



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Guilherme Bauer Negrini

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE CÉLULAS T EM ÓRGÃOS
LINFOIDES DE CAMUNDONGOS DO MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO
POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁCIDO VALPROICO**

Porto Alegre

2015

Guilherme Bauer Negrini

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE CÉLULAS T EM ÓRGÃOS
LINFOIDES DE CAMUNDONGOS DO MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO
POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁCIDO VALPROICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Biomedicina apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de habilitação: Imunologia.

Orientador: Dr. Victorio Bambini Júnior

Co-orientadora: Dr^a. Carmem Gottfried

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Negrini, Guilherme Bauer

Avaliação quantitativa e qualitativa de células T em órgãos linfoides de camundongos do modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico / Guilherme Bauer Negrini. -- 2015. 46 f.

Orientador: Victorio Bambini Junior.

Coorientadora: Carmem Juracy Silveira Gottfried.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Transtorno do Espectro do Autismo. 2. Modelo animal. 3. Órgãos linfoides. I. Bambini Junior, Victorio, orient. II. Gottfried, Carmem Juracy Silveira, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Guilherme Bauer Negrini

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE CÉLULAS T EM ÓRGÃOS
LINFOIDES DE CAMUNDONGOS DO MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO
POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁCIDO VALPROICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação em Biomedicina apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Marcelo Lazzaron Lamers
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Patricia Luciana da Costa Lopez
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Victorio Bambini Júnior
Instituto Oswaldo Cruz

*“Em um lugar escuro nos encontramos,
e um pouco mais de conhecimento ilumina nosso caminho.”*

Mestre Yoda.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus orientadores ao longo da maior parte do curso. Carmem, obrigado por ter me aceitado no PNG e por fazer desse o grupo de pesquisa mais unido que conheço. Ao Victorio, agradeço por ter aceitado ser meu orientador no TCC. Fico feliz de ter sido teu primeiro aluno orientado e de fazer parte de mais uma etapa da tua trajetória acadêmica.

Agradeço aos meus pais Ismael e Marilene, aos quais devo absolutamente tudo. Obrigado pelo apoio, pela paciência e pelo amor. É por vocês que eu dou o melhor de mim.

Agradeço aos “colegas” Maurício, Fran, Thainá, Hegger e Yasmine por serem as companhias mais divertidas durante esses 4 anos de Biomedicina.

Agradeço aos colegas de PNG que sempre me ajudaram e compreenderam os momentos que precisei me afastar das tarefas do laboratório para escrever.

Agradeço aos amigos, em especial ao Zeca, Thomas e Lucas, pela parceria de todos os momentos.

Agradeço ao Marco e a Eliane por serem companhias tão leves e doces.

Agradeço a Luísa pelo amor e por compartilhar sonhos comigo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	24
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. O Transtorno do Espectro do Autismo	13
1.2. Dados epidemiológicos	14
1.3. O modelo animal de TEA baseado na exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA).....	15
1.4. Sistema imunológico e órgãos linfoides	17
1.4.1. Organização do sistema imunológico	17
1.4.2. Organização dos órgãos linfoides.....	18
1.5. Relação entre o sistema imunológico e o TEA.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivos gerais.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO	24
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	37
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	45
Anexo 1 – Normas do periódico Neuroimmunomodulation.....	45

Lista de abreviaturas em português

EUA: Estados Unidos da América.

MHC: complexo principal de histocompatibilidade.

TCR: receptor de linfócito T.

TEA: Transtorno do Espectro do Autismo.

VPA: ácido valproico.

Lista de abreviaturas em inglês

ADDM: Autism and Developmental Disabilities Monitoring.

ASD: Autism Spectrum Disorder.

CDC: Centers for Disease Control and Prevention.

HDAC: histone deacetylase.

sAPP- α : soluble amyloid precursor protein α .

Lista de figuras

Figura 1 – Interações entre sistema imunológico e sistema nervoso central no TEA.
.....21

Lista de tabelas.

Tabela 1 – Dados de prevalência de TEA nos Estados Unidos da América..... 14

Tabela 2 – Alterações comportamentais comuns a modelos animais e pacientes com TEA..... 16

Tabela 3 – Alterações associadas ao diagnóstico de TEA comuns a modelos animais e pacientes..... 17

RESUMO

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) representa um grupo de desordens do neurodesenvolvimento, caracterizado por déficits na comunicação e na interação social e comportamentos repetitivos e interesses/atividades restritas. Dados epidemiológicos indicam que fatores ambientais, como a exposição materna ao ácido valpróico (VPA), aumentam o risco do nascimento de filhos com TEA. Embora a etiologia do transtorno seja desconhecida e os comportamentos observados advenham de alterações no sistema nervoso central, uma das hipóteses mais recentes para o desenvolvimento e fisiopatologia do transtorno, envolve componentes do sistema imunológico. Considerando a possível contribuição dos linfócitos para a patofisiologia do TEA nós buscamos avaliar o perfil fenotípico de linfócitos em órgãos linfóides de camundongos do modelo animal de TEA induzido por VPA. Camundongas prenhes receberam uma única injeção intraperitoneal de VPA (600 mg/kg) ou solução salina no 11º dia de gestação. Os machos da prole foram posteriormente eutanasiados aos 60 dias de idade para remoção do timo, baço e *pool* de linfonodos inguinais, axilares e braquiais. A celularidade dos órgãos foi avaliada em câmara de Neubauer e a análise por citometria de fluxo foi realizada com suspensões das células incubadas com anticorpos anti-CD3-FITC, anti-CD4-PE e anti-CD8-PE-Cy7. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação ao peso dos órgãos. Nos linfonodos foram encontradas reduções das populações CD3⁺ CD4⁺ e CD3⁺ CD8⁺ nos animais do grupo VPA, assim como redução do percentual de células CD4⁺ e aumento do percentual de células CD8⁺. Além disso, também foram encontradas pequenas alterações em relação a proporção dessas células no timo e baço dos camundongos VPA. No presente estudo fizemos a observação inédita da redução drástica de linfócitos T nos linfonodos de camundongos do modelo animal de TEA induzido por exposição pré-natal ao VPA. Entretanto, mais estudos são necessários para caracterizar o perfil imunológico do transtorno e seu possível papel no desencadeamento do TEA.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Transtorno do Espectro do Autismo

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) representa um grupo de distúrbios do neurodesenvolvimento, caracterizado por 1) déficits na comunicação e na interação social e 2) comportamentos repetitivos e interesses/atividades restritas (American Psychiatric Association, 2013). Embora possam variar de intensidade, ambas as características são presentes durante toda a vida (Rapin & Tuchman, 2008).

O termo autismo é derivado do grego *autos*, que significa si próprio, e foi utilizado pela primeira vez em 1911 pelo psiquiatra suíço Paul Eugen Bleuler como uma das características necessárias para diagnosticar pessoas com esquizofrenia, outro termo também cunhado pelo mesmo (Kuhn, 2004). Os primeiros usos do termo autismo para descrever um transtorno separado da esquizofrenia foram feitos de maneira independente e praticamente simultâneos: em 1938 por Hans Asperger, em uma palestra no Hospital Universitário de Viena, seguida de uma publicação em 1944, descrevendo características de “autistas psicopatas” em seus estudos de caso (Lyons & Fitzgerald, 2007); e em 1943 por Leo Kanner, em Baltimore nos Estados Unidos da América, para definir um grupo de onze crianças com diminuída capacidade de estabelecer contato interpessoal e afetivo (Kanner, 1968).

A etiologia do TEA permanece desconhecida, embora seja evidente a interação complexa de fatores genéticos e fatores de risco ambientais. Por se tratar de uma distúrbio altamente heterogênea e multifatorial (Gottfried & Bambini-Junior, 2013), além das duas características anteriormente citadas necessárias para o diagnóstico, existem diversas características adicionais associadas, como atrasos de linguagem, incapacidade de interpretar emoções a partir de expressões faciais (Sepeta et al., 2012), maior circunferência e volume cerebral quando jovens (Casanova, 2007; Rapin & Tuchman, 2008; Skoyles, 2008) e alterações no sistema imunológico (Onore, Careaga, & Ashwood, 2012b), tais como aumento de citocinas pró-inflamatórias e aumento na ativação de linfócitos T (Ashwood, Krakowiak, et al., 2011b). De fato, o transtorno pode se apresentar com manifestações tão distintas

que dificilmente dois indivíduos compartilhem o mesmo conjunto de sintomas e comorbidades (Gadia, Tuchman, & Rotta, 2004).

