



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

IOHANNA DECKMANN

**ALTERAÇÃO DE PERMEABILIDADE DE BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E
POSSÍVEIS MECANISMOS SUBJACENTES NO CONTEXTO DO TRANSTORNO
DO ESPECTRO AUTISTA: EFEITO PREVENTIVO DO RESVERATROL**

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre

2022



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

ALTERAÇÃO DE PERMEABILIDADE DE BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E
POSSÍVEIS MECANISMOS SUBJACENTES NO CONTEXTO DO TRANSTORNO
DO ESPECTRO AUTISTA: EFEITO PREVENTIVO DO RESVERATROL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do título
de Doutora em Bioquímica.

IOHANNA DECKMANN

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

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Deckmann, Iohanna
Alteração de Permeabilidade de Barreira
Hematoencefálica e Possíveis Mecanismos Subjacentes no
Contexto do Transtorno do Espectro Autista: Efeito
Preventivo do Resveratrol / Iohanna Deckmann. -- 2022.
293 f.
Orientador: Carmem Juracy Silveira Gottfried.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. transtorno do espectro autista. 2. ácido
valproico. 3. resveratrol. 4. barreiras neurais. 5.
aquaporina. I. Gottfried, Carmem Juracy Silveira,
orient. II. Título.

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

Iohanna Deckmann

ALTERAÇÃO DE PERMEABILIDADE DE BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E
POSSÍVEIS MECANISMOS SUBJACENTES NO CONTEXTO DO TRANSTORNO
DO ESPECTRO AUTISTA: EFEITO PREVENTIVO DO RESVERATROL

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutora em Bioquímica.

Aprovado em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Quincozes dos Santos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dra. Andrea Trentin – Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra. Patrícia Pelufo Silveira – Universidade de McGill, Canadá

Prof^a. Dra. Carmem Juracy Silveira Gottfried – Universidade Federal do Rio Grande
do Sul

Agradecimentos

Inicio os agradecimentos com um comentário pessoal para demonstrar toda minha gratidão à Ciência, aos pesquisadores no mundo todo e às muitas pessoas que foram essenciais nesse trajeto, especialmente nesse período de reinvenção, resiliência e resistência por conta da pandemia pela COVID-19 – período esse marcado pelo negacionismo e pelo apagão na ciência no Brasil.

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

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao PPG Bioquímica pela incrível formação de recursos humanos, pelos excelentes professores e por formar profissionais críticos. Especialmente, agradeço à secretaria do PPG (em nome da Cleia e do Giordano) pela assistência, atenção com os alunos, organização e competência de sempre.

À minha orientadora Carmem por ser uma grande mãe científica e por ter me recebido de braços abertos no grupo. Obrigada pela honra de fazer parte do GETTEA, por me possibilitar conviver com teu entusiasmo com a pesquisa, por tantas oportunidades de aprendizado, por confiar em mim e me incentivar. Agradeço também ao Victorio pela oportunidade de fazer parte do grupo e por ter me ensinado muito do que eu sei sobre TEA. Obrigada por tornarem o laboratório minha segunda casa e me permitirem contribuir no (muitas vezes turbulento) caminho da pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório, por tornarem o ambiente de trabalho mais divertido, por tornarem as coisas mais fáceis e por estarem sempre ao meu lado (ainda que virtualmente). Gratidão a todos os ICs que já passaram pelo laboratório (Bibi, Wal, Marília, Giovanna, Rafael, Bárbara...) e todos os PGs (Mauro, Gustavo, Gui Cordenonsi, Josemar, Brum, Darling, Gui, Bruna, Mell, Júlio,...) por toda ajuda em tantos momentos. Gui, obrigada por ter sido sempre um “fiel escudeiro”, por tantas trocas e conversas enriquecedoras. Marília, obrigada pela honra de coorientar teu TCC, por me tornar uma pessoa melhor com a tua fofura e por me ensinar tanto. Obrigada, Bruna, por ter se tornado uma super amiga pra todas as horas, por tantos

momentos bons e outros tantos de apoio compartilhados. Mell, obrigada por ter me pego pela mão e me incentivado tantas vezes, por poder contar contigo, por tantas risadas e por me questionar; obrigada pela tua paixão pela ciência e por ser uma heroína da vida real divulgando ciência em tempos de obscurantismo. Júlio, obrigada pela tua participação mais do que especial nessa tese, por ter sido um ótimo amigo e colega em todos os momentos, por ter segurado a minha mão (e por praticamente pipetar junto comigo quando as coisas não iam bem), por sempre ter o “vai dar tudo certo” na ponta da língua (mesmo que tivéssemos as piores perspectivas), por abdicar das tuas preocupações e angústias pra se preocupar comigo e me ajudar com as minhas questões; a duplinha “Corda e Caçamba” não seria o que é se não fosse tu!

Aos alunos do professor Guilhian, colegas de 27, por todos os momentos de ajuda e descontração. Obrigada, Bel, pela risada mais incrível do mundo! Obrigada também a todos os amigos “dos corredores da bioquímica” (especialmente Bernardo).

Ao Mauro, por ter sido meu companheiro na pesquisa por tanto tempo e por continuar sendo na vida. Por me ensinar, me ouvir, ser um grande parceiro e um grande incentivador, por entender as minhas ausências, pela paciência e o amor de sempre. Obrigada por ser o melhor papai que a Athena, a Gaia e a Nat poderiam ter enquanto a mamãe estava ocupada.

À minha família, meus pais e minha irmã, por serem meu alicerce, por me darem todo suporte, estrutura financeira e afetiva, por me permitirem (e incentivarem) a me dedicar integralmente aos estudos. Obrigada pela paciência, por me incentivarem a não desistir e por entenderem que muitas vezes eu não pude estar disponível tanto quanto vocês mereciam. Obrigada por viverem meus sonhos junto comigo e por me permitirem alçar voos cada vez mais altos. Gratidão pelo amor incondicional!

A todos os amigos de longa data e demais familiares (especialmente meus avós e tia Jaque).

Ao pessoal da portaria (especialmente Silvana) e do biotério (Fabíola e demais).

Aos animais que dão a vida para que as pesquisas sigam em frente.

Por fim, a todos que acreditam na ciência.

“Gracias a la vida que me ha dado tanto”

Mercedes Sosa

SUMÁRIO

PARTE I	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Lista de abreviaturas	iv
Lista de figuras	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transtorno do Espectro Autista	1
1.1.1. Prevalência	1
1.1.2. Diagnóstico	2
1.1.3. Fatores de risco	4
1.1.4. Ácido valproico como fator de risco e indutor do modelo animal de TEA	5
1.2. Bases neurobiológicas e mecanismos adjacentes	7
1.3. Alterações na dinâmica do volume encefálico	8
1.4. Barreiras neurais	10
1.4.1. Barreira hematoencefálica	10
1.4.2. Barreira hematoencefálica	11
1.4.3. Astrócitos	12
1.4.4. Aquaporinas	14
1.5. Alterações neuroimunológicas	16
1.6. Resveratrol	18
1.7. Justificativa e hipóteses	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
PARTE II	23

Capítulo I: artigo publicado.....	24
“ <i>Resveratrol prevents brain edema, blood–brain barrier permeability, and altered aquaporin profile in autism animal model</i> ”	24
Capítulo II: revisão publicada	77
“ <i>Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid</i> ”	77
Capítulo III: capítulo de livro aceito para publicação na editora <i>Springer Nature</i> ...	125
“ <i>Purinergic signaling in autism spectrum disorder</i> ”	125
PARTE III	169
3. DISCUSSÃO GERAL	170
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	187
5. PERSPECTIVAS	188
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	190
ANEXOS	234
ANEXO 1 – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	234
ANEXO 2 – Parecer de projeto de doutorado encaminhado para avaliação pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica	235
ANEXO 3 – Primeira autoria compartilhada em manuscrito submetido	237
“ <i>Resveratrol treatment of autism spectrum disorders – a pilot study</i> ”	237
ANEXO 4 – Levantamento acerca da suplementação com RSV no contexto gestacional	270

PARTE I

Resumo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) pode apresentar uma infinidade de condições clínicas associadas, como maior volume encefálico nos primeiros anos de vida em uma parcela dos pacientes; dessa forma, nos propusemos a avaliar, em modelo animal de autismo, processos possivelmente associados à formação de macrocefalia, bem como revisar na literatura os possíveis mecanismos subjacentes a essa dinâmica. No Capítulo I, avaliamos o conteúdo encefálico de água, a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), a expressão das aquaporina (AQP) 1 e 4 e da proteína ácida fibrilar glial (GFAP, um marcador de astrócitos) no modelo animal de TEA por exposição ao ácido valproico (VPA), e o potencial efeito do resveratrol (RSV). O tratamento com RSV preveniu a maior permeabilidade da BHE e o edema encefálico presentes no grupo VPA. A exposição ao VPA diminuiu os níveis da AQP1 no plexo coroide, na área somatossensorial primária, na região da amígdala e no córtex pré-frontal medial, reduziu os níveis de AQP4 no córtex pré-frontal medial e aumentou AQP4 na área somatossensorial primária (com prevenção pelo RSV), além de aumentar o número de astrócitos e a imunomarcagem de GFAP na área somatossensorial primária e no córtex pré-frontal medial, com melhora funcional promovida pelo RSV. No Capítulo II, fizemos uma extensa revisão da literatura e observamos a translacionalidade das alterações imunológicas entre pacientes com TEA e o modelo de TEA por exposição ao VPA. As alterações neuroimunológicas são uma marca registrada no TEA; nesse sentido, hipotetizamos que a indução do modelo de TEA pelo VPA possivelmente envolve mecanismos de ativação imunitária materna e que as alterações neuroimunológicas podem estar por trás das alterações observadas no Capítulo I, uma vez que são relacionadas com disfunções de BHE. Finalmente, no Capítulo III, revisamos a contribuição das alterações no metabolismo das purinas na fisiopatologia do TEA, pois, apesar da etiologia desse transtorno permanecer desconhecida, algumas rotas biológicas já foram associadas ao desencadeamento e/ou progressão do TEA, como a sinalização purinérgica. Em resumo, demonstramos a importante contribuição do modelo VPA também nos estudos de disfunções de barreiras neurais – ampliando os conhecimentos e a aplicabilidade desse modelo –, bem como reforçamos o caráter neuroprotetor preventivo do RSV nas disfunções da BHE devido ao seu papel tanto na manutenção da integridade da BHE quanto na prevenção de alterações subjacentes observadas. Finalmente, a partir de investigações translacionais, postulamos que as disfunções neuroimunológicas podem promover as alterações tanto em barreiras neurais quanto em vias biológicas associadas ao TEA, como a sinalização purinérgica, o que pode contribuir, não só na fisiopatologia, mas também na manutenção das características associadas a esse transtorno.

Palavras-chave: transtorno do espectro autista; ácido valproico; resveratrol; barreiras neurais; barreira hematoencefálica; aquaporina; astrócito; sistema nervoso central.

Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) can present a plethora of associated clinical conditions, such as increased brain volume in the first years of life in a portion of patients; therefore, we proposed to evaluate, in an animal model of autism, processes possibly associated with the formation of macrocephaly, as well as to review, in the literature, the possible mechanisms underlying this dynamic. In Chapter I, we evaluated brain water content, blood-brain barrier (BBB) permeability, aquaporin (AQP) 1 and 4, and glial fibrillary acidic protein (GFAP, a marker of astrocytes) expression in the animal model of ASD by exposure to valproic acid (VPA), and the potential effect of resveratrol (RSV). Treatment with RSV prevented the increased permeability of the BBB and the brain edema present in the VPA group. Exposure to VPA decreased AQP1 levels in the choroid plexus, primary somatosensory area, amygdala region, and medial prefrontal cortex, reduced AQP4 levels in the medial prefrontal cortex, and increased AQP4 in the primary somatosensory area (with prevention by RSV), in addition to an increase in the number of astrocytes and GFAP immunostaining in the primary somatosensory area and in the medial prefrontal cortex, with functional improvement promoted by RSV. In Chapter II, we revised the literature and looked at the translationality of immunological changes between ASD patients and the VPA exposure model of ASD. Neuroimmunological changes are a hallmark of ASD; in this sense, we hypothesized that the induction of the ASD model by the VPA possibly involves mechanisms of maternal immune activation and that neuroimmunological alterations may be behind the alterations observed in Chapter I, since they are related to BBB dysfunctions. Finally, in Chapter III, we also reviewed the contribution of changes in purine metabolism to the pathophysiology of ASD, because, although the etiology of this disorder remains unknown, some biological pathways have already been associated with the triggering and/or progression of ASD, such as purinergic signaling. In summary, we demonstrated the important contribution of the VPA model also in the studies of neural barriers dysfunctions – expanding the knowledge and applicability of this model –, as well as reinforcing the preventive neuroprotective character of RSV in BBB dysfunctions due to its role both in maintaining the BBB integrity and prevention of underlying changes observed. Finally, from translational investigations, we postulated that neuroimmunological dysfunctions could promote changes both in neural barriers and in biological pathways associated with ASD, such as purinergic signaling, which can contribute not only to the pathophysiology but also to the maintenance of the characteristics associated with this disorder.

Keywords: autism spectrum disorder; valproic acid; resveratrol; neural barriers; blood-brain barrier; aquaporin; astrocyte; central nervous system.

Lista de abreviaturas

- ABC** – lista de verificação de comportamento aberrante, do inglês *aberrant behavior checklist*
- ADORA2A/ADORA3** – receptores de adenosina A2A e A3
- AIM** – ativação imunitária materna
- AKT** – proteína cinase B ou serina/treonina cinase
- AMPc** – monofosfato de adenosina cíclico, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*
- AP-1** – proteína ativadora 1, do inglês *activator protein-1*
- AQP** – aquaporina
- ATP** – trifosfato de adenosina, do inglês *adenosine triphosphate*
- BA** – Área de Brodmann, do inglês *Brodman Area*
- BDNF** – fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *brain derived neurotrophic factor*)
- BHE** – barreira hematoencefálica
- BHL** – barreira hematoquímica
- BTBR** – cepa de camundongo BTBR T⁺lpr3^{tf}/J, um modelo genético de TEA
- CDC** – Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*
- CGI** – impressão clínica global, do inglês *clinical global impression*
- CHIP28** – proteína integral formadora de canal de 28 kDa, do inglês *channel-forming integral protein of 28 kDa*, nome inicial da AQP1
- COX** – ciclo-oxigenase
- CX** – conexina
- CXCL1** – ligante de quimiocina 1, do inglês *C-X-C motif chemokine ligand 1*
- DNA** – ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*
- DSM-5** – Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
- Egr3** – fator de resposta de crescimento precoce 3, do inglês *early growth response factor 3*
- ER β** – receptor de estrogênio β , do inglês *estrogen receptor beta*
- ESAM** – moléculas de adesão seletivas de endotélio, do inglês *endothelial cell-selective adhesion molecule*

FMR1 – regulador translacional FMRP 1, gene humano que codifica a proteína relacionada ao retardo mental do X frágil 1 (FMRP)

Foxp3 – fator de transcrição *forkhead box P3*

GABA – neurotransmissor ácido γ -aminobutírico, do inglês *gamma aminobutyric acid*

GABA-T – GABA-transaminase

GAT – transportador de GABA, do inglês *GABA transporter*

GATA3 – fator de transcrição que reconhece sequências de nucleotídeos G-A-T-A em promotores de genes alvo, ativando-os ou reprimindo-os

GETTEA – Grupo de Estudos Translacionais em Transtorno do Espectro Autista

GFAP – proteína ácida fibrilar glial, do inglês *glial fibrillary acidic protein*

GLAST/EAAT1 – transportador de glutamato/aspartato ou transportador de aminoácido excitatório 1, do inglês *glutamate/aspartate transporter/excitatory aminoacid transporter 1*

Glit-1 – transportador de glutamato 1, do inglês *glutamate transporter-1*

GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

GS – glutamina sintetase

GSH – glutationa (L-gama-glutamil-cisteinil-glicina)

GSK-3 β – glicogênio sintase cinase 3 beta, do inglês *glycogen synthase kinase 3 beta*

GWAS – estudos de associação ampla do genoma, do inglês *genome wide association studies*

HDAC – desacetilases de histonas, do inglês *histone deacetylase*

HLA – antígeno leucocitário humano, do inglês *human leukocyte antigen*)

IFN- γ – interferon gamma

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase, do inglês *inducible nitric oxide synthase*

JAM – moléculas juncionais de adesão, do inglês *junctional adhesion molecules*

KCC4 – cotransportador 4 de potássio e cloreto

Kir – canais retificadores internos de K⁺

LCR – líquido cefalorraquidiano ou líquido

MAPK – proteína cinase ativada por mitogênio, do inglês *mitogen-activated protein kinase*

MCP-1 – proteína quimioatrativa para monócitos 1, do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*

MECP2 – gene codificador da proteína ligante de metil-CpG 2 (MeCP2), associado à Síndrome de Rett e ao Transtorno do Desenvolvimento Intelectual

miR – microRNA

MMP-9 – metaloproteinase de matriz-9, do inglês *matrix metalloproteinase-9*

mTOR – alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês *mammalian target of rapamycin*

NBCe2 – cotransportador eletrogênico de sódio/bicarbonato

NDD – distúrbios do neurodesenvolvimento, do inglês *neurodevelopmental disorders*

NFκB – fator nuclear kappa B (NF-kb), do inglês *nuclear factor kappa b*

NO – óxido nítrico, do inglês *nitric oxid*

NOTCH – via biológica caracterizada pelo receptor *notch*

NPA – sequência asparagina-prolina-alanina conservado ao longo da sequência de aminoácidos das aquaporinas

Nrf2 – fator nuclear 2 relacionado ao eritroide-2, do inglês, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

PBMCs – células mononucleares de sangue periférico, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*

PDE – fosfodiesterase, do inglês *phosphodiesterase*

PDGFβR – receptor β do fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês *platelet-derived growth factor (PDGF) β receptor*

PGC-1α – coativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha*

PI3K – fosfoinositídeo 3-cinase

PTEN – fosfatase homóloga à tensina, do inglês *phosphatase and tensin homologue*

RhoA – membro da família Ras homólogo A, do inglês *Ras homolog family member A*

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro, do inglês *messenger ribonucleic acid*

RORγt – receptor órfão gama relacionado ao receptor de ácido retinoico (RAR), do inglês *retineic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma*

RSV – *trans*-resveratrol (3,4',5-triidroxiestilbeno)

SIRT – sirtuína

SNC – sistema nervoso central

SNP – polimorfismos de nucleotídeo único, do inglês *single nucleotide polymorphism*

SOCS-1 – supressor da sinalização de citocina 1, do inglês *suppressor of cytokine signaling 1*

SOD – superóxido dismutase

SSADH – semialdeído succinato desidrogenase, do inglês *succinic semialdehyde dehydrogenase*

STAT – transdutores de sinal e ativadores de transcrição, do inglês *signal transducers and activators of transcription*

T-bet – fator 21 de transcrição da T-Box, do inglês *T-Box transcription factor 21*

TDAH – transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TEA – transtorno do espectro autista

TGFβ1 – fator de crescimento transformador beta 1, do inglês *transforming growth factor beta 1*

TNF-α – fator de necrose tumoral alfa, do inglês *alpha tumor necrosis factor*

TSC 1 e 2 – complexo da esclerose tuberosa 1 e 2, do inglês *tuberous sclerosis complex*, genes associados à Esclerose Tuberosa

VPA – ácido valproico (ácido 2-propilpentanoico), do inglês *valproic acid*

Wnt – via biológica cuja sigla em inglês contém letras extraídas das palavras *Wingless* (drosófilas mutantes sem asas) e *Int* (denominação do gene mutante que causa a ausência de asas em drosófilas)

ZO – proteínas da zônula de oclusão

Lista de figuras

Figura 1 – Prevalência de TEA nos Estados Unidos no século XXI.....	2
Figura 2 – Vista esquemática da estrutura das aquaporinas.....	14
Figura 3 – Representação da linha do tempo para formação dos grupos experimentais	171

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno do Espectro Autista

Os distúrbios do neurodesenvolvimento (NDDs, do inglês *neurodevelopmental disorders*) são descritos ao longo dos anos mesmo antes dessa terminologia moderna (MORRIS-ROSENDAHL; CROCQ, 2020). Os NDDs, segundo a 5ª edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais (DSM-5, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), agrupam condições de início precoce – cujas características incluem deficiências na linguagem, cognição, entre outros – tais como distúrbios de aprendizagem específicos, deficiência intelectual, distúrbios motores e de comunicação, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e transtorno do espectro autista (TEA) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O termo “autismo” deriva do grego αὐτός (autos) e significa “de si mesmo, em relação a si mesmo”. Foi cunhado por Paul Bleuler (em 1911) para designar o retraimento social, considerado um dos sintomas mais graves em pacientes com esquizofrenia (KUHN, 2004). Creditava-se a Leo Kanner o pioneirismo na descrição do TEA ao relatar um distúrbio complexo definido por parâmetros comportamentais presente em um grupo de crianças com dificuldades em comum, como prejuízo de interação social (KANNER, 1943). Na mesma década, Hans Asperger também relatou um grupo de crianças com deficiências sociais e de comunicação, porém com alta inteligência não-verbal (ASPERGER, 1944; PEARCE, 2005).

