Cai, Z., Pan, Z. L., Pang, Y., Evans, O. B., & Rhodes, P. G. (2000). Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric Research*, *47*(1), 64–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10625084>
- Canetta, S., Bolkan, S., Padilla-Coreano, N., Song, L. J., Sahn, R., Harrison, N. L., Gordon, J. A., Brown, A., & Kellendonk, C. (2016). Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Molecular Psychiatry*, *21*(7), 956–68. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.222>
- Careaga, M., Murai, T., & Bauman, M. D. (2017). Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: From Rodents to Nonhuman and Human Primates. *Biological Psychiatry*, *81*(5), 391–401. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2016.10.020>
- Carpentier, P. A., Begolka, W. S., Olson, J. K., Elhofy, A., Karpus, W. J., & Miller, S. D. (2005). Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, *49*(3), 360–374. <https://doi.org/10.1002/glia.20117>
- Carter, C. J. (2019). Autism genes and the leukocyte transcriptome in autistic toddlers relate to pathogen interactomes, infection and the immune system. A role for excess neurotrophic sAPP α and reduced antimicrobial A β . *Neurochemistry International*, *126*, 36–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.03.007>
- Cawdell-Smith, J., Upfold, J., Edwards, M., & Smith, M. (1992). Neural tube and other developmental anomalies in the guinea pig following maternal hyperthermia during early neural tube development. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, *12*(1), 1–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1354895>
- Cervantes-Gonzalez, M., & Launay, O. (2010). Pandemic influenza A (H1N1) in pregnant women: impact of early diagnosis and antiviral treatment. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *8*(9), 981–984.

<https://doi.org/10.1586/eri.10.83>

- Chess, S. (1971). Autism in children with congenital rubella. *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia*, 1(1), 33–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5172438>
- Chess, S. (1977). Follow-up report on autism in congenital rubella. *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia*, 7(1), 69–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/576606>
- Choi, G. B., Yim, Y. S., Wong, H., Kim, S., Kim, H., Kim, S. V., Hoeffler, C. A., Littman, D. R., & Huh, J. R. (2016). The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. *Science (New York, N. Y.)*, 351(6276), 933–9. <https://doi.org/10.1126/science.aad0314>
- Christian, L. M., & Porter, K. (2014). Longitudinal changes in serum proinflammatory markers across pregnancy and postpartum: Effects of maternal body mass index. *Cytokine*, 70(2), 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.06.018>
- Cunningham, C., Campion, S., Teeling, J., Felton, L., & Perry, V. H. (2007). The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain, Behavior, and Immunity*, 21(4), 490–502. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2006.12.007>
- Das, U. N. (2002). Obesity, metabolic syndrome X, and inflammation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 18(5), 430–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11985951>
- Dawson, G., Webb, S. J., & McPartland, J. (2005). Understanding the Nature of Face Processing Impairment in Autism: Insights From Behavioral and Electrophysiological Studies. *Developmental Neuropsychology*, 27(3), 403–424. https://doi.org/10.1207/s15326942dn2703_6
- de Souza, D. F., Wartchow, K. M., Lunardi, P. S., Brolese, G., Tortorelli, L. S., Batassini, C., Biasibetti, R., & Gonçalves, C.-A. (2015). Changes in Astroglial Markers in a Maternal Immune Activation Model of Schizophrenia in Wistar Rats are Dependent on Sex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 489. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00489>
- Deckmann, I., Schwingel, G. B., Fontes-Dutra, M., Bambini-Junior, V., & Gottfried, C. (2018a). Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to

- Valproic Acid. *Neuroimmunomodulation*, 1–15.
<https://doi.org/10.1159/000492113>
- Deckmann, I., Schwingel, G. B., Fontes-Dutra, M., Bambini-Junior, V., & Gottfried, C. (2018b). Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Neuroimmunomodulation*, 25(5–6), 285–299.
<https://doi.org/10.1159/000492113>
- Dendrinios, G., Hemelt, M., & Keller, A. (2011). Prenatal VPA Exposure and Changes in Sensory Processing by the Superior Colliculus. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 5, 68. <https://doi.org/10.3389/fnint.2011.00068>
- Desmond, M., Wilson, G., Verniaud, W., Melnick, J., & WE, R. (1970). The early growth and development of infants with congenital rubella. *Advances in Teratology*, 4, 39–62.
- DEYKIN, E. Y., & MACMAHON, B. (1979). VIRAL EXPOSURE AND AUTISM. *American Journal of Epidemiology*, 109(6), 628–638.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112726>
- Díaz, P., Powell, T. L., & Jansson, T. (2014). The role of placental nutrient sensing in maternal-fetal resource allocation. *Biology of Reproduction*, 91(4), 82.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121798>
- Dickerson, D. D., & Bilkey, D. K. (2013). Aberrant neural synchrony in the maternal immune activation model: using translatable measures to explore targeted interventions. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 217.
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00217>
- Dickerson, D. D., Wolff, A. R., & Bilkey, D. K. (2010). Abnormal long-range neural synchrony in a maternal immune activation animal model of schizophrenia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(37), 12424–31. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3046-10.2010>
- Dinarello, C. A. (2009). Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 519–550.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132612>
- Duchatel, R. J., Jobling, P., Graham, B. A., Harms, L. R., Michie, P. T., Hodgson, D. M., & Tooney, P. A. (2016). Increased white matter neuron density in a rat model of maternal immune activation — Implications for schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 65, 118–

126. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2015.09.006>

- Edwards, M. J. (2007). Hyperthermia in utero due to maternal influenza is an environmental risk factor for schizophrenia. *Congenital Anomalies*, 47(3), 84–89. <https://doi.org/10.1111/j.1741-4520.2007.00151.x>
- Estes, A., Zwaigenbaum, L., Gu, H., St. John, T., Paterson, S., Elison, J. T., Hazlett, H., Botteron, K., Dager, S. R., Schultz, R. T., Kostopoulos, P., Evans, A., Dawson, G., Eliason, J., Alvarez, S., Piven, J., & IBIS network. (2015). Behavioral, cognitive, and adaptive development in infants with autism spectrum disorder in the first 2 years of life. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 7(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s11689-015-9117-6>
- Estes, M. L., Elmer, B. M., Carter, C. C., & McAllister, A. K. (2018). Maternal immune activation causes age-specific changes in cytokine receptor expression in offspring throughout development. *BioRxiv*, 490466. <https://doi.org/10.1101/490466>
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2015). Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(8), 469–486. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-6-3>
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, 353(6301), 772–777. <https://doi.org/10.1126/science.aag3194>
- Fang, S.-Y., Wang, S., Huang, N., Yeh, H.-H., & Chen, C.-Y. (2015). Prenatal Infection and Autism Spectrum Disorders in Childhood: A Population-Based Case-Control Study in Taiwan. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 29(4), 307–316. <https://doi.org/10.1111/ppe.12194>
- Farina, C., Aloisi, F., & Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology*, 28(3), 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005>
- Fatemi, S. H., Emamian, E. S., Kist, D., Sidwell, R. W., Nakajima, K., Akhter, P., Shier, A., Sheikh, S., & Bailey, K. (1999). Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of prenatally infected neonatal mice. *Molecular Psychiatry*, 4(2), 145–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10208446>
- 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>
- Fillman, S. G., Cloonan, N., Catts, V. S., Miller, L. C., Wong, J., McCrossin, T., Cairns, M., & Weickert, C. S. (2013). Increased inflammatory markers identified in the dorsolateral prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 18(2), 206–214. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.110>
- Fischer, K., Przepiera-Będzak, H., Sawicki, M., Walecka, A., Brzosko, I., & Brzosko, M. (2017). Serum Interleukin-23 in Polish Patients with Systemic Lupus Erythematosus: Association with Lupus Nephritis, Obesity, and Peripheral Vascular Disease. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2017/9401432>
- Fontes-Dutra, M., Santos-Terra, J., Deckmann, I., Brum Schwingel, G., Della-Flora Nunes, G., Hirsch, M. M., Bauer-Negrini, G., Riesgo, R. S., Bambini-Júnior, V., Hedin-Pereira, C., & Gottfried, C. (2018). Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10, 9. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00009>
- Gadia, C. A., Tuchman, R., & Rotta, N. T. (2004). Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. *Jornal de Pediatria*, 80(2), 83–94. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572004000300011>
- Garay, P. A., Hsiao, E. Y., Patterson, P. H., & McAllister, A. K. (2013). Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development. *Brain, Behavior, and Immunity*, 31, 54–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.07.008>
- Gasteiger, G., D’Osualdo, A., Schubert, D. A., Weber, A., Bruscia, E. M., & Hartl, D. (2017). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *Journal of Innate Immunity*, 9(2), 111–125. <https://doi.org/10.1159/000453397>
- Gee, K., Guzzo, C., Che Mat, N. F., Ma, W., & Kumar, A. (2009). The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 8(1), 40–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275692>
- Gentile, I., Zappulo, E., Riccio, M. P., Binda, S., Bubba, L., Pellegrinelli, L., Scognamiglio, D., Operto, F., Margari, L., Borgia, G., & Bravaccio, C. (2017). Prevalence of Congenital Cytomegalovirus Infection Assessed Through Viral Genome Detection in Dried Blood Spots in Children with Autism Spectrum

- Disorders. *In Vivo (Athens, Greece)*, 31(3), 467–473.
<https://doi.org/10.21873/invivo.11085>
- Giovanoli, S., Notter, T., Richetto, J., Labouesse, M. A., Vuillermot, S., Riva, M. A., & Meyer, U. (2015). Late prenatal immune activation causes hippocampal deficits in the absence of persistent inflammation across aging. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0437-y>
- Giovanoli, S., Weber-Stadlbauer, U., Schedlowski, M., Meyer, U., & Engler, H. (2016). Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of overt microglia anomalies. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.015>
- Goines, P. E., Croen, L. A., Braunschweig, D., Yoshida, C. K., Grether, J., Hansen, R., Kharrazi, M., Ashwood, P., & Van de Water, J. (2011). Increased midgestational IFN- γ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: A case-control study. *Molecular Autism*, 2(1), 13. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-2-13>
- Golan, H. M., Lev, V., Hallak, M., Sorokin, Y., & Huleihel, M. (2005). Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology*, 48(6), 903–917.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.12.023>
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Baronio, D., Zanatta, G., Silvestrin, R. B., Vaccaro, T., & Riesgo, R. (2013). Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model. In *InTech*.
<https://doi.org/10.5772/54824>
- Gray, S. M., & Bloch, M. H. (2012). Systematic Review of Proinflammatory Cytokines in Obsessive-Compulsive Disorder. *Current Psychiatry Reports*, 14(3), 220–228. <https://doi.org/10.1007/s11920-012-0272-0>
- Greenfeder, S., Umland, S. P., Cuss, F. M., Chapman, R. W., & Egan, R. W. (2001). Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respiratory Research*, 2(2), 71–9. <https://doi.org/10.1186/RR41>
- Gumusoglu, S. B., Fine, R. S., Murray, S. J., Bittle, J. L., & Stevens, H. E. (2017). The role of IL-6 in neurodevelopment after prenatal stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 65, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.05.015>
- Haarman, B. C. M. (Benno), Riemersma-Van der Lek, R. F., de Groot, J. C., Ruhé, H. G. (Eric), Klein, H. C., Zandstra, T. E., Burger, H., Schoevers, R. A., de Vries,

- E. F. J., Drexhage, H. A., Nolen, W. A., & Doorduyn, J. (2014). Neuroinflammation in bipolar disorder – A [11C]-(R)-PK11195 positron emission tomography study. *Brain, Behavior, and Immunity*, *40*, 219–225.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.016>
- Hagberg, H., Gressens, P., & Mallard, C. (2012). Inflammation during fetal and neonatal life: Implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Annals of Neurology*, *71*(4), 444–457.
<https://doi.org/10.1002/ana.22620>
- Hao, L. Y., Hao, X. Q., Li, S. H., & Li, X. H. (2010). Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats. *Neuroscience*, *166*(3), 763–770.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.006>
- Harvey, L., & Boksa, P. (2012). Prenatal and postnatal animal models of immune activation: Relevance to a range of neurodevelopmental disorders. *Developmental Neurobiology*, *72*(10), 1335–1348.
<https://doi.org/10.1002/dneu.22043>
- Hercher, C., Chopra, V., & Beasley, C. L. (2014). Evidence for morphological alterations in prefrontal white matter glia in schizophrenia and bipolar disorder. *Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN*, *39*(6), 376–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24936776>
- Holloway, T., Moreno, J. L., Umali, A., Rayannavar, V., Hodes, G. E., Russo, S. J., & Gonzalez-Maeso, J. (2013). Prenatal Stress Induces Schizophrenia-Like Alterations of Serotonin 2A and Metabotropic Glutamate 2 Receptors in the Adult Offspring: Role of Maternal Immune System. *Journal of Neuroscience*, *33*(3), 1088–1098. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2331-12.2013>
- Hornig, M., Bresnahan, M. A., Che, X., Schultz, A. F., Ukaigwe, J. E., Eddy, M. L., Hirtz, D., Gunnes, N., Lie, K. K., Magnus, P., Mjaaland, S., Reichborn-Kjennerud, T., Schjølberg, S., Øyen, A.-S., Levin, B., Susser, E. S., Stoltenberg, C., & Lipkin, W. I. (2018). Prenatal fever and autism risk. *Molecular Psychiatry*, *23*(3), 759–766. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.119>
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Chow, J., Mazmanian, S. K., & Patterson, P. H. (2012). Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(31), 12776–81.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1202556109>
- Huerta, M., & Lord, C. (2012). Diagnostic Evaluation of Autism Spectrum Disorders. *Pediatric Clinics of North America*, 103–111.
<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2011.10.018>
- Hutson, M. R., Keyte, A. L., Hernández-Morales, M., Gibbs, E., Kupchinsky, Z. A., Argyridis, I., Erwin, K. N., Pegram, K., Kneifel, M., Rosenberg, P. B., Matak, P., Xie, L., Grandl, J., Davis, E. E., Katsanis, N., Liu, C., & Benner, E. J. (2017). Temperature-activated ion channels in neural crest cells confer maternal fever-associated birth defects. *Science Signaling*, 10(500), eaal4055.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aal4055>
- Hutton, J. (2016). Does Rubella Cause Autism: A 2015 Reappraisal? *Frontiers in Human Neuroscience*, 10, 25. <https://doi.org/10.3389/FNHUM.2016.00025>
- Imai, K., Kotani, T., Tsuda, H., Nakano, T., Ushida, T., Iwase, A., Nagai, T., Toyokuni, S., Suzumura, A., & Kikkawa, F. (2018). Administration of molecular hydrogen during pregnancy improves behavioral abnormalities of offspring in a maternal immune activation model. *Scientific Reports*, 8(1), 9221.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27626-4>
- Inta, D., Lang, U. E., Borgwardt, S., Meyer-Lindenberg, A., & Gass, P. (2016). Microglia Activation and Schizophrenia: Lessons From the Effects of Minocycline on Postnatal Neurogenesis, Neuronal Survival and Synaptic Pruning. *Schizophrenia Bulletin*, 43(3), sbw088.
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbw088>
- John, G. R., Chen, L., Riviaccio, M. A., Melendez-Vasquez, C. V, Hartley, A., & Brosnan, C. F. (2004). Interleukin-1 Induces a Reactive Astroglial Phenotype via Deactivation of the Rho GTPase-Rock Axis. *Journal of Neuroscience*, 24(11), 2837–2845. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4789-03.2004>
- Juckel, G., Manitz, M. P., Brüne, M., Friebe, A., Heneka, M. T., & Wolf, R. J. (2011). Microglial activation in a neuroinflammatory animal model of schizophrenia — a pilot study. *Schizophrenia Research*, 131(1–3), 96–100.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2011.06.018>
- Kelly, E., Won, A., Refaeli, Y., & Van Parijs, L. (2002). IL-2 and related cytokines can promote T cell survival by activating AKT. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(2), 597–603. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777951>

- Khan, V. R., & Brown, I. R. (2002). The effect of hyperthermia on the induction of cell death in brain, testis, and thymus of the adult and developing rat. *Cell Stress & Chaperones*, 7(1), 73–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11892990>
- Khashan, A. S., Abel, K. M., McNamee, R., Pedersen, M. G., Webb, R. T., Baker, P. N., Kenny, L. C., & Mortensen, P. B. (2008). Higher Risk of Offspring Schizophrenia Following Antenatal Maternal Exposure to Severe Adverse Life Events. *Archives of General Psychiatry*, 65(2), 146. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.20>
- Kieffer, T. E. C., Laskewitz, A., Scherjon, S. A., Faas, M. M., & Prins, J. R. (2019). Memory T Cells in Pregnancy. *Frontiers in Immunology*, 10, 625. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00625>
- Kimura, M., Toth, L. A., Agostini, H., Cady, A. B., Majde, J. A., & Krueger, J. M. (1994a). Comparison of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *The American Journal of Physiology*, 267(6 Pt 2), R1596-605. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.267.6.R1596>
- Kimura, M., Toth, L. A., Agostini, H., Cady, A. B., Majde, J. A., & Krueger, J. M. (1994b). Comparison of acute phase responses induced in rabbits by lipopolysaccharide and double-stranded RNA. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 267(6), R1596–R1605. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.267.6.R1596>
- Kinney, D. K., Munir, K. M., Crowley, D. J., & Miller, A. M. (2008). Prenatal stress and risk for autism. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(8), 1519–1532. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2008.06.004>
- Kneeland, R. E., & Fatemi, S. H. (2013). Viral infection, inflammation and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 42, 35–48. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2012.02.001>
- Koehler, L., Fournel, A., Albertowski, K., Roessner, V., Gerber, J., Hummel, C., Hummel, T., & Bensafi, M. (2018). Impaired Odor Perception in Autism Spectrum Disorder Is Associated with Decreased Activity in Olfactory Cortex. *Chemical Senses*, 43(8), 627–634. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjy051>
- Kolozsi, E., Mackenzie, R. N., Rouillet, F. I., Decatanzaro, D., & Foster, J. A. (2009). Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic

- adhesion molecule neuroligin 3 in mice. *Neuroscience*, 163(4), 1201–1210.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.021>
- Kourtis, A. P., Read, J. S., & Jamieson, D. J. (2014). Pregnancy and infection. *The New England Journal of Medicine*, 370(23), 2211–8.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1213566>
- Krakowiak, P., Goines, P. E., Tancredi, D. J., Ashwood, P., Hansen, R. L., Hertz-Picciotto, I., & Van de Water, J. (2017). Neonatal Cytokine Profiles Associated With Autism Spectrum Disorder. *Biological Psychiatry*, 81(5), 442–451.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.08.007>
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 312–8. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8843599>
- Kuwabara, T., Ishikawa, F., Kondo, M., & Kakiuchi, T. (2017). The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/3908061>
- Labouesse, M. A., Dong, E., Grayson, D. R., Guidotti, A., & Meyer, U. (2015). Maternal immune activation induces *GAD1* and *GAD2* promoter remodeling in the offspring prefrontal cortex. *Epigenetics*, 10(12), 1143–1155.
<https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1114202>
- Lee, J. Y., & Bowden, D. S. (2000). Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 571–87.
<https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.571-587.2000>
- Li, Q., & Barres, B. A. (2017). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews. Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
- Li, W.-Y., Chang, Y.-C., Lee, L. J.-H., & Lee, L.-J. (2014). Prenatal Infection Affects the Neuronal Architecture and Cognitive Function in Adult Mice. *Developmental Neuroscience*, 36(5), 359–370. <https://doi.org/10.1159/000362383>
- Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X. M., Ji, L., Brown, T., & Malik, M. (2009). Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal of Neuroimmunology*, 207(1–2), 111–116.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>
- Liao, Y., Zhang, Y., Liu, X., Lu, Y., Zhang, L., Xi, T., Shu, S., & Fang, F. (2018). Maternal Murine Cytomegalovirus Infection during Pregnancy Up-regulates the Gene Expression of Toll-like Receptor 2 and 4 in Placenta. *Current Medical*

- Science*, 38(4), 632–639. <https://doi.org/10.1007/s11596-018-1924-z>
- Lins, B. R., Hurtubise, J. L., Roebuck, A. J., Marks, W. N., Zabder, N. K., Scott, G. A., Greba, Q., Dawicki, W., Zhang, X., Rudulier, C. D., Gordon, J. R., & Howland, J. G. (2018). Prospective Analysis of the Effects of Maternal Immune Activation on Rat Cytokines during Pregnancy and Behavior of the Male Offspring Relevant to Schizophrenia. *ENeuro*, 5(4).
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0249-18.2018>
- Lins, B. R., Marks, W. N., Zabder, N. K., Greba, Q., & Howland, J. G. (2019). Maternal Immune Activation during Pregnancy Alters the Behavior Profile of Female Offspring of Sprague Dawley Rats. *ENeuro*, 6(2).
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0437-18.2019>
- Little, L. M., Freuler, A. C., Houser, M. B., Guckian, L., Carbine, K., David, F. J., & Baranek, G. T. (2011). Psychometric validation of the Sensory Experiences Questionnaire. *The American Journal of Occupational Therapy : Official Publication of the American Occupational Therapy Association*, 65(2), 207–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21476368>
- Liu, W., Tang, Y., & Feng, J. (2011). Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sciences*, 89(5–6), 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.011>
- Liverman, C. S., Kaftan, H. A., Cui, L., Hersperger, S. G., Taboada, E., Klein, R. M., & Berman, N. E. J. (2006). Altered expression of pro-inflammatory and developmental genes in the fetal brain in a mouse model of maternal infection. *Neuroscience Letters*, 399(3), 220–225.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.064>
- Lombardo, M. V., Moon, H. M., Su, J., Palmer, T. D., Courchesne, E., & Pramparo, T. (2018). Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, 23(4), 1001–1013.
<https://doi.org/10.1038/mp.2017.15>
- Lucchina, L., & Depino, A. M. (2013). Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism. *Autism Research*, 7(2), 273–289.
<https://doi.org/10.1002/aur.1338>
- Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., Li, N., & Wei, F. (2015). Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and

dendritic cells. *F1000Research*, 4.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.7010.1>

Mahic, M., Mjaaland, S., Bøvelstad, H. M., Gunnes, N., Susser, E., Bresnahan, M., Øyen, A.-S., Levin, B., Che, X., Hirtz, D., Reichborn-Kjennerud, T., Schjølberg, S., Roth, C., Magnus, P., Stoltenberg, C., Surén, P., Hornig, M., & Lipkin, W. I. (2017). Maternal Immunoreactivity to Herpes Simplex Virus 2 and Risk of Autism Spectrum Disorder in Male Offspring. *MSphere*, 2(1).

<https://doi.org/10.1128/mSphere.00016-17>

Makinodan, M., Tatsumi, K., Manabe, T., Yamauchi, T., Makinodan, E., Matsuyoshi, H., Shimoda, S., Noriyama, Y., Kishimoto, T., & Wanaka, A. (2008). Maternal immune activation in mice delays myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring. *Journal of Neuroscience Research*, 86(10), 2190–2200. <https://doi.org/10.1002/jnr.21673>

Malek, T. R. (2003). The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(6), 961–965.

<https://doi.org/10.1189/jlb.0603272>

Manzardo, A. M., Henkhaus, R., Dhillon, S., & Butler, M. G. (2012). Plasma cytokine levels in children with autistic disorder and unrelated siblings. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 30(2), 121–127.

<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.12.003>

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>

Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 14(S2), 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>

Martínez-Varea, A., Pellicer, B., Perales-Marín, A., & Pellicer, A. (2014).

Relationship between maternal immunological response during pregnancy and onset of preeclampsia. *Journal of Immunology Research*, 2014, 210241.

