

Guilherme Bauer Negrini^{1, 3}, Victorio Bambini-Junior^{1,4}, Diego Baronio^{1, 2, 3}, Kamila Castro^{1, 3}, Gustavo Della Flora Nunes^{1,3}, Rudimar Riesgo^{1, 2, 3, 5}, Daniella Arêas Mendes-da-Cruz⁴, Wilson Savino⁴, Carmem Gottfried^{1, 3}.

¹Grupo de Estudos Translacionais em Transtorno do Espectro do Autismo (GETTEA). ²Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); ³Grupo de Pesquisa em Plasticidade Neuroglial – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). ⁴Laboratório de Pesquisa sobre o Timo - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz Foundation. ⁵Unidade de Neuropediatria, Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Introdução

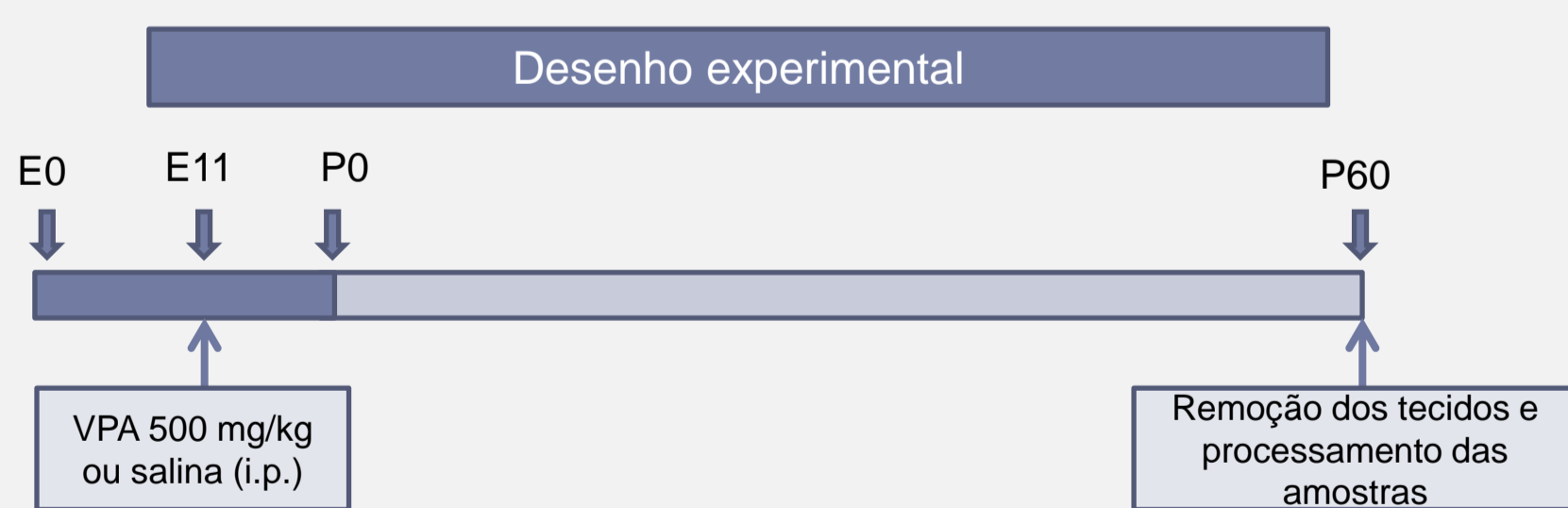
O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por déficits na comunicação e na interação social e presença de comportamentos repetitivos e interesses/atividades restritas [1]. A etiologia do TEA permanece desconhecida, embora em seu desencadeamento esteja explícita a complexa interação entre fatores genéticos e fatores de risco ambientais, como, por exemplo, o ácido valpróico (VPA) [2]. A exposição pré-natal ao VPA em murinos leva a comportamentos similares ao autismo na prole, tais como déficits na interação social e comportamentos repetitivos/estereotipados [3]. Diversas alterações imunológicas podem ser observadas em indivíduos com TEA, tais como perfil de citocinas pró-inflamatórias elevado no soro, aumento de ativação de linfócitos T, número elevado de monócitos circulantes e ativação de macrófagos periféricos e microglia [4,5]. Alterações imunológicas, tais como atrofia do timo e aumento dos níveis de mRNA de citocinas pró-inflamatórias, já foram descritas nesse modelo animal [6], entretanto, dados sobre a imunidade mediada por células ainda são escassos.

Objetivos

O presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil fenotípico de linfócitos em órgãos linfóides do modelo animal de TEA induzido por VPA.