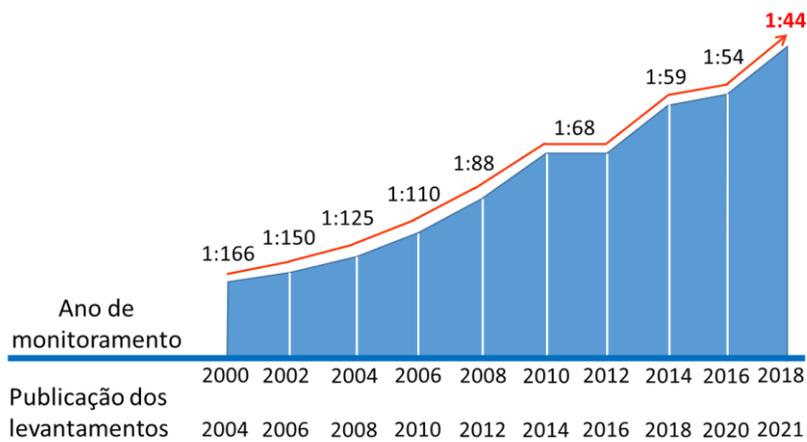
Graças a crescentes esforços com o objetivo de dar os devidos créditos às mulheres por sua contribuição nas mais diversas áreas, recentemente a comunidade científica reconheceu a psiquiatra russa/soviética Grunya Ssucharewa como pioneira no contexto do TEA pela descrição de 6 crianças com características autistas (ZELDOVICH, 2018), cujos sintomas incluíam “falta de expressividade facial e de movimentos expressivos, afastamento de seus semelhantes, fala estereotipada e interesses exclusivos” (SSUCHAREWA, 1926).

1.1.1. Prevalência

O TEA é uma desordem altamente prevalente e de incidência crescente (Figura 1). Levantamentos epidemiológicos mais recentes estimam 1 caso a cada 44 crianças até 8 anos de idade nos Estados Unidos, afetando 4,2 vezes mais o sexo masculino em relação ao feminino (MAENNER et al., 2021). Essa alta prevalência é associada a

diversos investimentos públicos em saúde e elevado custo econômico e social, incluindo custos em relação à perda de produtividade dos pais/responsáveis por indivíduos com TEA, custos médicos, terapêuticos e com educação (especial), sendo esse último um dos principais componentes (ROGGE; JANSSEN, 2019).

Figura 1 – Prevalência de TEA nos Estados Unidos no século XXI.



Adaptado de Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*).

1.1.2. Diagnóstico

O TEA agrupa transtornos anteriormente separados (síndrome de Asperger, autismo clássico, transtorno desintegrativo da infância e transtornos invasivos do desenvolvimento não especificados) e é caracterizado por prejuízos em dois domínios fundamentais para o diagnóstico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013):

a) Prejuízo na comunicação e interação social em múltiplos contextos, o que compreende déficits em reciprocidade social, na comunicação não-verbal utilizada para interação social e em habilidades para iniciar, manter e entender relacionamentos, dificuldade de contato visual, entre outros;

b) Comportamentos repetitivos, estereotípias, atividades e interesses restritos, como repetir palavras ou frases continuamente (ecolalia), rigidez comportamental (dificuldade com mudanças de rotina, interesses obsessivos), hiper ou hiporresponsividade sensoriais a estímulos (não nocivos e nocivos, respectivamente), interesses exagerados em aspectos sensoriais do ambiente, entre outros.

Além dos sintomas centrais, esses indivíduos podem apresentar ainda uma ampla gama de sintomas e comorbidades associadas, como irritabilidade (MCGUIRE

et al., 2016), prejuízo intelectual (BAUMAN, 2010; MEFFORD; BATSHAW; HOFFMAN, 2012; SRIVASTAVA; SCHWARTZ, 2014), TDAH (LAU-ZHU; FRITZ; MCLOUGHLIN, 2019), transtornos de ansiedade (ZABOSKI; STORCH, 2018), problemas de conduta (HERVAS; RUEDA, 2018) e do sono (DEVNANI; HEGDE, 2015), epilepsia (GESCHWIND, 2009; SPENCE; SCHNEIDER, 2009), problemas gastrointestinais (WASILEWSKA; KLUKOWSKI, 2015), além de alterações sensoriais em mais de 90% do pacientes (CHANG et al., 2014).

Apesar dos critérios diagnósticos serem bem delimitados, ainda há certo atraso no reconhecimento das alterações comportamentais. Essa dificuldade de identificação se dá, também, pela ausência de biomarcadores, além da apresentação altamente heterogênea e multifatorial desse transtorno (GOTTFRIED et al., 2013). O diagnóstico que, idealmente, deveria ocorrer até os 2 anos de idade, comumente ocorre quando a criança apresenta a sintomatologia característica da díade comportamental e/ou não apresenta habilidades típicas da sua idade (DOVER; LE COUTEUR, 2007).

Levando-se em conta esse contexto, as técnicas de diagnóstico por imagem têm sido úteis na pesquisa sobre alterações eletrofisiológicas, anatômicas e funcionais uma vez que fornecem um robusto material acerca do encéfalo *in vivo* (TCHACONAS; ADESMAN, 2013) tanto de pessoas diagnosticadas com TEA quanto com elevado risco genético para o transtorno. No início dos anos 2000, foi conduzido o primeiro estudo preditivo a partir dessas técnicas: analisando o cerebelo, mais de 95% dos casos de TEA (dentre 52 pacientes) e 92% dos casos controle foram classificados corretamente (AKSHOOMOFF et al., 2004). Outros parâmetros neuroanatômicos já foram utilizados como métricas preditivas, como excesso de líquido cefalorraquidiano (LCR ou líquido) entre o espaço subaracnoide e a superfície cortical do encéfalo (extra-axial) (SHEN et al., 2013, 2017, 2018), aumento da espessura e área de superfície cortical (HAZLETT et al., 2017; XIAO et al., 2017), redes de conectividade de substância branca (JIN et al., 2015) e conectividade inter-hemisférica mais fraca em áreas de linguagem (DINSTEIN et al., 2011; LOMBARDO et al., 2015). Recentemente, um estudo avaliando 59 bebês de 6 meses de idade com alto risco para desenvolver o transtorno, apresentou 82% de sensibilidade (predizendo corretamente um diagnóstico de TEA aos 24 meses) e 100% de especificidade (prevendo um diagnóstico negativo para TEA) a partir da identificação de conexões funcionais em

regiões relacionadas com comportamento social e repetitivo, linguagem, desenvolvimento motor – tipicamente associadas ao TEA (EMERSON et al., 2017).

Apesar dos exames por imagem se mostrarem uma alternativa diagnóstica interessante e com maior precisão na predição precoce de TEA (comparativamente a métodos de triagem comportamentais) em bebês de alto risco, somente a análise de alterações neuroanatômicas ainda não é uma métrica de predição forte o suficiente para ser extrapolada para a rotina clínica (GENG; KANG; WONG, 2020), mesmo utilizando outras técnicas complementares, como o eletroencefalograma (EEG), que aumenta para 95% o valor preditivo positivo (BOSL; TAGER-FLUSBERG; NELSON, 2018; GABARD-DURNAM et al., 2019) do diagnóstico. Porém, a avaliação do desenvolvimento inicial do encéfalo em crianças de alto risco genético pode ser uma estratégia promissora na investigação de biomarcadores e de subtipos de TEA.

1.1.3. Fatores de risco

O TEA é uma desordem de causa idiopática; no entanto, acredita-se que o gatilho etiológico envolve não somente fatores genéticos e ambientais, mas também suas interações (GOTTFRIED et al., 2015).

Especula-se que 5-30% dos casos de TEA podem ser explicados por mutação de um único gene ou por rearranjo genômico (duplicações ou deleções) (SCHAAF et al., 2020). Já estudos com gêmeos dizigóticos e monozigóticos demonstram concordância genética de 31% e 88%, respectivamente. Ainda, quando considerado o sexo, a concordância é de 100% para gêmeas monozigóticas e de 86% quando os irmãos são do sexo masculino (ROSENBERG et al., 2009). Essa alta concordância não deixa dúvidas de que a herança genética é um fator determinante. Além disso, já foram descritos genes que desencadeiam condições genéticas com alta sobreposição ao TEA, como a Síndrome do X Frágil (regulador translacional FMRP 1 – FMR1), a Esclerose Tuberosa (complexo da esclerose tuberosa 1 e 2 – TSC1 e 2), a Síndrome de Cowden (fosfatase homóloga à tensina – PTEN), a Síndrome de Rett (gene codificador da proteína ligante de metil-CpG 2 – MECP2) (BELMONTE; BOURGERON, 2006; BROWN et al., 1982; FELICIANO et al., 2013; NUMIS et al., 2011). Complementarmente, alguns fatores epigenéticos parecem estar envolvidos no desencadeamento do TEA, como a idade avançada dos genitores (DURKIN et al.,

2008), o que poderia ter relação com alguns fatores como metilação de DNA, diminuição na fertilidade e mudança do estilo de vida (OLSEN; ZHU, 2009).

Levando-se em conta fatores ambientais, sabe-se que o Sistema Nervoso Central (SNC) em desenvolvimento é particularmente vulnerável a danos externos. Nesse sentido, observações epidemiológicas sugerem que a exposição a substâncias teratogênicas pode ser um dos fatores envolvidos no desencadeamento do TEA. Entre os fatores ambientais já descritos como possíveis gatilhos, estão os fatores relacionados diretamente à mãe, como nutrição materna, equilíbrio hormonal, estresse e a ativação imunitária materna (AIM), e a exposição materna a substâncias químicas, incluindo poluentes atmosféricos, pesticidas, derivados de plásticos e metais (CHERONI; CAPORALE; TESTA, 2020), além de substâncias como a talidomida (IMAI et al., 2014) e o ácido valproico (VPA) (CHRISTENSEN et al., 2013; ROULLET; LAI; FOSTER, 2013; SMITH; BROWN, 2014).

1.1.4. Ácido valproico como fator de risco e indutor do modelo animal de TEA

O VPA (ácido 2-propilpentanoico) é um ácido carboxílico de cadeia ramificada, altamente lipossolúvel e permeável tanto à barreira hematoencefálica (BHE) quanto à placentária (BRUNI; WILDER, 1979). Foi utilizado como solvente orgânico para outras moléculas até que sua propriedade anticonvulsivante foi descoberta (BURTON, 1882; MEUNIER et al., 1963). Desde então, tem sido utilizado na indústria farmacêutica como um dos principais medicamentos no tratamento de epilepsia, transtorno bipolar e profilático de enxaqueca (REYNOLDS; SISK; RASGON, 2007) devido a sua rápida absorção no trato gastrointestinal, alta biodisponibilidade, curto tempo de meia-vida e rápida eliminação do organismo (BRUNI; WILDER, 1979; SILVA et al., 2008).

Já foram descritos alguns mecanismos prováveis pelos quais o VPA exerce seu papel anticonvulsivante, como aumento dos níveis do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) (REYNOLDS; SISK; RASGON, 2007), favorecimento da transcrição gênica por meio da inibição de desacetilases de histonas (HDAC, do inglês *histone deacetylase*) (PHIEL et al., 2001) e na ativação das sirtuínas (REID et al., 2005). Em relação ao TEA, apesar de ainda não se conhecerem os mecanismos fisiopatológicos desencadeados pela exposição intraútero ao VPA (NICOLINI; FAHNESTOCK, 2018), acredita-se que envolva mecanismos de AIM (FONTES-DUTRA et al., 2020).

No final dos anos 90, foram feitos os primeiros relatos de associação entre TEA e exposição ao VPA durante o neurodesenvolvimento tanto em indivíduos cujas mães utilizaram esse fármaco durante o período gestacional (CHRISTIANSON; CHESTER; KROMBERG, 1994; MOORE et al., 2000; WILLIAMS et al., 2001; WILLIAMS; HERSH, 1997) quanto em modelos animais de roedores com a indução de características do tipo autista na prole de ratas expostas ao teratígeno, os quais apresentaram alterações morfológicas no cerebelo, no tronco encefálico e nos nervos cranianos (semelhantes às descritas em indivíduos com TEA) (INGRAM et al., 2000; RODIER et al., 1997, 1996). Em meados dos anos 2000, o pesquisador Tomasz Schneider foi pioneiro na padronização de testes capazes de avaliar características do tipo autista em roedores e na demonstração dessas alterações (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005), validando o modelo animal de autismo por exposição pré-natal ao VPA.

Além dos déficits em comportamentos equivalentes ao comportamento social em humanos com TEA (BAMBINI-JUNIOR et al., 2011; SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005; YOCHUM et al., 2008), também já foram descritos prejuízos em outros domínios comportamentais, como aumento de estereotípias (SCHNEIDER et al., 2008), rigidez comportamental (BAMBINI-JUNIOR et al., 2011), menor sensibilidade a estímulos nocivos (SCHNEIDER et al., 2008; WANG et al., 2016), atividade exploratória aumentada (SCHNEIDER et al., 2008; TSUJINO et al., 2007), comportamentos do tipo ansioso (MARKRAM et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2008), entre outros. No Brasil, nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a ampliar os estudos pré-clínicos para investigação dos possíveis gatilhos etiológicos através da impressão digital deixada pela exposição intraútero ao VPA (BAMBINI-JUNIOR et al., 2011). Ainda, em 2013, foi publicado o estudo mais contundente em relação à predisposição ao TEA pela exposição ao VPA: a utilização desse fármaco durante a gestação – especialmente no primeiro trimestre – eleva em quase 5x o risco de ter filhos com diagnóstico de TEA (CHRISTENSEN et al., 2013).

Sabe-se que o primeiro trimestre gestacional é especialmente vulnerável a quaisquer eventos danosos uma vez que compreende o período de neurogênese, uma conhecida janela biológica de risco para diversos transtornos neuropsiquiátricos, inclusive o TEA (COURCHESNE et al., 2018). Como já mencionado, o modelo animal VPA reproduz a circunstância que leva ao transtorno (validade de construto), replica parâmetros comportamentais, moleculares e morfológicos similares aos encontrados

na condição humana (validade de face), além de possibilitar o estudo de estratégias terapêuticas eficazes para o tratamento da sintomatologia associada (validade preditiva) (MABUNGA et al., 2015). Dessa forma, modelos animais são importantes ferramentas de estudo que possibilitam a obtenção dos mais diversos tipos de amostras biológicas, bem como permitem a análise de vias biológicas potencialmente envolvidas na fisiopatologia do transtorno, facilitando a aquisição de conhecimentos que podem auxiliar no manejo clínico – principalmente no caso de desordens como o TEA, cujo diagnóstico se dá exclusivamente por análise comportamental.

1.2. Bases neurobiológicas e mecanismos adjacentes

Apesar de ainda não se conhecer exatamente o que leva ao surgimento do TEA, são descritas diversas alterações que podem tanto ter relação com o gatilho etiológico quanto com a manutenção/progressão dos sintomas. Há muitos anos são relatadas alterações histoanatômicas no contexto do TEA, como anormalidades em regiões encefálicas como hipocampo, subículo, córtex entorrinal, núcleos da amígdala, córtex neocerebelar, núcleos do teto do cerebelo (BAUMAN; KEMPER, 1985), alterações em regiões como os núcleos da base, como aumento no núcleo caudado (LANGEN et al., 2007), hiperativação em processos sensório-motores (TAKARAE et al., 2007), déficits executivos decorrentes da ativação reduzida nas regiões frontal, estriatal e parietal (SHAFRITZ et al., 2008), entre outras.

Uma das primeiras estruturas associadas ao TEA foi o cerebelo, uma vez que indivíduos com anormalidades nessa estrutura apresentam comportamentos do tipo autista e maior diagnóstico de TEA comparado à população sem essas alterações (PARISI; DOBYNS, 2003). Já foram descritas alterações em células de *Purkinje* (FATEMI et al., 2002; INGRAM et al., 2000; PETER et al., 2016; TSAI et al., 2012), alterações funcionais (FERNÁNDEZ et al., 2021), malformações cerebelares (MURAKAMI et al., 1989; OTAZU et al., 2021; RUMSEY et al., 1988), aumento de células da microglia (GIFFORD et al., 2021), entre outras.