<https://doi.org/10.1155/2014/210241>

McAlonan, G. M., Daly, E., Kumari, V., Critchley, H. D., van Amelsvoort, T., Suckling, J., Simmons, A., Sigmundsson, T., Greenwood, K., Russell, A.,

- Schmitz, N., Happe, F., Howlin, P., & Murphy, D. G. M. (2002). Brain anatomy and sensorimotor gating in Asperger's syndrome. *Brain : A Journal of Neurology*, 125(Pt 7), 1594–606. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077008>
- McDermott, K. W., Anderson, R. C., Foley, T., Radford, J., O'Halloran, S., & O'Keefe, G. W. (2017). Changes in Oligodendroglial and Microglial Cell Populations in the Embryonic Rat Spinal Cord Following Maternal Immune Activation. *The FASEB Journal*.
- Meyer, U. (2014). Prenatal Poly(I:C) Exposure and Other Developmental Immune Activation Models in Rodent Systems. *Biological Psychiatry*, 75(4), 307–315. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2013.07.011>
- Meyer, U., & Feldon, J. (2010). Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, 90(3), 285–326. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2009.10.018>
- Meyer, U., & Feldon, J. (2012). To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology*, 62(3), 1308–1321. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.009>
- Meyer, U., Feldon, J., & Fatemi, S. H. (2009). In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(7), 1061–1079. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2009.05.001>
- Meyer, U., Murray, P. J., Urwyler, A., Yee, B. K., Schedlowski, M., & Feldon, J. (2008). Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Molecular Psychiatry*, 13(2), 208–221. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002042>
- Meyer, U., Nyffeler, M., Engler, A., Urwyler, A., Schedlowski, M., Knuesel, I., Yee, B. K., & Feldon, J. (2006). The Time of Prenatal Immune Challenge Determines the Specificity of Inflammation-Mediated Brain and Behavioral Pathology. *Journal of Neuroscience*, 26(18), 4752–4762. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0099-06.2006>
- Meyer, U., Nyffeler, M., Yee, B. K., Knuesel, I., & Feldon, J. (2008). Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during

- early/middle and late fetal development in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(4), 469–486. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2007.09.012>
- Min, K.-J., Yang, M., Kim, S.-U., Jou, I., & Joe, E. (2006). Astrocytes Induce Hemeoxygenase-1 Expression in Microglia: A Feasible Mechanism for Preventing Excessive Brain Inflammation. *Journal of Neuroscience*, 26(6), 1880–1887. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3696-05.2006>
- Minakova, E., Lang, J., Medel-Matus, J.-S., Gould, G. G., Reynolds, A., Shin, D., Mazarati, A., & Sankar, R. (2019). Melanotan-II reverses autistic features in a maternal immune activation mouse model of autism. *PLOS ONE*, 14(1), e0210389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210389>
- Minakova, E., & Warner, B. B. (2018). Maternal immune activation, central nervous system development and behavioral phenotypes. *Birth Defects Research*, 110(20), 1539–1550. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1416>
- Mouihate, A., Al-Hashash, H., Rakhshani-Moghadam, S., & Kalakh, S. (2017). Impact of prenatal immune challenge on the demyelination injury during adulthood. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 23(9), 724–735. <https://doi.org/10.1111/cns.12718>
- Muneer, A. (2016). Bipolar Disorder: Role of Inflammation and the Development of Disease Biomarkers. *Psychiatry Investigation*, 13(1), 18–33. <https://doi.org/10.4306/pi.2016.13.1.18>
- Nahmias, A. J., Nahmias, S. B., & Danielsson, D. (2006). The Possible Role of Transplacentally-Acquired Antibodies to Infectious Agents, With Molecular Mimicry to Nervous System Sialic Acid Epitopes, as Causes of Neuromental Disorders: Prevention and Vaccine Implications. *Clinical and Developmental Immunology*, 13(2–4), 167–183. <https://doi.org/10.1080/17402520600801745>
- Nardone, S., & Elliott, E. (2016). The Interaction between the Immune System and Epigenetics in the Etiology of Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00329>
- Naviaux, R. K., Zolkipli, Z., Wang, L., Nakayama, T., Naviaux, J. C., Le, T. P., Schuchbauer, M. A., Rogac, M., Tang, Q., Dugan, L. L., & Powell, S. B. (2013). Antipurinergic Therapy Corrects the Autism-Like Features in the Poly(IC) Mouse Model. *PLoS ONE*, 8(3), e57380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057380>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, 308(5726),

- 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Norden, D. M., Fenn, A. M., Dugan, A., & Godbout, J. P. (2014). TGF β produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia*, 62(6), 881–895. <https://doi.org/10.1002/glia.22647>
- Onore, C. E., Schwartz, J. J., Careaga, M., Bennan, R. F., & Ashwood, P. (2014). Maternal immune activation leads to activated inflammatory macrophages in offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 38, 220. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2014.02.007>
- Openshaw, R. L., Kwon, J., McColl, A., Penninger, J. M., Cavanagh, J., Pratt, J. A., & Morris, B. J. (2019). JNK signalling mediates aspects of maternal immune activation: importance of maternal genotype in relation to schizophrenia risk. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1408-5>
- Ornoy, A., Weinstein-Fudim, L., & Ergaz, Z. (2015). Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reproductive Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.05.007>
- Oskvig, D. B., Elkahloun, A. G., Johnson, K. R., Phillips, T. M., & Herkenham, M. (2012). Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(4), 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.015>
- Ozawa, K., Hashimoto, K., Kishimoto, T., Shimizu, E., Ishikura, H., & Iyo, M. (2006). Immune Activation During Pregnancy in Mice Leads to Dopaminergic Hyperfunction and Cognitive Impairment in the Offspring: A Neurodevelopmental Animal Model of Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 59(6), 546–554. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2005.07.031>
- Parker-Athill, E. C., & Tan, J. (2010). Maternal immune activation and autism spectrum disorder: interleukin-6 signaling as a key mechanistic pathway. *Neuro-Signals*, 18(2), 113–28. <https://doi.org/10.1159/000319828>
- Patterson, P. (2009). Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behavioural Brain Research*.
- Pendyala, G., Chou, S., Jung, Y., Coiro, P., Spartz, E., Padmashri, R., Li, M., & Dunaevsky, A. (2017). Maternal Immune Activation Causes Behavioral Impairments and Altered Cerebellar Cytokine and Synaptic Protein Expression.

Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 42(7), 1435–1446.

<https://doi.org/10.1038/npp.2017.7>

Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A. E., & Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0268-4>

Piontkewitz, Y., Arad, M., & Weiner, I. (2011). Abnormal Trajectories of Neurodevelopment and Behavior Following In Utero Insult in the Rat. *Biological Psychiatry*, 70(9), 842–851. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2011.06.007>

Ranger, P., & Ellenbroek, B. A. (2015). Perinatal Influences of Valproate on Brain and Behaviour: An Animal Model for Autism. In *Current topics in behavioral neurosciences* (Vol. 29, pp. 363–386). https://doi.org/10.1007/7854_2015_404

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>

Ricci, S., Businaro, R., Ippoliti, F., Lo Vasco, V. R., Massoni, F., Onofri, E., Troili, G. M., Pontecorvi, V., Morelli, M., Rapp Ricciardi, M., & Archer, T. (2013). Altered cytokine and BDNF levels in autism spectrum disorder. *Neurotoxicity Research*, 24(4), 491–501. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9393-4>

Richetto, J., Massart, R., Weber-Stadlbauer, U., Szyf, M., Riva, M. A., & Meyer, U. (2017). Genome-wide DNA Methylation Changes in a Mouse Model of Infection-Mediated Neurodevelopmental Disorders. *Biological Psychiatry*, 81(3), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.010>

Rinaldi, T., Perrodin, C., & Markram, H. (2008). Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic Acid animal model of autism. *Frontiers in Neural Circuits*, 2, 4.

<https://doi.org/10.3389/neuro.04.004.2008>

Robinson, D. P., & Klein, S. L. (2012). Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Hormones and Behavior*, 62(3), 263–71. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.02.023>

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-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9926(199705)55:5<319::AID-)

TERA4>3.0.CO;2-U

- Ronovsky, M., Berger, S., Zambon, A., Reisinger, S. N., Horvath, O., Pollak, A., Lindtner, C., Berger, A., & Pollak, D. D. (2017). Maternal immune activation transgenerationally modulates maternal care and offspring depression-like behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, *63*, 127–136.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.10.016>
- Rose, D. R., Careaga, M., Van de Water, J., McAllister, K., Bauman, M. D., & Ashwood, P. (2017). Long-term altered immune responses following fetal priming in a non-human primate model of maternal immune activation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *63*, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.020>
- Roulet, 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>
- Roulet, 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>
- Said, N., Lakehayli, S., Battas, O., Hakkou, F., & Tazi, A. (2015). Effects of prenatal stress on anxiety-like behavior and nociceptive response in rats. *Journal of Integrative Neuroscience*, *14*(02), 223–234.
<https://doi.org/10.1142/S0219635215500107>
- Samuelsson, A.-M., Jennische, E., Hansson, H.-A., & Holmäng, A. (2006). Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA_A dysregulation and impaired spatial learning. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *290*(5), R1345–R1356. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00268.2005>
- Sappenfield, E., Jamieson, D. J., & Kourtis, A. P. (2013). Pregnancy and Susceptibility to Infectious Diseases. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, *2013*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/752852>
- Sasaki, J., Yamaguchi, A., Nabeshima, Y., Shigemitsu, S., Mesaki, N., & Kubo, T. (1995). Exercise at high temperature causes maternal hyperthermia and fetal anomalies in rats. *Teratology*, *51*(4), 233–236.
<https://doi.org/10.1002/tera.1420510407>
- 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>
- Schwartzter, J. J., Careaga, M., Onore, C. E., Rushakoff, J. A., Berman, R. F., & Ashwood, P. (2013). Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice. *Translational Psychiatry*, 3(3), e240–e240. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.16>
- Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W., & Patterson, P. H. (2003). Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(1), 297–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514227>
- Shi, L., Tu, N., & Patterson, P. H. (2005). Maternal influenza infection is likely to alter fetal brain development indirectly: the virus is not detected in the fetus. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(2–3), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.005>
- Shin Yim, Y., Park, A., Berrios, J., Lafourcade, M., Pascual, L. M., Soares, N., Yeon Kim, J., Kim, S., Kim, H., Waisman, A., Littman, D. R., Wickersham, I. R., Harnett, M. T., Huh, J. R., & Choi, G. B. (2017). Reversing behavioural abnormalities in mice exposed to maternal inflammation. *Nature*, 549(7673), 482–487. <https://doi.org/10.1038/nature23909>
- Sisti, G., Kanninen, T. T., & Witkin, S. S. (2016). Maternal immunity and pregnancy outcome: focus on preconception and autophagy. *Genes & Immunity*, 17(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/gene.2015.57>
- Slavuljica, I., Kveštak, D., Csaba Huszthy, P., Kosmac, K., Britt, W. J., & Jonjić, S. (2015). Immunobiology of congenital cytomegalovirus infection of the central nervous system—the murine cytomegalovirus model. *Cellular & Molecular Immunology*, 12(2), 180–191. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.51>
- Smith, M. S., Upfold, J. B., Edwards, M. J., Shiota, K., & Cawdell-Smith, J. (1992). The induction of neural tube defects by maternal hyperthermia: a comparison of the guinea-pig and human. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 18(1), 71–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1579201>
- Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *Journal of Neuroscience*. Retrieved from

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2387067/pdf/nihms42804.pdf>
- Smith, S., Hsiao, E., & Patterson, P. H. (2010). Activation of the Maternal Immune System as a Risk Factor for Neuropsychiatric Disorders. In *Maternal Influences on Fetal Neurodevelopment* (pp. 97–115). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-921-5_7
- Smolders, S., Notter, T., Smolders, S. M. T., Rigo, J.-M., & Brône, B. (2018). Controversies and prospects about microglia in maternal immune activation models for neurodevelopmental disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, *73*, 51–65. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2018.06.001>
- Stagno, S., Reynolds, D. W., Amos, C. S., Dahle, A. J., McCollister, F. P., Mohindra, I., Ermocilla, R., & Alford, C. A. (1977). Auditory and visual defects resulting from symptomatic and subclinical congenital cytomegaloviral and toxoplasma infections. *Pediatrics*, *59*(5), 669–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/193086>
- Suzuki, K., Matsuzaki, H., Iwata, K., Kamenno, Y., Shimmura, C., Kawai, S., Yoshihara, Y., Wakuda, T., Takebayashi, K., Takagai, S., Matsumoto, K., Tsuchiya, K. J., Iwata, Y., Nakamura, K., Tsujii, M., Sugiyama, T., & Mori, N. (2011). Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS ONE*, *6*(5), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020470>
- Takarae, Y., & Sweeney, J. (2017). Neural Hyperexcitability in Autism Spectrum Disorders. *Brain Sciences*, *7*(12), 129. <https://doi.org/10.3390/brainsci7100129>
- Tandon, R., Nasrallah, H. A., & Keshavan, M. S. (2009). Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia Research*, *110*(1–3), 1–23. <https://doi.org/10.1016/J.SCHRES.2009.03.005>
- Tang, B., Capitaó, C., Dean, B., & Thomas, E. A. (2012). Differential age- and disease-related effects on the expression of genes related to the arachidonic acid signaling pathway in schizophrenia. *Psychiatry Research*, *196*(2–3), 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2011.09.026>
- Torres-Platas, S. G., Cruceanu, C., Chen, G. G., Turecki, G., & Mechawar, N. (2014). Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain, Behavior, and Immunity*, *42*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.05.007>
- Toussiro, E. (2012). The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic

- inflammatory diseases. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 11(2), 159–68.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22280236>
- Townsend, J. J., Baringer, J. R., Wolinsky, J. S., Malamud, N., Mednick, J. P., Panitch, H. S., Scott, R. A. T., Oshiro, L. S., & Cremer, N. E. (1975). Progressive Rubella Panencephalitis. *New England Journal of Medicine*, 292(19), 990–993. <https://doi.org/10.1056/NEJM197505082921902>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(11), 2563–2582.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S24–S32.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>
- Urakubo, A., Jarskog, L. F., Lieberman, J. A., & Gilmore, J. H. (2001). Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophrenia Research*, 47(1), 27–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163542>
- Van den Eynde, K., Missault, S., Franssen, E., Raeymaekers, L., Willems, R., Drinkenburg, W., Timmermans, J.-P., Kumar-Singh, S., & Dedeurwaerdere, S. (2014). Hypolocomotive behaviour associated with increased microglia in a prenatal immune activation model with relevance to schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 258, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.005>
- 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>
- Vermillion, M. S., & Klein, S. L. (2018). Pregnancy and infection: using disease pathogenesis to inform vaccine strategy. *Npj Vaccines*, 3(1), 6.
<https://doi.org/10.1038/s41541-017-0042-4>
- Vuillermot, S., Weber, L., Feldon, J., & Meyer, U. (2010). A longitudinal examination of the neurodevelopmental impact of prenatal immune activation in mice reveals primary defects in dopaminergic development relevant to schizophrenia. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(4), 1270–87. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5408-09.2010>
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., & Nabekura, J. (2009). Resting

- Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *Journal of Neuroscience*, 29(13), 3974–3980. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009>
- Webster, W. S., & Edwards, M. J. (1984). Hyperthermia and the induction of neural tube defects in mice. *Teratology*, 29(3), 417–425. <https://doi.org/10.1002/tera.1420290313>
- Wischof, L., Irrsack, E., Osorio, C., & Koch, M. (2015). Prenatal LPS-exposure – a neurodevelopmental rat model of schizophrenia – differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 57, 17–30. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2014.10.004>
- Yamashita, Y., Fujimoto, C., Nakajima, E., Isagai, T., & Matsuishi, T. (2003). Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 33(4), 455–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12959425>
- Zager, A., Pinheiro, M. L., Ferraz-de-Paula, V., Ribeiro, A., & Palermo-Neto, J. (2013). Increased cell-mediated immunity in male mice offspring exposed to maternal immune activation during late gestation. *International Immunopharmacology*, 17(3), 633–637. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2013.08.007>
- Zerbo, O., Iosif, A.-M., Walker, C., Ozonoff, S., Hansen, R. L., & Hertz-Picciotto, I. (2013). Is Maternal Influenza or Fever During Pregnancy Associated with Autism or Developmental Delays? Results from the CHARGE (CHildhood Autism Risks from Genetics and Environment) Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 43(1), 25–33. <https://doi.org/10.1007/s10803-012-1540-x>
- Zerbo, O., Qian, Y., Yoshida, C., Grether, J. K., Van de Water, J., & Croen, L. A. (2015). Maternal Infection During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 45(12), 4015–25. <https://doi.org/10.1007/s10803-013-2016-3>
- Zhang, Z., & van Praag, H. (2015). Maternal immune activation differentially impacts mature and adult-born hippocampal neurons in male mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 45, 60–70. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2014.10.010>
- Zhong, F., Cui, D., Tao, H., Du, H., & Xing, C. (2015). IL-17A-producing T cells and

associated cytokines are involved in the progression of gastric cancer.

Oncology Reports, 34(5), 2365–2374. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4246>

Zhu, F., Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, X., & Zhao, J. (2014). Minocycline alleviates behavioral deficits and inhibits microglial activation in the offspring of pregnant mice after administration of polyriboinosinic–polyribocytidilic acid. *Psychiatry Research*, 219(3), 680–686. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.06.046>

Ziblat, A., Nuñez, S. Y., Raffo Iraolagoitia, X. L., Spallanzani, R. G., Torres, N. I., Sierra, J. M., Secchiari, F., Domaica, C. I., Fuertes, M. B., & Zwirner, N. W. (2018). Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN- γ Secretion by CD56bright Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells Activation. *Frontiers in Immunology*, 8, 1959. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01959>

Zuckerman, L., Rehavi, M., Nachman, R., & Weiner, I. (2003). Immune Activation During Pregnancy in Rats Leads to a PostPubertal Emergence of Disrupted Latent Inhibition, Dopaminergic Hyperfunction, and Altered Limbic Morphology in the Offspring: A Novel Neurodevelopmental Model of Schizophrenia.

Neuropsychopharmacology, 28(10), 1778–1789.

<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300248>

CAPÍTULO VI

DISCUSSÃO GERAL, CONCLUSÕES, PERSPECTIVAS

DISCUSSÃO GERAL

Esse capítulo traz uma discussão ampla de todos os artigos e dados produzidos pela tese, de maneira integrativa, não necessariamente seguindo uma ordem cronológica, e sim uma interrelação entre os achados.

O modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA é bem consolidado na literatura como um modelo que apresenta validade de face, de constructo e com valor preditivo para estudar mecanismos fisiopatológicos e estratégias potenciais terapêuticas no contexto TEA. Desde a primeira proposta das potenciais ações do VPA no neurodesenvolvimento como uma ferramenta para o estudo de transtornos como o TEA (Rodier et al., 1997b), até a primeira validação comportamental (Schneider et al., 2005), diversos estudos vêm evidenciando a alta validade de face que o modelo VPA possui para os sintomas principais do diagnóstico do TEA (Mabunga et al., 2015). Alterações sociais em múltiplos contextos, como na sociabilidade (Bambini-Junior et al., 2011; Kataoka et al., 2013; Kim et al., 2014; Rouillet et al., 2010; Schneider et al., 2005), na preferência por novidade social (Bambini-Junior et al., 2014; Kim et al., 2014), na sociabilidade recíproca (Hirsch et al., 2018a) são frequentemente observadas. O modelo também é capaz de reproduzir variados níveis de comportamentos repetitivos nos roedores, como um aumento da re-entrada no braço explorado do Y-maze (Markram et al., 2008a), alterações no comportamento de auto-limpeza (Gandal et al., 2010; Hirsch et al., 2018a; Mehta et al., 2011) e no número de bolas-de-gude enterradas (Mehta et al., 2011). Outras alterações já foram documentadas, como prejuízos na comunicação social por preferência alimentar (Hirsch et al., 2018a) e na vocalização ultrassônica (Gandal et al., 2010).

Na quinta edição do DSM, as hiper e hiporresponsividades sensoriais foram incluídas como sintomas-chave para diagnóstico do TEA (APA, 2013). De fato, desde 2009, estudos vêm apontando que as alterações sensoriais estão presentes em mais de 94% dos pacientes com TEA, apesar de sua manifestação diversa (Geschwind, 2009a). Recentemente, evidências demonstram que alterações em aspectos sensoriais podem ter um importante impacto para os prejuízos nos comportamentos sociais e nas estereotípias característicos do transtorno, compartilhando mecanismos comuns e influências recíprocas ao

longo do desenvolvimento (Gliga et al., 2014; Kuhaneck and Britner, 2013). Ainda, estudos mostram que as responsabilidades sensoriais, analisadas por diferentes tarefas já bem padronizadas na prática clínica (Baum et al., 2015), podem ser bons preditores para indicar o nível de severidade das alterações no comportamento social (Hilton et al., 2010). Dessa forma, faz-se necessário a compreensão não só de como esses dois mecanismos sofrem modulação de fatores ambientais de risco no neurodesenvolvimento, como também das inter-relações entre eles para o surgimento do fenótipo complexo do TEA.

Dessa forma, o presente estudo se propôs a avaliar componentes sensoriais comportamentais no modelo VPA em dois momentos do desenvolvimento: aos 10 dias de vida, foi realizada uma análise do componente olfatório pelo teste de busca pelo ninho (*nest seeking*), e aos 30 dias de vida, foi analisado o componente somatossensorial, pela estimulação das vibrissas (WNT). Os resultados dessa tese apontam dados inéditos de alterações importantes na percepção sensorial nos animais expostos ao VPA durante o período embrionário, trazendo novos parâmetros avaliados para as alterações já descritas anteriormente no teste de busca pelo ninho (Schneider et al., 2005), bem como, pela primeira vez, um aumento significativo na pontuação de resposta comportamental de irritabilidade pela estimulação sensorial das vibrissas, pelo WNT.

As alterações sensoriais estão presentes em indivíduos com TEA desde o início da vida (Elison et al., 2013; Germani et al., 2014). O presente estudo replica dados previamente descritos na literatura, os quais apontam para déficits sensoriais olfatórios em animais expostos ao VPA durante a gestação (Favre et al., 2013; Kolozsi et al., 2009; Schneider et al., 2005). Nesse contexto, aos 10 dias de vida, os animais do grupo VPA apresentaram prejuízos para a realização da escolha para o ninho, ou para realizar qualquer escolha (aumento tanto da latência para chegar ao ninho, quanto da latência para realizar qualquer escolha) e, ao avaliar a porcentagem de acertos das escolhas realizadas para o ninho, o grupo VPA apresenta um acerto em torno de 60%, enquanto que o grupo controle tem uma porcentagem de acerto de 95% (Fontes-Dutra et al., 2018). Nesse estudo, o tratamento pré-natal com RSV apresentou a mesma razão de acertos do grupo controle, prevenindo as alterações induzidas pela exposição

pré-natal ao VPA no grupo RSV+VPA. No entanto, esse tratamento não foi capaz de prevenir as alterações nas latências induzidas pelo VPA. Em relação às esses dados, dados do nosso grupo demonstram que a velocidade média e a distância percorrida dos animais VPA de 33 dias, no teste de campo aberto, não apresentam diferenças estatisticamente significativas (*personal communication*), de forma que, potencialmente, esse aumento da latência na tomada de decisão não está relacionado a um atraso motor.

Em relação às alterações sensoriais identificadas, tanto a migração dos neurônios em direção ao bulbo olfatório, modulando a sensação olfativa do animal (Foti et al., 2013), quanto alvos neurais envolvendo o comportamento de vínculo, como a amígdala (Landers and Sullivan, 2012; Rigon et al., 2015) são mecanismos possivelmente envolvidos nas alterações descritas nesse contexto. Os núcleos da amígdala possuem papéis cruciais para o comportamento afetivo de “ligação” ou de vínculo em humanos (Rigon et al., 2015). No quinto dia de vida do roedor, o desenvolvimento sináptico na amígdala é iniciado, atingindo seu apogeu entre o 10^o e o 20^o (P10 e P20, respectivamente) dia de vida (Landers and Sullivan, 2012). Mudanças estruturais, como o aumento do peso relativo da amígdala (Ecker et al., 2015), hiperativação bilateral antecipadamente ao contato social (Dichter, 2012; Markram et al., 2008a) apontam para a presença de uma alteração no balanço excitatório e inibitório em indivíduos com TEA. No modelo VPA, já foram observadas hiperativação da amígdala (Lin et al., 2013a; Markram et al., 2008a), bem como alterações comportamentais do tipo ansioso no teste de campo aberto, acompanhadas de prejuízos em componentes envolvendo a sinalização GABAérgica, como aumento da expressão de GAT1 em animais do modelo VPA (Olexová et al., 2016). Sabe-se que a região da amígdala possui um papel relevante para a integração de conteúdos aversivos a informações sensoriais para o estabelecimento de vínculos (Moriceau and Sullivan, 2005; Muller et al., 2006; Swartz et al., 2013). Uma vez que o presente trabalho observou uma alteração na proporção de neurônios PV⁺ na região da amígdala de ratos expostos ao VPA, é possível que um desbalanço entre a excitação e a inibição esteja ocorrendo no processamento integrativo dessa região, possivelmente refletindo alterações vistas em P10 no comportamento de busca pelo ninho. Visto que o RSV foi capaz

de prevenir a alteração na proporção de neurônios PV⁺ induzidas pelo VPA aos 30 dias, é possível que essa reorganização dos interneurônios possa ter relação com mecanismos de prevenção voltados para a migração dos neurônios. A partir disso, o estabelecimento de um balanço entre a excitação e inibição adequados podem ser mecanismos importantes para a prevenção pela exposição ao RSV, em que os animais RSV+VPA apresentam uma porcentagem de acertos para o ninho similar ao grupo controle, observados aos 10 dias de vida do roedor.