1.2. Dados epidemiológicos

Os primeiros estudos epidemiológicos relacionados ao TEA foram conduzidos no final dos anos da década de 1960 e início da década de 1970, nos quais a prevalência estimada em estudos europeus foi de 1 a cada 2500 indivíduos na população (Gillberg & Wing, 1999). No ano de 2000, o órgão Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (em inglês, *Centers for Disease Control and Prevention – CDC*), criou a rede *Autism and Developmental Disabilities Monitoring (ADDM)* para coletar dados e estimar a prevalência de TEA nos EUA. As primeiras estimativas, referentes aos anos de 2000 e 2002 foram de aproximadamente 1 a cada 150 crianças de até 8 anos de idade acometida pelo transtorno. Desde então a prevalência vem aumentando nos EUA (*Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*., 2014), conforme mostrado na tabela abaixo.

Tabela 1 – Dados de prevalência de TEA nos Estados Unidos da América.

Ano de monitoramento	Ano de nascimento	Prevalência (1 a cada 'x' crianças)
2000	1992	1:150
2002	1994	1:150
2004	1996	1:125
2006	1998	1:110
2008	2000	1:88
2010	2002	1:68

Fonte: adaptado de CDC – *Autism Spectrum Disorders: Data & Statistics*.

A elevação na prevalência se deve, em parte, à mudanças nos critérios de diagnóstico e maior conscientização sobre o TEA, entretanto, esses fatos não explicariam por completo o aumento observado (Fombonne, 2009). Estudos epidemiológicos e com modelos animais indicam que fatores ambientais podem ser responsáveis pelos aumentos na incidência do TEA (Christensen et al., 2013; Fombonne, 2009). Tais estudos têm evidenciado que condições ambientais adversas durante o período gestacional, como exposição materna a teratógenos (ex. ácido valpróico e talidomida) ou a ativação imune materna (por infecções virais ou

bacterianas) podem aumentar o risco de autismo na prole (Arndt, Stodgell, & Rodier, 2005; Dufour-Rainfray et al., 2011). Baseados nessas observações, foram propostos diferentes modelos animais de TEA induzidos geneticamente, por lesão, por ativação imune materna durante a gestação e farmacologicamente (Blundell et al., 2009; Murcia, Gulden, & Herrup, 2005; Rodier, Ingram, Tisdale, & Croog, 1997).

1.3. O modelo animal de TEA baseado na exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA)

Conforme mencionado anteriormente, observações feitas a partir de estudos epidemiológicos evidenciaram o envolvimento de teratógenos como fatores de risco ambientais possivelmente relacionados ao desencadeamento do autismo (Arndt et al., 2005). Entre os teratógenos, destaca-se o VPA, um anticonvulsivante e estabilizador de humor, cuja administração durante a gestação está associada à malformações congênitas, atrasos no desenvolvimento, prejuízo cognitivo e maior risco de TEA na prole (Florence I Rouillet, Lai, & Foster, 2013). Um estudo populacional realizado com todos os nascidos vivos entre 1996 e 2006 na Dinamarca associou o uso de ácido valproico durante a gestação com o aumento significativo do risco de desenvolvimento de TEA nos filhos, mostrando de forma contundente o papel desse fator ambiental na epidemiologia do transtorno (Christensen et al., 2013).

Idealmente, modelos animais confiáveis devem apresentar três características principais (Crawley, 2008): validade de construto, ou seja, o animal reproduz uma circunstância que, em humanos, leva a determinada condição; validade de face, relacionada a habilidade do modelo de reproduzir padrões encontrados na condição estudada; e validade preditiva, a qual se refere a similaridade de reações e respostas fisiológicas entre o modelo e o ser humano quando expostos a condições correspondentes (por exemplo, um tratamento farmacológico).

Em 1997, após observar redução no número de neurônios motores em nervos craneanos e anormalidades no cerebelo de ratos expostos pré-natalmente ao VPA, Patricia Rodier sugeriu que tal exposição poderia resultar em um modelo animal de autismo (Rodier et al., 1997). Apenas em 2005 foram relatadas as alterações

comportamentais no modelo, como diminuição da sociabilidade, estereotipias e diminuição da atividade exploratória (Schneider & Przewłocki, 2005).

O modelo animal de TEA induzido por VPA, portanto, satisfaz o critério de validade de construto ao se basear na utilização de um fator de risco conhecido para o desencadeamento de TEA em humanos como agente indutor das características do tipo-autista em roedores (Bromley et al., 2013). Em relação a validade de face, testes comportamentais demonstram alterações comportamentais correspondentes tanto aos déficits sociais quanto a presença de estereotipias nos roedores expostos pré-natalmente ao VPA (Bambini-Junior et al., 2011; F I Rouillet, Wollaston, Decatanzaro, & Foster, 2010).

A tabela 2 lista as principais alterações comportamentais, as quais são necessárias para o diagnóstico de TEA, similares entre roedores do modelo animal de TEA e pacientes com o transtorno.

Tabela 2 – Alterações comportamentais comuns a modelos animais e pacientes com TEA.

Publicação	Alterações comportamentais em modelos animais de TEA
(Schneider & Przewłocki, 2005)	Diminuição da sociabilidade.
(Tsujino et al., 2007)	Alterações no ciclo sono-vigília.
(Schneider et al., 2008)	Aumento de padrões comportamentais estereotipados.
(Bambini-Junior et al., 2011)	Rigidez comportamental.

Além de alterações comportamentais, muitas alterações morfológicas e neuroquímicas são encontradas no modelo animal em sistemas conhecidamente afetados em seres humanos com TEA. Na tabela 3 estão listados os principais relatos nesse contexto.

Tabela 3 – Alterações associadas ao diagnóstico de TEA comuns a modelos animais e pacientes.

Publicação	Alterações em modelos animais de TEA
(Rodier et al., 1997)	Mudanças na forma, número e volume das células de Purkinje no cerebelo.
(Miyazaki, Narita, & Narita, 2005)	Alterações na migração e maturação de neurônios serotoninérgicos.
(Gogolla et al., 2009)	Redução de neurônios inibitórios no córtex.
(Banji et al., 2011)	Elevação de marcadores de estresse oxidativo.
(Lucchina & Depino, 2013)	Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias.

1.4. Sistema imunológico e órgãos linfoides

1.4.1. Organização do sistema imunológico

O sistema imunológico é composto por uma rede de interações entre órgãos linfoides, células, fatores humorais e citocinas, tendo como principal função a proteção contra substâncias estranhas, microorganismos, patógenos e parasitas (Kierszembbaum, 2004). A imunidade pode ser dividida de forma geral em duas classificações, inata/natural e adaptativa/adquirida. A imunidade inata é o mecanismo mais simples e conservado na evolução, constituindo uma resposta rápida e sem necessidade de exposição prévia ao patógeno. É composta pela barreira epitelial, células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos), células *natural killer* (NK), proteínas do sistema complemento e citocinas. A imunidade adaptativa é caracterizada por reações antígeno específicas envolvendo receptores de células T e B, e é uma resposta mais demorada em comparação à imunidade inata, porém mais específica e com produção de memória imunológica (Parkin & Cohen, 2001). A imunidade adaptativa pode ainda ser dividida em imunidade humoral, mediada por anticorpos secretados por plasmócitos (linfócitos B diferenciados), promovendo a ação fagocitária de macrófagos e recrutamento de granulócitos; e imunidade celular, que envolve a captação do patógeno por uma célula fagocitária e apresentação de antígenos para os linfócitos T, cujo reconhecimento é feito pelo receptor de linfócito T (TCR).

As células apresentadoras de antígeno internalizam possíveis patógenos e os fragmentam em peptídeos antigênicos que serão expostos por moléculas de superfície, denominadas de complexo principal de histocompatibilidade (MHC ou HLA – antígenos leucocitários de humanos – em humanos), para reconhecimento pelo TCR dos linfócitos T. Existem dois tipos de MHC, variando na estrutura das cadeias polipeptídicas que os constituem: MHC de classe I, expressado por todas as células nucleadas; MHC de classe II, expresso pelas células apresentadoras de antígeno, células reticuloepiteliais do timo e células endoteliais (Kierszembraum, 2004).