Outra região bastante associada ao TEA é a amígdala. Estudos mostraram que macacos *Rhesus* submetidos à ablação de amígdala apresentavam menor resposta a estímulos sociais e menor interesse por convivência com seus coespecíficos (KLING; BROTHERS, 1992; KLING; STEKLIS, 1976); de forma complementar, pacientes com lesões nessa estrutura mostram redução no número de neurônios (AVINO et al., 2018;

SCHUMANN; AMARAL, 2006; WILKINSON, 2006) e conectividade atípica (FISHMAN et al., 2018), além de prejuízos no julgamento social (ADOLPHS et al., 1994; YOUNG et al., 1996) – o que foi chamado de “autismo adquirido” –, ao passo que modelos animais enfatizam alterações na sinalização de cálcio (BARRETT et al., 2017) e aumento da razão excitação/inibição sináptica nessa estrutura (LIN et al., 2013). Ainda, enquanto que a amígdala apresenta alterações de tamanho durante a infância em indivíduos com TEA, em adolescentes, essas mudanças parecem persistir no hipocampo, associadas a ativação astrogliar e desbalanço excitatório/inibitório (GROEN et al., 2010; ROJAS et al., 2004; SCHUMANN et al., 2004).

O córtex cerebral como um todo também apresenta mudanças morfofuncionais. Já foi observado dobramento cortical atípico em crianças com TEA principalmente no lobo frontal (HARDAN et al., 2004; LEVITT et al., 2003), alterações na conectividade inter-hemisférica (FENLON et al., 2015), redução da massa cinzenta e da conectividade funcional entre o hemisfério esquerdo e o córtex cingulado posterior em pacientes com alto funcionamento (PEREIRA et al., 2018), hiperplasia cortical (SPARKS et al., 2002) e conectividade neural alterada em circuitos corticais excitatórios e inibitórios (ZIKOPOULOS; BARBAS, 2013). A nível de córtex frontal, crianças com TEA apresentam 67% mais neurônios e um aumento em 17,6% do peso do cérebro (COURCHESNE et al., 2011). A mesma região em modelos animais apresentou redução da transmissão sináptica excitatória em neurônios piramidais das camadas 2/3 (SACAI et al., 2020). Ainda, já foram demonstradas alterações na organização neuronal nas camadas corticais e na citoarquitetura laminar, especialmente em córtex somestésico e córtex pré-frontal medial (CASANOVA et al., 2002, 2006; KATAOKA et al., 2013; STONER et al., 2014). O córtex somestésico, além de alterações na citoarquitetura (FONTES-DUTRA et al., 2018), também possui anormalidades de conectividade funcional (KHAN et al., 2015), bem como atividade cerebral atípica durante o processamento sensorial (MARCO et al., 2012).

1.3. Alterações na dinâmica do volume encefálico

Considerando a) a ausência de biomarcadores que antecipem o diagnóstico; b) o perímetro cefálico ligeiramente menor do que a média em mais de 90% de neonatos com alto risco familiar (e posteriormente diagnosticados com TEA) (COURCHESNE; CARPER; AKSHOOMOFF, 2003; DEMENTIEVA et al., 2005); e c) macrocefalia na

primeira infância em cerca de 20% das crianças com TEA (CHAWARSKA et al., 2011; HAZLETT et al., 2005), alguns estudos investigaram o neurodesenvolvimento em crianças com alto risco familiar de TEA a partir de técnicas de diagnóstico por imagem. Foi demonstrado o crescimento encefálico excessivo na infância (2-5 anos de idade) seguido por um decréscimo no final da infância/início da adolescência e uma aparente normalização na idade adulta (o tamanho geral do encéfalo está próximo da média considerada neurotípica) (AYLWARD et al., 2002; COURCHESNE; CARPER; AKSHOOMOFF, 2003; HA et al., 2015; HAZLETT et al., 2011; LANGE et al., 2015; LIN et al., 2015), ao passo que apenas 5% dos casos de macrocefalia ainda permanecem na adolescência e vida adulta (REDCAY; COURCHESNE, 2005).

Se por um lado é consolador pensar nesse conjunto de alterações como algo transitório, por outro, é necessário vislumbrar possíveis consequências funcionais desencadeadas pela alteração da dinâmica do crescimento encefálico no TEA. Esse "supercrescimento" ocorre durante anos iniciais de vida, os quais são críticos para o desenvolvimento e aquisição das habilidades de linguagem, social, emoção e atenção; coincidentemente, é o momento temporal em que os sintomas e os sinais do TEA estão se apresentando como perda de habilidades de linguagem e sociais (BARON-COHEN; ALLEN; GILLBERG, 1992; LANDA; GARRETT-MAYER, 2006; WETHERBY et al., 2004; ZWAIGENBAUM et al., 2005). No final da infância/início da adolescência, ocorre a desaceleração ou estagnação do crescimento craniano, quando o esperado seria um crescimento típico da puberdade e a maturação de habilidades relacionadas à sociabilidade. Esses dados em conjunto suportam a ideia de que a relação temporal entre aceleração de crescimento (concomitante à habilidade de linguagem) e desaceleração (concomitante à habilidade de sociabilidade) interfere na formação da citoarquitetura que dá suporte ao surgimento das mesmas (AYLWARD et al., 2002).

Alguns fatores como mutações na PTEN (gene de risco para TEA) (ABGHARI; MORADI; AKOUCHEKIAN, 2019; BUSCH et al., 2019; KAYMAKCALAN et al., 2021), na sinalização pelas proteínas fosfoinositídeo 3-cinase/proteína cinase B/proteína alvo da rapamicina em mamíferos (via PI3K/AKT/mTOR) (KLEIN et al., 2019; YEUNG et al., 2017; ZHANG et al., 2020) e síndromes altamente sobrepostas ao TEA como a Síndrome do X Frágil (OKAZAKI et al., 2021) já foram associados à macrocefalia em pacientes com TEA. Aumento de celularidade transitória, espessura de regiões corticais e presença de edema encefálico (e, possivelmente, disfunções nas barreiras

neurais) são algumas hipóteses relacionadas com esse fenômeno; no entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na dinâmica do volume encefálico em pacientes com TEA.

1.4. Barreiras neurais

Durante muito tempo, o SNC foi considerado um local imunologicamente privilegiado (TAMBUR; ROITBERG, 2005) devido a sua aparente impenetrabilidade a substâncias oriundas da periferia (o que, posteriormente, descobriu-se ser devido à barreira hematoencefálica – BHE) e a falta de vasos linfáticos no parênquima do SNC (ENGELHARDT et al., 2016). No entanto, estudos recentes propõem uma perspectiva revisada sobre o paradigma do privilégio imunológico do SNC, com especial relevância no estudo etiológico de diferentes distúrbios neurológicos (LOUVEAU; HARRIS; KIPNIS, 2015), com impacto na BHE e barreira hematoencefálica (BHL).

O SNC é protegido por outras barreiras neurais, pelo LCR e pelas meninges que cercam o encéfalo e a medula espinal (LOUVEAU; HARRIS; KIPNIS, 2015). Complementarmente, a BHE possui um caráter seletivo de passagem de moléculas; apesar das junções de oclusão impedirem a passagem paracelular, mecanismos como transportadores e canais especializados permitem a entrada molecular seletiva via transcelular. Além da BHE e da BHL, outras barreiras atuam na interface sangue/tecido neural: hematomedular, hemato-labiríntica, hemato-retiniana e hemato-nervosa (CHOI; KIM, 2008). A integridade dessas barreiras é vital para a homeostase encefálica, uma vez que disfunções, principalmente na BHE, fragilizam as defesas físicas do encéfalo, deixando-o vulnerável a substâncias periféricas danosas (OBERMEIER; DANEMAN; RANSOHOFF, 2013; ZHAO et al., 2015b).

1.4.1. Barreira hematoencefálica

A BHL é uma barreira entre o sangue e o LCR formada pela monocamada de células epiteliais do plexo coroide localizado principalmente nos ventrículos (principal local de produção do LCR), mas também nas estruturas epiteliais subaracnoides. Ao contrário da BHE, a BHL presente no estroma do plexo coroide apresenta fenestras nos capilares e vesículas de pinocitose, que formam um macrofiltro para proteínas (OREŠKOVIĆ; RADOŠ; KLARICA, 2017; TUMANI; HUSS; BACHHUBER, 2017), além de apresentar diferentes tipos de células imunológicas associadas ao plexo coroide,

tanto no estroma quanto aderindo à membrana das células epiteliais voltadas para o LCR (GHERSI-EGEA et al., 2018).

A BHL é mantida por junções de oclusão na superfície apical e por sistemas de transporte nas células epiteliais, permitindo a passagem de água, íons e nutrientes para compor o LCR (ENGELHARDT; SOROKIN, 2009). Três fatores favorecem as trocas entre o sangue e o LCR através do plexo coroide: 1) alto fluxo sanguíneo local coroidal devido a uma extensa rede de capilares em todo o estroma coroidal; 2) alta permissividade do endotélio coroidal – apesar da via paracelular ser vedada – a uma grande variedade de moléculas através das fenestrações que permitem uma difusão facilitada de moléculas com peso molecular até ~ 800 kDa; 3) presença de dobras basolaterais e microvilosidades apicais nas membranas das células epiteliais coroidais, aumentando a área de superfície para transferência entre o estroma e o LCR; isso implica em alta demanda energética - por isso, a presença de numerosas mitocôndrias nas células epiteliais do plexo coroide (GHERSI-EGEA et al., 2018).

De forma complementar, as células epiteliais do plexo coroide expressam uma ampla gama de transportadores e moléculas que regulam a produção e a composição do LCR. O gradiente osmótico criado pela secreção de Na^+ e Cl^- pelos transportadores $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{-ATPase}$, cotransportador eletrogênico NBCe2 (transporte sódio/bicarbonato) e cotransportador 4 de potássio e cloreto KCC4 conduz o influxo transepitelial de água através da aquaporina (AQP) 1 para a formação do LCR (BENARROCH, 2016). Assim, o plexo coroide desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase encefálica (DEMEESTERE; LIBERT; VANDENBROUCKE, 2015).

1.4.2. Barreira hematoencefálica

A BHE é uma barreira seletiva formada por células com atividade altamente coordenada que, juntas, formam a unidade neurovascular: a) células endoteliais especializadas, unidas por junções de oclusão; b) membrana basal; c) pericitos, os quais cobrem as células endoteliais compartilhando da mesma membrana basal; e d) pés terminais astrocíticos, os quais contribuem para as regulações dinâmicas de todo sistema neural (ABBOTT, 2013). Digno de nota, os pericitos são células contráteis devido à presença de actina de músculo liso em sua estrutura; exercem importante papel no controle do fluxo sanguíneo, na regulação da permeabilidade juncional, bem como na formação de contatos focais com o endotélio através da N-caderina e

conexinas, permitindo trocas de íons, metabólitos, segundos mensageiros e ácidos ribonucleicos entre os dois tipos de células (CARDOSO; BRITES; BRITO, 2010; LAI; KUO, 2005; LIU et al., 2012; REINHOLD; RITTNER, 2016). Neurônios e microglia também são observados na região perivascular (CHOI; KIM, 2008).

A passagem paracelular entre as células endoteliais é limitada pela presença das proteínas constituintes das junções de oclusão – claudinas, ocludinas, moléculas juncionais de adesão (JAMs), moléculas de adesão seletivas de endotélio (ESAM) e proteínas da zônula de oclusão (ZO) –, que unem as células endoteliais evitando a passagem de substâncias maiores que 0,4 kDa (ABBOTT et al., 2010; ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006). Além disso, a lâmina basal (formada por proteínas da matriz extracelular como colágeno e laminina) auxilia na estabilização da BHE fornecendo suporte para as células endoteliais e os pericitos (ZHAO et al., 2015b).

1.4.3. Astrócitos

Os astrócitos são o tipo de célula mais abundante no SNC, desempenhando diversos papéis anatômicos e funcionais (XIE; YANG, 2015). Essas células gliais, que ficam em contato com a superfície externa do endotélio da BHE por meio dos seus prolongamentos usualmente chamados de “pés” (CARDOSO; BRITES; BRITO, 2010), podem se apresentar nas formas protoplasmática (presente na substância cinzenta, com numerosos prolongamentos curtos e muitas ramificações) e fibrosa (presente na substância branca, com menos ramificações e prolongamentos mais longos) (OBERHEIM; GOLDMAN; NEDERGAARD, 2012). Além de auxiliar na manutenção da BHE, fornecendo suporte estrutural por meio da formação de matriz extracelular (síntese de proteoglicanos), os astrócitos mantêm a homeostase fisiológica do SNC, fornecendo um microambiente estável por meio da regulação de processos como regulação imunológica, suporte metabólico, tamponamento de potássio, neurogênese, modulação da transmissão e da plasticidade sináptica, e homeostase de neurotransmissores (BLANCHETTE; DANEMAN, 2015; PALMER; OUSMAN, 2018).

A homeostase de neurotransmissores se dá por recaptura e metabolismo; enquanto a maior parte do glutamato é recaptada pelos astrócitos pelo transportador de glutamato/aspartato (GLAST) e transportador de glutamato 1 (Glt-1), grande parte do GABA é recaptado pelos neurônios GABAérgicos pré-sinápticos pelo transportador de GABA (GAT). Dentre outras funções, o glutamato nos astrócitos pode ser utilizado

para a síntese de glutathiona (GSH) – um importante antioxidante biológico não-enzimático. Já o GABA, pode ser convertido em glutamato a partir das enzimas GABA-transaminase (GABA-T) e semialdeído succinato desidrogenase (SSADH), e servir de precursor para glutamina via glutamina sintetase (GS) (SCHOUSBOE; BAK; WAAGEPETERSEN, 2013).

Astrócitos e microglia são as principais células imunológicas inatas no SNC (FARINA; ALOISI; MEINL, 2007; RANSOHOFF; BROWN, 2012). Em condições normais, essas células são cruciais para o controle do processo inflamatório no encéfalo em desenvolvimento através do reconhecimento de fatores pró-inflamatórios capazes de perturbar a homeostase, os quais desempenham um papel importante na etiologia de vários distúrbios neurológicos e neuropsiquiátricos, incluindo o TEA (PETRELLI; PUCCI; BEZZI, 2016). Em condições de estresse celular, os astrócitos são capazes de se proliferar e adquirir uma forma reativa, caracterizada por hipertrofia, presença de numerosos prolongamentos e aumento na produção da proteína ácida fibrilar glial (GFAP, do inglês *glial fibrillar acidic protein*, proteína do citoesqueleto de astrócitos). Além disso, essa conformação reativa pode exacerbar o dano tecidual, uma vez que leva à redução na captação de glutamato, dificultando a ação dos astrócitos na homeostase de neurotransmissores (JAIN; KUMAR WADHWA; RAMANLAL JADHAV, 2015), bem como libera citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6, produzem e liberam óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (LIBERTO et al., 2004; LIDDELOW; BARRES, 2017).

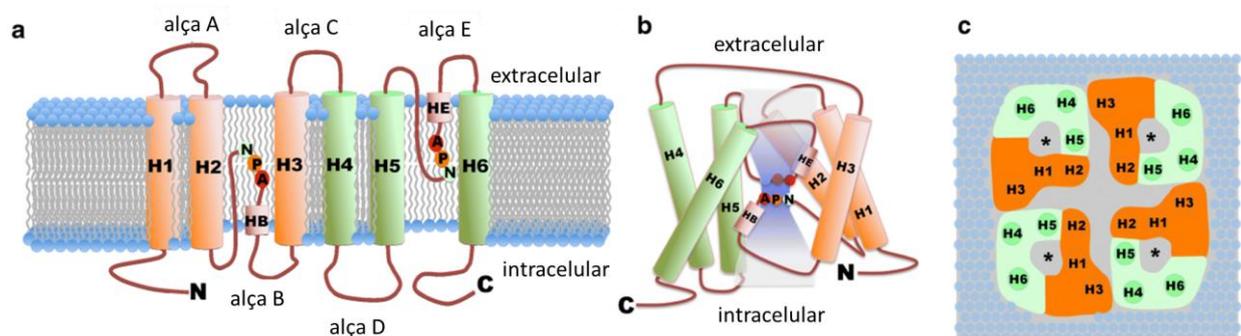
O TEA, assim como outros transtornos psiquiátricos, tem sua fisiopatologia associada a disfunções astrocitárias (MONY et al., 2016; ZEIDÁN-CHULIÁ et al., 2014), como aumento de gliose reativa e proliferação de células da glia no encéfalo de indivíduos com o TEA (PETRELLI; PUCCI; BEZZI, 2016), associação entre o TEA e genes relacionados à ativação de células da glia e do sistema imunológico (VOINEAGU et al., 2011). Apesar de alguns estudos não demonstrarem alterações nos parâmetros de astrócitos em tecidos *post mortem* de pacientes com TEA (LEE et al., 2017; MORGAN et al., 2014), previamente observamos alterações no metabolismo do glutamato no hipocampo em diferentes idades (BRISTOT SILVESTRIN et al., 2013), bem como aumento da expressão proteica de GFAP em diferentes estruturas encefálicas (BRISTOT SILVESTRIN et al., dados não publicados) em modelo animal VPA, corroborando com a literatura que demonstra a ativação neuroglial em pacientes

com TEA e modelos animais (EDMONSON; ZIATS; RENNERT, 2014; VARGAS et al., 2005; ZHAO et al., 2019). Além disso, os modelos animais da Síndrome do X Frágil apresentam uma perturbação específica na constituição das camadas mais profundas, além de apresentar um número aumentado de astrócitos (LEE et al., 2019).

1.4.4. Aquaporinas

Todas as membranas plasmáticas de mamíferos são permeáveis à água; os tecidos mais permeáveis recebem essa propriedade das AQP, família de proteínas canais presentes em praticamente todos os organismos. Possuem aproximadamente 30 kDa de peso molecular e sua principal função é permitir a passagem de água através das membranas celulares. São proteínas integrais de membrana que formam poros que permitem a passagem de água através das membranas enquanto bloqueiam a passagem de íons e solutos carregados (FILIPPIDIS; CAROZZA; REKATE, 2017) (Figura 2).

Figura 2 – Vista esquemática da estrutura das aquaporinas



A) A estrutura primária das aquaporinas contém porções N- e C-terminais citosólicas e seis domínios transmembrana (H1 a H6) conectados por cinco alças (A, C e E extracelulares e B e D intracelulares). Os *motifs* NPA estão localizados nas alças B (HB) e E (HE), formam hélices hidrofóbicas curtas que se dobram em direção à membrana para lados opostos. B) Modelo esquemático de arranjo dos domínios transmembrana, mostrando HB e HE, bem como o motivo NPA ao redor do poro condutor de água (mostrado em azul claro). É representada a obstrução do poro central pelos motivos NPA de acordo com o modelo da ampulheta. C) Vista de cima da superfície extracelular na parte superior de um tetrâmero de AQP. O arranjo da transmembrana que abrange os segmentos H1 a H3 (em laranja) e H4 a H6 (em verde) é mostrado. Os asteriscos destacam o poro de água de cada monômero AQP. Adaptado de (WITTEKINDT; DIETL, 2018).