Dentre as alterações sensoriais observadas em indivíduos com TEA, as táteis são as mais prevalentes, abrangendo cerca de 65,1% das crianças de 3 a 10 anos com diagnóstico para o TEA analisadas, enquanto que outras modalidades sensoriais, como gustação e olfação, bem como estímulos visuais e auditivos, abrangem, respectivamente, 56,2% e 50,9% (Tomchek and Dunn, 2007). As alterações nesse escopo permanecem ao longo do desenvolvimento e podem ser identificados em fases posteriores na vida adulta (Casco et al., 2008). De maneira complementar, análises de magnetoencefalografia demonstram alterações na representação somatotópica de indivíduos com TEA, evidenciando prejuízos complexos em regiões de processamento sensorial somático primário (Coskun et al., 2009).

No modelo animal de autismo por exposição pré-natal ao VPA, foi observado um aumento no limiar para estímulos nociceptivos (Schneider et al., 2008), hiporresponsividade a estímulos auditivos, bem como prejuízos na inibição pré-pulso (Gandal et al., 2010; Lane et al., 2012). As alterações em outros paradigmas comportamentais, como no comportamento social e nas estereotipias foram correlacionados com atividade anormal de oscilações gama em regiões de processamento sensorial, como no giro temporal superior (Gandal et al., 2010), indicando uma relação indireta entre o processamento sensorial e comportamentos complexos. Sendo assim, até esse momento, o componente sensorial era incluído em outras análises comportamentais não específicas para esse fim, situação que impedia uma avaliação direta da contribuição desse fator no contexto do TEA.

Somente em 2010, foi proposto um teste comportamental de estimulação de vibrissas para a análise do processamento tátil em roedores (McNamara et al., 2010), apresentando uma alta sensibilidade para alterações na área

somatossensorial primária (Learoyd and Lifshitz, 2012). O teste de estimulação das vibrissas, ou *Whisker Nuisance Task* (WNT), foi padronizado para detectar alterações comportamentais decorrentes de lesões na área somatossensorial primária, região-chave para o processamento das vibrissas faciais, bem como a severidade dessas lesões e potenciais efeitos benéficos de intervenções para restaurar o comportamento (McNamara et al., 2010). No entanto, não se sabia, até o momento, se o teste seria sensível para detectar alterações complexas fora do contexto de lesão na circuitaria de processamento da área somatossensorial primária em roedores. No presente trabalho, foi possível verificar não só a aplicabilidade do teste nesse contexto como também utilizá-lo para evidenciar o prejuízo sensorial observado em animais expostos ao VPA, os quais apresentaram escores, em média, 43% piores que os controles. Além disso, o tratamento com RSV foi capaz de prevenir esse tipo de alteração (Fontes-Dutra et al., 2018) (Capítulo II).

Em 2011, Ben-Ami Bartal publicou o primeiro estudo em roedores evidenciando que esses animais são capazes de manifestar comportamentos pró-sociais motivados, utilizando um paradigma comportamental desenvolvido por seu grupo (Bartal et al., 2011). Esse paradigma consiste na alocação de um rato numa arena que, na sua parte central, apresenta um tubo de contenção com um outro rato dentro. Esse tubo pode ser aberto apenas por uma intervenção externa, e o animal do lado de fora passa por sessões onde se observou o aprendizado intencional da abertura da gaiola de contenção. Bartal testou diversas modalidades desse teste e concluiu que os ratos se comportam de forma pró-social em resposta ao distresse de seu coespecífico, apontando fortes indícios de comportamento motivado do tipo empático nesses animais. Diversos estudos apontaram, nos anos seguintes, que os roedores são um modelo fidedigno para o estudo da manifestação de comportamentos pró-sociais (Ben-Ami Bartal et al., 2014; Decety and Svetlova, 2012; Mogil, 2012; Panksepp and Panksepp, 2013). A experiência da empatia traz um fenômeno social complexo à tona, uma vez que envolve a modulação por um alto grau de afiliação e processamentos cognitivos de alta complexidade (de Waal, 2008; Meyza et al., 2017). Alterações na resposta do tipo-empática foram observadas em indivíduos com TEA e em outros transtornos psiquiátricos (Baron-Cohen and Wheelwright,

2004; Shamay-Tsoory et al., 2002), especialmente no que se denomina “empatia cognitiva”, a qual pode ser caracterizada como a capacidade de compreensão da perspectiva de outro indivíduo (Deschamps et al., 2014). Dessa forma, o presente estudo também visou a caracterização da resposta do tipo empática dos roedores expostos ao VPA durante a gestação e se o RSV, o qual em estudos anteriores de comportamento social vem se mostrando uma estratégia de prevenção intra-útero (Bambini-Junior et al., 2014; Hirsch et al., 2018a), é capaz de prevenir as possíveis alterações encontradas no modelo animal de TEA.

O capítulo III da presente tese aponta, pela primeira vez, não apenas um atraso no primeiro dia de abertura do tubo pelos animais expostos ao VPA, como também uma redução da porcentagem de abertura nos primeiros quatro dias de teste nos grupos que foram expostos ao VPA (VPA e RSV+VPA), comparado com o grupo controle (Fontes-Dutra et al., 2019). Tendo em vista que o tubo de contenção permite a troca de informações sensoriais entre os roedores, apresentando orifícios onde os animais podem interagir olfativamente um com o outro, a combinação de informações sensoriais com o processamento cognitivo relacionado à tomada de decisão e atenção parecem ter papéis importantes para a construção desse comportamento (Ben-Ami Bartal et al., 2014; Jeon et al., 2010; Langford, 2006). No estudo anterior desta tese, foi apontado um efeito importante do RSV na prevenção de dois comportamentos sensoriais ao longo da vida do roedor (Fontes-Dutra et al., 2018) (Capítulo II). Assim, considerando que os parâmetros sensoriais estudados estão sendo prevenidos pelo RSV, porém não foi observada prevenção por parte da exposição pré-natal ao RSV no comportamento do tipo empático, é possível que a construção desse comportamento esteja sendo impactada mais diretamente por outros componentes alterados, como a tomada de decisão, mesmo que os componentes sensoriais que estão sendo fornecidos para a combinação com outras informações estejam sendo processados adequadamente. Essas hipóteses envolvem dois principais eixos: 1) alterações em processamentos cognitivos, como a tomada de decisão, e 2) integração de componentes sensoriais em regiões associativas de importância para a formação do comportamento do tipo empático.

Considerando as hipóteses levantadas no parágrafo anterior, estudos na literatura vêm apresentando fortes evidências de que tanto humanos, quanto roedores são capazes de combinar informações de diversas modalidades, como informações sensoriais, para a construção da tomada de decisão (Kiani et al., 2008; Raposo et al., 2012; Roitman and Shadlen, 2002). Em indivíduos com TEA, prejuízos na tomada de decisão são presentes na literatura, sendo principalmente atribuídos a uma redução na incorporação de informações de contexto afetivo nesse processo (Luke et al., 2012; Robic et al., 2015; Shah et al., 2016). Regiões de processamento como o córtex cingulado anterior (aCC), córtex orbitofrontal medial (mOFC) e córtex pré-frontal medial (mPFC) podem contribuir para comportamentos sociais associados à percepção do outro indivíduo e para a empatia tanto em humanos, quanto em roedores (Mony et al., 2018).

Conforme mencionado anteriormente, o RSV é capaz de prevenir alterações em outros contextos sociais que apresentam um componente de interação evidenciado, envolvendo a presença de intenso processamento sensorial (Bambini-Junior et al., 2014; Hirsch et al., 2018a), sugerindo que as pistas sociais para a tomada de decisão podem ser um substrato relevante para a prevenção pela exposição pré-natal ao RSV, bem como que, possivelmente, esses comportamentos tenham uma influência muito mais intensa de aspectos sensoriais que comportamentos mais abstratos e de formação mais associativa, como o comportamento do tipo empático. Considerando que, mesmo que ocorra uma prevenção das pistas sensoriais e sociais para a formação do comportamento do tipo empático, é possível que a combinação dessas informações com aspectos afetivos e de tomada de decisão não seja um substrato de prevenção por parte do RSV, visto que os animais VPA apresentam um atraso no início da abertura do tubo de contenção, como visto no Capítulo III (Fontes-Dutra et al., 2018). Essas alterações na circuitaria de construção desse comportamento podem envolver diferentes mecanismos e regiões em comparação com as envolvidas, por exemplo, na construção do comportamento de sociabilidade, preferência por novidade social e sociabilidade recíproca, os quais o RSV foi capaz de prevenir as alterações induzidas pelo VPA (Bambini-Junior et al., 2014; Hirsch et al., 2018a).

Dessa forma, a análise desses dados levantou o seguinte questionamento: quais comportamentos são relevantes e observados no primeiro dia de teste para que um animal se torne abridor nesse paradigma comportamental? Para responder esse questionamento, os grupos experimentais foram reorganizados, mantendo a discriminação das intervenções realizadas no período gestacional (Controle, RSV, VPA e RSV+VPA), mas agrupados em dois grandes grupos: animais que se tornaram abridores e animais que não cumpriram o critério para se tornar abridor. Foi estipulado, utilizando como base o trabalho pioneiro de Bartal e colaboradores que, o animal para se tornar abridor deve atender aos requisitos de ser capaz de abrir o tubo de contenção por dois dias consecutivos, pelo menos três vezes ao longo do experimento (Ben-Ami Bartal et al., 2014). Surpreendentemente, ao correlacionar os parâmetros avaliados no primeiro dia de teste com o desfecho de se tornar abridor, observou-se, além dos animais abridores se movimentarem mais rápido em um contexto geral no primeiro dia de teste, esse aumento da velocidade média acontece na zona da porta de abertura do tubo de contenção, apresentando correlação com o desfecho do animal se tornar abridor no passar do teste (Fontes-Dutra et al., 2019). Ainda, os dados revelam uma correlação positiva entre abrir o tubo de contenção no primeiro dia de teste com o desfecho de se tornar abridor nos dias seguintes (Fontes-Dutra et al., 2019). Além de dados inéditos sobre o comportamento do tipo empático no modelo VPA, os dados desse trabalho apontam para um refinamento dessa técnica comportamental na observação de parâmetros no primeiro dia de teste que apresentam correlação com o desfecho de se tornar abridor.

A área somatossensorial foi avaliada quanto a organização cortical e, juntamente com a região da amígdala, foram avaliados a distribuição de interneurônios GABAérgicos positivos para parvalbumina (PV⁺) e a expressão de proteínas envolvidos com a formação de sinapses, como PSD-95, Gefirina (Geph) e Sinaptofisina (Syp) (Capítulo II), bem como o padrão do traçado por eletroencefalografia (EEG) com a exploração de um campo aberto pelos roedores e a transmissão GABAérgica a partir das correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) nas células piramidais da área somatossensorial primária em fatias cerebrais (Capítulo IV). Complementarmente aos comportamentos

sensoriais alterados pela exposição pré-natal ao VPA, observou-se, na área somatossensorial primária, alterações na disposição de neurônios PV⁺; redução na frequência das correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) espontâneas nas camadas profundas IV/V, bem como a presença de ondas lentas no traçado do grupo VPA em registro de eletroencefalograma (EEG) - e, novamente, todas essas alterações foram prevenidas pela exposição pré-natal ao RSV.

Essa alteração no EEG, bem como a presença em concomitância de alteração comportamental na vigília similar a crises de ausência (Capítulo IV) pode indicar alterações importantes na circuitaria de processamento cortical da área somatossensorial primária, bem como um substrato de ação preventiva por parte do RSV. Estudos revelam que a presença de descargas de ondas lentas (do inglês, *slow-wave discharges*) podem ser geradas focalmente em áreas do córtex frontal e parietal, podendo indicar a presença de atividade oscilatória de propagação em vias tálamo-corticais de relevância sensorial, bem como em vias conectando estruturas subcorticais (Westmijse, 2009). Considerando as alterações induzidas pela exposição pré-natal ao VPA, é possível inferir que a reorganização dos neurônios PV⁺ possivelmente possui forte relação com o prejuízo nos componentes inibitórios registrados nas análises eletrofisiológicas *in vitro*, uma vez que essas células compõem a maior subpopulação de interneurônios GABAérgicos corticais, além de possuírem uma importante capacidade inibitória em decorrência da alta frequência de disparos associada às suas projeções sinápticas voltada para regiões como soma e segmento inicial de implantação axonal de células piramidais (Hu et al., 2014; Tremblay et al., 2016). Nesse contexto, é possível observar que alterações na distribuição celular e organização cortical podem afetar diretamente as conexões excitatórias e inibitórias, ocasionando oscilações no equilíbrio entre esses dois componentes, os quais podem ter influência não só na presença de eventos epileptogênicos (Kabat and Król, 2012), como também no prejuízo comportamental em tarefas com demandas sensoriais (Fontes-Dutra et al., 2018). As alterações laminares da desorganização cortical observadas no Capítulo II podem refletir modificações na migração neuronal, resultando em um prejuízo na alocação espacial cortical por parte das células que estão migrando, as quais se acumulam em regiões vizinhas. Alterações dessa natureza já foram vistas tanto

em modelo animal triplo nocaute para efrina (Torii et al., 2009) como no presente estudo, com a proposta de potenciais mecanismos por trás da localização alterada dos interneurônios PV⁺ (Fontes-Dutra et al., 2018).

Considerando a migração neuronal, um dos mecanismos propostos é a influência da sinalização das efrinas e seus receptores para a formação das colunas corticais de processamento primário (Torii et al., 2009). Modelos nocaute para a efrina A apresentam prejuízos na dispersão lateral de neurônios em migração, sem acarretar em proliferação alterada ou morte celular dessas células (Torii et al., 2009). Apesar dos mecanismos que guiam a migração de interneurônios corticais ainda não serem amplamente compreendidos, sabe-se que as efrinas também são responsáveis por guiar essas populações celulares emergentes da eminência gangliônica medial (EGM), servindo como pistas para promover a entrada de interneurônios em regiões adequadas, auxiliando na definição de sua rota migratória (Rudolph et al., 2010).

Além do papel na migração neuronal, as efrinas também têm relevância biológica para a conectividade dos interneurônios. Sabe-se que a estabilização de sinapses GABAérgicas depende da localização correta da proteína de ancoramento pós-sináptico gefirina (Geph) e que em modelos com deficiência na efrina A7 (EphA7) ocorre uma desestabilização da sinapse GABAérgica com alterações no potencial de longa duração (LTP), por exemplo, dependente da rota da mTOR, conhecidamente alterada no TEA (Beuter et al., 2016; Winden et al., 2018). Essa desestabilização poderia estar acarretando numa redução da inibição GABAérgica, a qual pode ser explicada, em parte, pela interação entre a EphA7 com a disposição da Geph na organização pós-sináptica inibitória. No Capítulo II, os níveis de Geph na área somatossensorial primária estão reduzidos no grupo VPA, com potencial prevenção, apesar de não observada a significância estatística, pelo tratamento pré-natal com RSV (Fontes-Dutra et al., 2018).

Analisando de forma integrativa os dados da alteração da localização espacial ao longo das camadas corticais da área somatossensorial primária induzida pela exposição pré-natal ao VPA (Capítulo II), juntamente com a alteração na frequência das CIPS espontâneas na camada IV/V (Capítulo IV), podemos inferir que a redução do *input* de conexões inibitórias em neurônios

piramidais corticais possa ser em decorrência da redução de interneurônios PV⁺ nessas camadas mais profundas, em detrimento de um aumento da localização desses mesmos interneurônios em camadas mais superficiais, como a camada II/III (Fontes-Dutra et al., 2018). Uma vez que a exposição pré-natal ao RSV foi capaz de prevenir a alteração na localização dos PV⁺ induzida pela exposição ao VPA, a localização correta desses interneurônios mantém, de forma adequada, as CIPS espontâneas na camada IV/V, que são de extrema relevância para a inibição correta dos neurônios piramidais dessa região (Naka and Adesnik, 2016). É importante ressaltar que as CIPS em miniatura não são alteradas pela exposição pré-natal ao VPA, indicando que a liberação quantal de neurotransmissores, ou seja, a funcionalidade da sinapse, permanece adequada. Por sua vez, as alterações observadas nas CIPS espontâneas revelam que a inibição basal dessa região pode estar comprometida no modelo VPA, uma vez que essas correntes são geradas pela liberação de neurotransmissores de forma dependente e independente de potenciais de ação na ausência de estimulação experimental (Pinheiro and Mulle, 2008). Por outro lado, a redução na constante do tempo de decaimento nas CIPS espontâneas, vista no Capítulo IV, pode estar relacionada com alterações nas subunidades e distribuição de receptores GABAérgicos no neurônio piramidal registrado, tendo em vista que a sensibilidade neuronal ao estímulo inibitório da sinapse é dependente da modulação do receptor GABA_A, por exemplo (Houston et al., 2009). Estudos demonstram que a modulação da expressão de diferentes subunidades do receptor GABA_A é capaz de gerar alterações na constante do tempo de decaimento em CIPS espontâneas (Eyre et al., 2012). Visto que a Geph é capaz de interagir com a α -subunidade do receptor GABA_A (Guang et al., 2018), e que estudos mostram que há uma redução da α -subunidade do receptor GABA_A em modelos animais de TEA nocautes para *Shank2* e6-7 (Lim et al., 2017), é possível que um dos mecanismos pelos quais a exposição ao VPA possa estar alterando a constante do tempo de decaimento das CIPS espontâneas possa ser por um prejuízo em subunidades específicas do receptor de GABA_A, alterando a cinética desse receptor na membrana do neurônio piramidal.

Por conseguinte, a prevenção da redução na frequência das CIPS espontâneas nas células piramidais pela exposição ao RSV pode ser, em parte, pela localização adequada dos interneurônios PV⁺, principalmente nas camadas profundas da área somatossensorial primária, para a realização da inibição correta sobre os neurônios piramidais dessa região. Já a prevenção observada sobre a redução da constante do tempo de decaimento das CIPS espontâneas pode ser, em parte, por uma modulação na via das efrinas e no ancoramento via Gefirina na porção pós-sináptica dos neurônios piramidais das camadas profundas da área somatossensorial primária.

POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS

1. Mecanismos Neuroimunes

O neurodesenvolvimento exige uma organização fina e complexa; alterações no microambiente imunológico no período gestacional, uma importante janela biológica, podem levar a diversas anormalidades no comportamento da prole, como visto em desordens como o TEA, demonstrando que mecanismos inflamatórios regulados são necessários para o equilíbrio de vias e de toda circuitaria neuronal típica.

A neurogênese embrionária ocorre em diferentes etapas finamente reguladas, incluindo proliferação, diferenciação, migração e maturação de células precursoras neurais; no entanto, esses eventos estão sujeitos a regulações extracelulares, incluindo os desafios ambientais pré-natais (Fan and Pang, 2017). Sabe-se que há proliferação, migração e diferenciação neuronal alteradas em modelos animais de ativação imune materna (MIA) (Capítulo V da presente tese), os quais são amplamente utilizados na pesquisa de transtornos neuropsiquiátricos (incluindo o TEA), comumente induzidos pela exposição de animais prenhes LPS ou Poly(I:C) (Estes and McAllister, 2016). Em modelo VPA, se viu que a exposição pré-natal prejudica a migração neuronal no giro denteado de animais adultos aumentando a suscetibilidade dos mesmos a convulsões (Sakai et al., 2018), demonstrando o importante componente neuroimune nas regulações epigenéticas.

Complementarmente, em humanos, observam-se diferentes alterações associadas à migração neuronal, entre eles densidade neuronal significativamente maior em córtex frontal de indivíduos com TEA quando comparados aos controles (Courchesne et al., 2011a), organização minicolunar aberrante (Casanova et al., 2002b), além de redução no número e no tamanho dos neurônios piramidais no córtex cingulado anterior de pacientes (Uppal et al., 2014) e regiões de ruptura na citoarquitetura laminar e desorganização cortical somente de neurônios (não de glia) nos córtices pré-frontal e temporal (Stoner et al., 2014a). A eficiência da conectividade estrutural se reflete na quantidade de sinapses e nas características biofísicas de sinapses individuais, de modo que esse conjunto implica na eficácia sináptica, o que pode mudar por meio de alterações diretas nas conexões físicas entre os neurônios (Zikopoulos and Barbas, 2013). Dessa forma, alterações na estrutura neuronal afetam a conectividade, refletindo nas interações de curto alcance e de longo alcance e na circuitaria como um todo (Belmonte, 2004). Em conjunto, esses dados conduzem à sugestão de que ocorrem anormalidades na migração neuronal.

A migração neuronal no córtex é controlada pela ação parácrina de glutamato e de GABA. O glutamato controla a migração radial de neurônios piramidais e regula a migração tangencial de interneurônios inibitórios. O GABA, por sua vez, possui ação dicotômica sobre os neurônios em migração radial, atuando como sinal “go” nas camadas inferiores e como sinal “stop” na placa cortical superior (Luhmann et al., 2015). A maioria dos interneurônios GABAérgicos origina-se na eminência gangliônica (Corbin and Butt, 2011), uma estrutura encefálica transitória presente durante o desenvolvimento embrionário (Kelsom and Lu, 2013). A eminência gangliônica medial é o local de origem de 50 a 60% da população de interneurônios corticais em camundongos, principalmente os parvalbumina-positivos (PV⁺) (Wonders and Anderson, 2006); já a caudal produz 30 a 40% dos interneurônios corticais (Anderson et al., 2001). Em roedores, os interneurônios GABAérgicos iniciam sua migração em direção às áreas corticais no dia embrionário 12,5 (E12,5) (Kelsom and Lu, 2013) e se completa, em sua maior parte, somente ao nascimento e envolve a atividade de vários fatores quimiotáticos, de transcrição e neurotransmissores (Faux et al., 2009; Marsh et al., 2008).

Em adultos, já está bem estabelecido o papel das citocinas inflamatórias na proliferação e diferenciação celular; já no contexto embrionário, foi demonstrado, por exemplo, que níveis elevados de IL-1 β estão implicados na alteração da neurogênese, afetando a proliferação e diferenciação celular (Kohman and Rhodes, 2012). Em cultura de hipocampo de embriões de rato se observou que a proliferação de células precursoras neurais (CPNs) foi significativamente diminuída na presença de IL-1 β , ao passo que a presença de IL-1 β aumentou a proporção de células que se tornaram astrócitos e reduziu a porcentagem de novos neurônios. Sabe-se que as CPNs expressam o receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1 R_1) (Green et al., 2012), indicando que a IL-1 β pode atuar diretamente nas CPNs. Dessa forma, as citocinas inflamatórias têm papéis reguladores positivos e negativos em todos os processos que integram a neurogênese, incluindo proliferação de CPNs, migração de neurônios jovens e maturação neuronal, reforçando a ideia de que a inflamação, particularmente a neuroinflamação, é relevante para a patogênese dos transtornos neuropsiquiátricos e comportamentais (Borsini et al., 2015).

Alterações neuroimunes são frequentemente associadas a desordens neuropsiquiátricas, incluindo o TEA. Apesar de não se conhecer exatamente os mecanismos pelos quais a imunidade periférica possa influenciar a função neuronal, já foi demonstrado o papel das moléculas imunes no desenvolvimento e na função encefálica e tem sido proposto uma importante influência das citocinas no comportamento (Deckmann et al., 2018). Interessantemente, um estudo recente realizado por Filiano e colaboradores coloca a imunidade meníngea em papel de destaque na regulação da atividade neural e do comportamento social por meio da sua íntima interação com interferon-gama (IFN- γ). Foi demonstrado que neurônios inibitórios respondem ao IFN- γ (derivado de células T meníngeas) e aumentam as correntes GABAérgicas nos neurônios de projeção, colocando o IFN- γ em um interessante contexto de “elo molecular” entre a imunidade meníngea e os circuitos neurais exigidos para o comportamento social (Filiano et al., 2016). A partir disso, os autores ainda sugerem que “é plausível que mudanças homeostáticas sutis na imunidade meníngea também possam contribuir para a modulação de circuitos neuronais responsáveis por nossos comportamentos e personalidade cotidianos”. Dessa

forma, pode-se cogitar que os prejuízos sociais observados no TEA possam estar relacionados com uma regulação anormal desse circuito; e, em último nível, supor que uma possível restauração dessa homeostase poderia prevenir a hiperexcitabilidade anormal observada no córtex pré-frontal no TEA (Filiano et al., 2016; Takarae and Sweeney, 2017). Assim, essa nova visão sobre a imunidade encefálica aponta para a necessidade de estudo dessas novas vias, a fim de compreender a etiologia de distúrbios do neurodesenvolvimento e neuropsiquiátricos associados à ativação imune materna, bem como propor novos alvos terapêuticos, como o RSV, que é um polifenol com propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras.

Muitos transtornos psiquiátricos (incluindo o TEA) (Lombardo et al., 2018; Nardone and Elliott, 2016; Parker-Athill and Tan, 2010) apresentam respostas inflamatórias acompanhadas de ativação microglial no Sistema Nervoso Central; assim sendo, mudanças no fenótipo da microglia podem ser um aspecto importante da ativação imune pré-natal, levando a alterações no desenvolvimento encefálico e prejuízos comportamentais e neuronais observados em modelos de MIA na vida pós-natal (Smolders et al., 2018).