Além do TCR, existem outras proteínas que atuam no reconhecimento do MHC, chamadas de co-receptores, com função de estabilizar a ligação das células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T. As moléculas CD4 e CD8 estão presentes na superfície das células T e fazem parte, respectivamente, da sinalização de linfócitos T auxiliares CD4+ e linfócitos T citotóxicos CD8+ no reconhecimento de antígenos associados ao MHC de classe II e de classe I (Kierszembraum, 2004).

1.4.2. Organização dos órgãos linfoides

Os órgãos linfoides podem ser classificados em primários e secundários. Órgãos linfoides primários são os locais onde acontece o desenvolvimento de células precursoras em linfócitos maduros, como a medula óssea, local de origem e diferenciação inicial dos linfócitos; e o timo, onde os timócitos se diferenciam em linfócitos T maduros. Órgãos linfoides secundários são locais onde os linfócitos interagem entre si ou com outras células para gerar respostas contra antígenos, como o baço e os linfonodos (Kipps, 2010).

O timo está localizado no mediastino superior e é dividido por uma fissura em dois lóbulos principais assimétricos, cada um consistindo em vários lóbulos incompletos. Cada lóbulo possui uma região cortical, externa, e uma região medular, interna. Os progenitores de linfócitos T produzidos na medula óssea chegam ao timo para se tornarem linfócitos T imunocompetentes CD4+ ou CD8+ (Kierszembraum, 2004). Essa maturação começa na parte mais externa do córtex, onde os timócitos duplo-negativos para CD4 e CD8 iniciam sua proliferação e reorganização gênica para expressão de um pré-TCR e dos co-receptores. Na parte mais interna do córtex os timócitos em amadurecimento são duplo-positivos e é onde acontece o processo de seleção positiva: apenas os timócitos capazes de

realizar uma ligação entre o TCR e o MHC próprio continuarão o desenvolvimento. Durante a migração dos timócitos duplo-positivos em direção a medula ocorre o processo de seleção negativa: apenas aqueles timócitos que não se ligam com alta afinidade ao MHC próprio sobreviverão (Kipps, 2010). Os timócitos selecionados entram na medula do timo onde amadurecem em linfócitos T simple-positivos para CD4 ou CD8 e eventualmente saem do timo em direção aos órgãos linfoides periféricos. Cerca de 95% dos timócitos morrem dentro do córtex do timo sem nunca terem amadurecido (Kierszembraum, 2004).

O baço está localizado no quadrante superior esquerdo do peritônio e é o maior órgão linfoide secundário do organismo. Possui dois componentes principais: a polpa vermelha, que atua como um filtro do sangue ao remover hemácias envelhecidas e microorganismos através dos macrófagos residentes; e a polpa branca, o componente imunológico do baço, formada por nódulos esplênicos com linfócitos T e B, células apresentadoras de antígeno e plasmócitos (Kierszembraum, 2004).

Os linfonodos são uma rede de órgãos linfoides secundários associados aos vasos linfáticos e responsáveis por filtrar antígenos do interstício e da linfa. Conforme o fluxo da linfa através dos vasos, células fagocitárias internalizam antígenos e os transportam para o interior dos linfonodos, onde são apresentados aos linfócitos T através do MHC (Kipps, 2010). A resposta imunológica é dependente da interação entre linfócitos T e linfócitos B, os quais proliferam e se diferenciam em plasmócitos secretores de imunoglobulinas (Kierszembraum, 2004).

1.5. Relação entre o sistema imunológico e o TEA

Embora a etiologia do TEA seja desconhecida e os comportamentos observados advenham de alterações no sistema nervoso central, uma das hipóteses mais recentes para o desenvolvimento e fisiopatologia do transtorno, envolve componentes do sistema imunológico (Gesundheit et al., 2013). Estudos epidemiológicos relacionam a ativação do sistema imunológico materno durante a gestação com o aumento do risco de TEA na prole (Atladóttir et al., 2010). 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 (Ashwood, Krakowiak, et al., 2011b), número elevado de monócitos circulantes (Sweeten, Posey, & McDougle, 2003) e ativação de macrófagos periféricos e microglia (Morgan et al., 2010; Vargas, Nascimbene, Krishnan, Zimmerman, & Pardo, 2005). Tais disfunções do sistema imunológico podem ser responsáveis por alterações neuronais e comportamentais encontradas no TEA (Liblau, Gonzalez-Dunia, Wiendl, & Zipp, 2013).

Além disso, indivíduos com TEA podem apresentar anormalidades linfocitárias, como redução da proporção e quantidade de células T CD4+ e total de linfócitos (Yonk et al., 1990). Outro estudo relata produção alterada de citocinas e diminuição na expressão de marcadores de ativação em linfócitos de crianças com TEA após estimulação com fitohemaglutinina (Ashwood, Krakowiak, et al., 2011a). Embora não existam relatos de infiltração de linfócitos no sistema nervoso central de pacientes com TEA, existe a possibilidade que isso ocorra durante a gravidez ou no início do desenvolvimento pós-natal (Gesundheit et al., 2013). Existem, no entanto, relatos de infiltração linfocitária no trato gastrointestinal de pacientes, com números elevados de células T CD4+ e T CD8+, assim como aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias por essas células (Ashwood et al., 2003).

A interação entre o sistema imunológico e o sistema nervoso central é complexa, podendo envolver secreção de citocinas, anticorpos, sistema complemento e migração celular (Onore, Careaga, & Ashwood, 2012a). A Figura 1 ilustra possíveis mecanismos envolvidos no TEA, como, por exemplo: níveis elevados das citocinas TNF- α , IL-1 β podem inibir a neurogênese e aumentar a morte celular; IL-6, principal citocina pró-inflamatória relacionada ao transtorno, pode promover o crescimento e proliferação de neurônios e oligodendrócitos; moléculas do sistema complemento podem opsonizar sinapses e promover a fagocitação pela microglia; ativação microglial pode promover a poda sináptica. Tais disfunções imunológicas poderiam resultar em um fenótipo comportamental observado no TEA.

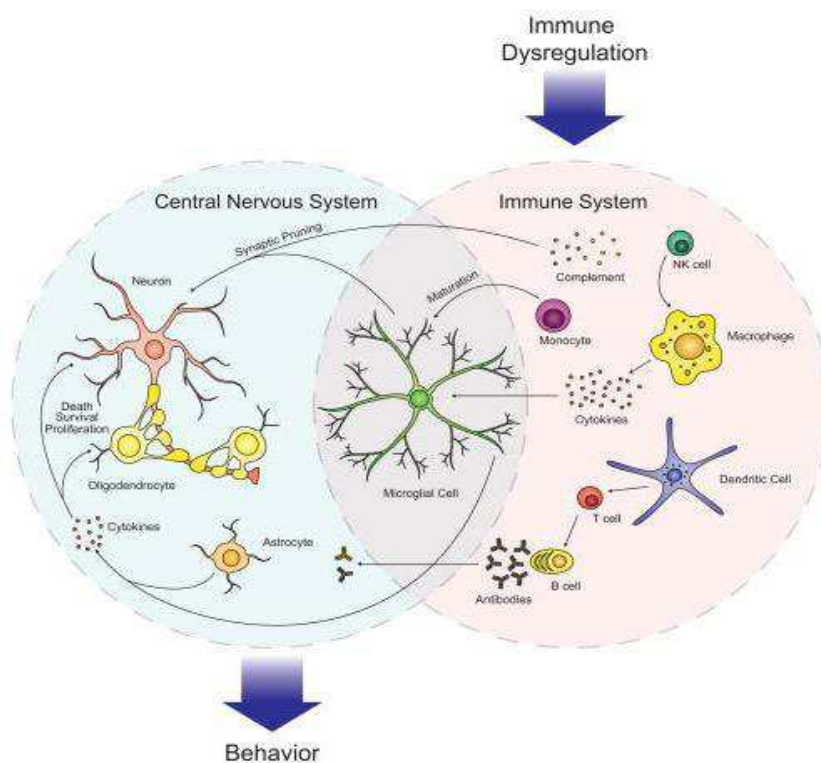


Figura 1 – Interações entre sistema imunológico e sistema nervoso central no TEA. Moléculas do sistema imunológico, tais como citocinas, anticorpos e sistema complemento, podem atravessar a barreira hematoencefálica e provocar alterações no sistema nervoso central.