Em geral, os monômeros de AQP apresentam seis domínios transmembrana com as porções carboxila (C) e amino terminal (N) intracelulares (NAGELHUS;

OTTERSEN, 2013; PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013). A organização das AQP em homotetrâmeros dá o formato de “ampulheta” ao poro central (BADAUT et al., 2014), por meio da interação tridimensional do motivo asparagina-prolina-alanina (Asn-Pro-Ala ou NPA), conservado ao longo da sequência de aminoácidos (BADAUT et al., 2014; ERIKSSON et al., 2013; NAGELHUS; OTTERSEN, 2013; PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2013; VERKMAN; MITRA, 2000).

A primeira AQP descrita (AQP1) foi descoberta por acaso em um experimento para isolamento de peptídeos e inicialmente chamada de CHIP28 (proteína integral formadora de canal de 28 kDa, do inglês *channel-forming integral protein of 28 kDa*) (BROWN, 2017; PRESTON et al., 1992). Desde então, já foram descritas 13 AQP, algumas permeáveis somente à água (AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 e AQP8) e outras – as aquagliceroporinas – (AQP3, AQP6, AQP7, AQP9 e AQP10), com a habilidade de transportar moléculas pequenas e sem carga, como glicerol, ureia e amônia. Ainda, foi proposto o subgrupo de superaquaporinas (AQP11 e AQP12), que são distintas devido à sua baixa homologia para o restante da família, apesar de também possuírem a sequência NPA (WITTEKINDT; DIETL, 2018). As AQP expressas em maiores concentrações no SNC são a 1 e a 4 (FILIPPIDIS; CAROZZA; REKATE, 2017).

AQP1 é expressa principalmente nas células endoteliais das superfícies apical e basolateral do plexo coroide (BENGA; HUBER, 2012; OSHIO et al., 2003), promovendo movimento transcelular da água e contribuindo com cerca de 25% da produção de LCR (FILIPPIDIS; CAROZZA; REKATE, 2017). Também já foi descrita em neurônios sensoriais no corno dorsal da medula espinhal e gânglios trigêmeos (contribuindo possivelmente para a sinalização da dor) (OSHIO et al., 2006; SHIELDS et al., 2007), em filamentos neuronais após lesão encefálica traumática (FUKUDA et al., 2012), em astrócitos na substância branca, na glia limitante e neurônios que innervam os vasos sanguíneos piais em primatas (ARCIENEGA et al., 2010).

A extensa distribuição de AQP4 em vários locais no encéfalo não deixa dúvidas do papel crucial da AQP4 na homeostase encefálica (NAGELHUS; OTTERSEN, 2013; PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2007, 2013; XIAO; HU, 2014). Especula-se que essa proteína possa estar envolvida no desenvolvimento e maturação da BHE (NICO et al., 2001). AQP4 é o principal canal de água no SNC, expresso principalmente em processos perivasculares dos pés astrocíticos, mas também no espaço subaracnoide (BLOCH; MANLEY, 2007; HUBBARD et al., 2015), medula espinhal (OSHIO et al.,

2004), retina e nervo óptico (NAGELHUS et al., 1998), células endoteliais (JUNG et al., 1994), giro denteado (HSU et al., 2011) e córtex temporal (HOSHI et al., 2017). Interessantemente, astrócitos reativos aumentam a expressão de AQP4, deslocando a expressão dos pés terminais para o soma do astrócito (ILIFF et al., 2014; KRESS et al., 2014). De forma complementar, alguns estudos em modelos nocaute para AQP4 demonstraram importantes alterações no padrão de disparo neuronal, sugerindo que essa proteína também exerça papel na manutenção da excitabilidade neural (KONG et al., 2008; NAGELHUS; OTTERSEN, 2013) e no tamponamento de potássio (BENGA; HUBER, 2012) devido à sua colocalização com o canal de potássio 4.1 (Kir4.1) (AMIRY-MOGHADDAM et al., 2003).

Em geral, poucos estudos abordam alterações de barreiras neurais e de canais de água no contexto do TEA. Em relação a alterações de permeabilidade encefálica, animais do modelo VPA apresentaram (macroscopicamente) maior permeabilidade da BHE ao corante azul de Evans no cerebelo (KUMAR; SHARMA; SHARMA, 2015; KUMAR; SHARMA, 2016a, 2016b). Em relação às AQP, foi demonstrado diminuição na expressão de AQP4 no cerebelo *post mortem* de indivíduos com o transtorno (FATEMI et al., 2008), ao passo que outro estudo demonstrou não haver alterações nos níveis séricos da mesma proteína em pacientes com TEA (KALRA et al., 2015).

1.5. Alterações neuroimunológicas

Existem várias maneiras pelas quais o ambiente gestacional pode afetar o neurodesenvolvimento da criança, incluindo a AIM, um dos fatores relacionados ao desencadeamento de TEA (MELTZER; VAN DE WATER, 2017). Já foi demonstrado aumento de citocinas pró-inflamatórias na prole de modelos animais de AIM (CHOI et al., 2016), associação entre anticorpos anti-fetais na mãe e déficits relacionados ao TEA na criança (BRAUNSCHWEIG et al., 2012; WARREN et al., 1990), além de autoimunorreatividade intensa (WILLS et al., 2009; ZIMMERMAN et al., 2007) principalmente às células progenitoras neuronais (MAZUR-KOLECKA et al., 2014).

Mais recentemente, diversos estudos têm mostrado uma associação entre os membros da família do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*) e a incidência de TEA (AL-HAKBANY; AWADALLAH; AL-AYADHI, 2014; CHIEN et al., 2012; GUERINI et al., 2015; MOSTAFA; SHEHAB; AL-AYADHI, 2013; TORRES; WESTOVER; ROSENSPIRE, 2012). Ademais, a partir de estudos de

associação ampla do genoma (GWAS, do inglês *genome wide association studies*), foi observada a regulação positiva de diversos genes enriquecidos para funções de resposta imunológica e inflamatória, domínios de imunoglobulina e outras ontologias imunorreguladoras em amostras de pacientes com TEA (GARBETT et al., 2008; GREGG et al., 2008; LINTAS; SACCO; PERSICO, 2012; VOINEAGU et al., 2011).

O desequilíbrio imunológico pós-natal é amplamente descrito e uma marca registrada no TEA (GOTTFRIED et al., 2015). Há relatos de neuroinflamação encefálica (VARGAS et al., 2005), diminuição de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (MOSTAFA; AL SHEHAB; FOUAD, 2010), resposta diferencial de monócitos (ENSTROM et al., 2010) e de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) (ASHWOOD et al., 2011c) isolados de pacientes sob estímulo em cultivos celulares, alteração na expressão de células T em modelos animais (PONZIO et al., 2007), redução na atividade de células NK (WARREN; FOSTER; MARGARETTEN, 1987) – mas não na contagem geral (DELISI et al., 1983), maior expressão de genes de citotoxicidade NK (ENSTROM et al., 2009) e expressão diferencial de células NK CD57⁺CD3⁻ (SINISCALCO et al., 2016).

Também são reportados aumentos tanto nos níveis de citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-13 em PBMCs após estímulo (KRAKOWIAK et al., 2017; MOLLOY et al., 2006) quanto pró-inflamatórias: 1) em sangue, IL-1RA, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40, IL-17, IFN- γ , GM-CSF (AL-AYADHI; MOSTAFA, 2012; ASHWOOD et al., 2011b; CROONENBERGHS et al., 2002), quimiocinas MCP-1, RANTES e eotaxina (ASHWOOD et al., 2011a); 2) tecido cerebral, IL-6, GM-CSF, TNF- α , MCP-1, TGF- β (LI et al., 2009; VARGAS et al., 2005); 3) PBMCs, TNF- α , IFN- γ e IL-17 (AKINTUNDE et al., 2015; JYONOUCHI et al., 2005; JYONOUCHI; SUN; ITOKAZU, 2002).

Considerando a etiologia desconhecida do TEA, ao longo dos anos, diversos estudos têm proposto que alterações em vias biológicas específicas – principalmente associadas ao sistema imunológico – teriam relação com alguns dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse transtorno. Nesse contexto, o sistema purinérgico emerge como forte candidato para modulação fenotípica. Por exemplo, camundongos nocaute para o receptor A1A apresentaram aumento de neuroinflamação e a atividade microglial (SYNOWITZ et al., 2006) ao passo que o receptor A2A tem função anti-inflamatória e pode ser regulado negativamente pelo microRNA (miR) miR-214, que promove a liberação das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-6 (ZHAO et al., 2015a).

Além disso, a microglia desempenha um papel crucial na neuroinflamação, tanto promovendo a vigilância necessária para manter a homeostase do SNC quanto espalhando ainda mais a inflamação quando ativada, facilitando o afrouxamento da BHE, permitindo infiltrado inflamatório da periferia em direção ao SNC. De qualquer forma, é um elemento suscetível à modulação da sinalização purinérgica (FUMAGALLI; LECCA; ABBRACCHIO, 2011), uma vez que durante eventos lesivos, há grande liberação de ATP local e consequente ativação de microglia residente por meio de receptores purinérgicos (MELANI et al., 2005), principalmente o P2X7 que é capaz de aumentar as respostas inflamatórias generalizadas, principalmente pela liberação de IL-1 β (FERRARI et al., 1997; GRAHAMES et al., 1999), bem como promover liberação de fatores neurotróficos (SUZUKI et al., 2004). O ATP liberado e a ativação de P2X7 também são capazes de ativar os astrócitos, mediando a sinalização para a síntese de citocinas pró-inflamatórias (SOLLE et al., 2001) e neurotransmissores como o glutamato (DUAN et al., 2003), diminuindo sua captação e reduzindo a atividade da GS (LO et al., 2008).

No contexto do TEA, poucos estudos descrevem a modulação inflamatória mediada pela sinalização purinérgica. O tratamento de camundongos BTBR com um antagonista do receptor A2A aumentou a expressão de GATA3, T-bet (AHMAD et al., 2017b) e ROR γ t, diminuindo Foxp3 e IL-10 (ANSARI et al., 2017b) modulou a expressão de receptores *toll-like* (AHMAD et al., 2017a), promoveu a expressão de quimiocinas (AHMAD et al., 2018b), aumentou a resposta Th1, diminuiu a resposta Th2, aumentando também os níveis de citocinas pró-inflamatórias (ANSARI et al., 2017a). Esses dados demonstram o importante papel anti-inflamatório do receptor A2A, uma vez que a inibição da ligação de adenosina via antagonismo foi capaz de replicar déficits comumente descritos no TEA.

1.6. Resveratrol

Considerando o contexto neuroimunológico envolvido no TEA, moléculas com efeito anti-inflamatório emergem como potenciais alvos de estudo para compreensão de vias biológicas envolvendo ativação imunológica que possam estar relacionadas com a fisiopatologia do TEA, bem como para novas estratégias farmacológicas em pacientes diagnosticados com o transtorno. Nesse sentido, os polifenóis –

especialmente o *trans*-resveratrol (RSV, 3,4',5-triidroxiestilbeno) – vêm ganhando cada vez mais atenção da comunidade científica.

O RSV é um polifenol da família dos estilbenos encontrado naturalmente em pinhas, amendoins, casca da uva (consequentemente, no vinho tinto), entre outros (KOUSHKI et al., 2018). Os efeitos protetores e terapêuticos da utilização do RSV como nutracêutico têm sido descritos em diversas patologias, incluindo câncer, obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e neurais (SHAYGANFARD, 2020; VANG et al., 2011). Além disso, também são amplamente descritos e revisados seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores (MENG et al., 2021; QUINCOZES-SANTOS; GOTTFRIED, 2011; VANG et al., 2011; ZHANG et al., 2021).

Vang e colaboradores (VANG et al., 2011), em uma robusta revisão da literatura, descrevem amplamente os mais diversos papéis modulatórios do RSV, tais como proliferação celular, apoptose e danos ao DNA, angiogênese, atividade mitocondrial, metabolismo do glutamato, entre outros. Têm sido propostos diversos mecanismos por meio dos quais o RSV provavelmente desempenha seu papel protetor, envolvendo principalmente modulação de processos inflamatórios, transcrição gênica e sinalização celular (SHAYGANFARD, 2020). Sabe-se que o RSV é capaz de contrapor os efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes observados em modelos animais de diversas condições patológicas, como obesidade, diabetes e hipertensão, diminuindo os níveis de TNF α , IL-1 β , IL-6, proteína quimioatrativa para monócitos 1 (MCP-1) e óxido nítrico sintase (iNOS) (VANG et al., 2011). Além disso, o efeito supressor da inflamação já foi associado tanto com a inibição da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (BAUR; SINCLAIR, 2006), quanto com a ativação do supressor da sinalização de citocina 1 (SOCS-1) (MALHOTRA; BATH; ELBARBRY, 2015). Também foi relatada a atuação inibitória da proteína p53 (processo relacionado a sobrevivência celular) provavelmente devido ao (bem descrito) papel do RSV na ativação da SIRT1 (BAUR; SINCLAIR, 2006; MALHOTRA; BATH; ELBARBRY, 2015), um membro da família de HDACs. Ainda, o RSV também promove a diferenciação de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain derived neurotrophic factor*) (MALHOTRA; BATH; ELBARBRY, 2015).

No contexto do TEA, nosso grupo de pesquisa é pioneiro na utilização do RSV como estratégia terapêutica. Demonstramos que o tratamento pré-natal com RSV entre os dias embrionários (E) E6,5 e E18,5 foi capaz de prevenir os déficits de

sociabilidade na prole (BAMBINI-JUNIOR et al., 2014; HIRSCH et al., 2018), além de alterações sensoriais, celulares (FONTES-DUTRA et al., 2018; SANTOS-TERRA et al., 2021) e moleculares (HIRSCH et al., 2018). Ainda em modelos animais de TEA, também já foi demonstrado que o RSV é capaz de contrapor a desregulação do receptor de estrogênio β (ER β) (XIE et al., 2018), aumentar a expressão gênica de SIRT1 e do fator de resposta de crescimento precoce 3 (Egr3, do inglês *early growth response factor 3*) na amígdala dos camundongos (HIDEMA et al., 2020), agindo principalmente em animais machos (JUYBARI et al., 2020), além de suprimir neuroinflamação (BHANDARI; KUHAD, 2017), atenuar citocinas pró-inflamatórias e ativação de JAK1-STAT3 (AHMAD et al., 2018c), atenuar a expressão de receptores de quimiocinas (BAKHEET et al., 2016), inibir receptores *toll-like* neuronais e sinalização por COX-2 (AHMAD et al., 2018a) e melhorar a desregulação da sinalização de células Treg e respostas Th1, Th2 e Th17 (BAKHEET et al., 2017) em modelo genético BTBR.

Além disso, recentemente, demonstramos que o uso de RSV em crianças diagnosticadas com TEA foi capaz de reduzir os índices de irritabilidade medidos pela lista de verificação de comportamento aberrante (ABC, do inglês *aberrant behavior checklist*), favorecendo, assim, a melhora na sociabilidade (MARCHEZAN *et al.*, *manuscrito submetido*). Outros estudos mostram que fibroblastos de pacientes com aumento nas concentrações de acil-carnitina e comprometimento da β -oxidação do ácido graxo mitocondrial também responderam satisfatoriamente ao tratamento com RSV, sendo a melhora proporcional ao nível de comprometimento dos pacientes na escala de responsividade social (BARONE et al., 2021). Dessa forma, nosso conjunto de dados prévios evidencia o papel terapêutico do RSV enquanto ferramenta de estudo em múltiplos contextos biológicos envolvendo a pesquisa acerca do TEA, bem como lança luz na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos tanto no gatilho e manutenção do TEA quanto na prevenção promovida pelo RSV.

1.7. Justificativa e hipóteses

O TEA, inicialmente descrito na década de 20, atrai cada vez mais atenção da comunidade científica devido à sua incidência crescente. Apesar do aumento exponencial nos estudos acerca desse transtorno nos últimos anos, sua etiologia ainda permanece um quebra-cabeças longe de ser solucionado. Nesse sentido, os

modelos animais emergem como importantes ferramentas de estudo, especialmente no caso de transtornos como o TEA cujo diagnóstico é exclusivamente pela análise de alterações comportamentais.

Além da sintomatologia central necessária para o diagnóstico, os pacientes com TEA podem apresentar condições associadas, como aumento do perímetro cefálico. Sabe-se que o TEA possui um forte componente neuroimunológico na sua fisiopatologia, o que pode estar por trás das alterações comportamentais, bem como pode ter associação com disfunções de barreiras neurais. Assim, a hipótese é que a AIM durante o período embrionário não só contribua para o fenótipo do tipo autista, como também resulte em disfunções de barreiras neurais por meio da desorganização cortical, aumento da permeabilidade da BHE, entrada de infiltrado inflamatório da periferia em direção ao SNC, alteração no perfil de células neurais, bem como utilize mecanismos subjacentes para a manutenção e progressão desse *status* neuroinflamatório, como a sinalização purinérgica.

Dessa forma, considerando:

- O relato de macrocefalia em pacientes pediátricos com TEA, bem como o amplo histórico de neuroinflamação envolvendo esse transtorno;
- A excelente translacionalidade do modelo VPA, uma vez que preenche os quesitos das validades de face e construto e possui valor preditivo;
- Os importantes efeitos preventivos do RSV no contexto do TEA, prevenindo comportamentos do tipo autista, alterações celulares e moleculares;
- A associação de alterações pontuais na sinalização purinérgica e outras rotas metabólicas com o desencadeamento e a manutenção do TEA.

A presente tese visou avaliar a integridade de barreiras neurais no modelo VPA, bem como revisar as publicações existentes na literatura acerca do componente neuroinflamatório presente no TEA e da contribuição da sinalização purinérgica nesse contexto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a integridade de barreiras neurais e seus mecanismos subjacentes em um modelo animal de TEA pela exposição pré-natal ao VPA, bem como o possível efeito preventivo da administração pré-natal do RSV sobre os mesmos parâmetros propostos, além de revisar a contribuição da sinalização purinérgica no TEA.