As células da microglia são células imunes residentes no SNC, onde desempenham funções na modulação da maturação celular e no estabelecimento de conexões neuronais adequadas (por meio de poda sináptica). Essas células podem alterar seu estado de “vigilante” (ou repouso) para “ativado” em resposta a perturbações no microambiente do SNC (Deckmann et al., 2018; Kreutzberg, 1996). Estudos de MIA já demonstraram aumento significativo na densidade celular de microglia (Juckel et al., 2011; Li et al., 2014; Zhu et al., 2014) e presença de marcadores de ativação microglial clássicos (Borrell et al., 2002; Van den Eynde et al., 2014; Zhu et al., 2014). Já os astrócitos, outro tipo de célula glial, tem um importante papel na propagação e regulação da neuroinflamação (Farina et al., 2007; Liu et al., 2011; Norden et al., 2014) liberando mediadores inflamatórios e citocinas, incluindo IL-1 β (Carpentier et al., 2005; John et al., 2004). Sabe-se que astrócitos ativados produzem muitos fatores regulatórios que podem influenciar a imunidade do SNC e fornecer *feedback* negativo para a microglia ativada (Min et al., 2006) e, de fato, já se observou neuroinflamação envolvendo astrogliose na prole dos

modelos MIA (Hao et al., 2010; Samuelsson et al., 2006), bem como um perfil astrocítico idade-dependente no modelo VPA (Bristot Silvestrin et al., 2011).

Diversas anormalidades sinápticas têm sido descritas em indivíduos com TEA. Por exemplo, sabe-se do papel essencial que a molécula de adesão celular Neuroligina-3 (Nlgn3) tem na função e maturação das sinapses (tanto excitatórias quanto inibitórias) e também já se conhece que mutações em NLGN3 no contexto do TEA (Burrows et al., 2015; Etherton et al., 2011). Em um estudo recente com a linhagem de células HT22 e com culturas primárias de neurônios do hipocampo de ratos se demonstrou que a sinalização Wnt/ β -catenina aumenta os níveis tanto de RNA mensageiro quanto proteico de Nlgn3. Além disso, a ativação dessa via com indutores farmacológicos da Wnt/ β -catenina aumentou o agrupamento e a co-localização de Nlgn3 com a proteína de ancoramento PSD-95 em processos dendríticos de neurônios primários. Dessa forma, a sinalização Wnt/ β -catenina pode ter relação com a desregulação do balanço excitatório/inibitório, como é observado em modelos animais de ASD (Medina et al., 2018). Na última década, identificaram-se diversas mutações e polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em indivíduos com TEA, muitos convergindo para a via Wnt/ β -catenina; dessa forma, acredita-se que mutações em genes relacionados à via da Wnt contribuem para o TEA (Bae and Hong, 2018).

2. Via da Wnt/ β -Catenina

A sinalização via Wnt surge como uma proposta clinicamente relevante no contexto de desordens cognitivas e modelos animais são ferramentas interessantes na elucidação dos mecanismos envolvidos. Estudo de genes da via da Wnt que não estão diretamente envolvidos no TEA auxiliam na elucidação da fisiopatologia desse transtorno, ao passo que estudos usando nocautes ou animais heterozigotos para mutações de genes de alto risco de desenvolvimento de TEA oferecem a oportunidade de determinar os circuitos neurais envolvidos (Kwan et al., 2016).

Dentre os modelos animais para estudo da via da Wnt, dois são de especial interesse (Kwan et al., 2016). O primeiro é a exposição de

camundongos fêmeas prenhes ao composto XAV939, que altera a sinalização canônica da via, causando uma expansão da população de células progenitoras intermediárias no córtex cerebral em desenvolvimento, resultando em uma superpopulação de neurônios no córtex, o que perturba a homeostase e altera a distribuição de interneurônios (Fang et al., 2014). O segundo modelo é o modelo animal por exposição ao VPA; esse fármaco possui muitos alvos, mas um de seus efeitos melhor caracterizados é a estimulação da via de sinalização Wnt canônica através da modulação da histona desacetilase e GSK3 (Go et al., 2012; Phiel et al., 2001; Wang et al., 2015; Wiltse, 2005; Zhang et al., 2012). Ambos os modelos geram anormalidades comportamentais semelhantes ao TEA, de modo que se sugere uma relação intrínseca entre a modulação anormal da sinalização Wnt durante o neurodesenvolvimento e características semelhantes ao autismo.

Conforme discutido anteriormente, um dos possíveis mecanismos pelos quais a exposição pré-natal ao VPA pode estar induzindo a desorganização cortical, bem como a disposição alterada dos neurônios que expressam parvalbumina (PV⁺) é por meio da migração neuronal. Essas respostas são moduladas pela regulação espaço-temporal da fosforilação proteica a partir de diversas cinases, como a GSK3 β (Alabed et al., 2010), alterando a forma como fatores reguladores se ligam a proteínas do citoesqueleto, como actina, miosina e tau, envolvidas no crescimento axonal, dendrítico, polaridade e migração neuronal, formação de sinapses, entre outros processos (Cole et al., 2006; Yamashita and Goshima, 2012). Uma vez que a GSK3 β é regulada pela via da Wnt/ β -Catenina e, sabendo que a hiperativação dessa via está implicada tanto com a fisiopatologia do TEA, quanto com as alterações induzidas pela exposição pré-natal ao VPA (Go et al., 2012), as quais podem ser transmitidas de forma transgeracional por mecanismos epigenéticos (Choi et al., 2016), estudos modulando essa via já mostraram eficácia para atenuar efeitos da indução pré-natal ao VPA (Go et al., 2012).

Um padrão de fosforilação alterado já foi observado em crianças com TEA, levando a um aumento da atividade da via da Akt/mTOR (Onore et al., 2017). Sabe-se que o complexo de degradação da β -Catenina interage com os dois complexos de supressão tumoral (TSC1 e TSC2) da rota da mTOR, a qual

é amplamente estudada como um dos mecanismos moleculares para a fisiopatologia do TEA (Caracci et al., 2016). A modulação do TSC1/2 com esse complexo da β -Catenina modula diretamente a sinalização da Wnt (Mak et al., 2003, 2005). Camundongos expostos ao VPA durante a gestação apresentam uma redução da metilação dos genes *WNT1* e *WNT2*, paralelamente com um aumento da ativação da via sinalizatória da Wnt/ β -Catenina (Wang et al., 2010b). Esses animais apresentaram um aumento dos níveis de receptor NMDA e aumento do potencial de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) (Rinaldi et al., 2007), bem como redução da expressão do transportador vesicular de GABA em culturas de neurônios corticais (Kumamaru et al., 2014). Além disso, a deleção do gene da β -catenina em neurônios inibitórios que expressam PV leva a prejuízos na interação social e em reconhecimento de objetos (Dong et al., 2016).

Esses achados sugerem que a modulação da via da Wnt/ β -Catenina, levando a sua hiperativação, podem estar envolvidos nos mecanismos relacionados com o aumento da excitação e, conseqüentemente, com o desequilíbrio entre a excitação e a inibição que são observados tanto no modelo VPA quanto em pacientes com TEA.

Interessantemente, o tratamento com moléculas anti-inflamatórias, como o sulindaco, leva a um aumento significativo de GSK3 β no córtex pré-frontal e no hipocampo de camundongos expostos ao VPA durante a gestação, levando a diminuição da ativação da via sinalizatória da Wnt/ β -Catenina, contrapondo as alterações comportamentais, como as estereotipias e o limiar para a nocicepção, induzidas pelo VPA (Zhang et al., 2012, 2015). O RSV possui uma atividade supressora dose-dependente da sinalização da Wnt, não alterando os níveis de β -Catenina e sua distribuição citoplasmática e nuclear, porém interagindo na ligação entre a β -Catenina com TCF4, contribuindo para a redução da sinalização da Wnt em diferentes tipos de células tumorais (Chen et al., 2012; Tarapore et al., 2012). Além disso, sabe-se que o RSV é capaz de ativar a sirtuína 1 (SIRT-1), a qual inibe a acetilação da β -Catenina, reduzindo a ativação dessa via pela indisponibilidade da translocação da β -Catenina para o núcleo celular (Chocarro-Calvo et al., 2013).

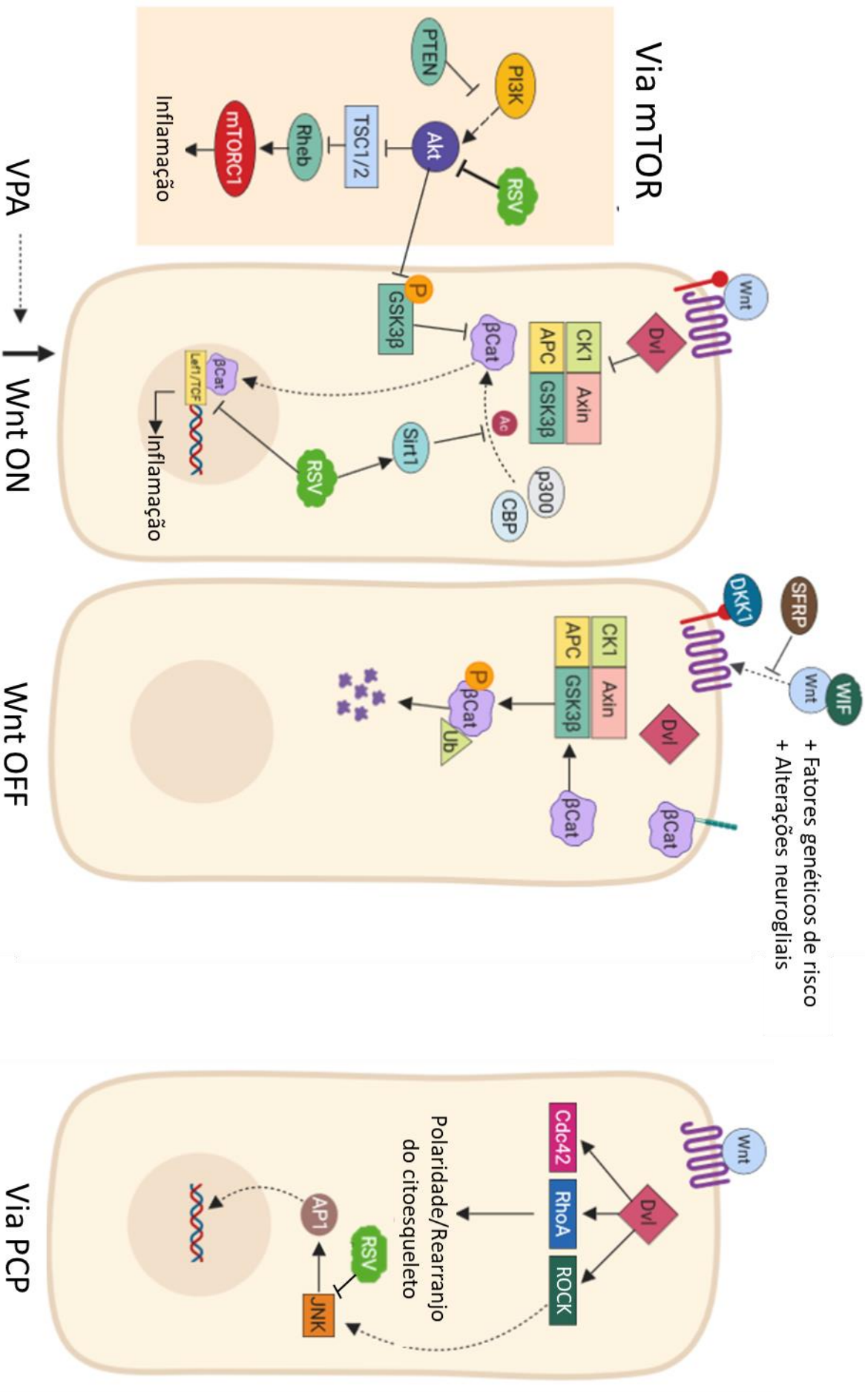
Outro alvo interessante do RSV envolve a modulação entre a via da mTOR e a via da Wnt/ β -Catenina. Em condições fisiológicas, a Akt promove a inibição do TSC1/2, o qual, por sua vez, inibe a Rheb, que tem um papel estimulatório sobre o complexo 1 da mTOR (mTORC1), promovendo a transcrição de genes relacionados com a inflamação, por exemplo (Prabowo et al., 2013). O RSV, por sua vez, é capaz de inibir a Akt, seja pela redução da fosforilação, seja pela redução da expressão dessa proteína, a qual reduz a ativação do mTORC1 (Jiang et al., 2009). Sabe-se que a proteína PTEN, a qual exerce um papel regulatório na da via PI3K-Akt-mTOR, está associada a prejuízos nos comportamentos de interação social em animais PTEN^{+/-} (Kwon et al., 2006).

Considerando que a Akt está hiperativa no contexto do TEA e que a hiperativação do mTORC1 está relacionada com diferentes desfechos observados em indivíduos com autismo, como, por exemplo, alterações sinápticas no aumento de espinhos dendríticos em diferentes regiões encefálicas (Winden et al., 2018), esse alvo do RSV que integra a via da mTOR com a via da Wnt/ β -Catenina parece ser um mecanismo promissor de ação do RSV em contraposição a mecanismos de indução de características do tipo autista pelo VPA.

Uma das vias não-canônicas da Wnt/ β -Catenina, ou a via PCP (*Planar Cell Polarity pathway*) envolve a ativação de diversas proteínas envolvidas com o remodelamento do citoesqueleto e já se observou que diversos genes participantes, como *DVL2*, *DIAPH3*, *FAT1*, *NF1*, *PRICKLE1* e *PRICKLE2*, *SCRIB1*, e *WNT2* estão alterados em indivíduos com TEA (Sans et al., 2016). Interessantemente, alterações nesses genes estão envolvidas com prejuízos na fechamento do tubo neural (Sowers et al., 2013) e em anormalidades comportamentais sociais e repetitivas em modelos nocaute para os genes da família Dvl (Belinson et al., 2016; Lijam et al., 1997). A ativação da rota não-canônica da Wnt/ β -Catenina promove a interação da proteína Dvl2 com três proteínas-chave do remodelamento do citoesqueleto: Rac1, Cdc42 e RhoA. Modelos genéticos de nocaute para RhoA no córtex cerebral de camundongos são capazes de induzir alterações de heterotopias corticais e lisencefalias (Stankiewicz and Linseman, 2014). Esse estudo evidenciou o papel relevante da

RhoA na migração neuronal, em que se hipotetiza que essa alteração na migração é atribuída a desestabilização da actina e dos microtúbulos da glia radial (Cappello et al., 2012). Recentemente, foi descoberto que inibidores das deacetilases de histonas (HDAC) aumentam a atividade da via não-canônica da Wnt/ β -Catenina, aumentando a fosforilação das c-Junus n-terminal cinases (JNK) (Jang and Jeong, 2018). Uma vez que o RSV é capaz de inibir a fosforilação da família JNK em culturas celulares (Wang et al., 2019) e, sabendo que essas vias são relevantes para a migração celular, uma das hipóteses principais originadas desse trabalho é a possibilidade de o RSV exercer papéis importantes na sinalização canônica e não-canônica da Wnt/ β -Catenina, modulando essa via em diferentes pontos levando a uma redução da ativação dela, em contraposição aos efeitos do VPA e do que se observa em indivíduos com TEA (Figura 1).

A proposta dessa via como um dos possíveis mecanismos de indução do VPA, bem como um possível alvo de prevenção do RSV levanta novas possibilidades no estudo de fenômenos relacionados à migração neuronal, desenvolvimento sináptico, organização cortical e balanço excitatório-inibitório que podem estar envolvidos na fisiopatologia das alterações no processamento em regiões corticais, como na área somatossensorial primária, dentro do TEA.



Via canônica da Wnt/ β -Catenina

Via não-canônica da Wnt/ β -Catenina

-  Receptor Frizzled
-  LRP5/6
-  Caderina
-  Kny/Ror2/Ryk

Figura 1: Possíveis vias envolvidas no mecanismo fisiopatológico do VPA e na prevenção pelo RSV. Via de sinalização da mTOR: o VPA aumenta a atividade da Akt, a qual estimula o complexo mTORC1, levando à expressão de diversas moléculas relacionados com o processo inflamatório. O RSV é capaz de inibir a Akt, podendo contrapor a ação do VPA. Ainda, essa inibição da Akt pelo RSV é capaz de inibir a atividade da GSK3 β , a qual modula a translocação da β -Catenina para o núcleo. **Via canônica de sinalização da Wnt/ β -Catenina (Wnt ativa/ON):** o VPA hiperativa esta via, levando à inibição do complexo de degradação da β -Catenina, formado pela CK1, Axin, APC e GSK3 β , promovendo a translocação da β -Catenina para o núcleo, a qual interage com os fatores de transcrição Lef1/TCF, levando à expressão de genes relacionados à inflamação. O RSV é capaz de modular tanto a inibição da interação da β -Catenina com os fatores de transcrição descritos quanto levar à ativação de Sirt1, a qual inibe a acetilação da β -Catenina, inibindo sua translocação nuclear. **Via canônica de sinalização da Wnt/ β -Catenina (Wnt inativa/OFF):** a presença de antagonistas endógenos da Wnt como o DKK1 ou fatores que inibem diretamente a Wnt (WIF, sFRP) impedem a ativação dessa via, não mobilizando o Dvl citosólico, permitindo que o complexo de degradação da β -Catenina não seja inibido, levando tanto à fosforilação quanto à ubiquitinação dessa proteína. Essa via pode ser regulada pela própria β -Catenina, a qual interage tanto com GSK3 β , quanto com caderinas, levando a sua rota de degradação. **Vias não canônicas da Wnt (Via de Polaridade Celular Planar):** com a ativação da Wnt o Dvl citosólico interage com as proteínas Cdc42, RhoA e ROCK, levando ao rearranjo do citoesqueleto, o qual permite a polaridade e a migração celular. Ainda, a ROCK é capaz de interagir com a JNK, a qual, por meio da Ap1, se transloca para o núcleo, levando à transcrição de genes envolvidos nesses processos. O RSV é capaz de inibir a fosforilação da JNK, podendo ser um mecanismo regulatório dessa via. Ac - Acetilação; Akt - Proteína cinase B; AP1 - Proteína ativadora 1; APC – Proteína relacionada a Adenomatose Poliposa Familiar; Axin – Axina; CBP - Proteína ligante de CREB; Cdc42 - Proteína homóloga do controle de divisão celular 42; CK1 - Caseína cinase 1; DKK1 – Proteína relacionada a Dickkopf 1; Dvl - Proteína intracelular relacionada a *dishvelled*; GSK3 β - Glicogênio-sintase-cinase 3-beta; JNK - c-Jun N-terminal cinase; Lef1 - Fator de ligação estimulador linfóide 1; mTOR - Proteína alvo da rapamicina em

mamíferos; mTORC1 - Complexo 1 da mTOR; P – Fosforilação; p300 - Histona acetil-transferase 300; PI3K - Fosfoinositídeo 3-cinase; PTEN - Proteína fosfatase e tensina homóloga; Rheb - Proteínas Ras homóloga encefálica; RhoA - Proteína da família do gene homólogo a Ras A; ROCK – Proteína cinase associada a Rho; RSV – Resveratrol; sFRP - Proteína secretada relacionada ao Frizzle; Sirt1 - Sirtuína 1; TCF - Fator de células T; TSC1/2 - Complexo esclerose tuberosa 1/2; Ub – Ubiquitina; VPA - Ácido Valproico; WIF - Fator inibitória da Wnt; Wnt - Proteína do sítio relacionado à ausência de asas; β Cat - beta-catenina

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho investigou tanto os efeitos da exposição pré-natal ao VPA, um fator de risco ambiental importante durante a gestação para o TEA, quanto o possível efeito preventivo pela exposição pré-natal ao RSV, um polifenol utilizado como estratégia intra-útero de prevenção de características do tipo autista nos comportamentos sensoriais no modelo VPA.

No capítulo II, em relação aos comportamentos sensoriais, mostrou-se, pela primeira vez, a aplicação do teste de estimulação de vibrissas para avaliar o componente somestésico no modelo animal VPA, mostrando importantes prejuízos nesse processamento por parte da exposição pré-natal a essa molécula. Essas alterações foram paralelas com uma desorganização cortical observada na ASSp, bem como uma disposição alterada dos interneurônios PV⁺ tanto na ASSp quanto na região da amígdala. Além disso, as alterações no processamento sensorial estão presentes desde o início da vida dos animais, conforme observado no comportamento de busca pelo ninho, onde se observam déficits importantes em comportamentos relacionados ao processamento olfativo. O tratamento pré-natal com RSV foi capaz de prevenir as alterações observadas pelo VPA, tanto a nível comportamental quanto a nível celular.

No capítulo III, em relação ao comportamento pró-social do tipo empático, o presente trabalho mostra, pela primeira vez, alterações nesse paradigma comportamental no grupo VPA, apresentando um atraso para o primeiro dia de abertura do tubo de constrição, e uma redução na porcentagem de aberturas concentrada nos quatro primeiros dias de teste, o que não foi prevenido pelo RSV. Ao investigar que tipos de comportamento os animais que se tornaram abridores apresentam, em comparação com aqueles que não se tornaram abridores, observou-se que existe um aumento da velocidade média na zona da porta que pode ser associada com o desfecho de se tornar abridor. Ademais, abrir no primeiro dia de teste também está relacionado com um maior risco do animal se tornar abridor no fim do teste.

No capítulo IV, em relação a eletrofisiologia *in vivo*, os animais VPA apresentaram períodos de disparos de ondas lentas associado a um comportamento alterado de parada comportamental durante a vigília. Somado a isso, esse mesmo grupo apresenta uma redução na frequência e na constante

do tempo de decaimento de correntes inibitórias pós-sinápticas (CIPS) espontâneas, registradas em neurônios piramidais da camada IV/V da área somatossensorial primária. Todas essas alterações foram prevenidas pelo tratamento pré-natal com RSV.

No capítulo V, importantes mecanismos fisiopatológicos envolvidos em modelos de ativação imune materna são apresentados na forma de um capítulo de livro, os quais são capazes de regular aspectos importantes do neurodesenvolvimento, como a migração neuronal, a qual pode estar relacionada com os mecanismos de ação do VPA, uma vez que este fármaco possui ação pró-inflamatória e pró-oxidante. Conclui-se que o VPA pode ter paralelos importantes, com relação a esses mecanismos de ação, com modelos de MIA, uma vez que ambos modelos induzem características do tipo autista na prole.

Finalmente, pode-se concluir que o RSV é uma potencial estratégia intra-útero para o estudo de alterações sensoriais no modelo VPA, bem como na investigação da contribuição do componente sensorial em outros comportamentos relevantes para o TEA. Como mecanismos de ação da exposição pré-natal ao RSV, incluem-se a reorganização cortical com a disposição adequada dos interneurônios PV⁺, mantendo a inibição basal relacionada às CIPS espontâneas adequadas na camada IV/V da área somatossensorial e prevenindo episódios de descargas de ondas lentas durante a exploração de um campo aberto pelos animais expostos ao VPA no período pré-natal. Aspectos neuroimunes podem ter uma importante relação com os mecanismos de ação do VPA, levantando a hipótese de que a modulação de vias como a via da Wnt/ β -Catenina possam contribuir tanto para a fisiopatologia do TEA, quanto para os mecanismos de indução do VPA, sendo um potencial substrato de ação do RSV para estudos seguintes.

5. PERSPECTIVAS

Considerando os resultados gerados pela presente tese, destacando as alterações sensoriais como um foco de estudo relevante para os mecanismos de indução de características do tipo autista pelo VPA, bem como alvo de prevenção pela exposição pré-natal ao RSV, as seguintes perspectivas emergem para o estudo do TEA no grupo:

- Avaliar, em embriões, parâmetros relacionados a moléculas envolvidas na migração neuronal, bem como na organização colunar e laminar da área somatossensorial primária, por meio de marcadores embrionários de camadas corticais;
- Analisar a arquitetura celular de neurônios e de células da glia da camada IV/V da área somatossensorial primária pela técnica de microinjeção;
- Analisar, por meio de colaborações com grupos parceiros do laboratório, componentes relevantes da via da Wnt/ β -Catenina, como o nível proteico e de fosforilação da GSK3 β , bem como a análise de atividade da via da mTOR por meio de kits específicos em células oriundas da área somatossensorial primária;
- Analisar, por meio de colaborações com grupos parceiros do laboratório, a ativação/inativação de interneurônios inibitórios na camada IV/V da área somatossensorial primária por meio de ferramentas de optogenética e a associação dos desfechos comportamentais com os observados em modelos animais de TEA;
- Ampliação dos estudos realizados pela presente tese em outras subpopulações de interneurônios corticais, como os positivos para calbindina (CB⁺), somatostatina (SST⁺) e calretinina (CR⁺) na área somatossensorial primária;
- Ampliação da investigação da distribuição e presença dos interneurônios GABAérgicos em outras regiões importantes para o processamento sensorial, como nos núcleos sensoriais talâmicos.
- Análises quantitativas dos EEGs, discriminando as oscilações beta, teta, delta, gama-rápido, gama lento, *ripple*, *fast ripple*. Uma vez que os dados apontam para uma alteração estrutural morfofuncional da área

somatossensorial primária, é possível que a conectividade dessa estrutura com outras regiões esteja alterada, refletindo no padrão de oscilações observadas no EEG. Dessa forma, as análises da quantificação do EEG serão expandidas para a investigação de acoplamento entre regiões encefálicas.