Fonte: (Onore et al., 2012a)

2. JUSTIFICATIVA

Levando em conta as dificuldades de realização de estudos com amostras biológicas de pacientes com TEA que não sejam sangue, o modelo animal de autismo induzido por VPA torna-se um interessante método de estudo do sistema imunológico e suas possíveis alterações no transtorno. Nosso grupo investiga o modelo animal de autismo induzido por VPA desde 2008, conduzindo avaliações comportamentais e análises moleculares sob uma perspectiva translacional de estudo do TEA e é nesse contexto que fica clara a necessidade da avaliação de células T em órgãos linfoides de camundongos do modelo animal de autismo e suas possíveis implicações na etiologia desse transtorno.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar qualitativa e quantitativamente o perfil fenotípico de linfócitos em órgãos linfóides de camundongos do modelo animal de TEA induzido por VPA.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a celularidade total e as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ em timo, baço e *pool* de linfonodos subcutâneos de camundongos do modelo animal de autismo induzido por VPA.

4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

(Formatado de acordo com as regras do periódico Neuroimmunomodulation, disponível no Anexo 1).

Prenatal exposure to valproic acid triggers quantitative and qualitative alterations in T cells of murine lymphoid organs – implications to autism

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

1. Translational Research Group in Autism Spectrum Disorders (GETTEA)
2. Postgraduate Program in Child and Adolescent Health, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
3. Research Group in Neuroglial Plasticity, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
4. Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil
5. Child Neurology Unit, Clinical Hospital of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Key-words: ASD, T cells, lymphoid organs, neuroimmune.

CORRESPONDENCE ADDRESS:

Guilherme Bauer Negrini
Departamento de Bioquímica
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo
90035-003 – Porto Alegre, RS – BRAZIL
Fax: +55 51 3308 5540 Phone: +55 51 3308 5565
Email: guilherme.negrini@ufrgs.br

Abstract

Objective: Considering the potential role of lymphocytes in the pathophysiology of Autism Specter Disorders (ASD) we aimed to evaluate possible alterations in lymphoid organs of the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid (VPA). **Methods:** Pregnant Swiss mice received a single intraperitoneal injection of 600 mg/kg of VPA (VPA group) or saline (control group) on day 11 of gestation. Male animals of the offspring were euthanized on postnatal day 60 for removal of thymuses, spleens, and a pool of inguinal, axillary and brachial lymph nodes. Cellularity was evaluated with a Neubauer chamber and flow cytometry analysis was performed on cell suspensions incubated with mouse antibodies anti-CD3-FITC (1:50), anti-CD4-PE (1:50) and anti-CD8-PE-Cy7 (1:100). **Results:** In this study no differences between groups were found in organ weight. Flow cytometry analysis revealed that both CD3+ CD4+ and CD3+ CD8+ subtypes were present in reduced amount in lymph nodes of VPA-group animals. Also the CD4+ percentage was increased in the lymph nodes of the VPA group, while the CD8+ percentage was diminished. Also minor alterations regarding the proportions of these cells were detected in thymuses and spleens from VPA group. **Conclusion:** In the present study, we made the novel observation that the number of T-cells is drastically reduced in lymph nodes of mice from the animal model of ASD induced by prenatal exposure to VPA. Further research is necessary to both characterize the immunological profile of ASD and investigate its connection with the etiology of this disorder.

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a complex developmental condition characterized by impairments in social interaction and repetitive patterns of behavior and interests [1]. Although its etiology is still unknown, both genetic and environmental factors are likely to play key roles in ASD pathophysiology [2]. In recent years, one of the more innovative hypotheses to explain the mechanisms by which ASD develops, regards the involvement of immune components [3]. In fact, many immunological alterations were already observed in patients with autism such as microglial activation in postmortem brains [4], family history of autoimmune diseases [5] and abnormal levels of inflammatory cytokines [6].

In addition, subjects affected by ASD commonly present lymphocytic abnormalities. Reduced proportion and quantity of CD4+ cells and total lymphocytes, were found in a study with 25 patients [7]. Another study reported altered production of cytokines and reduced expression of activation markers in lymphocytes of children with autism, after stimulation with phytohemagglutinin (PHA) [8]. Although there are no reports of lymphocytic infiltration in the central nervous system (CNS) of patients with autism, there is a possibility that this could happen either during pregnancy or during early postnatal development [3]. On the other hand, lymphocytic infiltration was already reported in the gut of patients, with elevated number of CD4+ and CD8+ subsets, as well as increased production of proinflammatory cytokines by these cells [9], [10].

The prenatal exposure to valproic acid (VPA) in rodents triggers autistic-like morphological and behavioral outcomes [11] and is based in the fact that maternal use of VPA during pregnancy is associated with increased risk of ASD development by the children [12]. Immunological alterations such as thymus atrophy [13] and increased mRNA levels of proinflammatory cytokines in the spleen (after LPS challenge) were already described in this model [14], but data about cell-mediated immunity are absent. Considering the potential role of lymphocytes in the pathophysiology of ASD we aimed to evaluate possible alterations in lymphoid organs of the animal model of ASD induced by prenatal exposure to VPA. Here we report abnormal numbers of T cell subsets in the

thymus, spleen and lymph nodes, suggesting that the behavioral changes are accompanied or even related to a neuroimmune process.

Materials and methods

Animals

Female Swiss mice were obtained from Federal University of Pelotas (Pelotas, RS, Brazil) and housed in a 12-h light-dark cycle, with controlled temperature (22 ± 1 °C), water and food *ad libitum*. The estrous cycle was monitored and animals were mated. Pregnancy was determined by the presence of vaginal plug, and that was considered the day 0 of gestation. Pregnant mice received a single intraperitoneal injection of 600 mg/kg of VPA (Acros Organics, New Jersey, USA) (VPA group) or saline (control group) on day 11 of gestation. Male animals of the offspring were anesthetized with isoflourane gas and exsanguinated on postnatal day 60. The experimental groups consisted of five animals per group.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinical Hospital of Porto Alegre (Porto Alegre, RS, Brazil) under project number 12-0433.

Tissue isolation and preparation

The thymuses, spleens, and a pool of inguinal, axillary and brachial lymph nodes were removed. Tissues were weighted, and individually dissociated, washed, centrifuged and resuspended in PBS solution for subsequent evaluation of cellularity with a Neubauer chamber and flow cytometry analysis.

Flow cytometry

Cell suspensions were incubated with mouse antibodies anti-CD3-FITC (1:50), anti-CD4-PE (1:50) and anti-CD8-PE-Cy7 (1:100), (BD Biosciences, San Jose, CA) for 20 min with 2% fetal bovine serum-PBS solution for 20 min at 4°C. After that, cells were washed and analyzed by flow cytometry for CD3+, CD4+ and CD8+ cell identification using the Attune® Acoustic Focusing

Cytometer (Life Technologies), equipped with the Attune® Cytometric Software version 1.2.5.

Statistical analyses

Data were analyzed using SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) and graphs were plotted with GraphPad Prism software. Results were expressed as means \pm standard error of the mean (SEM) and statistical comparisons were performed using the Student's t-test. A p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

Lymph nodes

In the present work no differences between groups were found in organ weight (Table 1). Interestingly, despite the fact that the lymph nodes weight was similar in control and VPA groups, the number of lymphocytes was drastically decreased in the later (control group: $23.16 \times 10^6 \pm 4.53 \times 10^6$; VPA group: $4.9 \times 10^6 \pm 0.83 \times 10^6$) (Table 1). Our data showed that both CD3+ CD4+ and CD3+ CD8+ subtypes were present in reduced amount in lymph nodes of VPA-group animals (Figure 1B). The analyses also showed an alteration of the proportion of CD4+/CD8+ cells. While the CD4+ percentage was increased in the lymph nodes of the VPA group, the CD8+ percentage was diminished (Figure 1A).