2.2. Objetivos específicos

- Capítulo I: avaliação das barreiras neurais e mecanismos subjacentes em modelo animal de TEA
 - Avaliar o conteúdo encefálico de água (medida de edema);
 - Analisar a integridade da barreira hematoencefálica;
 - Analisar a expressão e distribuição das aquaporinas 1 e 4 em diferentes regiões do SNC;
 - Analisar parâmetros astrocíticos.
- Capítulo II: revisão do estudo do componente neuroinflamatório presente no TEA
 - Realizar um levantamento das principais alterações neuroimunológicas descritas tanto em modelos animais quanto em pacientes com TEA;
 - Revisar os mecanismos envolvidos no contexto imunológico no desencadeamento do fenótipo autista a partir da exposição ao fator de risco VPA;
 - Estudar as vias comuns translacionais envolvendo as alterações imunológicas descritas em humanos e animais.
- Capítulo III: revisão do estudo sobre o envolvimento da sinalização purinérgica no TEA
 - Entender como o sistema purinérgico está envolvido na fisiopatologia do TEA;
 - Revisar as estratégias terapêuticas propostas que se utilizam dessa sinalização como mecanismo para modulação dos comportamentos do tipo autista.

PARTE II

Capítulo I: artigo publicado.

“Resveratrol prevents brain edema, blood–brain barrier permeability, and altered aquaporin profile in autism animal model”

International Journal of Developmental Neuroscience, 81(7), 579–604 (2021).

DOI: <https://doi.org/10.1002/jdn.10137>

**RESVERATROL PREVENTS BRAIN EDEMA, BLOOD-BRAIN BARRIER
PERMEABILITY AND ALTERED AQUAPORIN PROFILE IN AUTISM ANIMAL
MODEL**

Iohanna Deckmann^{a,b,c,d,#}, Júlio Santos-Terra^{a,b,c,d}, Mellanie Fontes-Dutra^{a,b,c,d},
Marília Körbes-Rockenbach^{a,b,c}, Guilherme Bauer-Negrini^{a,b,c,d}, Gustavo Brum
Schwingel^{a,b,c,d}, Rudimar Riesgo^{a,c,d,e}, Victorio Bambini-Junior^{a,c,d,f}, Carmem Gottfried^{a,b,c,d}

a Translational Research Group in Autism Spectrum Disorder - GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

b Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

c National Institute of Science and Technology in Neuroimmunomodulation - INCT-NIM, Brazil.

d Autism Wellbeing and Research Development - AWARD - Initiative BR-UK-CA

e Department of Pediatrics, Child Neurology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

f School of Pharmacology and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire, Preston, UK.

#ORCID ID: 0000-0002-6423-1938

Corresponding authors:

ID (iohanna.deckmann@gmail.com) and CG (cgottfried@ufrgs.br)

Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2600 – 21111. CEP: 90035-003 Porto Alegre-RS, Brazil.

Co-author e-mail address:

ID (iohanna.deckmann@gmail.com); JS-T (juliosterra@gmail.com); MF-D (dutra.mellanie@gmail.com); MK-R (mariliakrockenbach@gmail.com); GB-N (negrini.guilherme@gmail.com); GBS (brumschwingel@gmail.com); RR (riesgo@hcpa.edu.br); VB-J (VBambini-Junior@uclan.ac.uk); CG (cgottfried@ufrgs.br).

Funding statement: This work was supported by Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neuroimunomodulação (INCT-NIM #465489/2014-1), Rio de Janeiro, Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA #13-0047). We would also like to thank Fluxome (Stenløse, Denmark) for the generous gift of *trans*-resveratrol.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Data availability statement: "Research data are not shared."

Ethical statement: All procedures were approved by the local Ethics Commission on the Use of Animals (CEUA-UFRGS 36229) and performed according to ethical principles in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, as well as Brazilian Arouca Law (11,794, of October 8, 2008).

Author contributions: ID, JS-T, MF-D, MK-R, GB-N, GBS, RR, VB-J and CG: experimental design and intellectual contribution. RR, VB-J and CG: acquisition of financial resources. ID, GB-N and GBS: edema and Evans blue analyses. ID, JS-T, MF-D and MK-R: immunofluorescence and western blotting analyses. ID, JS-T, MF-D, VB-J and CG: data discussion and manuscript preparation.

Abbreviations: aCC: anterior cingulate cortex (in the medial prefrontal cortex); AmR: amygdala region; AQP: aquaporin; ASD: autism spectrum disorder; BBB: blood-brain barrier; CA: cornu ammonis (CA1-CA3, in the hippocampus); CNS: central nervous system; GFAP: glial fibrillary acidic protein; IL: infralimbic cortex (in the medial prefrontal cortex); MIA: maternal immune activation; mPFC: medial prefrontal cortex; PrL: prelimbic cortex (in the medial prefrontal cortex); pSSA: primary somatosensory area; RSV: resveratrol; VPA: valproic acid.

Highlights:

- Autism Spectrum Disorder (ASD) is hallmarked by neuroimmune background;

- ASD animal model replicates the greater brain volume described in ASD patients;
- Resveratrol (RSV) prevents blood-brain barrier alterations and edema formation;
- RSV restore AQP4 levels to control levels;
- RSV promotes a functional amelioration in astrocytes.

Abstract

Autism Spectrum Disorder can present a plethora of clinical conditions associated with the disorder, such as greater brain volume in the first years of life in a significant percentage of patients. We aimed to evaluate the brain water content, the blood-brain barrier permeability, and the expression of aquaporin 1 and 4, and GFAP in a valproic acid-animal model, assessing the effect of resveratrol. On postnatal day 30, Wistar rats of the valproic acid group showed greater permeability of the blood-brain barrier to the Evans blue dye and a higher proportion of brain water volume, prevented both by resveratrol. Prenatal exposition to valproic acid diminished aquaporin 1 in the choroid plexus, in the primary somatosensory area, in the amygdala region and in the medial prefrontal cortex, reduced aquaporin 4 in medial prefrontal cortex and increased aquaporin 4 levels in primary somatosensory area (with resveratrol prevention). Valproic acid exposition also increased the number of astrocytes and GFAP fluorescence in both primary somatosensory area and medial prefrontal cortex. In medial prefrontal cortex, resveratrol prevented the increased fluorescence. Finally, there was an effect of resveratrol *per se* on the number of astrocytes and GFAP fluorescence in the amygdala region and in the hippocampus. Thus, this work demonstrates significant changes in blood-brain barrier permeability, edema formation, distribution of aquaporin 1 and 4, in addition to astrocytes profile in the animal model of autism, as well as the use of resveratrol as a tool to investigate the mechanisms involved in the pathophysiology of Autism Spectrum Disorder.

Keywords: Autism spectrum disorder. Valproic acid. Resveratrol. Water content. Blood-brain barrier. Aquaporin.

1. INTRODUCTION

Autism Spectrum Disorder (ASD) was first characterized in the 1920s by the Russian psychiatrist Grunya Sukharewa, who described 6 children with autistic characteristics (Ssucharewa, 1926; Zeldovich, 2018). Currently, ASD is a highly prevalent neurodevelopmental disorder characterized by 1) deficits in communication and social interaction and 2) the presence of repetitive behaviors and restricted interests/activities (APA, 2013), affecting 1:54 children up to 8 years old in the USA (Maenner et al., 2020).

Despite research advances on this disorder, the etiology of ASD remains unknown. However, epidemiological observations suggest that environmental factors, such as valproic acid (VPA), are closely related to the onset of ASD (Christensen et al., 2013; Rouillet et al., 2013; Smith & Brown, 2014). Besides the core symptoms, several conditions associated with ASD are described, including greater brain volume in the first years of life (Aylward et al., 2002) affecting around 20% of ASD patients (Sacco et al., 2015).

For a long time, it was hypothesized that the Central Nervous System (CNS) was an immunologically privileged location (Tambur & Roitberg, 2005) due to blood-brain barrier (BBB), a selective barrier composed, among others, by astrocytes (Abbott, 2013). Several studies relate astrocytic dysfunctions to psychiatric disorders, including ASD (Mony et al., 2016; Zeidán-Chuliá et al., 2014). Increased reactive gliosis, proliferation of glial cells in the brain of ASD individuals (Petrelli et al., 2016) as well as the association between ASD and genes related to the activation of glia and the immune system (Voineagu et al., 2011), stressing the role of astrocytes in ASD and in BBB impairments.

Besides astrocytes, the BBB's dynamic can be affected by the water channels aquaporins (AQP). AQP1 is expressed mainly in the apical membrane of the choroid plexus (involved in the production of cerebrospinal fluid), in addition to glial membranes, astrocytes and ependymal cells (Benga & Huber, 2012; Oshio et al., 2003). On the other hand, AQP4 is the most common water channel in the CNS, present in greater quantity in terminal feet of astrocytes that surround blood vessels (essential constituent of BBB) (Nagelhus & Ottersen, 2013; Papadopoulos & Verkman, 2007; Xiao & Hu, 2014), playing an important role in removing water from the cerebral parenchyma, in addition to assisting the potassium buffering (Benga & Huber, 2012).

Few studies have been conducted related to BBB and AQP alteration in ASD individuals, indicating decreased cerebellar AQP4 (*postmortem*) (Fatemi et al., 2008), and no alteration in serum (Kalra et al., 2015), as well as a huge cerebellar permeability in the VPA-animal model of ASD (Kumar & Sharma, 2016b, 2016a; Kumar et al., 2015). Considering the increased brain volume and the possible impairment of neural barrier systems, as well as the pro-inflammatory and pro-oxidant processes already observed in ASD individuals, molecules with antioxidant and anti-inflammatory properties become important targets for the study of neuroprotective mechanisms in ASD.

The *trans*-resveratrol (RSV, 3,5,4'-trihydroxystilbene) is a naturally occurring polyphenolic compound present in grapes, peanuts and red wine, having several biological effects (Frémont, 2000; Vang et al., 2011). Several studies emphasizing the protective and therapeutic roles of RSV in several pathologies (Berman et al., 2017; Koushki et al., 2020), highlighting the anti-inflammatory (J.-A. Lee et al., 2015; Sánchez-Fidalgo et al., 2010), antioxidant (Mohammadshahi et al., 2014) and neuroprotective effects (Quincozes-Santos & Gottfried, 2011; Tang, 2010) of RSV.

Our research group have been demonstrated the preventive effect of prenatal treatment with RSV in sociability and sensory deficits in the offspring of VPA-animal model (Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018), as well as in microRNA levels (Hirsch et al., 2018). These results enable the use of RSV as both a reliable method for understanding the pathophysiology of ASD and an assisting tool in the study of biological routes and structures involved in its etiology.

The mechanisms that mediate the brain volume dynamics are largely unknown; thus, we proposed an investigation of factors possibly associated with the formation of brain edema in ASD in an animal model of autism. Thus, we aimed to evaluate the proportion of brain fluid volume, the BBB permeability, as well as to analyze AQP 1 and 4 and GFAP+ astrocytes in 30-day-old animals of the animal model of autism induced by prenatal exposure to VPA, evaluating the possible therapeutic effect of RSV.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURE

2.1 Animals

Wistar rats from the Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals (CREAL-UFRGS) of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) were used, kept in standard animal facilities conditions, with food and water *ad libitum*,

light/dark cycle 12 hours, constant temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and a maximum of four animals per housing box. All procedures were approved by the local Ethics Commission on the Use of Animals (CEUA-UFRGS 36229) and performed according to ethical principles in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, as well as Brazilian Arouca Law (11,794, of October 8, 2008).

The animals' euthanasia procedure followed the Euthanasia Practice Guidelines of the National Council for Animal Experimentation Control (Normative Resolution N. 13, 2013). Euthanasia was performed by anesthetic overdose with ketamine and xilasine, supplied in concentrations three times higher (300 mg/kg and 40 mg/kg, respectively) than the concentration required to obtain an anesthetic-surgical plan.

2.2 Animal model and RSV treatment

The animals were mated overnight and, in the next morning, the presence of sperm was verified in the vaginal canal of the females; when fertilization was confirmed, the embryonic day 0.5 (E0.5) was determined. From E6.5 to E18.5, pregnant rats received RSV (trans-resveratrol, Fluxome, Stenløse, Denmark - 3.6 mg/kg) or dimethylsulfoxide (DMSO P.A. - vehicle, equivalent volume of RSV injection in a proportion 1:1 of DMSO and saline) subcutaneously. At E12.5, pregnant rats received a single injection of VPA (sodium valproate, Sigma-Aldrich, USA - 600mg/kg) or saline solution (0.9% - vehicle) via intraperitoneal (i.p.), as previously described (Bambini-Junior et al., 2014). On postnatal day 21 (P21), the litter was weaned and, at P30, male rats were euthanized by anesthetic overdose. The total number of animals used in the study was 24 control, 28 RSV, 25 VPA, and 22 RSV+VPA divided randomly among experiments, generated from the following number of dams: 5 control, 7 RSV, 14 VPA, and 12 RSV+VPA. As we use a maximum of 1 male from the same litter in each group, the excess offspring per litter was destined to other projects in the lab). The litters were randomly divided so that sibling animals were not part of the same experiment (n of animals is n of litters). The loss rate for the VPA groups was 50% in this protocol.

2.3 Tissue preparation and analysis

2.3.1 Brain water content

Immediately after the euthanasia, the brains were removed, weighed, and placed in a drying oven at 60°C . After 72h, brains were reweighed and the brain water

content was measured considering the difference between wet tissue weight (w) and dry weight (d) (Wei et al., 2015). We considered the animal body weight since the animals prenatally VPA-exposed presented lower body weight throughout the development as described by Schneider et al., 2005 (Schneider & Przewłocki, 2005) as follows: $\{[(\text{wet weight} - \text{dry weight})/\text{wet weight}] \times 100/\text{animal body weight}\}$.

2.3.2 Evans blue dye permeability

The animals were injected via i.p. with Evans blue 2% solution (4 mg/kg) diluted in saline solution 0,9% (Kumar et al., 2015) and, after 2 hours, were anesthetized and subjected to transcardiac perfusion with saline solution and 4% paraformaldehyde. The brain was removed, post-fixed in 4% paraformaldehyde and preserved in sucrose (15% and 30%). The tissues were kept in an ultrafreezer (-80°C) until coronal slices (25 µm) were made in cryostat (Leica Microsystems). The brain coordinates following Paxinos Atlas (5th edition): bregma 3.72/3.24 (medial prefrontal cortex - mPFC) and -2.92/-3.00 (primary somatosensory area - pSSA, amygdala region - AmR, hippocampus and choroid plexus).

The slices were also incubated with DAPI solution for marking nuclei (diluted in 1:10,000 in saline solution 0.9%) for 10 minutes, followed by 5 washes with 0.1 M pH 7.4 PBS (3 minutes each) and adding the Fluoshield® mounting medium and the coverslip. The images were obtained in a 20x magnification using a confocal microscope (Olympus FV1000 – Olympus FluoView 4.0 Viewer) at the Center for Microscopy and Microanalysis (CMM-UFRGS) and the fluorescence was analyzed using the ImageJ® software.

2.3.3 Immunofluorescence

After anesthesia, the animals were euthanized by transcardiac perfusion with saline solution 0.9% and 4% paraformaldehyde, the brain was removed, preserved and cut as already described.

The technique was performed according to a previous protocol (Fontes-Dutra et al., 2018) and followed the following steps: 1) tissue permeabilization with PBS-Triton 0.1% or 0.3% (according to primary antibody); 2) 3 washes with PBS; 3) blocking with PBS-Triton 0.1% (or 0.3%) containing 5% bovine serum albumin (BSA); 4) incubation with primary antibodies for 48h at 4°C in PBS-Triton 0.1% (or 0.3%) BSA 1% solution; 5) 5 washes with PBS buffer; 6) incubation with secondary antibodies for

2 hours at room temperature; 7) 5 washes with PBS; 8) incubation with DAPI solution (1:10,000 - 10 minutes); 9) 5 washes with PBS followed by addition of Fluoshield® mounting medium and coverslip. The images were obtained as previously described. Two trained researchers did manual analysis of both fluorescence distribution and cell counting in the brain regions and subregions, blinded for the experimental groups, using the ImageJ® software.

All primary antibodies were chosen according to the previous data from references cited in the manufacturer datasheets. All reagent information were detailed in Supplementary Table 1. Representative images of the AQP1 and AQP4 labeling can be seen in Supplementary Figure 1 and Supplementary Figure 2, respectively.

2.3.4 Western blotting

Following to the euthanasia, the brain was removed and the mPFC, pSSA, AmR and hippocampus were dissected.

The samples were homogenized in a buffer containing protease inhibitor, 10% SDS, EDTA 100 mM, TRIS/HCl buffer 500 mM pH 8. The total proteins were quantified by the Lowry method (Lowry et al., 1951) and the samples prepared in a buffer containing glycerol, bromophenol blue, TRIS/HCl buffer and β -mercaptoethanol. 40 μ g of protein was applied in 10% polyacrylamide gel, separated by one-dimensional electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes for the detection of the AQP1 and AQP4 immunocontents. The membranes were blocked in 5% BSA dissolved in a pH 7.5 TRIS buffer (TBS) with 0.1% Tween-20 (TTBS) and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies.

After incubation, the membranes were washed with TTBS and incubated with secondary antibodies, followed by 3 washes. The substrate SuperSignal® West Pico (Thermo Fisher Scientific) was used on the membranes and the chemiluminescent signal was detected using ImageQuant™ LAS 4000 (GE HealthCare Life Sciences). The quantification of the relative immunocontent was performed with the ImageJ software (v. 1.51) and the data was normalized by the housekeeping protein β -actin. All reagent information were detailed in Supplementary Table 1.

2.4 Statistical analysis

The data were analyzed using the IBM SPSS Statistics 20 program (IBM SPSS, Armonk, NY, USA). Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests of normality were

applied to determine data distribution. The data of "edema" and "BBB permeability to Evans blue dye" had a non-normal distribution; therefore, a non-parametric test was performed for independent samples (Kruskal-Wallis). Immunofluorescence and western blotting data showed normal data distribution, using the two-way ANOVA test followed by Sidak's post-test. When there was an interaction effect, pairwise comparison was analyzed in the post hoc; when there was no effect, the effect of exposure to factors (VPA or RSV) was analyzed.

The graphs were made using the GraphPad Prism 6 program. Data were reported as median \pm interquartile range (IQR) for the non-parametric test and mean \pm standard deviation for the parametric test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Prenatal administration of RSV prevents the alterations induced by prenatal exposure to VPA in body weight and in proportional brain water content at P30

Prenatal exposure to VPA increased brain water content ($p = 0.003$, Figure 1A), decreased body weight ($p = 0.001$, Figure 1B) and increased proportion of brain fluid ($p = 0.002$, Figure 1C). In this experiment, prenatal treatment with RSV was able to prevent these alterations. Detailed statistics are shown in Table 1.