- Análise proteica da expressão de subunidades do receptor GABA_A na área somatossensorial primária para a correlação com os dados encontrados na constante do tempo de decaimento do presente trabalho
- Investigação da translacionalidade, por meio de colaboração com grupos parceiros dos achados eletroencefalográficos no modelo VPA com os dados em pacientes com TEA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, P., Molnar, Z., Tzeng, Y.-S., Lai, D.-M., Arnold, S. J., and Stumm, R. (2015). Intermediate Progenitors Facilitate Intracortical Progression of Thalamocortical Axons and Interneurons through CXCL12 Chemokine Signaling. *J. Neurosci.* 35, 13053–13063. doi:10.1523/JNEUROSCI.1488-15.2015.
- Adolphs, R. (2009). The social brain: neural basis of social knowledge. *Annu. Rev. Psychol.* 60, 693–716. doi:10.1146/annurev.psych.60.110707.163514.
- Ahnaou, A., Moechars, D., Raeymaekers, L., Biermans, R., Manyakov, N. V., Bottelbergs, A., et al. (2017). Emergence of early alterations in network oscillations and functional connectivity in a tau seeding mouse model of Alzheimer's disease pathology. *Sci. Rep.* 7, 14189. doi:10.1038/s41598-017-13839-6.
- Alabed, Y. Z., Pool, M., Ong Tone, S., Sutherland, C., and Fournier, A. E. (2010). GSK3 Regulates Myelin-Dependent Axon Outgrowth Inhibition through CRMP4. *J. Neurosci.* 30, 5635–5643. doi:10.1523/JNEUROSCI.6154-09.2010.
- Aldinger, K. A., Kogan, J., Kimonis, V., Fernandez, B., Horn, D., Klopocki, E., et al. (2012). Cerebellar and posterior fossa malformations in patients with autism-associated chromosome 22q13 terminal deletion. *Am J Med Genet A* 161A, 131–136. doi:10.1002/ajmg.a.35700.
- Amaral, D. G., Bauman, M. D., and Schumann, C. M. (2003). The amygdala and autism: implications from non-human primate studies. *Genes. Brain. Behav.* 2, 295–302. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14606694> [Accessed May 23, 2018].
- American Psychiatry Association (APA) (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition*. 5th Ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc doi:10.1176/appi.books.9780890425596.893619.
- American Psychiatric Association (2013). *DSM-V*. doi:10.1176/appi.books.9780890425596.744053.
- An, K., Ikeda, T., Yoshimura, Y., Hasegawa, C., Saito, D. N., Kumazaki, H., et al. (2018). Altered Gamma Oscillations during Motor Control in Children with Autism Spectrum Disorder. *J. Neurosci.* 38, 7878–7886. doi:10.1523/JNEUROSCI.1229-18.2018.
- Anderson, S. A. (1997). Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on Dlx Genes. *Science (80-.)*. 278, 474–476. doi:10.1126/science.278.5337.474.
- Anderson, S. A., Marín, O., Horn, C., Jennings, K., and Rubenstein, J. L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Dev.* 128, 353–63.
- APA, A. P. A.- (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, DSM-V*. Fifth Edit. Washington, DC.
- Ashok, A. H., Baugh, J., and Yeragani, V. K. (2012). Paul Eugen Bleuler and the origin of the term schizophrenia (SCHIZOPRENIEGRUPPE). *Indian J. Psychiatry* 54, 95–6. doi:10.4103/0019-5545.94660.
- Ashwood, P., and Krakowiak, P. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are

- associated with impaired behavioral outcome. ... , *Behav. Immun.*
- Asperger, H. (1944). Die "Autistischen Psychopathen" im Kindesalter. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.* 117, 76–136. doi:10.1007/BF01837709.
- Atladdottir, H. O., Pedersen, M. G., Thorsen, P., Mortensen, P. B., Deleuran, B., Eaton, W. W., et al. (2009). Association of Family History of Autoimmune Diseases and Autism Spectrum Disorders. *Pediatrics* 124, 687–694. doi:10.1542/peds.2008-2445.
- Ausderau, K., Sideris, J., Furlong, M., Little, L. M., Bulluck, J., and Baranek, G. T. (2014). National survey of sensory features in children with ASD: Factor structure of the sensory experience questionnaire (3.0). *J. Autism Dev. Disord.* 44, 915–925. doi:10.1007/s10803-013-1945-1.
- Aylward, E. H., Minshew, N. J., Goldstein, G., Honeycutt, N. A., Augustine, A. M., Yates, K. O., et al. (1999). MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. *Neurology* 53, 2145–2150. doi:10.1212/WNL.53.9.2145.
- Ayres, A. J. (1979). "Sensory Integration and the Child," in *Sensory integration therapy* (Los Angeles, CA: Western Psychological Services), 135-2156.
- Bae, S. M., and Hong, J. Y. (2018). The Wnt Signaling Pathway and Related Therapeutic Drugs in Autism Spectrum Disorder. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 16 (2), 129–135. doi:10.9758/cpn.2018.16.2.129.
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D. L., Maenner, M. J., Daniels, J., Warren, Z., et al. (2018). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR. Surveill. Summ.* 67, 1–23. doi:10.15585/mmwr.ss6706a1.
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G. A., Moreira, J. C., Riesgo, R., and Gottfried, C. (2011). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res* 1408, 8–16. doi:S0006-8993(11)01097-3 [pii] 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., et al. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci. Lett.* 583, 176–81. doi:10.1016/j.neulet.2014.09.039.
- Banerjee, A., Garcia-Oscos, F., Roychowdhury, S., Galindo, L. C., Hall, S., Kilgard, M. P., et al. (2012). Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 1309–1318. doi:S1461145712001216 [pii]10.1017/S1461145712001216.
- Baranek, G. T., Boyd, B. A., Poe, M. D., David, F. J., and Watson, L. R. (2007). Hyperresponsive sensory patterns in young children with autism, developmental delay, and typical development. *Am. J. Ment. Retard.* 112, 233–45. doi:10.1352/0895-8017(2007)112[233:HSPIYC]2.0.CO;2.
- Baron-Cohen, S., Ring, H. A., Bullmore, E. T., Wheelwright, S., Ashwin, C., and Williams, S. C. R. R. (2000). The amygdala theory of autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 355–364. doi:10.1016/S0149-7634(00)00011-7.
- Baron-Cohen, S., and Wheelwright, S. (2004). The Empathy Quotient: An Investigation of Adults with Asperger Syndrome or High Functioning Autism, and Normal Sex Differences. *J. Autism Dev. Disord.* 34, 163–175. doi:10.1023/B:JADD.0000022607.19833.00.
- Bartal, I. B.-A., Decety, J., Mason, P., Ben-Ami Bartal, I., Decety, J., and

- Mason, P. (2011). Empathy and pro-social behavior in rats. *Science* (80-). 334, 1427–1430. doi:334/6061/1427 [pii]10.1126/science.1210789.
- Bartos, M., and Elgueta, C. (2012). Functional characteristics of parvalbumin- and cholecystinin-expressing basket cells. *J. Physiol.* 590, 669–81. doi:10.1113/jphysiol.2011.226175.
- Baum, S. H., Stevenson, R. A., and Wallace, M. T. (2015). Behavioral, perceptual, and neural alterations in sensory and multisensory function in autism spectrum disorder. *Prog. Neurobiol.* 134, 140–160. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.09.007.
- Bauman, M. L. (2010). Medical comorbidities in autism: challenges to diagnosis and treatment. *Neurotherapeutics* 7, 320–327. doi:S1933-7213(10)00054-1 [pii]10.1016/j.nurt.2010.06.001.
- Belinson, H., Nakatani, J., Babineau, B. A., Birnbaum, R. Y., Ellegood, J., Bershteyn, M., et al. (2016). Prenatal β -catenin/Brn2/Tbr2 transcriptional cascade regulates adult social and stereotypic behaviors. *Mol. Psychiatry* 21, 1417–1433. doi:10.1038/mp.2015.207.
- Belmonte, M. K. (2004). Autism and Abnormal Development of Brain Connectivity. *J. Neurosci.* 24, 9228–9231. doi:10.1523/JNEUROSCI.3340-04.2004.
- Belmonte, M. K., Allen, G., Beckel-Mitchener, A., Boulanger, L. M., Carper, R. A., and Webb, S. J. (2004). Autism and Abnormal Development of Brain Connectivity. *J. Neurosci.* 24, 9228–9231. doi:10.1523/JNEUROSCI.3340-04.2004.
- Ben-Ami Bartal, I., Rodgers, D. A., Bernardez Sarria, M. S., Decety, J., and Mason, P. (2014). Pro-social behavior in rats is modulated by social experience. *Elife* 3, e01385. doi:10.7554/eLife.01385.
- Ben-Sasson, A., Cermak, S. A., Orsmond, G. I., Tager-Flusberg, H., Kadlec, M. B., and Carter, A. S. (2008). Sensory clusters of toddlers with autism spectrum disorders: Differences in affective symptoms. *J. Child Psychol. Psychiatry Allied Discip.* 49, 817–825. doi:10.1111/j.1469-7610.2008.01899.x.
- Ben-Sasson, A., Hen, L., Fluss, R., Cermak, S. A., Engel-Yeger, B., and Gal, E. (2009a). A meta-analysis of sensory modulation symptoms in individuals with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 39, 1–11. doi:10.1007/s10803-008-0593-3.
- Ben-Sasson, A., Hen, L., Fluss, R., Cermak, S. A., Engel-Yeger, B., and Gal, E. (2009b). A meta-analysis of sensory modulation symptoms in individuals with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 39, 1–11. doi:10.1007/s10803-008-0593-3.
- Bertelsen, F., Folloni, D., Møller, A., Landau, A. M., Scheel-Krüger, J., and Winterdahl, M. (2017). Suppressed play behaviour and decreased oxytocin receptor binding in the amygdala after prenatal exposure to low-dose valproic acid. *Behav. Pharmacol.* 28, 450–457. doi:10.1097/FBP.0000000000000316.
- Betancur, C., and Buxbaum, J. D. (2013). SHANK3 haploinsufficiency: A “common” but underdiagnosed highly penetrant monogenic cause of autism spectrum disorders. *Mol. Autism.* doi:10.1186/2040-2392-4-17.
- Beuter, S., Ardi, Z., Horovitz, O., Wuchter, J., Keller, S., Saha, R., et al. (2016). Receptor tyrosine kinase EphA7 is required for interneuron connectivity at specific subcellular compartments of granule cells. *Sci. Rep.* 6, 29710.

- doi:10.1038/srep29710.
- Beversdorf, D. Q. (2016). Phenotyping, etiological factors, and biomarkers: Toward precision medicine in autism spectrum disorders. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 37, 659–673. doi:10.1097/DBP.0000000000000351.
- Borrell, J., Vela, J. M., Arévalo-Martin, A., Molina-Holgado, E., and Guaza, C. (2002). Prenatal Immune Challenge Disrupts Sensorimotor Gating in Adult Rats Implications for the Etiopathogenesis of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 26, 204–215. doi:10.1016/S0893-133X(01)00360-8.
- Borsini, A., Zunszain, P. A., Thuret, S., and Pariante, C. M. (2015). The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci.* 38, 145–57. doi:10.1016/j.tins.2014.12.006.
- Bortone, D., and Polleux, F. (2009). KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* 62, 53–71. doi:10.1016/j.neuron.2009.01.034.
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 551–563. doi:10.1038/nrn3992.
- Bozdagi, O., Sakurai, T., Papapetrou, D., Wang, X., Dickstein, D. L., Takahashi, N., et al. (2010). Haploinsufficiency of the autism-associated Shank3 gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol Autism* 1, 15. doi:2040-2392-1-15 [pii]10.1186/2040-2392-1-15.
- Bristot Silvestrin, R., Bambini-Junior, V., Galland, F., Daniele Bobermim, L., Quincozes- Santos, A., Torres Abib, R., et al. (2011). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res* 1495, 52–60. doi:S0006-8993(12)01842-2 [pii] 10.1016/j.brainres.2012.11.048.
- Bruni, J., and Wilder, B. J. (1979). Valproic Acid: Review of a New Antiepileptic Drug. *Arch. Neurol.* 36, 393–398. doi:10.1001/archneur.1979.00500430023002.
- Buckner, R. L., Krienen, F. M., Castellanos, A., Diaz, J. C., and Yeo, B. T. T. (2011). The organization of the human cerebellum estimated by intrinsic functional connectivity. *J. Neurophysiol.* doi:10.1152/jn.00339.2011.
- Buescher, A. V. S., Cidav, Z., Knapp, M., and Mandell, D. S. (2014). Costs of autism spectrum disorders in the United Kingdom and the United States. *JAMA Pediatr.* 168, 721–728. doi:10.1001/jamapediatrics.2014.210.
- Burrows, E. L., Laskaris, L., Koyama, L., Churilov, L., Bornstein, J. C., Hill-Yardin, E. L., et al. (2015). A neuroligin-3 mutation implicated in autism causes abnormal aggression and increases repetitive behavior in mice. *Mol. Autism* 6, 62. doi:10.1186/s13229-015-0055-7.
- Burton, B. S. (1882). On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *Am. Chem. Soc.* 3, 385–395.
- Calcagnotto, M. E., Paredes, M. F., Tihan, T., Barbaro, N. M., and Baraban, S. C. (2005). Dysfunction of synaptic inhibition in epilepsy associated with focal cortical dysplasia. *J. Neurosci.* 25, 9649–57. doi:10.1523/JNEUROSCI.2687-05.2005.
- Canitano, R., and Scandurra, V. (2011). Psychopharmacology in autism: An update. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 35, 18–28. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.10.015.

- Cao, W., Lin, S., Xia, Q., Du, Y., Yang, Q., Zhang, M., et al. (2018). Gamma Oscillation Dysfunction in mPFC Leads to Social Deficits in Neuroligin 3 R451C Knockin Mice. *Neuron* 97, 1253-1260.e7. doi:10.1016/j.neuron.2018.02.001.
- Cappello, S., Böhringer, C. R. J., Bergami, M., Conzelmann, K.-K., Ghanem, A., Tomassy, G. S., et al. (2012). A Radial Glia-Specific Role of RhoA in Double Cortex Formation. *Neuron* 73, 911–924. doi:10.1016/j.neuron.2011.12.030.
- Caracci, M. O., Ávila, M. E., and De Ferrari, G. V (2016). Synaptic Wnt/GSK3 β Signaling Hub in Autism. *Neural Plast.* 2016, 9603751. doi:10.1155/2016/9603751.
- Cardin, J. A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., et al. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature* 459, 663–667. doi:10.1038/nature08002.
- Caronia-Brown, G., and Grove, E. A. (2011). Timing of cortical interneuron migration is influenced by the cortical hem. *Cereb. Cortex* 21, 748–55. doi:10.1093/cercor/bhq142.
- Carpentier, P. A., Begolka, W. S., Olson, J. K., Elhofy, A., Karpus, W. J., and Miller, S. D. (2005). Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* 49, 360–374. doi:10.1002/glia.20117.
- Casanova, M. F., Buxhoeveden, D., and Gomez, J. (2003). Disruption in the inhibitory architecture of the cell minicolumn: implications for autism. *Neuroscientist* 9, 496–507. doi:10.1177/1073858403253552.
- Casanova, M. F., Buxhoeveden, D. P., Switala, A. E., and Roy, E. (2002a). Minicolumnar pathology in autism. *Neurology* 58, 428–432. doi:10.1212/WNL.58.3.428.
- Casanova, M. F., Buxhoeveden, D. P., Switala, A. E., and Roy, E. (2002b). Minicolumnar pathology in autism. *Neurology* 58, 428–432. doi:10.1212/WNL.58.3.428.
- Casanova, M. F., El-Baz, A. S., Kamat, S. S., Dombroski, B. A., Khalifa, F., Elnakib, A., et al. (2013). Focal cortical dysplasias in autism spectrum disorders. *Acta Neuropathol. Commun.* 1, 67. doi:10.1186/2051-5960-1-67.
- Casanova, M. F., Switala, A. E., van Engeland, H., Heinsen, H., Steinbusch, H. W. M., Hof, P. R., et al. (2006). Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta Neuropathol.* doi:10.1007/s00401-006-0085-5.
- Cascio, C. J., Moana-Filho, E. J., Guest, S., Nebel, M. B., Weisner, J., Baranek, G. T., et al. (2012). Perceptual and Neural Response to Affective Tactile Texture Stimulation in Adults with Autism Spectrum Disorders. *Autism Res.* 5, 231–244. doi:10.1002/aur.1224.
- Cascio, C., McGlone, F., Folger, S., Tannan, V., Baranek, G., Pelphrey, K. A., et al. (2008). Tactile perception in adults with autism: a multidimensional psychophysical study. *J. Autism Dev. Disord.* 38, 127–37. doi:10.1007/s10803-007-0370-8.
- Chen, G., Huang, L. D., Jiang, Y. M., and Manji, H. K. (1999). The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J. Neurochem.* doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0721327.x.
- Chen, H.-J., Hsu, L.-S., Shia, Y.-T., Lin, M.-W., and Lin, C.-M. (2012). The β -catenin/TCF complex as a novel target of resveratrol in the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1143–1153. doi:10.1016/j.bcp.2012.08.011.

- Chen, J. A., Peñagarikano, O., Belgard, T. G., Swarup, V., and Geschwind, D. H. (2015). The Emerging Picture of Autism Spectrum Disorder: Genetics and Pathology. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040405.
- Chenn, A. (2008). Wnt/ β -catenin signaling in cerebral cortical development. *Organogenesis* 4, 76–80. doi:10.4161/org.4.2.5852.
- Chocarro-Calvo, A., García-Martínez, J. M., Ardila-González, S., De la Vieja, A., and García-Jiménez, C. (2013). Glucose-Induced β -Catenin Acetylation Enhances Wnt Signaling in Cancer. *Mol. Cell* 49, 474–486. doi:10.1016/j.molcel.2012.11.022.
- Choi, C. S., Gonzales, E. L., Kim, K. C., Yang, S. M., Kim, J.-W., Mabunga, D. F., et al. (2016). The transgenerational inheritance of autism-like phenotypes in mice exposed to valproic acid during pregnancy. *Sci. Rep.* 6, 36250. doi:10.1038/srep36250.
- Christensen, D. L., Maenner, M. J., Bilder, D., Constantino, J. N., Daniels, J., Durkin, M. S., et al. (2019). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 4 Years - Early Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, Seven Sites, United States, 2010, 2012, and 2014. *MMWR. Surveill. Summ.* 68, 1–19. doi:10.15585/mmwr.ss6802a1.
- Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., et al. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* 309, 1696–703. doi:10.1001/jama.2013.2270.
- Coghlan, S., Horder, J., Inkster, B., Mendez, M. A., Murphy, D. G., and Nutt, D. J. (2012). GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms. *Neurosci Biobehav Rev* 36, 2044–2055. doi:S0149-7634(12)00118-2 [pii]10.1016/j.neubiorev.2012.07.005.
- Cole, A. R., Causeret, F., Yadirgi, G., Hastie, C. J., McLauchlan, H., McManus, E. J., et al. (2006). Distinct Priming Kinases Contribute to Differential Regulation of Collapsin Response Mediator Proteins by Glycogen Synthase Kinase-3 *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* 281, 16591–16598. doi:10.1074/jbc.M513344200.
- Colvert, E., Tick, B., McEwen, F., Stewart, C., Curran, S. R., Woodhouse, E., et al. (2015). Heritability of autism spectrum disorder in a UK population-based twin sample. *JAMA Psychiatry* 72, 415. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.3028.
- Condé, F., Lund, J. S., Jacobowitz, D. M., Baimbridge, K. G., and Lewis, D. A. (1994). Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: Distribution and morphology. *J. Comp. Neurol.* 341, 95–116. doi:10.1002/cne.903410109.
- Connors, B. W., and Gutnick, M. J. (1990). Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* 13, 99–104. doi:10.1016/0166-2236(90)90185-D.
- Corbin, J. G., and Butt, S. J. B. (2011). Developmental mechanisms for the generation of telencephalic interneurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 710–732. doi:10.1002/dneu.20890.
- Coskun, M. A., Varghese, L., Reddoch, S., Castillo, E. M., Pearson, D. A., Loveland, K. A., et al. (2009). How somatic cortical maps differ in autistic and typical brains. *Neuroreport* 20, 175–179.

- doi:10.1097/WNR.0b013e32831f47d1.
- Courchesne, E., Mouton, P. R., Calhoun, M. E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M. J., et al. (2011a). Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *JAMA* 306, 2001–2010. doi:306/18/2001 [pii] 10.1001/jama.2011.1638.
- Courchesne, E., Mouton, P. R., Calhoun, M. E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M. J., et al. (2011b). Neuron Number and Size in Prefrontal Cortex of Children With Autism. *JAMA* 306, 2001–2010. doi:10.1001/jama.2011.1638.
- Coury, D. L., Ashwood, P., Fasano, A., Fuchs, G., Geraghty, M., Kaul, A., et al. (2012). Gastrointestinal Conditions in Children With Autism Spectrum Disorder: Developing a Research Agenda. *Pediatrics* 130, 160–168. doi:10.1542/peds.2012-0900n.
- Crippa, A., Del Vecchio, G., Ceccarelli, S. B., Nobile, M., Arrigoni, F., and Brambilla, P. (2016). Cortico-cerebellar connectivity in Autism Spectrum Disorder: What do we know so far? *Front. Psychiatry*. doi:10.3389/fpsyt.2016.00020.
- Croen, L. A., Zerbo, O., Qian, Y., Massolo, M. L., Rich, S., Sidney, S., et al. (2015). The health status of adults on the autism spectrum. *Autism* 19, 814–823. doi:10.1177/1362361315577517.
- Cummins, R. A. (1991). Sensory Integration and Learning Disabilities: Ayres' Factor Analyses Reappraised. *J. Learn. Disabil.* 24, 160–168. doi:10.1177/002221949102400304.
- Dalton, K. M., Nacewicz, B. M., Johnstone, T., Schaefer, H. S., Gernsbacher, M. A., Goldsmith, H. H., et al. (2005). Gaze fixation and the neural circuitry of face processing in autism. *Nat. Neurosci.* 8, 519–526. doi:10.1038/nn1421.
- De Rubeis, S., and Buxbaum, J. D. (2015). Recent Advances in the Genetics of Autism Spectrum Disorder. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* doi:10.1007/s11910-015-0553-1.
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Cicek, A. E., et al. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. doi:10.1038/nature13772.
- de Waal, F. B. M. (2008). Putting the Altruism Back into Altruism: The Evolution of Empathy. *Annu. Rev. Psychol.* 59, 279–300. doi:10.1146/annurev.psych.59.103006.093625.
- Decety, J., and Svetlova, M. (2012). Putting together phylogenetic and ontogenetic perspectives on empathy. *Dev. Cogn. Neurosci.* 2, 1–24. doi:10.1016/J.DCN.2011.05.003.
- Deckmann, I., Schwingel, G. B., Fontes-Dutra, M., Bambini-Junior, V., and Gottfried, C. (2018). Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. *Neuroimmunomodulation*, 1–15. doi:10.1159/000492113.
- DeFelipe, J. (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *J Chem Neuroanat* 14, 1–19. doi:S0891061897100138 [pii].
- Demeulemeester, H., Vandesande, F., Orban, G. A. A., Heizmann, C. W. W., and Pochet, R. (1989). Calbindin D-28K and parvalbumin immunoreactivity

- is confined to two separate neuronal subpopulations in the cat visual cortex, whereas partial coexistence is shown in the dorsal lateral geniculate nucleus. *Neurosci. Lett.* 99, 6–11. doi:10.1016/0304-3940(89)90255-3.
- Deschamps, P. K. H., Been, M., and Matthys, W. (2014). Empathy and Empathy Induced Prosocial Behavior in 6- and 7-Year-Olds with Autism Spectrum Disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 44, 1749–1758. doi:10.1007/s10803-014-2048-3.
- Devlin, B., and Scherer, S. W. (2012). Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 229–237. doi:10.1016/j.gde.2012.03.002.
- Dichter, G. S. (2012). Functional magnetic resonance imaging of autism spectrum disorders. *Dialogues Clin. Neurosci.* 14, 319–51.
- Dickie, E. W., and Armony, J. L. (2008). Amygdala responses to unattended fearful faces: Interaction between sex and trait anxiety. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* 162, 51–57. doi:10.1016/j.psychres.2007.08.002.
- Dietert, R. R., Dietert, J. M., and DeWitt, J. C. (2011). Environmental risk factors for autism. *Emerg. Health Threats J.* 4. doi:10.3402/ehth.v4i0.7111.
- Dinstein, I., Heeger, D. J., Lorenzi, L., Minshew, N. J., Malach, R., and Behrmann, M. (2012). Unreliable Evoked Responses in Autism. *Neuron* 75, 981–991. doi:10.1016/J.NEURON.2012.07.026.
- Dong, F., Jiang, J., McSweeney, C., Zou, D., Liu, L., and Mao, Y. (2016). Deletion of CTNNA1 in inhibitory circuitry contributes to autism-associated behavioral defects. *Hum. Mol. Genet.* 25, ddw131. doi:10.1093/hmg/ddw131.
- Dover, C. J., and Le Couteur, A. (2007). How to diagnose autism. *Arch Dis Child* 92, 540–545. doi:10.1136/adc.2005.086280.
- Ecker, C., Bookheimer, S. Y., and Murphy, D. G. M. (2015). Neuroimaging in autism spectrum disorder: brain structure and function across the lifespan. *Lancet Neurol.* 14, 1121–1134. doi:10.1016/S1474-4422(15)00050-2.
- Ehrlichman, R. S., Gandal, M. J., Maxwell, C. R., Lazarewicz, M. T., Finkel, L. H., Contreras, D., et al. (2009). N-methyl-d-aspartic acid receptor antagonist-induced frequency oscillations in mice recreate pattern of electrophysiological deficits in schizophrenia. *Neuroscience* 158, 705–712. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.10.031.
- El-Fishawy, P., and State, M. W. (2010). The Genetics of Autism: Key Issues, Recent Findings, and Clinical Implications. *Psychiatr. Clin. North Am.* 33, 83–105. doi:10.1016/J.PSC.2009.12.002.
- Elison, J. T., Paterson, S. J., Wolff, J. J., Reznick, J. S., Sasson, N. J., Gu, H., et al. (2013). White Matter Microstructure and Atypical Visual Orienting in 7-Month-Olds at Risk for Autism. *Am. J. Psychiatry* 170, 899–908. doi:10.1176/appi.ajp.2012.12091150.
- Estes, M. L., and McAllister, A. K. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science (80-.)*. 353, 772–777. doi:10.1126/science.aag3194.
- Etherton, M., Foldy, C., Sharma, M., Tabuchi, K., Liu, X., Shamloo, M., et al. (2011). Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* doi:10.1073/pnas.1111093108.
- Evans, B. (2013). How autism became autism: The radical transformation of a central concept of child development in Britain. *Hist. Human Sci.* 26, 3–31.