Thymus

We did not observe any sign of thymus involution, once there were no differences between groups in organ weights, cellularity and absolute number of thymocytes subsets analyzed (Table1). However, the percentage of CD4+ cells was lower (control group: 14.78 ± 1.14 ; VPA group: 10.04 ± 0.82) and double negative (DN) was higher (control group: 2.33 ± 0.11 ; VPA group: 4.01 ± 0.29) in the thymuses of VPA-group animals (Table 2). No difference was observed in the percentage of double positive (DP) and CD8+ cells between groups (Table 2).

Spleen

The spleen cellularity and weight did not differ significantly between groups (Table 1). However, a 30% decrease was observed in the percentage of CD8+ cells in the spleens of the VPA-group (control group: 10.15% \pm 0.63; VPA group: 7.03% \pm 0.38) (Table 2). VPA-group animals also have a lower proportion of CD3+ CD8+ cells (control group: 23.32% \pm 0.81; VPA group: 18.68% \pm 0.86) (Table 3).

Discussion

While the etiology of ASD remains unknown, the association between ASD and immunological disturbances is becoming more evident due to studies in both patients and animal models. In the 70's, it was already reported that patients with autism produce an abnormal immune response after stimulation [15]. For example, lymphocyte cultures from patients with autism showed reduced PHA-stimulated differentiation, when compared to cells from typically developing subjects [15]. In the last decades, several other reports indicated a probable role of immune alterations in the pathophysiology of this disorder, including increased incidence of autism in children exposed to infections during pregnancy [16] and a family history of autoimmune diseases being more common in families of children with ASD [17]. In addition, patients with ASD present a variety of abnormalities in cellular and humoral immune functions [16].

In the present study, we made the novel observation that the number of T-cells is drastically reduced in lymph nodes of mice from the animal model of ASD induced by prenatal exposure to VPA. Consequently, we also observed reduced amount of CD3+ CD4+ and CD3+ CD8+ cells and alterations of the cells proportions in this tissue. Also minor alterations were detected in thymuses and spleens of these animals. Interestingly, no difference regarding the number of T cells and their subsets (CD4+ and CD8+) was found when the blood of patients and controls was compared [18]. On the other hand, T cell CD8+ effector memory and terminally differentiated CD4+ are reduced in children with autism [19]. This could indicate a difficulty to properly activate and stimulate T cells in the secondary lymphoid organs. As a consequence, the altered T cell

expansion may result in impairments in both primary immune response and memory T cell development [8].

Recent data suggests that histone deacetylase (HDAC) inhibitors, such as VPA, possess potent immunomodulatory properties both *in vitro* and *in vivo* [20]. Studies involving animal experimentation and VPA, other than the animal model of autism, revealed that exposure to VPA may lead to impairments in the proliferative process of lymphocytes *in vitro* [21], as well as to a drastic reduction in the number of these cells in lymph nodes, spleen and peripheral blood of an inflammatory disease model in mice [22].

Furthermore, rats exposed prenatally to VPA displayed thymic atrophy [23]. In our work, no difference was found between thymuses weight and cellularity in mice from VPA and control groups. The discrepancy between those results can be ascribed to differences in the animal species studied and to the use of animals twice as old by Schneider et al. [23]. On the other hand, we do found an increased population of DN and a decrease in the percentage of CD4+ thymocytes. This result is supported by a study in mice overexpressing soluble amyloid precursor protein α (sAPP- α) - a protein found in high levels in patients with ASD - in which the T-cell subtypes proportions was also altered, with increased DN and CD8+ thymocytes, and decreased DP population [24]. It's tempting to hypothesize that thymic alterations in ASD start with subtle changes in T-cell subsets proportion and then progress to major damage of the thymus, thus accelerating its natural involution process.

A decrease in the percentage of CD8+ splenocytes was detected in the present study. Another study previously showed that splenocytes of VPA rats demonstrated decreased proliferative response to concanavalin A [23]. The significance and causes of these alterations in splenocytes should be further investigated, but there is already some evidence that metabolic changes could be involved, since in mice prenatally exposed to viral mimic poly(I:C) - another animal model of ASD - the splenocytes show lower ATP production due to reduced complex I activity [25].

The analysis of data regarding immune system abnormalities in ASD is complicated by differences in analytical techniques, age range of the patients,

diagnostic criteria used and, sometimes, there is a lack of confirmation of the absence of ASD or other neurodevelopmental disorders in the controls, especially when using siblings as controls. Given the challenges of conducting studies with biological samples, other than blood, of patients with ASD, the use of animal models emerges as an important tool to understand the extension of involvement of immune system modifications in ASD. In addition, they enable researchers to test hypothesis about molecular mechanisms underlying this changes and to investigate the cause-consequence relationship linking nervous and immune systems alterations in ASD.

Further research is necessary to both characterize the immunological profile of ASD and investigate its connection with the etiology of this disorder. The landscape of immune alterations should yet be completed in patients and animal models of ASD, as well as the assessment of possible molecular links between those modifications and the core symptoms of ASD. It is worth noting that an effect of VPA on the dams, not necessarily a direct action on the fetuses, could be responsible for the outcomes in the offspring. These maternal immunological perturbations could, in turn, influence the general fetal development and trigger the autism-like features of the model. Thus, we anticipate that assessment of immune system of female mice exposed to VPA during gestation, as well as its offspring, and the correlations of these alterations with the development of the central nervous system would advance our understanding about the role of immune components in ASD.

References

- [1] American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5)*. 2013.
- [2] C. Gottfried and V. Bambini-Junior, "Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model," *Recent Adv. ...*, 2013.
- [3] B. Gesundheit, J. P. Rosenzweig, D. Naor, B. Lerer, D. a. Zachor, V. Procházka, M. Melamed, D. a. Kristt, A. Steinberg, C. Shulman, P. Hwang, G. Koren, A. Walfisch, J. R. Passweg, J. a. Snowden, R. Tamouza, M. Leboyer, D. Farge-Bancel, and P. Ashwood, "Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders," *J. Autoimmun.*, vol. 44, pp. 1–7, 2013.
- [4] J. T. Morgan, G. Chana, C. A. Pardo, C. Achim, K. Semendeferi, J. Buckwalter, E. Courchesne, and I. P. Everall, "Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism," *Biol. Psychiatry*, vol. 68, pp. 368–376, 2010.
- [5] T. L. Sweeten, S. L. Bowyer, D. J. Posey, G. M. Halberstadt, and C. J. McDougle, "Increased Prevalence of Familial Autoimmunity in Probands With Pervasive Developmental Disorders," *Pediatrics*, vol. 112, no. 5, pp. e420–e420, 2003.
- [6] P. Ashwood, P. Krakowiak, I. Hertz-Picciotto, R. Hansen, I. Pessah, and J. Van de Water, "Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 25, pp. 40–45, 2011.
- [7] L. J. Yonk, R. P. Warren, R. a Burger, P. Cole, J. D. Odell, W. L. Warren, E. White, and V. K. Singh, "CD4+ helper T cell depression in autism.," *Immunol. Lett.*, vol. 25, no. 4, pp. 341–345, 1990.
- [8] P. Ashwood, P. Krakowiak, I. Hertz-Picciotto, R. Hansen, I. N. Pessah, and J. Van de Water, "Altered T cell responses in children with autism.," *Brain. Behav. Immun.*, vol. 25, no. 5, pp. 840–9, 2011.
- [9] P. Ashwood, A. Anthony, A. a. Pellicer, F. Torrente, J. a. Walker-Smith, and A. J. Wakefield, "Intestinal Lymphocyte Populations in Children with Regressive Autism: Evidence for Extensive Mucosal Immunopathology," *J. Clin. Immunol.*, vol. 23, no. 6, pp. 504–517, 2003.