Materiais e métodos

Camundongas prenhes receberam uma única injeção intraperitoneal de ácido valpróico (500 mg/kg – grupo VPA) ou solução salina (grupo controle) no 11º dia de gestação. Os animais machos da prole foram anestesiados e exsanguinados aos 60 dias para a remoção de timo, baço e pool de linfonodos inguinais, axilares e braquiais. Os tecidos foram individualmente pesados, dissociados, lavados, centrifugados e ressuspensos em tampão PBS para subsequente avaliação da celularidade em câmara de Neubauer e incubação com os anticorpos anti-CD3-FITC (1:50), anti-CD4-PE (1:50) e anti-CD8-PE-Cy7 (1:100) para análise em citometria de fluxo. Tais anticorpos têm como alvo moléculas de superfície comum aos linfócitos T (CD3) e expressas por subtipos diferentes de linfócitos T, como T auxiliar (CD4) e T citotóxico (CD8). Os resultados foram comparados através do teste-t de Student e expressos em média ± erro padrão da média. Valor de $p \leq 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.



Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (nº de projeto: 12-0433).

Referências

- [1] Am Psych Assoc (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th Ed.)
- [2] Fombonne E. 2009, *Pediatr. Res.* 65, 591-598;
- [3] Rouillet et al, 2013, *Neurotoxicol Teratol*, Mar-Apr;36:47-56.
- [4] Ashwood et al, 2011, *Behav. Immun*, vol.25, pp 40-45.
- [5] Sweeten et al, 2003, *Am. J. Psychiatry*, vol. 160, pp 1691-1693.
- [6] Schneider et al, 2008; *Psychoneuroendocrinolgy*; 33 (6)
- [7] Lucchina et al., 2014, *Autism Res*; 7(2):273-89.
- [8] Han et al., 2011. *Res in ASD*, Vol 5, 1, 486-494.
- [9] Smith et al., 2009. DOI: 10.1007/978-0-387-84851-8.