3.2. Prenatal administration of RSV prevents the increased BBB permeability induced by VPA at P30

The VPA group had increased BBB permeability to Evans blue dye (representative images in Figure 2) in the choroid plexus ($p = 0.009$), in the pSSA, both in layers II/III ($p = 0.004$) and IV/V ($p = 0.005$), in subregions of the mPFC when compared to the control and/or RSV group) anterior cingulate cortex (aCC) (II/III: $p = 0.001$; IV/V: $p = 0.013$); 2) prelimbic cortex (PrL) (II/III: $p = 0.019$; IV/V: $p = 0.022$); and 3) infralimbic cortex (IL) (II/III: $p = 0.028$; IV/V: $p = 0.016$). RSV was able to prevent the permeability alterations in these regions. No significant difference was observed in dye permeability in the hippocampus ($p = 0.134$) or in the AmR ($p = 0.050$). Detailed statistics are shown in Table 2.

3.3. Prenatal exposure to VPA changes choroid plexus morphology and decreases AQP1 distribution at P30

The choroid plexus from both groups exposed to VPA had a huge morphological alteration (indicated by the white arrow in Figure 3A) and decreased AQP1 labeling (Figure 3A-3B, control: 1244 ± 279.3 ; RSV: 1053 ± 131.9 ; VPA: 867.1 ± 76.11 ; RSV+VPA: 798.6 ± 221.3 ; $F(3, 16) = 5.345$, $p_{VPA} = 0.0022$). These alterations were not prevented by RSV.

3.4. Prenatal administration of RSV prevents the VPA-induced increase in AQP4-immunocontent and distribution in pSSA at P30.

Prenatal exposure to VPA decreased AQP1 content in pSSA (Figure 4A, Control: 1.594 ± 0.073 ; RSV: 1.342 ± 0.210 ; VPA: 1.148 ± 0.180 ; RSV+VPA: 0.834 ± 0.185 ; $F(1, 12) = 31.39$; $p_{VPA} = 0.0001$) in deep layers (II/III; $p_{interaction} = 0.9098$; IV/V: $p_{VPA} = 0.0005$) with no preventive effect by RSV (Table 3). Interestingly, the VPA group had increased AQP4 content in pSSA (Figure 4E, control: 1.445 ± 0.0256 ; RSV: 1.086 ± 0.149 ; VPA: 2.391 ± 0.368 ; RSV+VPA: 1.457 ± 0.314 ; $F(1, 12) = 5.128$; $p_{interaction} = 0.0429$) in deep layers (II/III: $p_{interaction} = 0.4255$; IV/V: $p_{interaction} = 0.0011$) with a significant preventive effect of RSV. Detailed statistics of immunofluorescence are shown in Table 3.

3.5. mPFC has decreased levels of both AQP1 and AQP4 induced by prenatal exposure to VPA

Despite no change was observed in the AQP1 immunocontent in mPFC from VPA group (Figure 4C, control: 1.221 ± 0.185 ; RSV: 1.124 ± 0.182 ; VPA: 1.081 ± 0.389 ; RSV+VPA: 0.975 ± 0.195 ; $F(1, 12) = 0.00095$; $p_{interaction} = 0.9759$), both groups exposed prenatally to VPA presented decreased distribution of this protein in all subregions of the mPFC, with no preventive effect of RSV: aCC – layers II/III ($p_{VPA} = 0.0043$) and IV/V ($p_{VPA} = 0.0010$); PrL – layers II/III ($p_{VPA} = 0.0010$) and IV/V ($p_{VPA} < 0.0001$); IL – layers II/III ($p_{VPA} = 0.0009$) and IV/V ($p_{VPA} = 0.0004$) (Table 4).

The VPA group had decreased content of AQP4 (Figure 4G, control: 0.816 ± 0.196 ; RSV: 1.019 ± 0.130 ; VPA: 0.387 ± 0.164 ; RSV+VPA: 0.946 ± 0.507 ; $F(1, 12) = 6.808$; $p_{RSV} = 0.0228$) with decreased distribution of this protein in all subregions of the mPFC: aCC – layers II/III ($p_{interaction} = 0.0421$) and IV/V ($p_{interaction} = 0.0125$); PrL – layers II/III ($p_{interaction} = 0.0449$) and IV/V ($p_{interaction} = 0.0167$); IL – layers II/III ($p_{interaction} = 0.0412$) and IV/V ($p_{interaction} = 0.0171$). Detailed statistics of immunofluorescence are shown in Table 4.

3.6. Intrauterine exposure to VPA induces a decrease in AQP1 in the AmR

Despite no differences were observed in AQP1 immunocontent in the AmR among experimental groups (Figure 4B, Control: 0.918 ± 0.214 ; RSV: 1.089 ± 0.399 ; VPA: 0.871 ± 0.113 ; RSV+VPA: 0.842 ± 0.277 ; $F(1, 12) = 0.6424$; p interaction = 0.4384), both groups that received VPA had decreased distribution of AQP1 (p VPA = 0.0004) (Table 5). No changes were observed in both AQP4 content (Figure 4F, Control: 1.192 ± 0.457 ; RSV: 1.288 ± 0.333 ; VPA: 0.943 ± 0.108 ; RSV+VPA: 1.512 ± 0.521 ; $F(1, 12) = 1.484$; p interaction = 0.2466) and in distribution among groups (p interaction = 0.5988). Detailed statistics of immunofluorescence are shown in Table 5.

3.7. Prenatal exposure to VPA does not alter the expression profile of AQP1 and AQP4 in the hippocampus, but the RSV treatment had a *per se* effect

No changes were observed in the hippocampal content of AQP1 (Figure 4D, Control: 1.031 ± 0.275 ; RSV: 0.927 ± 0.273 ; VPA: 0.941 ± 0.214 ; RSV+VPA: 0.977 ± 0.238 ; $F(1, 12) = 0.3097$; p interaction = 0.5881). However, a *per se* effect of RSV was observed, with decreased AQP1 distribution in dentate gyrus and CA2 region: Dentate gyrus (p RSV = 0.0412); CA1 (p RSV = 0.0518); CA2 (p RSV = 0.0330); CA3 (p RSV = 0.0810) (Table 6).

No changes were observed in both AQP4 content (Figure 4H, Control: 0.533 ± 0.271 ; RSV: 0.422 ± 0.221 ; VPA: 0.291 ± 0.106 ; RSV+VPA: 0.360 ± 0.116 ; $F(1, 12) = 0.8866$; p interaction = 0.365) and distribution among groups: dentate gyrus (p interaction = 0.0387); CA1 (p interaction = 0.0786); CA2 (p interaction = 0.1113); CA3 (p interaction = 0.0490). Detailed statistics of immunofluorescence are shown in Table 6.

3.8 RSV treatment improves the functional but not morphological aspect of astrocytic changes induced by prenatal exposure to VPA

3.8.1 Primary somatosensory area

An increased number of GFAP⁺-astrocytes was observed in layers II/III (p VPA = 0.0038) and in layers IV/V (p VPA = 0.0038) in both groups that were prenatally exposed to VPA (representative image in Figure 5). As expected, this data was

reflected by increased GFAP immunofluorescence per area (II/III: p VPA = 0.0270; IV/V: p RSV = 0.0380). Detailed statistics are shown in Table 7.

3.8.2 Medial prefrontal cortex

This region showed different effects between the upper (II/III) and deeper (IV/V) layers. In upper layers, exposition to VPA increases the number of astrocytes, with no preventive effect of RSV (aCC: p VPA = 0.0135; PrL: p VPA = 0.0269; IL: p VPA = 0.0278), which was reflected in the GFAP immunofluorescence values (aCC: p VPA = 0.0379; PrL: p VPA = 0.0604; IL: p interaction = 0.5621).

In deeper layers, both groups exposed to VPA increased the number of GFAP⁺-astrocytes (aCC: p VPA = 0.0091; PrL: p VPA = 0.0004; IL: p VPA = 0.0018). However, we observed increased GFAP immunofluorescence in the VPA group, with a significantly preventive effect of RSV (aCC: p interaction = 0.0171; PrL: p interaction = 0.2853; IL: p interaction = 0.0455). Detailed statistics are shown in Table 8.

3.8.3 Amygdala region

In this region, we observed a *per se* effect of RSV, with decreased number GFAP⁺-astrocytes (p interaction = 0.0017) and GFAP immunofluorescence (p interaction = 0.0450) in RSV group. Detailed statistics are shown in Table 9.

3.8.4 Hippocampus

Another *per se* effect of RSV was observed in number of GFAP⁺-astrocytes (dentate gyrus: p interaction = 0.0162; CA1: p interaction = 0.1926; CA2: p RSV = 0.0001; CA3: p interaction = 0.0461) and GFAP immunofluorescence values (dentate gyrus: p interaction = 0.0096; CA1: p interaction = 0.0172; CA2: p interaction = 0.0214; CA3: p interaction = 0.0058). Detailed statistics are shown in Table 10.

4. DISCUSSION

A significant percentage of ASD patients presents increased brain volume in the first years of life, followed by an apparent normalization of this volume in late childhood (Aylward et al., 2002; Bartholomeusz et al., 2002; Emerson et al., 2017; Hazlett et al., 2011). Recent evidence in animal models has been highlighting the association of maternal inflammatory processes during critical embryonic development with excessive brain growth and with the triggering of ASD-associated behavior in the

offspring (Le Belle et al., 2014). In fact, maternal immune activation (MIA) contributes to the onset of several neuropsychiatric disorders, including ASD (Estes & McAllister, 2016). Thus, we postulate that the fingerprint caused by prenatal exposure to VPA could involve mechanisms of MIA since animals from VPA-animal model present enhanced levels of IL-1 β , IL-6, and TFN- α in the hippocampus and other brain regions (Deckmann et al., 2018), besides enhanced TFN- α levels and microglial activation after prenatal VPA exposure (Zamberletti et al., 2019).

In the present study, we demonstrated that the prenatal exposure to VPA increased the absolute brain water content, providing a clearer overview of the higher liquid volume in the brain of the VPA group even though the body structure was smaller. The preventive effect of RSV against these changes, in addition to the alterations in the proteins AQP1 and AQP4 according to brain region, opens new clues about the mechanisms associated to the brain volume changes in ASD patients.

The VPA group presented evident BBB permeability in brain regions related to the neocortex: choroid plexus (directly in contact with neocortex), pSSA (layers II/III and IV/V) and all subregions of the mPFC (aCC, PrL and IL, in superficial and deeper layers). In all of these regions, RSV treatment was able to prevent the BBB permeability. BBB damage can be a pivotal event for brain edema development, which could be both initiated and regulated by several pro-inflammatory mediators (among them cytokines and chemokines) that coordinate the extent of leukocyte entry to the brain parenchyma, causing loosening of the tight junctions and vasogenic edema (Stamatovic et al., 2006). RSV, known by its antioxidants and anti-inflammatory properties, could be acting as a neuroprotective molecule in different pathways during embryonic development. In a model of cerebral ischemia-reperfusion, RSV attenuates BBB dysfunctions and reverses the brain water accumulation by the regulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) (Wei et al., 2015). MMP-9 is an enzyme with zinc-dependent proteolytic activity that has the ability to break down collagen IV (which composes basal lamina) and whose increased levels were associated with neurodevelopmental disorders, including ASD (Reinhard et al., 2015). Both VPA and RSV are able to act in an epigenetic way, mainly modulating the histone activity. The histone deacetylase inhibition (HDACi) - an effect of VPA - is able to induce several effects on the BBB stabilization by the deregulation of important transcription factors associated with BBB formation like SOX7, SOX18, TAL1, and ETS1 (Roudnicky et al., 2020), as well as is known to interfere in the immune system, inducing increased

transcription of proinflammatory genes associated with the NFkappaB pathway, for example (Rahman et al., 2004). This is important since inflammatory mediators are known to increase the BBB permeability, leading to an inflammatory infiltrate in the CNS, and are associated with neurodevelopmental disorders, such as ASD. Complementary, VPA-prenatal exposure promotes systemic inflammation, and is known that the maternal immune activation (MIA) animal model is associated with BBB disruption (Simões et al., 2018). The early treatment with RSV (beginning at E6.5) probably reduced BBB alterations by the attenuating HDACi induced by VPA through the activating Sirt and promoting modulations of proteins like MMP9 and TIMP1 (Moussa et al., 2017; Sawda et al., 2017; Wei et al., 2015). Therefore, RSV acts as a stabilizer of the transcription, preventing both BBB cell alterations (directly) and the shift for a proinflammatory status in the immune system (indirectly).

We investigated the expression and distribution of aquaporins, important water channels, in different regions of CNS. These proteins perform several roles, but one of the main ones is to facilitate the movement of water, both in and out of the CNS (Rosu et al., 2019). The VPA group decreased the AQP1 distribution in the choroid plexus, in the deeper layers of pSSA, in the AmR and in all of the subregions of mPFC analyzed. Choroid plexus is crucial given its role in the production and release of CSF and it has been shown that in animals knocked out for AQP1 there was a reduction of up to 25% in the rate of cerebrospinal fluid secretion (Oshio et al., 2003). In addition, a morphological alteration was observed in the insertion of the choroid plexus in the third ventricle. A similar lesion was observed in a model of cerebral ischemic edema (Akdemir et al., 2016), but here in the present study, we do not consider any association between this morphological alteration and the pathophysiology of ASD, which may simply be a teratogenic effect of VPA *per se*.

The VPA group increased the AQP4 content in deeper layers of the pSSA (prevented by RSV) whereas the mPFC presented decreased levels without prevention by the RSV. Alterations on the AQP4 profile in *postmortem* brain tissue of ASD individuals have already been reported (Fatemi et al., 2008), including a discrete reduction in Brodmann area 9 (BA9 - equivalent of the frontal cortex) and an increase in the BA40 (parietal cortex, where is the pSSA). They also showed increased connexin 43 levels (a protein present in astrocytic gap junction) in BA9, representing an increase in neuroglial signaling and an improvement of cell-cell communication in the frontal lobe (an integrative area) (Fatemi et al., 2008). Moreover, AQP4 knockout mice have

reduced brain swelling in cytotoxic edema, whilst there is a significantly worse result in the case of vasogenic brain edema (Papadopoulos & Verkman, 2007). In the VPA model, it is still not elucidated what type of brain edema is present. Lastly, there are findings linking AQP4 with neuroimmune modulation (Ikeshima-Kataoka, 2016), which represents an important clue in the ASD pathophysiology, since the immune component of this disorder is both relevant and well established (Gottfried et al., 2015).

Noteworthy, as there are few studies on the dynamics of AQP1 and AQP4 in ASD, we think it is important to clarify some points. Despite the common sense that AQP4 is more widely expressed in the brain than AQP1, we observed higher fluorescence levels in AQP1 compared to AQP4 in the control groups in some regions (pSSA and AmR). In astrocytes, the distribution of AQP4 is predominantly in the endfeet projections surrounding vessels; however, its brain concentration varies according to region, with higher levels in the cerebellum and lower expression in the hippocampus, diencephalons, and cortex (Hubbard et al., 2015). Undoubtedly, AQP1 is mainly expressed in the choroid plexus; nevertheless, it is also expressed under normal conditions in other brain structures, such as the brain stem, cerebellum, brain cortex, hippocampus, hypothalamus, and olfactory bulb (Li et al., 2020; Qiu et al., 2014). Beyond that, studies demonstrate neuronal localization of AQP1 in mouse cortical slices, as well as increased cortical levels of AQP1 in Alzheimer's disease models. Moreover, this same work also demonstrates that wild-type animals at 60 days old, present higher amounts of AQP1 protein than AQP4 in cortical homogenates (Park et al., 2021). Finally, in the amygdala region, the human protein atlas demonstrates the mRNA expression of AQP1 (The Human Protein Atlas, n.d.). These studies indicate that the concentration and distribution of AQP 1 and 4 vary according to cell type/domain and brain region, which corroborates our present study regarding the brain region.

The increased GFAP-immunofluorescence and number of GFAP⁺-astrocytes in mPFC and pSSA by prenatal exposure to VPA corroborate with previous studies showing neuroglial activation in both ASD patients and animal models (Bristol Silvestrin et al., 2013; Edmonson et al., 2014; Vargas et al., 2005; Zhao et al., 2019). Here, we observed an important preventive effect of RSV in the mPFC, demonstrated in the decrease of GFAP immunofluorescence. Based on previous data, that indicate the neuroprotective effect of lower doses of RSV in hippocampus slices (emphasizing the important role of RSV in improving glutamate uptake by astrocytes and modulate

the synaptic plasticity) (Bobermin et al., 2012; De Almeida et al., 2008; Quincozes-Santos et al., 2013; Quincozes-Santos & Gottfried, 2011), and an improvement in neuroinflammation (an ASD hallmark) in an ASD-animal model (Ahmad et al., 2018; Bhandari & Kuhad, 2017), it would be possible that also in this context, we have a beneficial effect on astrocyte metabolism and function, since this treatment is effective in ameliorates several behavioral impairments in VPA animal model (Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018; Hirsch et al., 2018).

Despite some studies demonstrated no alterations in astrocyte parameters in ASD post mortem tissues (T. T. Lee et al., 2017; Morgan et al., 2014), animal models of fragile X syndrome (a disorder with a high prevalence of ASD) present a specific disruption in the constitution of the deeper layers, besides presenting an increased number of astrocytes (F. Lee et al., 2019). Therefore, alterations in the laminar constitution could influence directly the distribution of astrocytes. The dynamics of cortical disorganization is widely described in ASD. An event like acute neuroinflammation, with increased levels of brain cytokines, may contribute to synaptic reorganization, which results in long-term alterations regarding hyperexcitability of the whole neural circuitry (Clarkson et al., 2017). One of the most relevant findings in patients with ASD is the identification of disturbance in the organization of the minicolumns (Casanova, 2007) and the presence of patches with loss of layer delimitation in the cortex (DeNardo et al., 2015; Stoner et al., 2014), being the deeper cortical layers the most affected.

In hippocampus and AmR, we observed only effects of RSV treatment. A possible explanation for this effect observed in the amygdala region is that the amygdalar nuclei originate at different times between embryonic day E10-E12 in rats, before the induction of the animal model (in E12.5), and during the prenatal treatment with RSV (between E6.5 to E18.5) (Soma et al., 2009). Although the embryonary origin of the hippocampus starting from E15 (Hayashi et al., 2015), the effects of prenatal exposure to VPA seem to be progressive and of late-onset (Santos-Terra, *unpublished observations*). Despite being a molecule with important neuroprotective effects already described, RSV was able to cause changes in the hippocampus at P30. Considering the progressive effect of VPA in adulthood, maybe RSV develops an earlier cellular background to better support the progressive damage induced by VPA.

One of the major theories regarding ASD pathophysiology refers to the electrophysiological changes, mainly the imbalance between excitation and inhibition.