- doi:10.1177/0952695113484320.
- Eyre, M. D., Renzi, M., Farrant, M., and Nusser, Z. (2012). Setting the Time Course of Inhibitory Synaptic Currents by Mixing Multiple GABAA Receptor Subunit Isoforms. *J. Neurosci.* 32, 5853–5867. doi:10.1523/JNEUROSCI.6495-11.2012.
- Fan, L.-W., and Pang, Y. (2017). Dysregulation of neurogenesis by neuroinflammation: key differences in neurodevelopmental and neurological disorders. *Neural Regen. Res.* 12(3), 366–371. doi:10.4103/1673-5374.202926.
- Fang, W.-Q., Chen, W.-W., Jiang, L., Liu, K., Yung, W.-H., Fu, A. K. Y., et al. (2014). Overproduction of Upper-Layer Neurons in the Neocortex Leads to Autism-like Features in Mice. *Cell Rep.* 9, 1635–1643. doi:10.1016/j.celrep.2014.11.003.
- Farina, C., Aloisi, F., and Meinel, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 138–145. doi:10.1016/j.it.2007.01.005.
- Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Reutiman, T. J., and Thuras, P. D. (2009a). Expression of GABAB Receptors Is Altered in Brains of Subjects with Autism. *The Cerebellum* 8, 64–69. doi:10.1007/s12311-008-0075-3.
- Fatemi, S. H., Halt, A. R., Stary, J. M., Kanodia, R., Schulz, S. C., and Realmuto, G. R. (2002). Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices. *Biol Psychiatry* 52, 805–810. doi:S0006322302014300 [pii].
- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., and Thuras, P. D. (2009b). GABAA Receptor Downregulation in Brains of Subjects with Autism. *J. Autism Dev. Disord.* 39, 223–230. doi:10.1007/s10803-008-0646-7.
- Faux, C., Rakic, S., Andrews, W., Yanagawa, Y., Obata, K., and Parnavelas, J. G. (2009). Differential gene expression in migrating cortical interneurons during mouse forebrain development. *J. Comp. Neurol.* 518, NA-NA. doi:10.1002/cne.22271.
- Favre, M. M. R., Barkat, T. T. R., Lamendola, D., Khazen, G., Markram, H., and Markram, K. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 88. doi:10.3389/fnbeh.2013.00088.
- Feldmeyer, D., Qi, G., Emmenegger, V., and Staiger, J. F. (2018). Inhibitory Interneurons and their Circuit Motifs in the Many Layers of the Barrel Cortex. *Neuroscience* 368, 132–151. doi:10.1016/j.neuroscience.2017.05.027.
- Filiano, A. J., Xu, Y., Tustison, N. J., Marsh, R. L., Baker, W., Smirnov, I., et al. (2016). Unexpected role of interferon- γ in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature* 535, 425–429. doi:10.1038/nature18626.
- Filippi-Chiela, E. C., Villodre, E. S., Zamin, L. L., and Lenz, G. (2011). Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One* 6, e20849. doi:10.1371/journal.pone.0020849PONE-D-10-06452 [pii].
- Fontes-Dutra, M., Della-Flora Nunes, G., Santos-Terra, J., Souza-Nunes, W., Bauer-Negrini, G., Hirsch, M. M. M., et al. (2019). Abnormal empathy-like pro-social behaviour in the valproic acid model of autism spectrum disorder. *Behav. Brain Res.* 364, 11–18.
- Fontes-Dutra, M., Santos-Terra, J., Deckmann, I., Brum Schwingel, G., Della-Flora Nunes, G., Hirsch, M. M., et al. (2018). Resveratrol Prevents Cellular

- and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. *Front. Synaptic Neurosci.* 10, 9. doi:10.3389/fnsyn.2018.00009.
- Foti, S. B., Chou, A., Moll, A. D., and Roskams, A. J. (2013). HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 31, 434–47. doi:10.1016/j.ijdevneu.2013.03.008.
- Fremont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66, 663–673. doi:S0024320599004105 [pii].
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., et al. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485, 517–21. doi:10.1038/nature11007.
- Gandal, M. J., Edgar, J. C., Ehrlichman, R. S., Mehta, M., Roberts, T. P. L., and Siegel, S. J. (2010). Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol. Psychiatry* 68, 1100–1106. doi:10.1016/j.biopsych.2010.09.031.
- Germani, T., Zwaigenbaum, L., Bryson, S., Brian, J., Smith, I., Roberts, W., et al. (2014). Brief Report: Assessment of Early Sensory Processing in Infants at High-Risk of Autism Spectrum Disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 44, 3264–3270. doi:10.1007/s10803-014-2175-x.
- Geschwind, D. H. (2009a). Advances in autism. *Annu Rev Med* 60, 367–380. doi:10.1146/annurev.med.60.053107.121225.
- Geschwind, D. H. (2009b). Advances in autism. *Annu Rev Med* 60, 367–380. doi:10.1146/annurev.med.60.053107.121225.
- Gilbert, J., and Man, H.-Y. (2017). Fundamental Elements in Autism: From Neurogenesis and Neurite Growth to Synaptic Plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* doi:10.3389/fncel.2017.00359.
- Gkogkas, C. G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D. B., et al. (2013). Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493, 371–377. doi:10.1038/nature11628.
- Gliga, T., Jones, E. J. H., Bedford, R., Charman, T., and Johnson, M. H. (2014). From early markers to neuro-developmental mechanisms of autism. *Dev. Rev.* 34, 189–207. doi:10.1016/j.dr.2014.05.003.
- Go, H. S., Kim, K. C., Choi, C. S., Jeon, S. J., Kwon, K. J., Han, S.-H., et al. (2012). Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat brain via a mechanism involving the GSK-3 β / β -catenin pathway. *Neuropharmacology* 63, 1028–1041. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.07.028.
- Gordon, I., Jack, A., Pretzsch, C. M., Vander Wyk, B., Leckman, J. F., Feldman, R., et al. (2016). Intranasal Oxytocin Enhances Connectivity in the Neural Circuitry Supporting Social Motivation and Social Perception in Children with Autism. *Sci. Rep.* 6, 35054. doi:10.1038/srep35054.
- Gottfried, C., Bambini-junior, V., Baronio, D., Zanatta, G., Silvestrin, R. B., and Vaccaro, T. (2013). Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder : From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model.
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., and Savino, W. (2015). The impact of neuroimmune alterations in autism spectrum disorder. *Front. Psychiatry* 6, 121. doi:10.3389/fpsy.2015.00121.
- Gozes, I., Zamostiano, R., Pinhasov, A., Bassan, M., Giladi, E., Steingart, R. A., et al. (2006). A Novel VIP Responsive Gene: Activity Dependent

- Neuroprotective Protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06957.x.
- Grandin, T. (2009). Visual abilities and sensory differences in a person with autism. *Biol Psychiatry* 65, 15–16. doi:S0006-3223(08)01399-1 [pii]10.1016/j.biopsych.2008.11.005.
- Green, H. F., Treacy, E., Keohane, A. K., Sullivan, A. M., O'Keefe, G. W., and Nolan, Y. M. (2012). A role for interleukin-1 β in determining the lineage fate of embryonic rat hippocampal neural precursor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 49, 311–321. doi:10.1016/j.mcn.2012.01.001.
- Green, S. A., and Ben-Sasson, A. (2010). Anxiety disorders and sensory over-responsivity in children with autism spectrum disorders: Is there a causal relationship? *J. Autism Dev. Disord.* 40, 1495–1504. doi:10.1007/s10803-010-1007-x.
- Green, S. A., Hernandez, L., Tottenham, N., Krasileva, K., Bookheimer, S. Y., and Dapretto, M. (2015). Neurobiology of Sensory Overresponsivity in Youth With Autism Spectrum Disorders. *JAMA psychiatry* 72, 778–786. doi:10.1001/jamapsychiatry.2015.0737.
- Guang, S., Pang, N., Deng, X., Yang, L., He, F., Wu, L., et al. (2018). Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder. *Front. Cell. Neurosci.* doi:10.3389/fncel.2018.00470.
- Gulyás, A. I., Tóth, K., Dános, P., and Freund, T. F. (1991). Subpopulations of GABAergic neurons containing parvalbumin, calbindin D28k, and cholecystokinin in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 312, 371–378. doi:10.1002/cne.903120305.
- Guo, X., Duan, X., Long, Z., Chen, H. H., Wang, Y., Zheng, J., et al. (2016). Decreased amygdala functional connectivity in adolescents with autism: A resting-state fMRI study. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* 257, 47–56. doi:10.1016/j.pscychresns.2016.10.005.
- Gupta, S. C., Kannappan, R., Reuter, S., Kim, J. H., and Aggarwal, B. B. (2011). Chemosensitization of tumors by resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 150–160. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05852.x.
- Haigh, S. M., Minshew, N., Heeger, D. J., Dinstein, I., and Behrmann, M. (2016). Over-Responsiveness and Greater Variability in Roughness Perception in Autism. *Autism Res.* 9, 393–402. doi:10.1002/aur.1505.
- Hall, A. C., Brennan, A., Goold, R. G., Cleverley, K., Lucas, F. R., Gordon-Weeks, P. R., et al. (2002). Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* doi:10.1006/mcne.2002.1117.
- Han, Y. S., Zheng, W. H., Bastianetto, S., Chabot, J. G., and Quirion, R. (2004). Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. *Br J Pharmacol* 141, 997–1005. doi:10.1038/sj.bjp.0705688141/6/997 [pii].
- Hansel, C. (2019). Deregulation of synaptic plasticity in autism. *Neurosci. Lett.* 688, 58–61. doi:10.1016/j.neulet.2018.02.003.
- Hao, L. Y., Hao, X. Q., Li, S. H., and Li, X. H. (2010). Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in cognitive deficits in age-increasing offspring rats. *Neuroscience* 166, 763–770. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.01.006.
- Hardan, A. Y., Minshew, N. J., Melhem, N. M., Srihari, S., Jo, B., Bansal, R., et al. (2008). An MRI and proton spectroscopy study of the thalamus in children with autism. *Psychiatry Res. - Neuroimaging* 163, 97–105.

- doi:10.1016/j.psychresns.2007.12.002.
- Harden, C. L. (2013). In utero valproate exposure and autism: long suspected, finally proven. *Epilepsy Curr.* 13, 282–4. doi:10.5698/1535-7597-13.6.282.
- Hashemi, E., Ariza, J., Rogers, H., Noctor, S. C., and Martínez-Cerdeño, V. (2016). The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Medial Prefrontal Cortex in Autism. *Cereb. Cortex*, 1–13. doi:10.1093/cercor/bhw021.
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front. Hum. Neurosci.* 3, 31. doi:10.3389/neuro.09.031.2009.
- Hilton, C. L., Harper, J. D., Kueker, R. H., Lang, A. R., Abbacchi, A. M., Todorov, A., et al. (2010). Sensory Responsiveness as a Predictor of Social Severity in Children with High Functioning Autism Spectrum Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 40, 937–945. doi:10.1007/s10803-010-0944-8.
- Hirsch, M. M., Deckmann, I., Fontes-Dutra, M., Bauer-Negrini, G., Della-Flora Nunes, G., Nunes, W., et al. (2018a). Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. *Food Chem. Toxicol.* 115. doi:10.1016/j.fct.2018.02.061.
- Hirsch, M. M. M., Deckmann, I., Fontes-Dutra, M., Bauer-Negrini, G., Della-Flora Nunes, G., Nunes, W., et al. (2018b). Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. *Food Chem. Toxicol.* 115, 336–343. doi:10.1016/j.fct.2018.02.061.
- Holingue, C., Newill, C., Lee, L. C., Pasricha, P. J., and Daniele Fallin, M. (2018). Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence. *Autism Res.* 11, 24–36. doi:10.1002/aur.1854.
- Hoshino, O. (2012). Regulation of ambient GABA levels by neuron-glia signaling for reliable perception of multisensory events. *Neural Comput* 24, 2964–2993. doi:10.1162/NECO_a_00356.
- Hosie, S., Malone, D. T., Liu, S., Glass, M., Adlard, P. A., Hannan, A. J., et al. (2018). Altered Amygdala Excitation and CB1 Receptor Modulation of Aggressive Behavior in the Neuroigin-3R451C Mouse Model of Autism. *Front. Cell. Neurosci.* doi:10.3389/fncel.2018.00234.
- Houston, C. M., Bright, D. P., Sivilotti, L. G., Beato, M., and Smart, T. G. (2009). Intracellular chloride ions regulate the time course of GABA-mediated inhibitory synaptic transmission. *J. Neurosci.* 29, 10416–23. doi:10.1523/JNEUROSCI.1670-09.2009.
- Howard, M. W., Rizzuto, D. S., Caplan, J. B., Madsen, J. R., Lisman, J., Aschenbrenner-Scheibe, R., et al. (2003). Gamma Oscillations Correlate with Working Memory Load in Humans. *Cereb. Cortex* 13, 1369–1374. doi:10.1093/cercor/bhg084.
- Howe, F. E. J., and Stagg, S. D. (2016). How Sensory Experiences Affect Adolescents with an Autistic Spectrum Condition within the Classroom. *J. Autism Dev. Disord.* 46, 1656–1668. doi:10.1007/s10803-015-2693-1.
- Hu, H., Gan, J., and Jonas, P. (2014). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science (80-)*. 345, 1255263–1255263. doi:10.1126/science.1255263.
- Huang, J. P., Huang, S. S., Deng, J. Y., Chang, C. C., Day, Y. J., and 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 Radic Biol Med* 49, 1710–1721. doi:S0891-5849(10)00531-9 [pii]10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.032.
- Hutsler, J. J., and Casanova, M. F. (2016). Review: Cortical construction in autism spectrum disorder: columns, connectivity and the subplate. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 42, 115–134. doi:10.1111/nan.12227.
- Hutsler, J. J., and Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res.* 1309, 83–94. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.120.
- Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B., and Rodier, P. M. (2000a). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol* 22, 319–324. doi:S0892-0362(99)00083-5 [pii].
- Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B., and Rodier, P. M. (2000b). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 319–324. doi:10.1016/S0892-0362(99)00083-5.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W., et al. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* (80-.). 275, 218–220. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8985016.
- Jang, S., and Jeong, H.-S. (2018). Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation via the Wnt signaling pathway in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Neurosci. Lett.* 668, 24–30. doi:10.1016/j.neulet.2018.01.006.
- Jasmin, E., Couture, M., McKinley, P., Reid, G., Fombonne, E., and Gisel, E. (2009). Sensori-motor and daily living skills of preschool children with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord* 39, 231–241. doi:10.1007/s10803-008-0617-z.
- Jeon, D., Kim, S., Chetana, M., Jo, D., Ruley, H. E., Lin, S.-Y., et al. (2010). Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca²⁺ channels in ACC. *Nat. Neurosci.* 13, 482–488. doi:10.1038/nn.2504.
- Jia, X., and Kohn, A. (2011). Gamma rhythms in the brain. *PLoS Biol.* 9, e1001045. doi:10.1371/journal.pbio.1001045.
- Jiang, H., Shang, X., Wu, H., Gautam, S. C., Al-Holou, S., Li, C., et al. (2009). Resveratrol downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling pathways in human U251 glioma cells. *J. Exp. Ther. Oncol.* 8, 25–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19827268> [Accessed July 17, 2019].
- Jiang, Y. hui, and Ehlers, M. D. (2013). Modeling Autism by SHANK Gene Mutations in Mice. *Neuron.* doi:10.1016/j.neuron.2013.03.016.
- John, G. R., Chen, L., Riviaccio, M. A., Melendez-Vasquez, C. V, Hartley, A., and Brosnan, C. F. (2004). Interleukin-1 Induces a Reactive Astroglial Phenotype via Deactivation of the Rho GTPase-Rock Axis. *J. Neurosci.* 24, 2837–2845. doi:10.1523/JNEUROSCI.4789-03.2004.
- Juckel, G., Manitz, M. P., Brüne, M., Friebe, A., Heneka, M. T., and Wolf, R. J. (2011). Microglial activation in a neuroinflammatory animal model of schizophrenia — a pilot study. *Schizophr. Res.* 131, 96–100. doi:10.1016/j.schres.2011.06.018.

- Jung, G. A., Yoon, J. Y., Moon, B. S., Yang, D. H., Kim, H. Y., Lee, S. H., et al. (2008). Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK- p21 Cip/WAF1 pathway. *BMC Cell Biol.* doi:10.1186/1471-2121-9-66.
- Jyonouchi, H., Sun, S., and Le, H. (2001). Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J. Neuroimmunol.* 120, 170–179. doi:10.1016/S0165-5728(01)00421-0.
- Kabat, J., and Król, P. (2012). Focal cortical dysplasia - review. *Polish J. Radiol.* 77, 35–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844307> [Accessed July 17, 2019].
- Kałużna-Czaplińska, J., Żurawicz, E., and Jóźwik-Pruska, J. (2018). Focus on the Social Aspect of Autism. *J. Autism Dev. Disord.* 48, 1861–1867. doi:10.1007/s10803-017-3407-7.
- Kanari, L., Ramaswamy, S., Shi, Y., Morand, S., Meystre, J., Perin, R., et al. (2018). Objective Classification of Neocortical Pyramidal Cells. *bioRxiv*, 349977. doi:10.1101/349977.
- Kang, H. J., Kawasawa, Y. I., Cheng, F., Zhu, Y., Xu, X., Li, M., et al. (2011). Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature.* doi:10.1038/nature10523.
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nerv. Child* 2, 217–250.
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., and Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 91–103. doi:10.1017/S1461145711001714.
- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7, 476–486. doi:10.1093/cercor/7.6.476.
- Keil, A., Daniels, J. L., Forssen, U., Hultman, C., Cnattingius, S., Söderberg, K. C., et al. (2010). Parental autoimmune diseases associated with autism spectrum disorders in offspring. *Epidemiology* 21, 805–808. doi:10.1097/EDE.0b013e3181f26e3f.
- Kelsom, C., and Lu, W. (2013). Development and specification of GABAergic cortical interneurons. *Cell Biosci.* 3, 19. doi:10.1186/2045-3701-3-19.
- Keown, C. L., Datko, M. C., Chen, C. P., Maximo, J. O., Jahedi, A., and Müller, R.-A. (2017). Network Organization Is Globally Atypical in Autism: A Graph Theory Study of Intrinsic Functional Connectivity. *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* 2, 66–75. doi:10.1016/j.bpsc.2016.07.008.
- Kern, J. K., Trivedi, M. H., Grannemann, B. D., Garver, C. R., Johnson, D. G., Andrews, A. A., et al. (2007). Sensory correlations in autism. *Autism* 11, 123–134. doi:11/2/123 [pii]10.1177/1362361307075702.
- Khan, S., Michmizos, K., Tommerdahl, M., Ganesan, S., Kitzbichler, M. G., Zetino, M., et al. (2015). Somatosensory cortex functional connectivity abnormalities in autism show opposite trends, depending on direction and spatial scale. *Brain* 138, 1394–1409. doi:10.1093/brain/awv043.
- Kiani, R., Hanks, T. D., and Shadlen, M. N. (2008). Bounded Integration in Parietal Cortex Underlies Decisions Even When Viewing Duration Is Dictated by the Environment. *J. Neurosci.* 28, 3017–3029.

- doi:10.1523/JNEUROSCI.4761-07.2008.
- Kientz, M. A., and Dunn, W. (1997). A Comparison of the Performance of Children With and Without Autism on the Sensory Profile. *Am. J. Occup. Ther.* 51, 530–537. doi:10.5014/ajot.51.7.530.
- Kilroy, E., Aziz-Zadeh, L., and Cermak, S. (2019). Ayres Theories of Autism and Sensory Integration Revisited: What Contemporary Neuroscience Has to Say. *Brain Sci.* 9. doi:10.3390/brainsci9030068.
- Kim, J.-W., Seung, H., Kwon, K. J., Ko, M. J., Lee, E. J., Oh, H. A., et al. (2014). Subchronic Treatment of Donepezil Rescues Impaired Social, Hyperactive, and Stereotypic Behavior in Valproic Acid-Induced Animal Model of Autism. *PLoS One* 9, e104927. doi:10.1371/journal.pone.0104927.
- Kleijer, K. T. E., van Nieuwenhuize, D., Spierenburg, H. A., Gregorio-Jordan, S., Kas, M. J. H., and Burbach, J. P. H. (2018). Structural abnormalities in the primary somatosensory cortex and a normal behavioral profile in *Contactin-5* deficient mice. *Cell Adh. Migr.* 12, 5–18. doi:10.1080/19336918.2017.1288788.
- Kleinmans, N. M., Johnson, L. C., Richards, T., Mahurin, R., Greenson, J., Dawson, G., et al. (2009). Reduced neural habituation in the amygdala and social impairments in autism spectrum disorders. *Am. J. Psychiatry* 166, 467–475. doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101681.
- Klin, A., Jones, W., Schultz, R., Volkmar, F., and Cohen, D. (2002). Visual fixation patterns during viewing of naturalistic social situations as predictors of social competence in individuals with autism. *Arch. Gen. Psychiatry* 59, 809–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215080> [Accessed July 9, 2019].
- Klintwall, L., Holm, A., Eriksson, M., Carlsson, L. H., Olsson, M. B., Hedvall, Å., et al. (2011). Sensory abnormalities in autism. A brief report. *Res Dev Disabil* 32, 795–800. doi:S0891-4222(10)00259-3 [pii]10.1016/j.ridd.2010.10.021.
- Kohman, R. A., and Rhodes, J. S. (2012). Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav Immun* 27, 22–32. doi:S0889-1591(12)00430-8 [pii]10.1016/j.bbi.2012.09.003.
- Kolozsi, E., Mackenzie, R. N., Rouillet, F. I., Decatanzaro, D., and Foster, J. A. (2009). Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic adhesion molecule neuroligin 3 in mice. *Neuroscience* 163, 1201–1210. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.07.021.
- Krakowiak, P., Goodlin-Jones, B., Hertz-Picciotto, I., Croen, L. A., and Hansen, R. L. (2008). Sleep problems in children with autism spectrum disorders, developmental delays, and typical development: A population-based study. *J. Sleep Res.* 17, 197–206. doi:10.1111/j.1365-2869.2008.00650.x.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312–8.
- Kuhaneck, H. M., and Britner, P. A. (2013). A Preliminary Investigation of the Relationship between Sensory Processing and Social Play in Autism Spectrum Disorder. *OTJR Occup. Particip. Heal.* 33, 159–167. doi:10.3928/15394492-20130614-04.
- Kumamaru, E., Egashira, Y., Takenaka, R., and Takamori, S. (2014). Valproic acid selectively suppresses the formation of inhibitory synapses in cultured cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 569, 142–7. doi:10.1016/j.neulet.2014.03.066.