Apoio



Resultados e Discussão

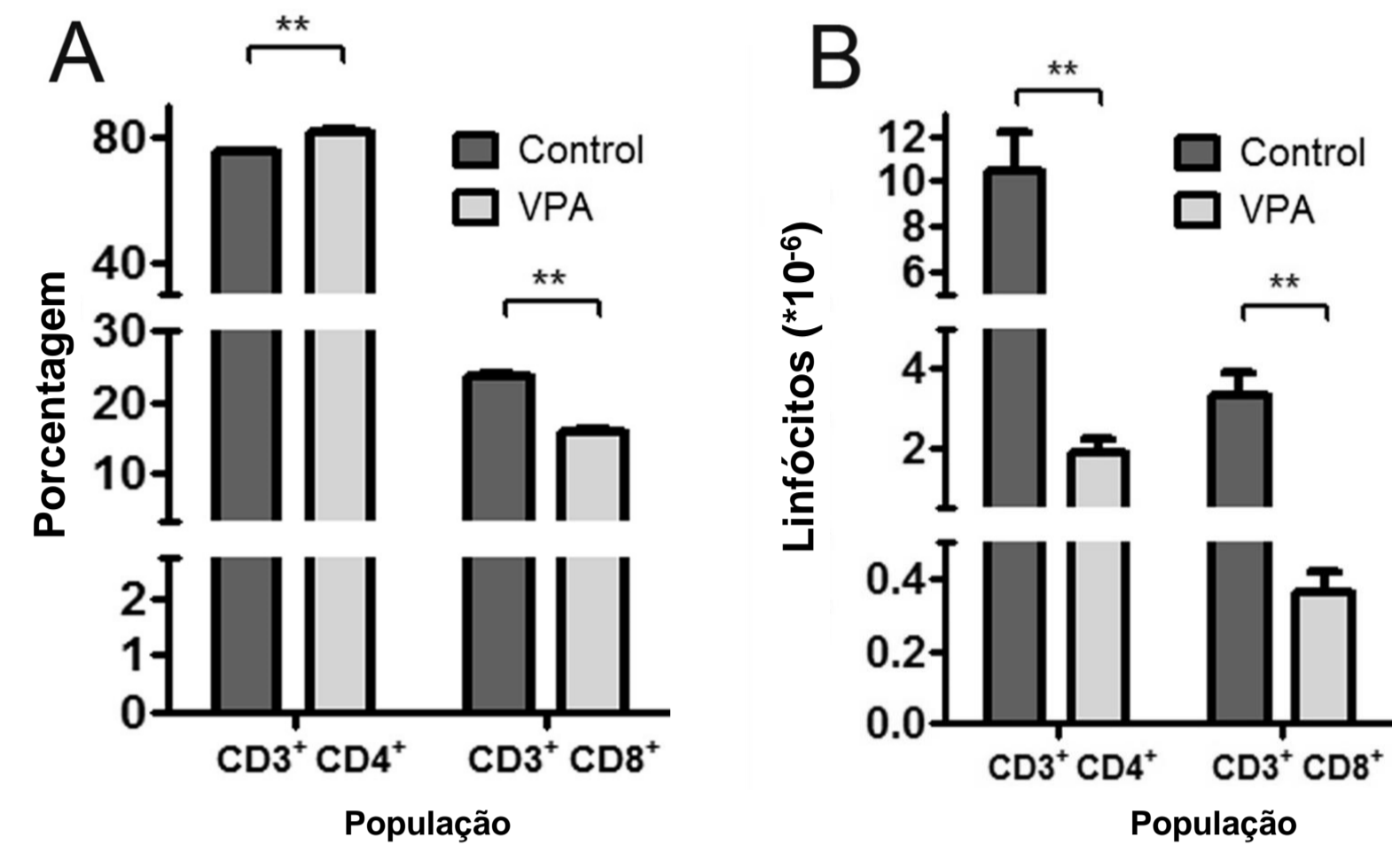


Figura 1: Alterações qualitativas e quantitativas nas células dos linfonodos de camundongos do modelo VPA. Observa-se diminuição da celularidade e número de células T CD3+. ** $p < 0,01$.

	Linfócitos (*10 ⁻⁶)		Linfócitos (*10 ⁻⁸) /g de tecido		Peso relativo (g tecido/g animal)	
	Controle	VPA	Controle	VPA	Controle	VPA
Timo	67.43 ± 12.23	64.68 ± 12.99	11 ± 2.17	13.85 ± 0.13	0.18 ± 0.019	0.14 ± 0.013
Baço	82.71 ± 11.81	106.67 ± 35.85	9.46 ± 1.25	14.4 ± 5.08	0.24 ± 0.009	0.21 ± 0.013
Linfonodo	23.16 ± 4.53	4.9 ± 0.83**	3.31 ± 0.88	0.63 ± 0.13*	0.22 ± 0.02	0.2 ± 0.006

Tabela 1: Quantidade relativa e absoluta de linfócitos e peso relativo de diferentes órgãos linfóides de camundongos controle e VPA.

		Timo		Baço	
		Linfócitos (*10 ⁻⁶)	Porcentagem	Linfócitos (*10 ⁻⁶)	Porcentagem
CD4 ⁺	Controle	7.88 ± 1.12	14.78 ± 1.14	7.74 ± 1.61	28.82 ± 1.74
	VPA	5.41 ± 1.21	10.04 ± 0.82*	7.44 ± 2.14	22.44 ± 2.02
CD8 ⁺	Controle	1.61 ± 0.20	3.11 ± 0.41	2.71 ± 0.54	10.15 ± 0.63
	VPA	1.13 ± 0.26	2.08 ± 0.12	2.48 ± 0.83	7.03 ± 0.38**
DN	Controle	1.27 ± 0.23	2.33 ± 0.11	-	-
	VPA	2.07 ± 0.39	4.01 ± 0.29**	-	-
DP	Controle	46.17 ± 10.74	80.61 ± 2.21	-	-
	VPA	43.47 ± 8.94	83.87 ± 1.05	-	-

Tabela 2: Análise quantitativa e qualitativa de populações linfócitos no timo e baço de camundongos controle e VPA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

No presente estudo não foram encontrados diferenças de peso relativo entre os grupos nos órgãos linfóides analisados. No timo, não foi encontrado sinal de involução, pois não houve diferença de peso, celularidade e número de timócitos (Tabela 1). Entretanto, o percentual de células CD4⁺ foi menor no timo dos animais do grupo VPA (Tabela 2).

Nos linfonodos, o número de linfócitos reduziu drasticamente no grupo VPA (Tabela 1). Houve uma redução no número de células CD3⁺ (células T maduras). A análise dos subtipos dessas células revelou um redução no percentual de células CD8⁺ e maior porcentagem de células CD3⁺ CD4⁺ do grupo VPA (Figura 1). No baço, foi observada uma diminuição de 30% de células CD8⁺ no grupo VPA (Tabela 2).

Evidências sugerem que alterações em populações de linfócitos T estão relacionadas com prejuízos em funções executivas e comportamentos estereotipados no TEA [7]. Além disso, diminuição de células CD4⁺ está relacionada a prejuízos motores, ansiedade e comportamentos similares a depressão [8]. Por fim, sabe-se que alterações decorrentes de ativação imune materna promovem alterações no neurodesenvolvimento e no comportamento, evidenciando o papel do sistema imunológico em alterações comportamentais [9].

Conclusões

O presente estudo observou, pela primeira vez, a redução de células T em linfonodos de camundongos do modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA. Tal observação corrobora com os relatos de diminuição de proliferação e ativação frente a um estímulo de linfócitos de pacientes com TEA e ajuda a estabelecer a natureza neuroimune desse transtorno. Estudos adicionais são necessários para caracterizar o perfil imunológico do TEA e sua conexão com a etiologia do transtorno.