- [10] P. Ashwood and A. J. Wakefield, "Immune activation of peripheral blood and mucosal CD3+ lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal symptoms.," *J. Neuroimmunol.*, vol. 173, no. 1–2, pp. 126–34, 2006.
- [11] V. Bambini-Junior, G. Zanatta, G. Della Flora Nunes, G. Mueller de Melo, M. Michels, M. Fontes-Dutra, V. Nogueira Freire, R. Riesgo, and C. Gottfried, "Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid.," *Neurosci. Lett.*, vol. 583, pp. 176–81, Nov. 2014.
- [12] J. Christensen, T. K. Grønborg, M. J. Sørensen, D. Schendel, E. T. Parner, L. H. Pedersen, and M. Vestergaard, "Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism.," *JAMA*, vol. 309, no. 16, pp. 1696–703, Apr. 2013.
- [13] T. Schneider, A. Roman, A. Basta-Kaim, M. Kubera, B. Budziszewska, K. Schneider, and R. Przewłocki, "Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 33, pp. 728–740, 2008.
- [14] L. Lucchina and A. M. Depino, "Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism.," *Autism Res.*, pp. 1–17, 2013.
- [15] E. G. Stubbs and M. L. Crawford, "Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children.," *J. Autism Child. Schizophr.*, vol. 7, no. 1, pp. 49–55, 1977.
- [16] P. H. Patterson, "Maternal infection and immune involvement in autism," *Trends Mol. Med.*, vol. 17, no. 7, pp. 389–394, 2011.
- [17] A. M. Enstrom, J. A. Van de Water, and P. Ashwood, "Autoimmunity in autism.," *Curr. Opin. Investig. Drugs*, vol. 10, no. 5, pp. 463–73, May 2009.
- [18] P. Ashwood, B. A. Corbett, A. Kantor, H. Schulman, J. Van de Water, and D. G. Amaral, "In search of cellular immunophenotypes in the blood of children with autism.," *PLoS One*, vol. 6, no. 5, p. e19299, 2011.
- [19] M. Saresella, I. Marventano, F. R. Guerini, R. Mancuso, L. Ceresa, M.

- Zanzottera, B. Rusconi, E. Maggioni, C. Tinelli, and M. Clerici, "An Autistic Endophenotype Results in Complex Immune Dysfunction in Healthy Siblings of Autistic Children," *Biol. Psychiatry*, vol. 66, no. 10, pp. 978–984, 2009.
- [20] J. Arbez, B. Lamarthée, B. Gaugler, and P. Saas, "Histone deacetylase inhibitor valproic acid affects plasmacytoid dendritic cells phenotype and function.," *Immunobiology*, vol. 219, no. 8, pp. 637–43, Aug. 2014.
- [21] Z.-Y. Zhang, Y. Wu, and H. J. Schluesener, "Valproic acid ameliorates inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis rats.," *Neuroscience*, vol. 221, pp. 140–50, 2012.
- [22] K. C. Dowdell, L. Pesnicak, V. Hoffmann, K. Steadman, A. T. Remaley, J. I. Cohen, S. E. Straus, and V. K. Rao, "Valproic acid (VPA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, diminishes lymphoproliferation in the Fas - deficient MRL/lpr-/- murine model of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS)," *Exp. Hematol.*, vol. 37, no. 4, pp. 487–494, 2009.
- [23] T. Schneider, A. Roman, A. Basta-Kaim, M. Kubera, B. Budziszewska, K. Schneider, and R. Przewłocki, "Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid.," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 33, no. 6, pp. 728–40, Jul. 2008.
- [24] A. R. Bailey, H. Hou, D. F. Obregon, J. Tian, Y. Zhu, Q. Zou, W. V Nikolic, M. Bengtson, T. Mori, T. Murphy, and J. Tan, "Aberrant T-lymphocyte development and function in mice overexpressing human soluble amyloid precursor protein-alpha: implications for autism.," *FASEB J.*, vol. 26, no. 3, pp. 1040–1051, 2012.
- [25] C. Giulivi, E. Napoli, J. Schwartzner, M. Careaga, and P. Ashwood, "Gestational exposure to a viral mimetic poly(i:C) results in long-lasting changes in mitochondrial function by leucocytes in the adult offspring.," *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, p. 609602, Jan. 2013.

Tables and figures

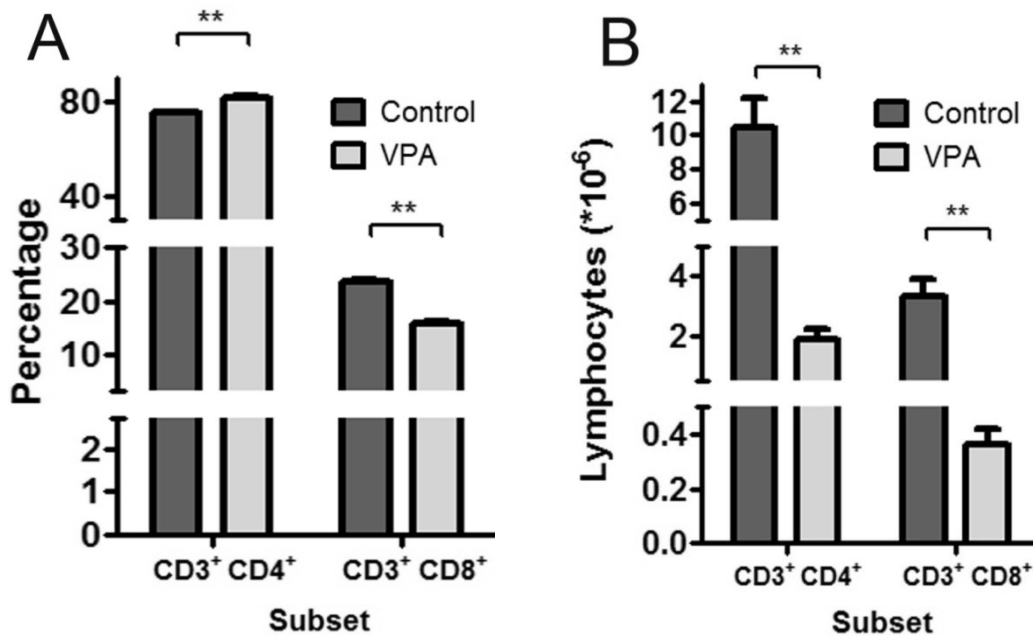


Figure 1. Qualitative and quantitative changes in cells of subcutaneous lymph nodes of VPA mice. (A) Changes in the proportion of each cell type can be observed. (B) Moreover, there is a huge decrease in the cellularity and number of all lymphocyte subtypes analyzed. ** $p < 0,01$.

Table 1. Absolute and relative quantity of lymphocytes and relative mass of different lymphoid organs from control and VPA mice. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

	Lymphocytes ($\times 10^{-6}$)		Lymphocytes ($\times 10^{-8}$) /g of tissue		Relative mass (g tissue/g animal)	
	Control	VPA	Control	VPA	Control	VPA
Thymus	67.43 ± 12.23	64.68 ± 12.99	11 ± 2.17	13.85 ± 0.13	0.18 ± 0.019	0.14 ± 0.013
Spleen	82.71 ± 11.81	106.67 ± 35.85	9.46 ± 1.25	14.4 ± 5.08	0.24 ± 0.009	0.21 ± 0.013
Lymph node	23.16 ± 4.53	4.9 ± 0.83**	3.31 ± 0.88	0.63 ± 0.13*	0.22 ± 0.02	0.2 ± 0.006

Table 2. Quantitative and qualitative analysis of CD4+, CD8+, CD4- CD8- (DN), CD4+ CD8+ (DP) lymphocytes subsets in thymus and spleen from VPA and control mice. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

		Thymus		Spleen	
		Lymphocytes ($\times 10^{-6}$)	Percentage	Lymphocytes ($\times 10^{-6}$)	Percentage
CD4⁺	Control	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⁺	Control	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	Control	1.27 ± 0.23	2.33 ± 0.11	-	-
	VPA	2.07 ± 0.39	4.01 ± 0.29**	-	-
DP	Control	46.17 ± 10.74	80.61 ± 2.21	-	-
	VPA	43.47 ± 8.94	83.87 ± 1.05	-	-

Table 3. Quantitative and qualitative analysis of CD3+, CD3+ CD4+, CD3+ CD8+ lymphocytes subsets in spleen from VPA and control mice. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

		Spleen	
		Lymphocytes ($\times 10^{-6}$)	Percentage
CD3⁺	Control	9.57 ± 2.04	35.8 ± 2.76
	VPA	8.98 ± 2.59	27.1 ± 2.5
CD3⁺ CD4⁺	Control	6.83 ± 1.48	71.25 ± 0.83
	VPA	6.49 ± 1.8	73.33 ± 1.09
CD3⁺ CD8⁺	Control	2.23 ± 0.47	23.32 ± 0.81
	VPA	1.72 ± 0.53	18.68 ± 0.86**

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente estudo foi relatada pela primeira vez a redução de células T em linfonodos de camundongos do modelo animal de TEA induzido por exposição pré-natal ao VPA. Essa redução se mostrou em ambas as populações de células CD3+ CD4+ e CD3+ CD8+, acompanhada de alterações na proporção das células nos linfonodos. Apesar de uma diferença no número de células T não ter sido encontrada em sangue de pacientes com TEA (Ashwood, Corbett, et al., 2011), existem relatos de redução de linfócitos T de memória CD8+ e linfócitos T CD4+ diferenciados em crianças com TEA (Saresella et al., 2009). Tais observações poderiam indicar uma disfunção para ativar e estimular células T em órgãos linfoides, resultando em prejuízos na resposta imunológica primária e desenvolvimento de células T de memória. Além disso, uma das características do TEA é a heterogeneidade dos sintomas (Gottfried & Bambini-Junior, 2013), responsável por algumas discrepâncias entre estudos.