The presence of epilepsy or seizure episodes in approximately 30% of individuals with ASD reinforces the excitatory profile predominant in ASD (Spence & Schneider, 2009). In response to this hyperexcitability and chronic neuroinflammation, might be observed proliferation and hypertrophy of the astrocytes, which acquire a reactive profile (Poskanzer & Molofsky, 2018), due to several roles, including K⁺ buffering. The extracellular K⁺ is critical for defining the resting potential of neurons and astrocyte membranes, and mechanisms for removing this ion from the synaptic cleft are vital to maintaining cerebral homeostasis (Bellot-Saez et al., 2017). One mechanism of K⁺ uptake by glial cells is through the action of internal rectifying channels of K⁺ (Kir) (Olsen et al., 2015). This is particularly important since AQP4 and Kir4.1 are highly overlapping channels in the astrocytic end-feet (Strohschein et al., 2011) and probably AQP4 is required to sustain efficient K⁺ clearance, considering the association of water flux alteration and increasing intensity of epileptic seizures (Amiry-Moghaddam et al., 2003), and a delay in K⁺ buffering in *AQP4*-null mice (Lu et al., 2008).

Considering all data, we hypothesized that the brain impairments induced by the VPA model include a neuroinflammation background triggered in the developing brain of the embryo, which contributes to the increased BBB permeability (and consequently edema due to the entry of water and inflammatory infiltrate). In consequence, there is a decrease in the levels of AQP1 and AQP4 to maintain water homeostasis in the brain. In parallel, neuroinflammation triggers the excitotoxicity process, leading to a reactive astrocytic phenotype. The increased astrocytic activity leads to an increased need for K⁺ buffering, which in turn increases Kir4.1 and, consequently, AQP4 levels in a region-specific manner (which, in turn, could be the main onset to brain edema formation). The fingerprinting caused by VPA happens in multiple regions; since pSSA is a primary processing area, both the impact caused by VPA and the prevention mechanisms by RSV may be more expressive and less complex than those occurring in mPFC, an associative and more complex region. Here, RSV prevents successfully the impairments regarding BBB permeability and the increase of AQP4 in the pSSA, as well as decreases GFAP antibody labeling in the mPFC, indicating a lower glial reactivity. Thereby, based on several shreds of evidence that point to RSV as a stabilizer of the neural environment, RSV could also normalize K⁺ levels and restructure synaptic connections in pSSA considering the co-localization of AQP4 and Kir4.1 channels.

5. CONCLUDING REMARKS

In summary, we demonstrated that prenatal exposure to VPA alters the bodyweight of the animals, as well as induces brain edema, and increases the permeability of BBB. In addition, there was an altered AQP profile in region-dependent in VPA-exposed animals and GFAP augmented expression. RSV was able to prevent important changes in GFAP+ astrocytes and in AQP4 in the pSSA. The neuroprotective role of the RSV in this model shed some light on pathways possibly associated with the alterations induced by VPA along with neuroimmune changes also observed in ASD individuals. Taken together, the present data emphasize the investigation of the mechanisms involved in the neuroimmunological issues as a promising strategy in the understanding of biological pathways in ASD pathophysiology.

REFERENCES

- Abbott, N. J. (2013). Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(3), 437–449. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>
- Ahmad, S. F., Ansari, M. A., Nadeem, A., Bakheet, S. A., Alzahrani, M. Z., Alshammari, M. A., Alanazi, W. A., Alasmari, A. F., & Attia, S. M. (2018). Resveratrol attenuates pro-inflammatory cytokines and activation of JAK1-STAT3 in BTBR T+ Itpr3tf/J autistic mice. *European Journal of Pharmacology*, 829, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.04.008>
- Akdemir, G., Kaymaz, F., GURSOY-ÖZDEMİR, Y., AKALAN, N., & AKDEMİR, E. (2016). The time course changes in expression of aquaporin 4 and aquaporin 1 following global cerebral ischemic edema in rat. *Surgical Neurology International*, 7(1). <https://doi.org/10.4103/2152-7806.173316>
- Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M., Eid, T., De Lanerolle, N. C., Nagelhus, E. A., Adams, M. E., Froehner, S. C., Agre, P., & Ottersen, O. P. (2003). Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: Phenotypic defects in brains of α -syn trophin-null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13615–13620. <https://doi.org/10.1073/pnas.2336064100>
- APA, A. P. A.-. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth*

Edition, DSM-V (Fifth Edit). Washington, DC.

- Aylward, E. H., Minshew, N. J., Field, K., Sparks, B. F., & Singh, N. (2002). Effects of age on brain volume and head circumference in autism. *Neurology*, *59*(2), 175–83.
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., Nogueira Freire, V., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>
- Bartholomeusz, H. H., Courchesne, E., & Karns, C. M. (2002). Relationship Between Head Circumference and Brain Volume in Healthy Normal Toddlers, Children, and Adults. *Neuropediatrics*, *33*, 232–238.
- Bellot-Saez, A., Kékesi, O., Morley, J. W., & Buskila, Y. (2017). Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *77*, 87–97.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2017.03.002>
- Benga, O., & Huber, V. J. (2012). Brain water channel proteins in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.03.008>
- Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., Holz, M. K., & Einstein, A. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *NPJ Precision Oncology*, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0038-6>.The
- Bhandari, R., & Kuhad, A. (2017). Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. *Neurochemistry International*, *103*, 8–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.12.012>
- Bobermin, L. D., Quincozes-Santos, A., Guerra, M. C., Leite, M. C., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., & Gottfried, C. (2012). Resveratrol Prevents Ammonia Toxicity in Astroglial Cells. *PLoS ONE*, *7*(12), 52164.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052164>
- Bristot Silvestrin, R., Bambini-Junior, V., Galland, F., Daniele Bobermim, L., Quincozes- Santos, A., Torres Abib, R., Zanotto, C., Batassini, C., Brolese, G., Gonçalves, C. A., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2013). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.11.048>
- Casanova, M. F. (2007). The Neuropathology of Autism. *Brain Pathology*, *17*(4), 422–433. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00100.x>

- 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*, 1696–1703. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
- Clarkson, B. D. S., Kahoud, R. J., McCarthy, C. B., & Howe, C. L. (2017). Inflammatory cytokine-induced changes in neural network activity measured by waveform analysis of high-content calcium imaging in murine cortical neurons. *Scientific Reports*, 7(1), 9037. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09182-5>
- De Almeida, L. M. V., Piñeiro, C. C., Leite, M. C., Brolese, G., Leal, R. B., Gottfried, C., & Gonçalves, C. A. (2008). Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochemical Research*, 33(1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9399-5>
- Deckmann, I., Schwingel, G. B., Fontes-Dutra, M., Bambini-Junior, V., & 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*, 25(5–6), 285–299. <https://doi.org/10.1159/000492113>
- DeNardo, L. A., Berns, D. S., DeLoach, K., & Luo, L. (2015). Connectivity of mouse somatosensory and prefrontal cortex examined with trans-synaptic tracing. *Nature Neuroscience*, 18(11), 1687–1697. <https://doi.org/10.1038/nn.4131>
- Edmonson, C., Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2014). *Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum*. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-5-3>
- Emerson, R. W., Adams, C., Nishino, T., Hazlett, H. C., Wolff, J. J., Zwaigenbaum, L., Constantino, J. N., Shen, M. D., Swanson, M. R., Elison, J. T., Kandala, S., Estes, A. M., Botteron, K. N., Collins, L., Dager, S. R., Evans, A. C., Gerig, G., Gu, H., McKinstry, R. C., Paterson, S., Schultz, R. T., Styner, M., Schlaggar, B. L., Pruett, J. R., & Piven, J. (2017). Functional neuroimaging of high-risk 6-month-old infants predicts a diagnosis of autism at 24 months of age. *Science Translational Medicine*, 9(393). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag2882>
- 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>
- Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Reutiman, T. J., & Lee, S. (2008). Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects

- with autism. *Synapse*. <https://doi.org/10.1002/syn.20519>
- 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>
- Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, *66*(8), 663–673. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00410-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00410-5)
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., & Savino, W. (2015). The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, *6*, 121. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00121>
- Hayashi, K., Kubo, K. I., Kitazawa, A., & Nakajima, K. (2015). Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus. *Frontiers in Neuroscience*, *9*(APR), 135. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00135>
- Hazlett, H. C., Poe, M., Gerig, G., Styner, M., Chappell, C., Smith, R. G., Vachet, C., & Piven, J. (2011). Early Brain Overgrowth in Autism Associated with an Increase in Cortical Surface Area Before Age 2 years. *Archives of General Psychiatry*, *68*(5), 467–476. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.39.Early>
- Hirsch, M. M., Deckmann, I., Fontes-Dutra, M., Bauer-Negrini, G., Della-Flora Nunes, G., Nunes, W., Rabelo, B., Riesgo, R., Margis, R., Bambini-Junior, V., & Gottfried, C. (2018). Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. *Food and Chemical Toxicology*, *115*(February), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.061>
- Hubbard, J. A., Hsu, M. S., Seldin, M. M., & Binder, D. K. (2015). Expression of the astrocyte water channel aquaporin-4 in the mouse brain. *ASN Neuro*, *7*(5). <https://doi.org/10.1177/1759091415605486>
- Ikeshima-Kataoka, H. (2016). Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(8), 1306. <https://doi.org/10.3390/ijms17081306>
- Kalra, S., Burbelo, P. D., Bayat, A., Ching, K. H., Thurm, A., Iadarola, M. J., & Swedo, S. E. (2015). No evidence of antibodies against GAD65 and other specific antigens in children with autism. *BBACLI*, *4*, 81–84.

<https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.08.001>

- Koushki, M., Lakzaei, M., Khodabandehloo, H., Hosseini, H., Meshkani, R., & Panahi, G. (2020). Therapeutic effect of resveratrol supplementation on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Postgraduate Medical Journal*, *96*(1134), 197–205. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2019-136415>
- Kumar, H., & Sharma, B. (2016a). Memantine ameliorates autistic behavior, biochemistry & blood brain barrier impairments in rats. *Brain Research Bulletin*, *124*, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.013>
- Kumar, H., & Sharma, B. (2016b). Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.052>
- Kumar, H., Sharma, B. M., & Sharma, B. (2015). Benefits of agomelatine in behavioral, neurochemical and blood brain barrier alterations in prenatal valproic acid induced autism spectrum disorder. *Neurochemistry International*. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.10.007>
- Le Belle, J. E., Sperry, J., Ngo, A., Ghochani, Y., Laks, D. R., López-Aranda, M., Silva, A. J., & Kornblum, H. I. (2014). Maternal inflammation contributes to brain overgrowth and autism-associated behaviors through altered redox signaling in stem and progenitor cells. *Stem Cell Reports*, *3*(5), 725–34. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.09.004>
- Lee, F., Lai, T., Su, P., & Liu, F. (2019). Altered cortical Cytoarchitecture in the Fmr1 knockout mouse. *Molecular Brain*, *12*(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0478-8>
- Lee, J.-A., Ha, S. K., Cho, E., & Choi, I. (2015). Resveratrol as a Bioenhancer to Improve Anti-Inflammatory Activities of Apigenin. *Nutrients*, *7*(11), 9650–61. <https://doi.org/10.3390/nu7115485>
- Lee, T. T., Skafidas, E., Dottori, M., Zantomio, D., Pantelis, C., Everall, I., & Chana, G. (2017). No preliminary evidence of differences in astrocyte density within the white matter of the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Molecular Autism*, *8*(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0181-5>
- Li, Q., Aalling, N. N., Förstera, B., Ertürk, A., Nedergaard, M., Møllgård, K., & Xavier, A. L. R. (2020). Aquaporin 1 and the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter 1 are present in the leptomeningeal vasculature of the adult rodent central nervous system.

- Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-0176-z>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–75.
- Lu, D. C., Zhang, H., Zador, Z., & Verkman, A. S. (2008). Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels. *The FASEB Journal*, 22(9), 3216–3223. <https://doi.org/10.1096/fj.07-104836>
- Maenner, M. J., Shaw, K. A., Baio, J., Washington, A., Patrick, M., DiRienzo, M., Christensen, D. L., Wiggins, L. D., Pettygrove, S., Andrews, J. G., Lopez, M., Hudson, A., Baroud, T., Schwenk, Y., White, T., Rosenberg, C. R., Lee, L.-C., Harrington, R. A., Huston, M., Hewitt, A., Esler, A., Hall-Lande, J., Poynter, J. N., Hallas-Muchow, L., Constantino, J. N., Fitzgerald, R. T., Zahorodny, W., Shenouda, J., Daniels, J. L., Warren, Z., Vehorn, A., Salinas, A., Durkin, M. S., & Dietz, P. M. (2020). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. *MMWR. Surveillance Summaries*, 69(4), 1–12. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6904a1>
- Mohammadshahi, M., Haidari, F., & Soufi, F. G. (2014). Chronic resveratrol administration improves diabetic cardiomyopathy in part by reducing oxidative stress. *Cardiology Journal*, 21(1), 39–46. <https://doi.org/10.5603/CJ.a2013.0051>
- Mony, T. J., Lee, J. W., Dreyfus, C., DiCicco-Bloom, E., & Lee, H. J. (2016). Valproic Acid Exposure during Early Postnatal Gliogenesis Leads to Autistic-like Behaviors in Rats. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience : The Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, 14(4), 338–344. <https://doi.org/10.9758/cpn.2016.14.4.338>
- Morgan, J. T., Barger, N., Amaral, D. G., & Schumann, C. M. (2014). Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder. *PLoS ONE*, 9(10), 110356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110356>
- Moussa, C., Hebron, M., Huang, X., Ahn, J., Rissman, R. A., Aisen, P. S., & Turner, R. S. (2017). Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0779-0>
- Nagelhus, E. A., & Ottersen, O. P. (2013). Physiological Roles of Aquaporin-4 in

- Brain. *Physiological Reviews*, 93(4), 1543–1562.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>
- Olsen, M. L., Khakh, B. S., Skatchkov, S. N., Zhou, M., Lee, C. J., & Rouach, N. (2015). New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(41), 13827–35.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2603-15.2015>
- Oshio, K., Song, Y., Verkman, A. S., & Manley, G. T. (2003). Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 86, 525–8. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14753499>
- Papadopoulos, M. C., & Verkman, A. S. (2007). Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatric Nephrology*. <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0411-0>
- Park, J., Madan, M., Chigurupati, S., Baek, S. H., Cho, Y., Mughal, M. R., Yu, A., Chan, S. L., Pattisapu, J. V., Mattson, M. P., & Jo, D. G. (2021). Neuronal aquaporin 1 inhibits amyloidogenesis by suppressing the interaction between beta-secretase and amyloid precursor protein. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 76(1), 23–31.
<https://doi.org/10.1093/GERONA/GLAA068>
- Petrelli, F., Pucci, L., & Bezzi, P. (2016). Astrocytes and Microglia and Their Potential Link with Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 21.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00021>
- Poskanzer, K. E., & Molofsky, A. V. (2018). Dynamism of an Astrocyte In Vivo: Perspectives on Identity and Function. *Annual Review of Physiology*, 80, 143–157. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121125>
- Qiu, B., Li, X., Sun, X., Wang, Y., Jing, Z., Zhang, X., & Wang, Y. (2014). Overexpression of aquaporin-1 aggravates hippocampal damage in mouse traumatic brain injury models. *Molecular Medicine Reports*, 9(3), 916–922.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2014.1899>
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., & Gottfried, C. (2013). Resveratrol Protects C6 Astrocyte Cell Line against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress through Heme Oxygenase 1. *PLoS ONE*, 8(5), 64372.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064372>

- Quincozes-Santos, A., & Gottfried, C. (2011). Resveratrol modulates astroglial functions: Neuroprotective hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 72–78. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05857.x>
- Rahman, I., Marwick, J., & Kirkham, P. (2004). Redox modulation of chromatin remodeling: Impact on histone acetylation and deacetylation, NF- κ B and pro-inflammatory gene expression. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1255–1267. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.042>
- Reinhard, S. M., Razak, K., & Ethell, I. M. (2015). A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 280. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00280>
- Rosu, G. C., Pirici, I., Grigorie, A. A., Istrate-Ofiteru, A. M., Iovan, L., Tudorica, V., & Pirici, D. (2019). Distribution of Aquaporins 1 and 4 in the Central Nervous System. *Current Health Sciences Journal*, 45(2), 218–226. <https://doi.org/10.12865/CHSJ.45.02.14>
- Roudnicky, F., Kim, B. K., Lan, Y., Schmucki, R., Küppers, V., Christensen, K., Graf, M., Patsch, C., Burcin, M., Meyer, C. A., Westenskow, P. D., & Cowan, C. A. (2020). Identification of a combination of transcription factors that synergistically increases endothelial cell barrier resistance. *Scientific Reports*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60688-x>
- 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>
- Sacco, R., Gabriele, S., & Persico, A. M. (2015). Head circumference and brain size in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 234(2), 239–251. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2015.08.016>
- Sánchez-Fidalgo, S., Cárdeno, A., Villegas, I., Talero, E., & de la Lastra, C. A. (2010). Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*, 633(1–3), 78–84. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2010.01.025>
- Sawda, C., Moussa, C., & Turner, R. S. (2017). Resveratrol for alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1403(1), 142–149. <https://doi.org/10.1111/nyas.13431>

- 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>
- Simões, L. R., Sangiogo, G., Tashiro, M. H., Generoso, J. S., Faller, C. J., Domingui, D., Mastella, G. A., Scaini, G., Giridharan, V. V., Michels, M., Florentino, D., Petronilho, F., Réus, G. Z., Dal-Pizzol, F., Zugno, A. I., & Barichello, T. (2018). Maternal immune activation induced by lipopolysaccharide triggers immune response in pregnant mother and fetus, and induces behavioral impairment in adult rats. *Journal of Psychiatric Research*, 100, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.02.007>
- Smith, V., & Brown, N. (2014). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, 99(5), 198. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-305636>
- Soma, M., Aizawa, H., Ito, Y., Maekawa, M., Osumi, N., Nakahira, E., Okamoto, H., Tanaka, K., & Yuasa, S. (2009). Development of the mouse amygdala as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *The Journal of Comparative Neurology*, 513(1), 113–128. <https://doi.org/10.1002/cne.21945>
- Spence, S. J., & Schneider, M. T. (2009). The role of epilepsy and epileptiform EEGs in autism spectrum disorders. *Pediatric Research*, 65(6), 599–606. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e7168>
- Ssucharewa, G. E. (1926). Die schizoiden Psychopathien im Kindesalter. (Part 1 of 2). *European Neurology*, 60(3–4), 235–247. <https://doi.org/10.1159/000190478>
- Stamatovic, S. M., Dimitrijevic, O. B., Keep, R. F., & Andjelkovic, A. V. (2006). Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. In *Brain Edema XIII* (Vol. 96, pp. 444–450). Vienna: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/3-211-30714-1_91
- Stoner, R., Chow, M. L., Boyle, M. P., Sunkin, S. M., Mouton, P. R., Roy, S., Wynshaw-Boris, A., Colamarino, S. A., Lein, E. S., & Courchesne, E. (2014). Patches of disorganization in the neocortex of children with autism. *The New England Journal of Medicine*, 370(13), 1209–1219. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1307491>
- Strohschein, S., Hüttmann, K., Gabriel, S., Binder, D. K., Heinemann, U., &