- Kwan, V., Unda, B. K., and Singh, K. K. (2016). Wnt signaling networks in autism spectrum disorder and intellectual disability. *J. Neurodev. Disord.* 8, 45. doi:10.1186/s11689-016-9176-3.
- Kwon, C.-H., Luikart, B. W., Powell, C. M., Zhou, J., Matheny, S. A., Zhang, W., et al. (2006). Pten Regulates Neuronal Arborization and Social Interaction in Mice. *Neuron* 50, 377–388. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.023.
- Landers, M. S., and Sullivan, R. M. (2012). The development and neurobiology of infant attachment and fear. *Dev. Neurosci.* 34, 101–114. doi:10.1159/000336732.
- Lane, S. J., Reynolds, S., and Dumenci, L. (2012). Sensory overresponsivity and anxiety in typically developing children and children with autism and attention deficit hyperactivity disorder: Cause or coexistence? *Am. J. Occup. Ther.* 66, 595–603. doi:10.5014/ajot.2012.004523.
- Langford, D. J. (2006). Social Modulation of Pain as Evidence for Empathy in Mice. *Science (80-.)*. 312, 1967–1970. doi:10.1126/science.1128322.
- Lauber, E., Filice, F., and Schwaller, B. (2018). Dysregulation of Parvalbumin Expression in the *Cntnap2*^{-/-} Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 262. doi:10.3389/fnmol.2018.00262.
- Lavdas, a a, Grigoriou, M., Pachnis, V., and Parnavelas, J. G. (1999). The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 19, 7881–7888. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10479690> [Accessed July 10, 2019].
- Lavelle, T. A., Weinstein, M. C., Newhouse, J. P., Munir, K., Kuhlthau, K. A., and Prosser, L. A. (2014). Economic burden of childhood autism spectrum disorders. *Pediatrics* 133, 520–542. doi:10.1542/peds.2013-0763.
- Lawrence, Y. A., Kemper, T. L., Bauman, M. L., and Blatt, G. J. (2010). Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive hippocampal interneuron density in autism. *Acta Neurol. Scand.* 121, 99–108. doi:10.1111/j.1600-0404.2009.01234.x.
- Le, T. N., Zhou, Q.-P., Cobos, I., Zhang, S., Zagozewski, J., Japoni, S., et al. (2017). GABAergic Interneuron Differentiation in the Basal Forebrain Is Mediated through Direct Regulation of Glutamic Acid Decarboxylase Isoforms by *Dlx* Homeobox Transcription Factors. *J. Neurosci.* 37, 8816–8829. doi:10.1523/JNEUROSCI.2125-16.2017.
- Learoyd, A. E., and Lifshitz, J. (2012). Comparison of rat sensory behavioral tasks to detect somatosensory morbidity after diffuse brain-injury. *Behav. Brain Res.* 226, 197–204. doi:10.1016/j.bbr.2011.09.016.
- Leblond, C. S., Nava, C., Polge, A., Gauthier, J., Huguet, G., Lumbroso, S., et al. (2014). Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A Gradient of Severity in Cognitive Impairments. *PLoS Genet.* doi:10.1371/journal.pgen.1004580.
- Lee, B. K., Magnusson, C., Gardner, R. M., Blomström, Å., Newschaffer, C. J., Burstyn, I., et al. (2015). Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain. Behav. Immun.* 44, 100–105. doi:10.1016/j.bbi.2014.09.001.
- Lee, E., Lee, J., and Kim, E. (2017). Excitation/Inhibition Imbalance in Animal Models of Autism Spectrum Disorders. *Biol. Psychiatry* 81, 838–847. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322316323873> [Accessed July 10, 2019].

- Leekam, S. (2016). Social cognitive impairment and autism: what are we trying to explain? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 371, 20150082. doi:10.1098/rstb.2015.0082.
- Leekam, S. R., Nieto, C., Libby, S. J., Wing, L., and Gould, J. (2007). Describing the Sensory Abnormalities of Children and Adults with Autism. *J. Autism Dev. Disord.* 37, 894–910. doi:10.1007/s10803-006-0218-7.
- Lewis, M. L., Kesler, M., Candy, S. A., Rho, J. M., and Pittman, Q. J. (2018). Comorbid epilepsy in autism spectrum disorder: Implications of postnatal inflammation for brain excitability. *Epilepsia* 59, 1316–1326. doi:10.1111/epi.14440.
- Li, W.-Y., Chang, Y.-C., Lee, L.-J. J.-H., and Lee, L.-J. J.-H. (2014). Prenatal Infection Affects the Neuronal Architecture and Cognitive Function in Adult Mice. *Dev. Neurosci.* 36, 359–370. doi:10.1159/000362383.
- Li, X., Zou, H., and Brown, W. T. (2012). Genes associated with autism spectrum disorder. *Brain Res. Bull.* 88, 543–552. doi:10.1016/j.brainresbull.2012.05.017.
- Lijam, N., Paylor, R., McDonald, M. P., Crawley, J. N., Deng, C.-X., Herrup, K., et al. (1997). Social Interaction and Sensorimotor Gating Abnormalities in Mice Lacking Dvl1. *Cell* 90, 895–905. doi:10.1016/S0092-8674(00)80354-2.
- Lim, C.-S., Kim, H., Yu, N.-K., Kang, S. J., Kim, T., Ko, H.-G., et al. (2017). Enhancing inhibitory synaptic function reverses spatial memory deficits in Shank2 mutant mice. *Neuropharmacology* 112, 104–112. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.08.016.
- Lin, H.-C. C., Gean, P.-W. W., Wang, C.-C. C., Chan, Y.-H. H., and Chen, P. S. (2013a). The Amygdala Excitatory/Inhibitory Balance in a Valproate-Induced Rat Autism Model. *PLoS One* 8, e55248. doi:10.1371/journal.pone.0055248.
- Lin, H. C., Gean, P. W., Wang, C. C., Chan, Y. H., and Chen, P. S. (2013b). The Amygdala Excitatory/Inhibitory Balance in a Valproate-Induced Rat Autism Model. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0055248.
- Liss, M., Saulnier, C., Fein, D., and Kinsbourne, M. (2006). Sensory and attention abnormalities in autistic spectrum disorders. *Autism* 10, 155–172. doi:10.1177/1362361306062021.
- Liu, W., Tang, Y., and Feng, J. (2011). Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci.* 89, 141–146. doi:10.1016/j.lfs.2011.05.011.
- Lombardo, M. V, Moon, H. M., Su, J., Palmer, T. D., Courchesne, E., and Pramparo, T. (2018). Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry* 23, 1001–1013. doi:10.1038/mp.2017.15.
- Lucchina, L., and Depino, A. M. (2013). Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism. *Autism Res.* doi:10.1002/aur.1338.
- Lucchina, L., and Depino, A. M. (2014). Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism. *Autism Res* 7, 273–89. doi:10.1002/aur.1338.
- Luhmann, H. J., Fukuda, A., and Kilb, W. (2015). Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 4.

- doi:10.3389/fncel.2015.00004.
- Luke, L., Clare, I. C. H., Ring, H., Redley, M., and Watson, P. (2012). Decision-making difficulties experienced by adults with autism spectrum conditions. *Autism* 16, 612–621. doi:10.1177/1362361311415876.
- Lunden, J. W., Durens, M., Phillips, A. W., and Nestor, M. W. (2019). Cortical interneuron function in autism spectrum condition. *Pediatr. Res.* 85, 146–154. doi:10.1038/s41390-018-0214-6.
- Lundqvist, M., Rose, J., Herman, P., Brincat, S. L. L. L., Buschman, T. J. J. J., and Miller, E. K. K. K. (2016). Gamma and Beta Bursts Underlie Working Memory. *Neuron* 90. doi:10.1016/j.neuron.2016.02.028.
- Mabunga, D. F. N., Gonzales, E. L. T., Kim, J.-W., Kim, K. C., and Shin, C. Y. (2015). Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp. Neurobiol.* 24, 285–300. doi:10.5607/en.2015.24.4.285.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell.* doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016.
- MacDonald, M., Lord, C., and Ulrich, D. (2013). The relationship of motor skills and adaptive behavior skills in young children with autism spectrum disorders. *Res. Autism Spectr. Disord.* 7, 1383–1390. doi:10.1016/j.rasd.2013.07.020.
- Mahan, V. L. (2019). Neurointegrity and neurophysiology: astrocyte, glutamate, and carbon monoxide interactions. *Med. Gas Res.* 9, 24–45. doi:10.4103/2045-9912.254639.
- Mak, B. C., Kenerson, H. L., Aicher, L. D., Barnes, E. A., and Yeung, R. S. (2005). Aberrant beta-catenin signaling in tuberous sclerosis. *Am. J. Pathol.* 167, 107–16. doi:10.1016/s0002-9440(10)62958-6.
- Mak, B. C., Takemaru, K.-I., Kenerson, H. L., Moon, R. T., and Yeung, R. S. (2003). The Tuberlin-Hamartin Complex Negatively Regulates β -Catenin Signaling Activity. *J. Biol. Chem.* 278, 5947–5951. doi:10.1074/jbc.C200473200.
- Mandel, S., and Gozes, I. (2007). Activity-dependent neuroprotective protein constitutes a novel element in the SWI/SNF chromatin remodeling complex. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M704756200.
- Marco, E. J., Hinkley, L. B. N., Hill, S. S., and Nagarajan, S. S. (2011). Sensory processing in autism: A review of neurophysiologic findings. *Pediatr. Res.* 69, 0–14. doi:10.1203/PDR.0b013e3182130c54.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 793–807. doi:10.1038/nrn1519.
- Markram, K., Rinaldi, T., La Mendola, D., Sandi, C., and Markram, H. (2008a). Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 33, 901–912. doi:1301453 [pii]10.1038/sj.npp.1301453.
- Markram, K., Rinaldi, T., La Mendola, D., Sandi, C., Markram, H., Mendola, D. La, et al. (2008b). Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 33, 901–912. doi:1301453 [pii]10.1038/sj.npp.1301453.
- Marsh, E. D., Minarcik, J., Campbell, K., Brooks-Kayal, A. R., and Golden, J. A. (2008). FACS-array gene expression analysis during early development of mouse telencephalic interneurons. *Dev. Neurobiol.* 68, 434–445.

- doi:10.1002/dneu.20602.
- Marsh, E. D., Nasrallah, M. P., Walsh, C., Murray, K. A., Nicole Sunnen, C., McCoy, A., et al. (2016). Developmental interneuron subtype deficits after targeted loss of Arx. *BMC Neurosci.* 17, 35. doi:10.1186/s12868-016-0265-8.
- Matsushima, K., and Kato, T. (2013). Social Interaction and Atypical Sensory Processing in Children with Autism Spectrum Disorders *. *Hong Kong J. Occup. Ther.* 23, 89–96. doi:10.1016/j.hkjot.2013.11.003.
- Maximo, J. O., and Kana, R. K. (2019). Aberrant “deep connectivity” in autism: A cortico-subcortical functional connectivity magnetic resonance imaging study. *Autism Res.* 12, 384–400. doi:10.1002/aur.2058.
- Mazurek, M. O., Vasa, R. A., Kalb, L. G., Kanne, S. M., Rosenberg, D., Keefer, A., et al. (2013). Anxiety, sensory over-responsivity, and gastrointestinal problems in children with autism spectrum disorders. *J. Abnorm. Child Psychol.* 41, 165–176. doi:10.1007/s10802-012-9668-x.
- McCormick, D. A., Connors, B. W., Lighthall, J. W., and Prince, D. A. (1985). Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J. Neurophysiol.* 54, 782–806. doi:10.1152/jn.1985.54.4.782.
- McDonald, A. J. J., and Betette, R. L. L. (2001). Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: Morphology and co-localization of Calbindin-D28k. *Neuroscience* 102, 413–425. doi:10.1016/S0306-4522(00)00481-4.
- McNamara, K. C. S., Lisembee, A. M., and Lifshitz, J. (2010). The whisker nuisance task identifies a late onset, persistent sensory sensitivity in diffuse brain-injured rats. *J. Neurotrauma* 27, 695–706. doi:10.1089/neu.2009.1237.
- Medina, M. A., Andrade, V. M., Caracci, M. O., Avila, M. E., Verdugo, D. A., Vargas, M. F., et al. (2018). Wnt/ β -catenin signaling stimulates the expression and synaptic clustering of the autism-associated Neuroligin 3 gene. *Transl Psychiatry* 8 (1). doi:10.1038/s41398-018-0093-y.
- Mefford, H. C., Batshaw, M. L., and Hoffman, E. P. (2012). Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med* 366, 733–743. doi:10.1056/NEJMra1114194.
- Mehta, M. V., Gandal, M. J., and Siegel, S. J. (2011). mGluR5-antagonist mediated reversal of elevated stereotyped, repetitive behaviors in the VPA model of autism. *PLoS One* 6, 260–277. doi:10.1371/journal.pone.0026077.
- Meunier, H., Carraz, G., Neunier, Y., Eymard, P., and Aimard, M. (1963). [Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid]. *Therapie* 18, 435–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13935231>.
- Meyer, U. (2014). Prenatal Poly(I:C) Exposure and Other Developmental Immune Activation Models in Rodent Systems. *Biol. Psychiatry* 75, 307–315. doi:10.1016/j.biopsych.2013.07.011.
- Meyza, K. Z., Bartal, I. B.-A., Monfils, M. H., Panksepp, J. B., and Knapska, E. (2017). The roots of empathy: Through the lens of rodent models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 76, 216–234. doi:10.1016/J.NEUBIOREV.2016.10.028.
- Milne, E. (2011). Increased Intra-Participant Variability in Children with Autistic Spectrum Disorders: Evidence from Single-Trial Analysis of Evoked EEG.

- Front. Psychol.* 2, 51. doi:10.3389/fpsyg.2011.00051.
- Min, K.-J., Yang, M., Kim, S.-U., Jou, I., and Joe, E. (2006). Astrocytes Induce Hemeoxygenase-1 Expression in Microglia: A Feasible Mechanism for Preventing Excessive Brain Inflammation. *J. Neurosci.* 26, 1880–1887. doi:10.1523/JNEUROSCI.3696-05.2006.
- Moessner, R., Marshall, C. R., Sutcliffe, J. S., Skaug, J., Pinto, D., Vincent, J., et al. (2007). Contribution of SHANK3 Mutations to Autism Spectrum Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* doi:10.1086/522590.
- Mogil, J. S. (2012). The surprising empathic abilities of rodents. *Trends Cogn. Sci.* 16, 143–4. doi:10.1016/j.tics.2011.12.012.
- Moldrich, R. X., Leanage, G., She, D., Dolan-Evans, E., Nelson, M., Reza, N., et al. (2013). Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behav. Brain Res.* doi:10.1016/j.bbr.2013.09.049.
- Mony, T. J., Hong, M., and Lee, H. J. (2018). Empathy Study in Rodent Model of Autism Spectrum Disorders. *Psychiatry Investig.* 15, 104–110. doi:10.30773/pi.2017.06.20.
- Moriceau, S., and Sullivan, R. M. (2005). Neurobiology of infant attachment. *Dev. Psychobiol.* 47, 230–242. doi:10.1002/dev.20093.
- Moriuchi, J. M., Klin, A., and Jones, W. (2017). Mechanisms of Diminished Attention to Eyes in Autism. *Am. J. Psychiatry* 174, 26–35. doi:10.1176/appi.ajp.2016.15091222.
- Mottron, L., Dawson, M., and Soulières, I. (2009). Enhanced perception in savant syndrome: patterns, structure and creativity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 1385–1391. doi:10.1098/rstb.2008.0333.
- Muller, J. F., Mascagni, F., and McDonald, A. J. (2006). Pyramidal cells of the rat basolateral amygdala: synaptology and innervation by parvalbumin-immunoreactive interneurons. *J Comp Neurol* 494, 635–650. doi:10.1002/cne.20832.
- Munji, R. N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J. A., and Pleasure, S. J. (2011). Wnt Signaling Regulates Neuronal Differentiation of Cortical Intermediate Progenitors. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.5404-10.2011.
- Nair, A., Carper, R. A., Abbott, A. E., Chen, C. P., Solders, S., Nakutin, S., et al. (2015). Regional specificity of aberrant thalamocortical connectivity in autism. *Hum. Brain Mapp.* 36, 4497–4511. doi:10.1002/hbm.22938.
- Naisbitt, S., Eunjoon, K., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., et al. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron.* doi:10.1016/S0896-6273(00)80809-0.
- Naka, A., and Adesnik, H. (2016). Inhibitory Circuits in Cortical Layer 5. *Front. Neural Circuits* 10, 35. doi:10.3389/fncir.2016.00035.
- Nardone, S., and Elliott, E. (2016). The Interaction between the Immune System and Epigenetics in the Etiology of Autism Spectrum Disorders. *Front. Neurosci.* 10. doi:10.3389/fnins.2016.00329.
- Nicolini, C., Ahn, Y., Michalski, B., Rho, J. M., and Fahnstock, M. (2015). Decreased mTOR signaling pathway in human idiopathic autism and in rats exposed to valproic acid. *Acta Neuropathol. Commun.* doi:10.1186/s40478-015-0184-4.
- Nicolini, C., and Fahnstock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. doi:10.1016/j.expneurol.2017.04.017.
- Norden, D. M., Fenn, A. M., Dugan, A., and Godbout, J. P. (2014). TGFβ

- produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia* 62, 881–895. doi:10.1002/glia.22647.
- O'Loughlin, E., Pakan, J. M. P., Yilmazer-Hanke, D., and McDermott, K. W. (2017). Acute in utero exposure to lipopolysaccharide induces inflammation in the pre- and postnatal brain and alters the glial cytoarchitecture in the developing amygdala. *J. Neuroinflammation*. doi:10.1186/s12974-017-0981-8.
- Olexová, L., Štefánik, P., and Kršková, L. (2016). Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amygdala and cerebellum of VPA rats — An animal model of autism. *Neurosci. Lett.* 629, 9–14. doi:10.1016/j.neulet.2016.06.035.
- Onore, C., Yang, H., Van de Water, J., and Ashwood, P. (2017). Dynamic Akt/mTOR Signaling in Children with Autism Spectrum Disorder. *Front. Pediatr.* 5, 43. doi:10.3389/fped.2017.00043.
- Orefice, L. L., Zimmerman, A. L., Chirila, A. M., Sleboda, S. J., Head, J. P., and Ginty, D. D. (2016). Peripheral Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse Models of ASDs. *Cell* 166, 299–313. doi:10.1016/j.cell.2016.05.033.
- Ortiz-Mantilla, S., Cantiani, C., Shafer, V. L., and Benasich, A. A. (2019). Minimally-verbal children with autism show deficits in theta and gamma oscillations during processing of semantically-related visual information. *Sci. Rep.* 9, 5072. doi:10.1038/s41598-019-41511-8.
- Otis, T. S., and Mody, I. (1992). Modulation of decay kinetics and frequency of GABAA receptor-mediated spontaneous inhibitory postsynaptic currents in hippocampal neurons. *Neuroscience*. doi:10.1016/0306-4522(92)90073-B.
- Packer, A. M., and Yuste, R. (2011). Dense, unspecific connectivity of neocortical parvalbumin-positive interneurons: a canonical microcircuit for inhibition? *J. Neurosci.* 31, 13260–71. doi:10.1523/JNEUROSCI.3131-11.2011.
- Pangratz-Fuehrer, S., and Hestrin, S. (2011). Synaptogenesis of electrical and GABAergic synapses of fast-spiking inhibitory neurons in the neocortex. *J. Neurosci.* 31, 10767–75. doi:10.1523/JNEUROSCI.6655-10.2011.
- Panksepp, J., and Panksepp, J. B. (2013). Toward a cross-species understanding of empathy. *Trends Neurosci.* 36, 489–96. doi:10.1016/j.tins.2013.04.009.
- Parisi, M. A., and Dobyns, W. B. (2003). Human malformations of the midbrain and hindbrain: Review and proposed classification scheme. *Mol. Genet. Metab.* doi:10.1016/j.ymgme.2003.08.010.
- Parker-Athill, E. C., and Tan, J. (2010). Maternal immune activation and autism spectrum disorder: interleukin-6 signaling as a key mechanistic pathway. *Neurosignals.* 18, 113–28. doi:10.1159/000319828.
- Paxinos, G., and Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Acad. Press. San Diego 3rd.
- Pearce, J. M. S. (2005). Kanner's infantile autism and Asperger's syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 200–205. doi:10.1136/jnnp.2004.042820.
- Peck, C. J., and Salzman, C. D. (2014). The Amygdala and Basal Forebrain as a Pathway for Motivationally Guided Attention. *J. Neurosci.* 34, 13757–13767. doi:10.1523/JNEUROSCI.2106-14.2014.
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. a., and Klein, P. S. (2001). Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a

- Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J. Biol. Chem.* 276, 36734–36741. doi:10.1074/jbc.M101287200.
- Pierce, K., Haist, F., Sedaghat, F., and Courchesne, E. (2004). The brain response to personally familiar faces in autism: findings of fusiform activity and beyond. *Brain* 127, 2703–2716. doi:10.1093/brain/awh289.
- Pinheiro, P. S., and Mulle, C. (2008). Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. doi:10.1038/nrn2379.
- Prabowo, A. S., Anink, J. J., Lammens, M., Nellist, M., van den Ouweland, A. M. W., Adle-Biassette, H., et al. (2013). Fetal Brain Lesions in Tuberous Sclerosis Complex: TORC1 Activation and Inflammation. *Brain Pathol.* 23, 45–59. doi:10.1111/j.1750-3639.2012.00616.x.
- Puts, N. A. J., Wodka, E. L., Harris, A. D., Crocetti, D., Tommerdahl, M., Mostofsky, S. H., et al. Reduced GABA and altered somatosensory function in children with autism spectrum disorder. *Autism Res.* 10, 608–619. doi:10.1002/aur.1691.
- Puts, N. A. J., Wodka, E. L., Tommerdahl, M., Mostofsky, S. H., and Edden, R. A. E. (2014). Impaired tactile processing in children with autism spectrum disorder. *J. Neurophysiol.* 111, 1803–11. doi:10.1152/jn.00890.2013.
- Quincozes-Santos, A., and Gottfried, C. Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 72–78. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05857.x.
- Raghanti, M. A., Spocter, M. A., Butti, C., Hof, P. R., and Sherwood, C. C. (2004). A comparative perspective on minicolumns and inhibitory GABAergic interneurons in the neocortex. *Front Neuroanat* 4, 3. doi:10.3389/neuro.05.003.2010.
- Ramadori, G., Gautron, L., Fujikawa, T., Vianna, C. R., Elmquist, J. K., and Coppari, R. (2009). Central administration of resveratrol improves diet-induced diabetes. *Endocrinology* 150, 5326–5333. doi:en.2009-0528 [pii]10.1210/en.2009-0528.
- Raposo, D., Sheppard, J. P., Schrater, P. R., and Churchland, A. K. (2012). Multisensory decision-making in rats and humans. *J. Neurosci.* 32, 3726–35. doi:10.1523/JNEUROSCI.4998-11.2012.
- Reynolds, M. F., Sisk, E. C., and Rasgon, N. L. (2007). Valproate and neuroendocrine changes in relation to women treated for epilepsy and bipolar disorder: a review. *Curr. Med. Chem.* 14, 2799–812.
- Ricci, S., Businaro, R., Ippoliti, F., Lo Vasco, V. R., Massoni, F., Onofri, E., et al. (2013). Altered cytokine and BDNF levels in autism spectrum disorder. *Neurotox. Res.* 24, 491–501. doi:10.1007/s12640-013-9393-4.
- Rigon, A., Duff, M. C., and Voss, M. W. (2015). Structural and functional neural correlates of self-reported attachment in healthy adults: evidence for an amygdalar involvement. *Brain Imaging Behav.* 10, 941–952. doi:10.1007/s11682-015-9446-9.
- Rinaldi, T., Kulangara, K., Antonello, K., and Markram, H. (2007). Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13501–6. doi:10.1073/pnas.0704391104.
- Robertson, C. E., and Baron-Cohen, S. (2017). Sensory perception in autism. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 671–684. doi:10.1038/nrn.2017.112.
- Robic, S., Sonié, S., Fonlupt, P., Henaff, M.-A., Touil, N., Coricelli, G., et al. (2015). Decision-Making in a Changing World: A Study in Autism Spectrum

- Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 45, 1603–1613. doi:10.1007/s10803-014-2311-7.
- Rodier, P. M., Bryson, S. E., and Welch, J. P. (1997a). Minor malformations and physical measurements in autism: data from Nova Scotia. *Teratology* 55, 319–325. doi:10.1002/(SICI)1096-9926(199705)55:5<319::AID-TERA4>3.0.CO;2-U [pii]10.1002/(SICI)1096-9926(199705)55:5<319::AID-TERA4>3.0.CO;2-U.
- Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., and Croog, V. J. (1997b). Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod Toxicol* 11, 417–422. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9100317.
- Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., Nelson, S., and Romano, J. (1996). Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J. Comp. Neurol.* 370, 247–261. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2.
- Rogers, S. J., and Ozonoff, S. (2005). Annotation: What do we know about sensory dysfunction in autism? A critical review of the empirical evidence. *J. Child Psychol. Psychiatry* 46, 1255–1268. doi:10.1111/j.1469-7610.2005.01431.x.
- Roitman, J. D., and Shadlen, M. N. (2002). Response of neurons in the lateral intraparietal area during a combined visual discrimination reaction time task. *J. Neurosci.* 22, 9475–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12417672> [Accessed May 27, 2018].
- Rojas, D. C., and Wilson, L. B. (2014). Gamma-band abnormalities as markers of autism spectrum disorders. *Biomark. Med.* 8, 353. doi:10.2217/BMM.14.15.
- Roulet, F. I., Wollaston, L., deCatanzaro, D., and 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, 514–522. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.06.069.
- Rubenstein, J.L.R & Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain Behav.* 2, 255–267. doi:10.1046/j.1601-183X.2003.00037.x.
- Rudie, J. D., Shehzad, Z., Hernandez, L. M., Colich, N. L., Bookheimer, S. Y., Iacoboni, M., et al. (2012). Reduced Functional Integration and Segregation of Distributed Neural Systems Underlying Social and Emotional Information Processing in Autism Spectrum Disorders. *Cereb. Cortex* 22, 1025–1037. doi:10.1093/cercor/bhr171.
- Rudolph, J., Zimmer, G., Steinecke, A., Barchmann, S., and Bolz, J. (2010). Ephrins guide migrating cortical interneurons in the basal telencephalon. *Cell Adh. Migr.* 4, 400–8. doi:10.4161/cam.4.3.11640.
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., and Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.* 71, 45–61. doi:10.1002/dneu.20853.
- Russo, N., Foxe, J. J., Brandwein, A. B., Altschuler, T., Gomes, H., and Molholm, S. (2010). Multisensory processing in children with autism: High-density electrical mapping of auditory-somatosensory integration. *Autism Res.* 3, 253–267. doi:10.1002/aur.152.