Cabe ressaltar que, apesar do papel dos linfócitos T na etiologia do TEA permanecer desconhecido, muitas alterações imunológicas fazem parte do transtorno, tais como perfil de citocinas pró-inflamatórias elevado no soro, aumento de ativação de linfócitos T (Ashwood, Krakowiak, et al., 2011b), presença de auto-anticorpos (Wills et al., 2007) e aumento de células NK (Ashwood, Corbett, et al., 2011). De fato, estudos de transcriptoma revelam a existência de dois grandes módulos de genes alterados no TEA, sendo esses genes de desenvolvimento neural e genes de resposta imunológica (Gupta et al., 2014; Voineagu et al., 2011; Ziats & Rennert, 2011).

Apesar de não terem sido encontrados sinais de involução tímica como Schneider e colaboradores (Schneider et al., 2008), isso pode se dever a diferença entre as espécies e idades dos animais utilizados em ambos estudos. Ainda assim foram encontradas alterações como aumento da população de células DN e diminuição percentual de células CD4+, talvez indicando um início sutil de mudanças que podem progredir para alterações mais significativas em idades mais avançadas.

A redução do percentual de esplenócitos CD8+ também foi observada. Schneider e colaboradores (Schneider et al., 2008) já demonstraram que

esplenócitos de ratos VPA possuem diminuição da proliferação em resposta à concanavalina. O significado e causa dessas alterações permanecem desconhecidos, embora existam evidências que apontem para alterações metabólicas nessas células (Giulivi, Napoli, Schwartz, Careaga, & Ashwood, 2013).

Interessantemente, inibidores de deacetilase de histonas (HDAC), uma das propriedades do VPA, possuem ações imunomoduladoras tanto *in vitro* como *in vivo* (Arbez, Lamarthée, Gaugler, & Saas, 2014). A exposição ao VPA em linfócitos *in vitro* leva a prejuízos na proliferação (Zhang, Wu, & Schluesener, 2012), assim como reduz drasticamente o número de linfócitos em linfonodos, baço e sangue em camundongos de modelo animal de doença inflamatória (Dowdell et al., 2009). Tais evidências ajudam a desvendar o possível mecanismo pelo qual o VPA exerce seus efeitos deletérios na prole. É possível também que os efeitos do VPA não sejam diretos nos fetos, mas sim nas mães, causando disfunções imunológicas maternas que podem influenciar o desenvolvimento dos fetos e serem responsáveis pelo desencadeamento do fenótipo do tipo-autista no modelo.

Como possíveis perspectivas destacam-se a avaliação de linfócitos T e citocinas circulantes nas roedoras expostas ao VPA para avaliação de possíveis alterações imunológicas que possam afetar a prole. Além disso, uma avaliação de citocinas presentes no encéfalo de fetos em diferentes idades embrionárias poderia contribuir para a descoberta do período em que ocorrem perturbações na sinalização neuroimunológica dependente dessas moléculas. Como parte complementar, porém não apresentada nesse trabalho, análise por citometria de fluxo de células CD3⁺ CD19⁺ já foram iniciadas para avaliação de possíveis alterações em linfócitos B nos mesmos órgãos linfoides.

REFERÊNCIAS

- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5)*. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition TR*.
<http://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>
- Arbez, J., Lamarthée, B., Gaugler, B., & Saas, P. (2014). Histone deacetylase inhibitor valproic acid affects plasmacytoid dendritic cells phenotype and function. *Immunobiology*, 219(8), 637–43.
<http://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.013>
- Arndt, T. L., Stodgell, C. J., & Rodier, P. M. (2005). The teratology of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*.
<http://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.11.001>
- Ashwood, P., Anthony, A., Pellicer, A. a., Torrente, F., Walker-Smith, J. a., & Wakefield, A. J. (2003). Intestinal Lymphocyte Populations in Children with Regressive Autism: Evidence for Extensive Mucosal Immunopathology. *Journal of Clinical Immunology*, 23(6), 504–517.
<http://doi.org/10.1023/B:JOCI.0000010427.05143.bb>
- Ashwood, P., Corbett, B. A., Kantor, A., Schulman, H., Van de Water, J., & Amaral, D. G. (2011). In search of cellular immunophenotypes in the blood of children with autism. *PloS One*, 6(5), e19299.
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019299>
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I. N., & Van de Water, J. (2011a). Altered T cell responses in children with autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(5), 840–9. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.002>
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., & Van de Water, J. (2011b). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25, 40–45.
<http://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.003>
- 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, 1423–1430. <http://doi.org/10.1007/s10803-010-1006-y>
- 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*, 1408, 8–16. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.015>

- Banji, D., Banji, O. J. F., Abbagoni, S., Hayath, M. S., Kambam, S., & Chiluka, V. L. (2011). Amelioration of behavioral aberrations and oxidative markers by green tea extract in valproate induced autism in animals. *Brain Research*, *1410*, 141–51. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.063>
- Blundell, J., Tabuchi, K., Bolliger, M. F., Blaiss, C. A., Brose, N., Liu, X., ... Powell, C. M. (2009). Increased anxiety-like behavior in mice lacking the inhibitory synapse cell adhesion molecule neuroligin 2. *Genes, Brain and Behavior*, *8*, 114–126. <http://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2008.00455.x>
- Bromley, R. L., Mawer, G. E., Briggs, M., Cheyne, C., Clayton-Smith, J., García-Fiñana, M., ... Group, L. and M. N. (2013). The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *84*(6), 637–643. <http://doi.org/10.1136/jnnp-2012-304270>
- Casanova, M. F. (2007). The neuropathology of autism. In *Brain Pathology* (Vol. 17, pp. 422–433). <http://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00100.x>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C.: 2002)*, *63*(2), 1–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670961>
- Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*, *309*(16), 1696–703. <http://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
- Crawley, J. N. (2008). Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron*, *57*(6), 809–18. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.001>
- Dowdell, K. C., Pesnicak, L., Hoffmann, V., Steadman, K., Remaley, A. T., Cohen, J. I., ... Rao, V. K. (2009). Valproic acid (VPA), a histone deacetylase (HDAC) inhibitor, diminishes lymphoproliferation in the Fas -deficient MRL/lpr/- murine model of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Experimental Hematology*, *37*(4), 487–494. <http://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.12.002>
- Dufour-Rainfray, D., Vourc'h, P., Tourlet, S., Guilloteau, D., Chalon, S., & Andres, C. R. (2011). Fetal exposure to teratogens: Evidence of genes involved in autism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.013>
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric Research*. <http://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e7203>
- Gadia, C. a, Tuchman, R., & Rotta, N. T. (2004). Autismo e doenças invasivas de

- desenvolvimento. *Jornal de Pediatria*, 80(2), 83–94. <http://doi.org/10.1590/S0021-75572004000300011>
- Gesundheit, B., Rosenzweig, J. P., Naor, D., Lerer, B., Zachor, D. a., Procházka, V., ... Ashwood, P. (2013). Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autoimmunity*, 44, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.05.005>
- Gillberg, C., & Wing, L. (1999). Autism: not an extremely rare disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 99(6), 399–406. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1999.tb00984.x>
- Giulivi, C., Napoli, E., Schwartzer, J., Careaga, M., & Ashwood, P. (2013). Gestational exposure to a viral mimetic poly(i:C) results in long-lasting changes in mitochondrial function by leucocytes in the adult offspring. *Mediators of Inflammation*, 2013, 609602. <http://doi.org/10.1155/2013/609602>
- Gogolla, N., LeBlanc, J. J., Quast, K. B., Südhof, T. C., Fagiolini, M., & Hensch, T. K. (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 1(2), 172–181. <http://doi.org/10.1007/s11689-009-9023-x>
- Gottfried, C., & Bambini-Junior, V. (2013). Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model. *Recent Advances in*
- Gupta, S., Ellis, S. E., Ashar, F. N., Moes, A., Bader, J. S., Zhan, J., ... Arking, D. E. (2014). Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nature Communications*, 5, 5748. <http://doi.org/10.1038/ncomms6748>
- Kanner, L. (1968). Autistic disturbances of affective contact. *Acta Paedopsychiatrica*, 35, 100–136. <http://doi.org/10.1105/tpc.11.5.949>
- Kierszembau, A. L. (2004). *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia* (1st ed.). Rio de Janeiro, RJ: Elsevier.
- Kipps, T. J. (2010). Chapter 5. The Organization and Structure of Lymphoid Tissues. In M. A. Lichtman, T. J. Kipps, U. Seligsohn, K. Kaushansky, & J. T. Prchal (Eds.), *Williams Hematology, 8e*. New York, NY: The McGraw-Hill Companies. Retrieved from <http://mhmedical.com/content.aspx?aid=6115884>
- Kuhn, R. (2004). Eugen Bleuler's concepts of psychopathology. *History of Psychiatry*, 15(59 Pt 3), 361–366. <http://doi.org/10.1177/0957154X04044603>
- Liblau, R. S., Gonzalez-Dunia, D., Wiendl, H., & Zipp, F. (2013). Neurons as targets for T cells in the nervous system. *Trends in Neurosciences*. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2013.01.008>

- Lucchina, L., & Depino, A. M. (2013). Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism. *Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research*, 1–17. <http://doi.org/10.1002/aur.1338>
- Lyons, V., & Fitzgerald, M. (2007). Asperger (1906-1980) and Kanner (1894-1981), the two pioneers of autism [2]. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 37(10), 2022–2023. <http://doi.org/10.1007/s10803-007-0383-3>
- Miyazaki, K., Narita, N., & Narita, M. (2005). Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: Implication for pathogenesis of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(2-3 SPEC. ISS.), 287–297. <http://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.004>
- Morgan, J. T., Chana, G., Pardo, C. A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., ... Everall, I. P. (2010). Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biological Psychiatry*, 68, 368–376. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.024>
- Murcia, C. L., Gulden, F., & Herrup, K. (2005). A question of balance: A proposal for new mouse models of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*. <http://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.07.001>
- Onore, C., Careaga, M., & Ashwood, P. (2012a). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.007>
- Onore, C., Careaga, M., & Ashwood, P. (2012b). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(3), 383–92. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.007>
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270), 1777–89. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Rapin, I., & Tuchman, R. F. (2008). Autism: Definition, Neurobiology, Screening, Diagnosis. *Pediatric Clinics of North America*. <http://doi.org/10.1016/j.pcl.2008.07.005>
- Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., & Croog, V. J. (1997). Linking etiologies in humans and animal models: Studies of autism. In *Reproductive Toxicology* (Vol. 11, pp. 417–422). [http://doi.org/10.1016/S0890-6238\(97\)80001-U](http://doi.org/10.1016/S0890-6238(97)80001-U)
- 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. <http://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. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.069>
- Saresella, M., Marventano, I., Guerini, F. R., Mancuso, R., Ceresa, L., Zanzottera, M., ... Clerici, M. (2009). An Autistic Endophenotype Results in Complex Immune Dysfunction in Healthy Siblings of Autistic Children. *Biological Psychiatry*, 66(10), 978–984. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.06.020>
- Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30, 80–89. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., & Przewłocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 728–740. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.011>
- Sepeta, L., Tsuchiya, N., Davies, M. S., Sigman, M., Bookheimer, S. Y., & Dapretto, M. (2012). Abnormal social reward processing in autism as indexed by pupillary responses to happy faces. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 4, 17. <http://doi.org/10.1186/1866-1955-4-17>
- Skoyles, J. R. (2008). No new neurobiology yet for autism. *Archives of Neurology*, 65(1), 155; author reply 155–6. <http://doi.org/10.1001/archneurol.2007.25>
- Sweeten, T. L., Posey, D. J., & McDougle, C. J. (2003). High blood monocyte counts and neopterin levels in children with autistic disorder. *American Journal of Psychiatry*, 160, 1691–1693. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.9.1691>
- Tsujino, N., Nakatani, Y., Seki, Y., Nakasato, A., Nakamura, M., Sugawara, M., & Arita, H. (2007). Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. *Neuroscience Research*, 57(2), 289–295. <http://doi.org/10.1016/j.neures.2006.10.018>
- 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, 67–81. <http://doi.org/10.1002/ana.20315>
- Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J. K., Tian, Y., Horvath, S., ... Geschwind, D. H. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, 474(7351), 380–4. <http://doi.org/10.1038/nature10110>
- Wills, S., Cabanlit, M., Bennett, J., Ashwood, P., Amaral, D., & Van de Water, J. (2007). Autoantibodies in autism spectrum disorders (ASD). *Annals of the New*

- York Academy of Sciences*, 1107, 79–91. <http://doi.org/10.1196/annals.1381.009>
- Yonk, L. J., Warren, R. P., Burger, R. a, Cole, P., Odell, J. D., Warren, W. L., ... Singh, V. K. (1990). CD4+ helper T cell depression in autism. *Immunology Letters*, 25(4), 341–345. [http://doi.org/10.1016/0165-2478\(90\)90205-5](http://doi.org/10.1016/0165-2478(90)90205-5)
- Zhang, Z.-Y., Wu, Y., & Schluesener, H. J. (2012). Valproic acid ameliorates inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis rats. *Neuroscience*, 221, 140–50. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.013>
- Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2011). Expression Profiling of Autism Candidate Genes during Human Brain Development Implicates Central Immune Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 6(9), e24691. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0024691>

ANEXOS

Anexo 1 – Normas do periódico Neuroimmunomodulation

Orientações para publicação disponíveis em: www.karger.com/nim_guidelines.

Arrangement

Title page: The first page of each paper should carry the title, the authors' full first and last names, and the name of the institute or department where the authors conducted their research work.

In addition, the following should be put on the title page:

1. A short title for use as a running head;
2. A list of 3–9 key words that reflect the content of the paper;
3. The name and complete mailing address as well as phone and fax numbers as well as e-mail address of the individual to whom correspondence, proofs, and requests for reprints should be addressed.

Abstract: Each paper needs an abstract of up to 250 words.

Abstracts for Original Papers should be structured with subheadings as follows: Objective(s), Methods, Results, Conclusion(s).

The words used in the subheadings of the Abstract are not included in the 250 words of the Abstract.

Footnotes: Avoid footnotes if at all possible. When essential, they should be numbered consecutively and typed at the foot of the appropriate page.

Acknowledgments, including, where relevant, credit to the sources of grant support, should be placed before the references.

Tables and illustrations: Tables (numbered in arabic numerals) should be prepared on separate sheets, and each should have a suitable heading. Illustrations should be numbered in Arabic numerals and legends for the figures should be submitted on a separate page. For the reproduction of illustrations, only good drawings and original photographs can be accepted; negatives or photocopies

cannot be used. Due to technical reasons, figures with a screen background should not be submitted. When possible, group several illustrations on one block for reproduction (max. size 181 x 223 mm) or provide crop marks. On the back of each illustration, indicate its number, the author's name, and 'top' with a soft pencil. Electronically submitted b/w half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.

References

In the text identify references by Arabic numerals [in square brackets]. Papers that have been submitted to a journal but are not yet accepted should not be listed in the bibliography, but the data in them can be referred to in the text as unpublished observations. If details of methods are only available in papers that are 'in press', copies of the papers should be included with the manuscript submitted to 'Neuroimmunomodulation', so that the editorial referees can have adequate information to judge the manuscript. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetize; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of all the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. Preferably, please cite all authors. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (www.icmje.org).