- Sailer, L., Duclot, F., Wang, Z., and Kabbaj, M. (2019). Consequences of prenatal exposure to valproic acid in the socially monogamous prairie voles. *Sci. Rep.* 9, 2453. doi:10.1038/s41598-019-39014-7.
- Sakai, A., Matsuda, T., Doi, H., Nagaishi, Y., Kato, K., and Nakashima, K. (2018). Ectopic neurogenesis induced by prenatal antiepileptic drug exposure augments seizure susceptibility in adult mice. *PNAS* 115 (16), 4270–4275. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.1716479115.
- Salimpoor, V. N., van den Bosch, I., Kovacevic, N., McIntosh, A. R., Dagher, A., and Zatorre, R. J. (2013). Interactions Between the Nucleus Accumbens and Auditory Cortices Predict Music Reward Value. *Science* (80-.). 340, 216–219. doi:10.1126/science.1231059.
- Samuelsson, A.-M., Jennische, E., Hansson, H.-A., and Holmäng, A. (2006). Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA_A dysregulation and impaired spatial learning. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 290, R1345–R1356. doi:10.1152/ajpregu.00268.2005.
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., and Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA* 311, 1770–7. doi:10.1001/jama.2014.4144.
- Sans, N., Ezan, J., Moreau, M. M., and Montcouquiol, M. (2016). Planar Cell Polarity Gene Mutations in Autism Spectrum Disorder, Intellectual Disabilities, and Related Deletion/Duplication Syndromes. *Neuronal Synaptic Dysfunct. Autism Spectr. Disord. Intellect. Disabil.*, 189–219. doi:10.1016/B978-0-12-800109-7.00013-3.
- Schneider, T., Przewlocki, R., and Przewlocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30, 80–89. doi:10.1038/sj.npp.13005181300518 [pii].
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., et al. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 33, 728–740. doi:S0306-4530(08)00061-9 [pii]10.1016/j.psyneuen.2008.02.011.
- Schoen, S. A., Miller, L. J., and Green, K. E. (2008). Pilot study of the sensory over-responsivity scales: Assessment and inventory. *Am. J. Occup. Ther.* 62, 393–406. doi:10.5014/ajot.62.4.393.
- Schroeder, J. C., Reim, D., Boeckers, T. M., and Schmeisser, M. J. (2015). “Genetic Animal Models for Autism Spectrum Disorder,” in *Current topics in behavioral neurosciences*, 311–324. doi:10.1007/7854_2015_407.
- Schumann, C. M., and Amaral, D. G. (2006). Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. *J Neurosci* 26, 7674–7679. doi:26/29/7674 [pii]10.1523/JNEUROSCI.1285-06.2006.
- Selby, L., Zhang, C., and Sun, Q. Q. (2007). Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurosci Lett* 412, 227–232. doi:S0304-3940(06)01202-X [pii]10.1016/j.neulet.2006.11.062.
- Shah, P., Catmur, C., and Bird, G. (2016). Emotional decision-making in autism spectrum disorder: the roles of interoception and alexithymia. *Mol. Autism* 7, 43. doi:10.1186/s13229-016-0104-x.
- Shamay-Tsoory, S. G., Tomer, R., Yaniv, S., and Aharon-Peretz, J. (2002).

- Empathy Deficits in Asperger Syndrome: a Cognitive Profile. *Neurocase* 8, 245–252. doi:10.1093/neucas/8.3.245.
- Silver, W. G., and Rapin, I. (2012). Neurobiological basis of autism. *Pediatr Clin North Am* 59, 45–61, x. doi:S0031-3955(11)00145-3 [pii]10.1016/j.pcl.2011.10.010.
- Smolders, S., Notter, T., Smolders, S. M. T., Rigo, J.-M., and Brône, B. (2018). Controversies and prospects about microglia in maternal immune activation models for neurodevelopmental disorders. *Brain. Behav. Immun.* 73, 51–65. doi:10.1016/J.BBI.2018.06.001.
- Snijders, T. M., Milivojevic, B., and Kemner, C. (2013). Atypical excitation-inhibition balance in autism captured by the gamma response to contextual modulation. *NeuroImage Clin.* 3, 65–72. doi:10.1016/j.nicl.2013.06.015.
- Sokolova, E., Oerlemans, A. M., Rommelse, N. N., Groot, P., Hartman, C. A., Glennon, J. C., et al. (2017). A causal and mediation analysis of the comorbidity between attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorder (ASD). *J. Autism Dev. Disord.* 47, 1595–1604. doi:10.1007/s10803-017-3083-7.
- Sousa, J. A. B. M. de (2013). Caracterização comportamental e distribuição de neurônios inibitórios em um modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico. Available at: <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/17029> [Accessed July 10, 2019].
- Sowers, L. P., Loo, L., Wu, Y., Campbell, E., Ulrich, J. D., Wu, S., et al. (2013). Disruption of the non-canonical Wnt gene PRICKLE2 leads to autism-like behaviors with evidence for hippocampal synaptic dysfunction. *Mol. Psychiatry* 18, 1077–1089. doi:10.1038/mp.2013.71.
- Sparks, B. F., Friedman, S. D., Shaw, D. W., Aylward, E. H., Echelard, D., Artru, A. A., et al. (2002). Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. *Neurology* 59, 184–192. doi:10.1212/WNL.59.2.184.
- Spence, S. J., and Schneider, M. T. (2009). The role of epilepsy and epileptiform eegs in autism spectrum disorders. NIH Public Access doi:10.1203/PDR.0b013e31819e7168.
- Spencer, K. M., Niznikiewicz, M. A., Shenton, M. E., and McCarley, R. W. (2008). Sensory-Evoked Gamma Oscillations in Chronic Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 63, 744–747. doi:10.1016/J.BIOPSYCH.2007.10.017.
- Ssucharewa, G. E. (1926). Die schizoiden Psychopathien im Kindesalter. (Part 1 of 2). *Eur. Neurol.* 60, 235–247. doi:10.1159/000190478.
- Stankiewicz, T. R., and Linseman, D. A. (2014). Rho family GTPases: key players in neuronal development, neuronal survival, and neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 314. doi:10.3389/fncel.2014.00314.
- Stoner, R., Chow, M. L., Boyle, M. P., Sunkin, S. M., Mouton, P. R., Roy, S., et al. (2014a). Patches of Disorganization in the Neocortex of Children with Autism. *N. Engl. J. Med.* 370, 1209–1219. doi:10.1056/NEJMoa1307491.
- Stoner, R., Chow, M. L., Boyle, M. P., Sunkin, S. M., Mouton, P. R., Roy, S., et al. (2014b). Patches of Disorganization in the Neocortex of Children with Autism. *N. Engl. J. Med.* 370, 1209–1219. doi:10.1056/NEJMoa1307491.
- Suarez, M. A. (2012). Sensory Processing in Children with Autism Spectrum Disorders and Impact on Functioning. *Pediatr. Clin. North Am.* 59, 203–

214. doi:10.1016/j.pcl.2011.10.012.
- Subramanian, M., Timmerman, C. K., Schwartz, J. L., Pham, D. L., and Meffert, M. K. (2015). Characterizing autism spectrum disorders by key biochemical pathways. *Front. Neurosci.* doi:10.3389/fnins.2015.00313.
- Suzuki, K., Matsuzaki, H., Iwata, K., Kamenno, Y., Shimmura, C., Kawai, S., et al. (2011). Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS One* 6, 1–6. doi:10.1371/journal.pone.0020470.
- Swartz, J. R., Wiggins, J. L., Carrasco, M., Lord, C., and Monk, C. S. (2013). Amygdala habituation and prefrontal functional connectivity in youth with autism spectrum disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 52, 84–93. doi:S0890-8567(12)00818-0 [pii]10.1016/j.jaac.2012.10.012.
- Szkudelska, K., and Szkudelski, T. (2010). Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur J Pharmacol* 635, 1–8. doi:S0014-2999(10)00200-1 [pii]10.1016/j.ejphar.2010.02.054.
- Takarae, Y., and Sweeney, J. (2017). Neural Hyperexcitability in Autism Spectrum Disorders. *Brain Sci.* 7 (10), 129. doi:10.3390/brainsci7100129.
- Tamás, G., Somogyi, P., and Buhl, E. H. (1998). Differentially Interconnected Networks of GABAergic Interneurons in the Visual Cortex of the Cat. *J. Neurosci.* 18, 4255–4270. doi:10.1523/jneurosci.18-11-04255.1998.
- Tammimies, K. (2019). Genetic mechanisms of regression in autism spectrum disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 102, 208–220. doi:10.1016/j.neubiorev.2019.04.022.
- Tang, B. L. (2010). Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1-A hypothesis. *Brain Res Bull* 81, 359–361. doi:S0361-9230(09)00400-6 [pii]10.1016/j.brainresbull.2009.12.007.
- Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., et al. (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* 83, 1131–43. doi:10.1016/j.neuron.2014.07.040.
- Tarapore, R. S., Siddiqui, I. A., and Mukhtar, H. (2012). Modulation of Wnt/ -catenin signaling pathway by bioactive food components. *Carcinogenesis* 33, 483–491. doi:10.1093/carcin/bgr305.
- Thirunavukkarasu, M., Penumathsa, S. V., Koneru, S., Juhasz, B., Zhan, L., Otani, H., et al. (2007). Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radic Biol Med* 43, 720–729. doi:S0891-5849(07)00318-8 [pii]10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.004.
- Toledo-Rodriguez, M., Blumenfeld, B., Wu, C., Luo, J., Attali, B., Goodman, P., et al. (2004). Correlation Maps Allow Neuronal Electrical Properties to be Predicted from Single-cell Gene Expression Profiles in Rat Neocortex. *Cereb. Cortex* 14, 1310–1327. doi:10.1093/cercor/bhh092.
- Tomchek, S. D., and Dunn, W. (2007). Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile. *Am. J. Occup. Ther.* 61, 190–200.
- Torii, M., Hashimoto-Torii, K., Levitt, P., and Rakic, P. (2009). Integration of neuronal clones in the radial cortical columns by EphA and ephrin-A signalling. *Nature* 461, 524–528. doi:10.1038/nature08362.
- Tosches, M. A. (2017). Developmental and genetic mechanisms of neural circuit evolution. *Dev. Biol.* 431, 16–25. doi:10.1016/J.YDBIO.2017.06.016.
- Tottenham, N., Hertzog, M. E., Gillespie-Lynch, K., Gilhooly, T., Millner, A. J.,

- and Casey, B. J. J. (2014). Elevated amygdala response to faces and gaze aversion in autism spectrum disorder. *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 9, 106–117. doi:10.1093/scan/nst050.
- Tremblay, R., Lee, S., and Rudy, B. (2016). GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron* 91, 260–92. doi:10.1016/j.neuron.2016.06.033.
- Tsai, P. T. (2016). Autism and cerebellar dysfunction: Evidence from animal models. *Semin. Fetal Neonatal Med.* doi:10.1016/j.siny.2016.04.009.
- Tsujino, N., Nakatani, Y., Seki, Y., Nakasato, A., Nakamura, M., Sugawara, M., et al. (2007). Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. *Neurosci Res* 57, 289–295. doi:S0168-0102(06)00291-4 [pii]10.1016/j.neures.2006.10.018.
- Tuchman, R., and Cuccaro, M. (2011). Epilepsy and autism: Neurodevelopmental perspective. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 11, 428–434. doi:10.1007/s11910-011-0195-x.
- Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D. C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., et al. (2014). Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science (80-.)*. 343, 675–679. doi:343/6171/675 [pii]10.1126/science.1247190.
- Uppal, N., Wicinski, B., Buxbaum, J. D., Heinsen, H., Schmitz, C., and Hof, P. R. (2014). Neuropathology of the anterior midcingulate cortex in young children with autism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73(9), 891–902. doi:10.1097/NEN.000000000000108.
- Van den Eynde, K., Missault, S., Fransen, E., Raeymaekers, L., Willems, R., Drinkenburg, W., et al. (2014). Hypolocomotive behaviour associated with increased microglia in a prenatal immune activation model with relevance to schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 258, 179–186. doi:10.1016/j.bbr.2013.10.005.
- Vang, O., Ahmad, N., Baile, C. A., Baur, J. A., Brown, K., Csiszar, A., et al. (2011a). What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* 6, e19881. doi:10.1371/journal.pone.0019881PONE-D-11-01755 [pii].
- Vang, O., Ahmad, N., Baile, C. A., Baur, J. A., Brown, K., Csiszar, A., et al. (2011b). What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* 6, e19881. doi:10.1371/journal.pone.0019881PONE-D-11-01755 [pii].
- Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., and Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 57, 67–81. doi:10.1002/ana.20315.
- Varghese, M., Keshav, N., Jacot-Descombes, S., Warda, T., Wicinski, B., Dickstein, D. L., et al. (2017). Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol.* doi:10.1007/s00401-017-1736-4.
- Vieira de Almeida, L. M., Pineiro, C. C., Leite, M. C., Brolese, G., Leal, R. B., Gottfried, C., et al. (2008). Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem Res* 33, 8–15. doi:10.1007/s11064-007-9399-5.
- Vijayakumar, N. T., and Judy, M. V. (2016). Autism spectrum disorders: Integration of the genome, transcriptome and the environment. *J. Neurol. Sci.* doi:10.1016/j.jns.2016.03.026.
- Volk, D. W., and Lewis, D. A. (2014). Early Developmental Disturbances of

- Cortical Inhibitory Neurons: Contribution to Cognitive Deficits in Schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 40, 952–957. doi:10.1093/schbul/sbu111.
- Volk, D. W., Matsubara, T., Li, S., Sengupta, E. J., Georgiev, D., Minabe, Y., et al. (2012). Deficits in Transcriptional Regulators of Cortical Parvalbumin Neurons in Schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 169, 1082–1091. doi:10.1176/appi.ajp.2012.12030305.
- Wang, F.-M., Hu, Z., Liu, X., Feng, J. Q., Augsburger, R. A., Gutmann, J. L., et al. (2019). Resveratrol represses tumor necrosis factor α /c-Jun N-terminal kinase signaling via autophagy in human dental pulp stem cells. *Arch. Oral Biol.* 97, 116–121. doi:10.1016/J.ARCHORALBIO.2018.10.020.
- Wang, L., Almeida, L. E. F., Nettleton, M., Khaibullina, A., Albani, S., Kamimura, S., et al. (2016). Altered nocifensive behavior in animal models of autism spectrum disorder: The role of the nicotinic cholinergic system. *Neuropharmacology* 111, 323–334. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.09.013.
- Wang, L., Liu, Y., Li, S., Long, Z.-Y., and Wu, Y.-M. (2015). Wnt signaling pathway participates in valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 578–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25755748> [Accessed July 17, 2019].
- Wang, X., Tao, J., Qiao, Y., Luo, S., Zhao, Z., Gao, Y., et al. (2018). Gastrodin Rescues Autistic-Like Phenotypes in Valproic Acid-Induced Animal Model. *Front. Neurol.* 9, 1052. doi:10.3389/fneur.2018.01052.
- Wang, Y., Dye, C. A., Sohal, V., Long, J. E., Estrada, R. C., Roztocil, T., et al. (2010a). Dlx5 and Dlx6 Regulate the Development of Parvalbumin-Expressing Cortical Interneurons. *J. Neurosci.* 30, 5334–5345. doi:10.1523/JNEUROSCI.5963-09.2010.
- Wang, Z., Xu, L., Zhu, X., Cui, W., Sun, Y., Nishijo, H., et al. (2010b). Demethylation of Specific Wnt/ β -Catenin Pathway Genes and its Upregulation in Rat Brain Induced by Prenatal Valproate Exposure. *Anat. Rec. Adv. Integr. Anat. Evol. Biol.* 293, 1947–1953. doi:10.1002/ar.21232.
- Watson, L. R., Patten, E., Baranek, G. T., Poe, M., Boyd, B. A., Freuler, A., et al. (2011). Differential Associations Between Sensory Response Patterns and Language, Social, and Communication Measures in Children With Autism or Other Developmental Disabilities. *J. Speech, Lang. Hear. Res.* 54, 1562–1576. doi:10.1044/1092-4388(2011/10-0029).
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., et al. (2010). The neuropathology of autism: Defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol.* doi:10.1007/s00401-010-0655-4.
- Whitney, E. R., Kemper, T. L., Bauman, M. L., Rosene, D. L., and Blatt, G. J. (2008). Cerebellar Purkinje Cells are Reduced in a Subpopulation of Autistic Brains: A Stereological Experiment Using Calbindin-D28k. *The Cerebellum* 7, 406–416. doi:10.1007/s12311-008-0043-y.
- Wiltse, J. (2005). Mode of action: inhibition of histone deacetylase, altering WNT-dependent gene expression, and regulation of beta-catenin--developmental effects of valproic acid. *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 727–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16417040> [Accessed July 17, 2019].
- Winden, K. D., Ebrahimi-Fakhari, D., and Sahin, M. (2018). Abnormal mTOR Activation in Autism. *Annu. Rev. Neurosci.* 41, 1–23. doi:10.1146/annurev-

- neuro-080317-061747.
- Wlodarczyk, A. I., Xu, C., Song, I., Doronin, M., Wu, Y.-W., Walker, M. C., et al. (2013). Tonic GABAA conductance decreases membrane time constant and increases EPSP-spike precision in hippocampal pyramidal neurons. *Front. Neural Circuits*. doi:10.3389/fncir.2013.00205.
- Won, H., Mah, W., and Kim, E. (2013). Autism spectrum disorder causes, mechanisms, and treatments: focus on neuronal synapses. *Front. Mol. Neurosci.* 6, 19. doi:10.3389/fnmol.2013.00019.
- Wonders, C. P., and Anderson, S. A. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 687–96. doi:10.1038/nrn1954.
- Xu, Q., Guo, L., Moore, H., Waclaw, R. R., Campbell, K., and Anderson, S. A. (2010). Sonic Hedgehog Signaling Confers Ventral Telencephalic Progenitors with Distinct Cortical Interneuron Fates. *Neuron* 65, 328–340. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.004.
- Yamashita, N., and Goshima, Y. (2012). Collapsin Response Mediator Proteins Regulate Neuronal Development and Plasticity by Switching Their Phosphorylation Status. *Mol. Neurobiol.* 45, 234–246. doi:10.1007/s12035-012-8242-4.
- Yau, J. M., DeAngelis, G. C., and Angelaki, D. E. (2015). Dissecting neural circuits for multisensory integration and crossmodal processing. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370, 20140203. doi:10.1098/rstb.2014.0203.
- Yochum, C. L., Dowling, P., Reuhl, K. R., Wagner, G. C., and Ming, X. (2008). VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice. *Brain Res.* 1203, 126–132. doi:10.1016/j.brainres.2008.01.055.
- Zald, D. H. (2003). The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. *Brain Res. Rev.* 41, 88–123. doi:10.1016/S0165-0173(02)00248-5.
- Zamin, L. L., Dillenburg-Pilla, P., Argenta-Comiran, R., Horn, A. P., Simao, F., Nassif, M., et al. (2006). Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. *Neurobiol Dis* 24, 170–182. doi:S0969-9961(06)00144-6 [pii]10.1016/j.nbd.2006.06.002.
- Zeldovich, L. (2018). How History Forgot the Woman Who Defined Autism - Scientific American. *Sci. Am.*
- Zerbo, O., Qian, Y., Yoshida, C., Grether, J. K., Van de Water, J., and Croen, L. A. (2015). Maternal Infection During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 45, 4015–4025. doi:10.1007/s10803-013-2016-3.
- Zhang, Y., Sun, Y., Wang, F., Wang, Z., Peng, Y., and Li, R. (2012). Downregulating the Canonical Wnt/ β -catenin Signaling Pathway Attenuates the Susceptibility to Autism-like Phenotypes by Decreasing Oxidative Stress. *Neurochem. Res.* 37, 1409–1419. doi:10.1007/s11064-012-0724-2.
- Zhang, Y., YANG, C., YUAN, G., WANG, Z., CUI, W., and LI, R. (2015). Sulindac attenuates valproic acid-induced oxidative stress levels in primary cultured cortical neurons and ameliorates repetitive/stereotypic-like movement disorders in Wistar rats prenatally exposed to valproic acid. *Int. J. Mol. Med.* 35, 263–270. doi:10.3892/ijmm.2014.1996.
- Zhou, Y., Sharma, J., Ke, Q., Landman, R., Yuan, J., Chen, H., et al. (2019). Atypical behaviour and connectivity in SHANK3-mutant macaques. *Nature*

570, 326–331. doi:10.1038/s41586-019-1278-0.

Zhu, F., Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, X., and Zhao, J. (2014). Minocycline alleviates behavioral deficits and inhibits microglial activation in the offspring of pregnant mice after administration of polyriboinosinic–polyribocytidilic acid. *Psychiatry Res.* 219, 680–686. doi:10.1016/j.psychres.2014.06.046.

Zikopoulos, B., and Barbas, H. (2013). Altered neural connectivity in excitatory and inhibitory cortical circuits in autism. *Front. Hum. Neurosci.* 7, 609. doi:10.3389/fnhum.2013.00609.

**GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 160477

Data de Aprovação do Projeto: 08/03/2017

Título: ANÁLISE ELETROFISIOLÓGICA E MORFOFUNCIONAL DA ÁREA SOMATOSSENSORIAL NO MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPRÓICO

Data de Término: 01/10/2019

Pesquisador Responsável: RUDIMAR DOS SANTOS RIESSO

Equipe de pesquisa:

CARMEM GOTTFRIED	FRANCINE DALPIAN	GUILHERME BAUER NEGRINI	IOHANNA DECKMANN
MARIA ELISA CALCAGNOTTO	MAURO MOZAEEL HIRSCH	MAYARA VENDRAMIN PASQUETTI	MELLANIE FONTES DUTRA DA SILVA
VICTORIO BAMBINI JUNIOR			

Submissão	Documento	Especie/Linhagem	Sexo/Idade	Qtd.	Data Reunião	Situação
17/09/2016	APROVAÇÃO	RATO - WISTAR	M/45-60dias	10		
		RATO - WISTAR	F/45-60dias	64		
		RATO - WISTAR	-neonatos	136	21/02/2017	APROVADO
Total de Animais:				210		


 Coordenador
 Comissão de Ética no Uso de Animais

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

7. ANEXOS

7.1. Carta de aprovação ao CEUA (HCPA: 2016-0477)