- Steinhäuser, C. (2011). Impact of aquaporin-4 channels on K⁺ buffering and gap junction coupling in the hippocampus. *GLIA*, 59(6), 973–980.
<https://doi.org/10.1002/glia.21169>
- Tambur, A. R., & Roitberg, B. (2005). Immunology of the central nervous system. *Neurological Research*, 27(7), 675–678.
<https://doi.org/10.1179/016164105X49544>
- Tang, B. L. (2010). Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1—A hypothesis. *Brain Research Bulletin*, 81(4–5), 359–361.
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2009.12.007>
- The Human Protein Atlas. (n.d.). Tissue expression of AQP1 - Staining in Amygdala - The Human Protein Atlas. Retrieved June 7, 2021, from
<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000240583-AQP1/tissue/Amygdala>
- Vang, O., Ahmad, N., Baile, C. A., Baur, J. A., Brown, K., Csiszar, A., Das, D. K., Delmas, D., Gottfried, C., Lin, H.-Y., Ma, Q.-Y., Mukhopadhyay, P., Nalini, N., Pezzuto, J. M., Richard, T., Shukla, Y., Surh, Y.-J., Szekeres, T., Szkudelski, T., Walle, T., & Wu, J. M. (2011). What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol. *PLoS ONE*, 6(6), e19881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019881>
- Vargas, D. L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A. W., & Pardo, C. A. (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*, 57(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/ana.20315>
- Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J. K., Tian, Y., Horvath, S., Mill, J., Cantor, R. M., Blencowe, B. J., & Geschwind, D. H. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*, 474(7351), 380–384. <https://doi.org/10.1038/nature10110>
- Wei, H., Wang, S., Zhen, L., Yang, Q., Wu, Z., Lei, X., Lv, J., Xiong, L., & Xue, R. (2015). Resveratrol Attenuates the Blood-Brain Barrier Dysfunction by Regulation of the MMP-9/TIMP-1 Balance after Cerebral Ischemia Reperfusion in Rats. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(4), 872–879.
<https://doi.org/10.1007/s12031-014-0441-1>
- Xiao, M., & Hu, G. (2014). Involvement of Aquaporin 4 in Astrocyte Function and Neuropsychiatric Disorders. *CNS Neuroscience and Therapeutics*.
<https://doi.org/10.1111/cns.12267>
- Zamberletti, E., Gabaglio, M., Woolley-Roberts, M., Bingham, S., Rubino, T., &

- Parolaro, D. (2019). Cannabidiol Treatment Ameliorates Autism-Like Behaviors and Restores Hippocampal Endocannabinoid System and Glia Alterations Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00367>
- Zeidán-Chuliá, F., Salmina, A. B., Malinovskaya, N. A., Noda, M., Verkhatsky, A., & Moreira, J. C. F. (2014). The glial perspective of autism spectrum disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 38, 160–172. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2013.11.008>
- Zeldovich, L. (2018). How History Forgot the Woman Who Defined Autism - Scientific American.
- Zhao, H., Wang, Q., Yan, T., Zhang, Y., Xu, H. jian, Yu, H. peng, Tu, Z., Guo, X., Jiang, Y. hui, Li, X. jiang, Zhou, H., & Zhang, Y. Q. (2019). Maternal valproic acid exposure leads to neurogenesis defects and autism-like behaviors in non-human primates. *Translational Psychiatry*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0608-1>

List of Figures

Figure 1 – Brain water content in an animal model of autism and the resveratrol effect (RSV). A) Percentage of water in the whole brain through the difference in wet weight and dry weight. B) Body weight, showing that the animals in the VPA group have lower weight throughout development. C) Proportion of brain fluid volume corrected by the difference in body weight of the animals. Values are shown in median±IQR. Statistical analyses: Kruskal-Wallis. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 4. * p <0.05; ** p <0.001.

Figure 2 – Permeability of the blood-brain barrier to Evans blue dye. A) Representative images of the anterior cingulate cortex (II/III layers). The nuclear dye DAPI is stained in blue and the fluorescence of Evans blue in red. Scale bar: 50 µm. Statistical analyses: Kruskal-Wallis. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 7, N_{VPA}: 4, N_{RSV+VPA}: 4.

Figure 3 – Distribution of aquaporin 1 (AQP1) in the choroid plexus. (A) Representative images of the immunofluorescent label and (B) graphic representation of the expression of AQP1 in the choroid plexus. Scale bar: 40 µm. Values are shown as mean of fluorescence ± standard deviation. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Sidak. N = 5. * p <0.05. AQP1 is marked in green and nuclear DAPI dye in blue.

Figure 4 - Immunocontent of aquaporin 1 (AQP1) and AQP4 in different regions of the Central Nervous System. Quantification of AQP1 and AQP4 immunostaining (A)(E) in the primary somatosensory area, (B)(F) in the amygdala region, (C)(G) in the medial prefrontal cortex and (D)(H) in the hippocampus, respectively. The immunocontent of both AQP1 and AQP4 was normalized by the β-actin loading control. Values are shown as mean ± standard deviation. Statistical analysis: Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Sidak. N = 4. * p <0.05.

Figure 5 - Analysis of astrocytes in the primary somatosensory area. Representative images of the immunofluorescent labeling of DAPI, GFAP and AQP4 in the primary somatosensory area (II/III) in the different experimental groups. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Sidak. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6,

N_{RSV+VPA}: 5. GFAP is marked in green, AQP4 in red and DAPI nuclear dye in blue.
Scale bar: 50 μ m.

Supplementary Figure 1 - Representative images of the AQP1 labeling.

Illustrative images of DAPI (blue) and AQP1 (green) staining in the pSSA (layers IV/V), aCC (mPFC – layers II/III), DG (hippocampus) and AmR in the different experimental groups. Scale bar: 50 μ m.

Supplementary Figure 2 - Representative images of the AQP4 labeling.

Illustrative images of DAPI (blue), GFAP (green) and AQP4 (red) staining in the pSSA (layers IV/V), aCC (mPFC – layers II/III), DG (hippocampus) and AmR in the different experimental groups. Scale bar: 50 μ m.

List of Tables

Table 1 – Descriptive statistics of body weight and in proportional brain water content

	Median (IQR)	Chi-Square, df	p Value	Mean rank	Pairwise comparisons
%	CON: 78.27 (75.10±78.74) RSV: 77.44 (74.89±77.56) VPA: 79.41 (79.23±79.73) RSV+VPA: 77.91 (77.74±77.93)	14.019, 3	0.003**	CON: 10.00 RSV: 6.86 VPA: 20.50 RSV+VPA: 11.25	CON vs RSV: >0.999
					CON vs VPA: 0.044*
					CON vs RSV+VPA: >0.999
					RSV vs VPA: 0.002**
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
					VPA vs RSV+VPA: 0.208
					CON vs RSV: >0.999
g	CON: 73.50 (59.00±83.50) RSV: 73.00 (61.00±76.00) VPA: 45.50 (43.00±47.75) RSV+VPA: 83.50 (77.25±107.00)	15.659, 3	0.001**	CON: 9.50 RSV: 10.86 VPA: 20.50 RSV+VPA: 5.00	CON vs VPA: 0.030*
					CON vs RSV+VPA: >0.999
					RSV vs VPA: 0.064#
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
					VPA vs RSV+VPA: 0.002**
					CON vs RSV: >0.999
					CON vs VPA: 0.034*
%/g	CON: 1.052 (0.914±1.347) RSV: 1.025 (0.998±1.268) VPA: 1.749 (1.663±1.847) RSV+VPA: 0.934 (0.737±1.009)	14.699, 3	0.002**	CON: 14.33 RSV: 12.79 VPA: 3.50 RSV+VPA: 19.88	CON vs RSV+VPA: >0.999
					RSV vs VPA: 0.082#
					RSV vs RSV+VPA: 0.570
					VPA vs RSV+VPA: 0.001**
					CON vs RSV: >0.999
					CON vs VPA: 0.034*
					CON vs RSV+VPA: >0.999

%: brain water content percentage; **g:** body weight; **%/g:** proportion of brain fluid. p <0.05 was considered significant. *p<0.05, **p<0.01. Statistical analyses: Kruskal-Wallis. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 4.

Table 2 – Descriptive statistics of Evans blue dye

	Median (IQR)	Chi-Square, df	p Value	Mean rank	Pairwise comparisons
CP	CON: 98.08 (75.07±103.4) RSV: 77.09 (56.18±91.46) VPA: 253.6 (150.4±393.0) RSV+VPA: 72.00 (62.16±88.70)	11.674, 3	0.009**	CON: 12.60 RSV: 7.64 VPA: 19.50 RSV+VPA: 7.30	CON vs RSV: >0.999
					CON vs VPA: 0.584
					CON vs RSV+VPA: >0.999
					RSV vs VPA: 0.014*
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
HIP	CON: 100.6 (81.16±122.5) RSV: 83.16 (63.64±97.31) VPA: 107.4 (57.4±180.5) RSV+VPA: 68.5 (55.03±75.59)	5.572, 3	0.134	CON: 14.90 RSV: 10.36 VPA: 13.25 RSV+VPA: 6.20	VPA vs RSV+VPA: 0.020*
					CON vs RSV: >0.999
					CON vs VPA: >0.999
					CON vs RSV+VPA: 0.149
					RSV vs VPA: >0.999
AmR	CON: 97.14 (90.83±115.4) RSV: 79.56 (66.98±94.11) VPA: 108.7 (46.77±159.2) RSV+VPA: 66.17 (44.93±83.03)	7.812, 3	0.050	CON: 15.60 RSV: 8.86 VPA: 14.75 RSV+VPA: 6.40	RSV vs RSV+VPA: >0.999
					VPA vs RSV+VPA: 0.269
					CON vs RSV: 0.381
					CON vs VPA: >0.999
					CON vs RSV+VPA: 0.114
pSSA (II/III)	CON: 123.00 (113.7±146.1) RSV: 88.71 (78.22±106.4) VPA: 838.6 (624.3±1019.0) RSV+VPA: 86.19 (78.83±112.4)	13.541, 3	0.004**	CON: 13.8 RSV: 6.79 VPA: 19.50 RSV+VPA: 7.30	RSV vs VPA: 0.006**
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
					VPA vs RSV+VPA: 0.020*
					CON vs RSV: 0.468
					CON vs VPA: 0.856
pSSA (IV/V)	CON: 124.6 (115.4±142.0) RSV: 105.9 (62.22±118.5) VPA: 483.9 (321.5±578.7) RSV+VPA: 95.09 (91.75±120.7)	12.855, 3	0.005**	CON: 13.40 RSV: 7.00 VPA: 19.50 RSV+VPA: 7.40	CON vs RSV+VPA: 0.757
					RSV vs VPA: 0.008**
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
					VPA vs RSV+VPA: 0.022*
					CON vs RSV: >0.999
aCC (II/III)	CON: 100.9 (78.63±112.2) RSV: 77.78 (74.32±90.65) VPA: 370.1 (279.2±416.7) RSV+VPA: 71.57 (68.05±95.45)	11.670, 3	0.001**	CON: 11.50 RSV: 8.21 VPA: 18.50 RSV+VPA: 5.25	CON vs VPA: 0.465
					CON vs RSV+VPA: 0.690
					RSV vs VPA: 0.033*
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
					VPA vs RSV+VPA: 0.009**
aCC (IV/V)	CON: 86.73 (81.27±99.31) RSV: 78.16 (77.02±107.5) VPA: 423.9 (335.2±447.6) RSV+VPA: 80.25 (78.98±92.59)	10.801, 3	0.013*	CON: 11.20 RSV: 6.86 VPA: 18.50 RSV+VPA: 8.00	CON vs RSV: >0.999
					CON vs VPA: 0.391
					CON vs RSV+VPA: >0.999
					RSV vs VPA: 0.010*
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
PrL (II/III)	CON: 78.56 (71.57±100.8) RSV: 79.78 (74.39±106.5) VPA: 378.2 (230.0±422.7) RSV+VPA: 73.94 (64.44±89.42)	9.926, 3	0.019*	CON: 8.40 RSV: 9.71 VPA: 18.50 RSV+VPA: 6.50	VPA vs RSV+VPA: 0.071#
					CON vs RSV: >0.999
					CON vs VPA: 0.065#
					CON vs RSV+VPA: >0.999
					RSV vs VPA: 0.106
PrL (IV/V)	CON: 82.80 (78.15±99.0) RSV: 86.23 (71.51±108.7) VPA: 364.9 (172.0±378.0) RSV+VPA: 69.02 (63.39±89.87)	9.653, 3	0.022*	CON: 9.70 RSV: 9.71 VPA: 18.00 RSV+VPA: 5.38	RSV vs RSV+VPA: >0.999
					VPA vs RSV+VPA: 0.024*
					CON vs RSV: >0.999
					CON vs VPA: 0.219
					CON vs RSV+VPA: >0.999
					RSV vs VPA: 0.152
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
					VPA vs RSV+VPA: 0.015*

IL (II/III)	CON: 81.6 (80.25±93.42)	9.060, 3	0.028*	CON: 9.40	CON vs RSV: >0.999
	RSV: 79.34 (71.30±104.2)			RSV: 7.93	CON vs VPA: 0.141
	VPA: 232.9 (141.5±351.4)			VPA: 18.38	CON vs RSV+VPA: >0.999
	RSV+VPA: 78.77 (68.97±106.5)			RSV+VPA: 8.50	RSV vs VPA: 0.029*
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
				VPA vs RSV+VPA: 0.109	
IL (IV/V)	CON: 87.79 (86.19±104.8)	10.289, 3	0.016*	CON: 10.80	CON vs RSV: >0.999
	RSV: 81.65 (76.40±108.2)			RSV: 7.21	CON vs VPA: 0.313
	VPA: 275.0 (153.4±336.0)			VPA: 18.50	CON vs RSV+VPA: >0.999
	RSV+VPA: 87.05 (66.13±98.72)			RSV+VPA: 7.88	RSV vs VPA: 0.014*
					RSV vs RSV+VPA: >0.999
				VPA vs RSV+VPA: 0.066#	

II/III: upper cortical layers; **IV/V:** deeper cortical layers; **aCC:** anterior cingulate cortex; **AmR:** amygdala region; **CP:** choroid plexus; **HIP:** hippocampus; **IL:** infralimbic cortex; **IQR:** interquartile range; **PrL:** prelimbic cortex; **pSSA:** primary somatosensory area. p <0.05 was considered significant. *p<0.05, **p<0.01. Statistical analyses: Kruskal-Wallis. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 7, N_{VPA}: 4, N_{RSV+VPA}: 4.

Table 3 – Descriptive statistics of the AQP1 and AQP4 distribution profile in pSSA

	Mean ± SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
AQP1 (II/III)	CON: 438.3±105.9	Interaction: F (1, 17) = 0,013; p = 0.909 VPA: F (1, 17) = 2,171; p = 0.158 RSV: F (1, 17) = 0,064; p = 0.804	CON vs RSV: >0.999
	RSV: 455.8±121.3		CON vs VPA: 0.934
	VPA: 373.7±89.17		CON vs RSV+VPA: 0.966
	RSV+VPA: 380.2±111.2		RSV vs VPA: 0.744
			RSV vs RSV+VPA: 0.838
			VPA vs RSV+VPA: >0.999
AQP1 (IV/V)	CON: 556.3±140.8	Interaction: F (1, 17) = 0.821; p = 0.377 VPA: F (1, 17) = 18.28; p = 0.0005*** RSV: F (1, 17) = 0.0607; p = 0.808	CON vs RSV: 0.969
	RSV: 507.6±82.91		CON vs VPA: 0.015*
	VPA: 337.6±80.89		CON vs RSV+VPA: 0.049*
	RSV+VPA: 365.4±83.67		RSV vs VPA: 0.039*
			RSV vs RSV+VPA: 0.139
			VPA vs RSV+VPA: 0.997
AQP4 (II/III)	CON: 154.1±32.47	Interaction: F (1, 18) = 0.6649; p = 0.4255 VPA: F (1, 18) = 0.8502; p = 0.3687 RSV: F (1, 18) = 0.8440; p = 0.3704	CON vs RSV: 0.801
	RSV: 194.3±55.26		CON vs VPA: 0.799
	VPA: 194.4±52.50		CON vs RSV+VPA: 0.789
	RSV+VPA: 196.8±69.81		RSV vs VPA: >0.999
			RSV vs RSV+VPA: >0.999
			VPA vs RSV+VPA: >0.999
AQP4 (IV/V)	CON: 109.9±23.35	Interaction: F (1, 19) = 14.75; p = 0.0011** VPA: F (1, 19) = 2.573; p = 0.1252 RSV: F (1, 19) = 0.7357; p = 0.4017	CON vs RSV: 0.2348
	RSV: 147.5±21.48		CON vs VPA: 0.0052**
	VPA: 173.8±27.00		CON vs RSV+VPA: 0.9966
	RSV+VPA: 123.7±28.31		RSV vs VPA: 0.4338
			RSV vs RSV+VPA: 0.5920
			VPA vs RSV+VPA: 0.0252*

II/III: upper cortical layers; IV/V: deeper cortical layers; pSSA: primary somatosensory area; SD: standard deviation. p <0.05 was considered significant. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Statistical analyses: two-way ANOVA parametric test followed by Sidak. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 5. "Mean" represents de mean of fluorescence.

Table 4 – Descriptive statistics of the AQP1 and AQP4 distribution profile in mPFC

	Mean ± SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
AQP1 aCC (II/III)	CON: 340.0±20.61 RSV: 317.6±59.90 VPA: 237.3±34.16 RSV+VPA: 240.3±89.26	Interaction: F (1, 14) = 0.232; p = 0.637 VPA: F (1, 14) = 11.59; p = 0.0043** RSV: F (1, 14) = 0.136 ; p = 0.717	CON vs RSV: 0.989 CON vs VPA: 0.091# CON vs RSV+VPA: 0.105 RSV vs VPA: 0.264 RSV vs RSV+VPA: 0.301 VPA vs RSV+VPA: >0.999
			CON vs RSV: 0.995 CON vs VPA: 0.017* CON vs RSV+VPA: 0.079# RSV vs VPA: 0.049* RSV vs RSV+VPA: 0.207 VPA vs RSV+VPA: 0.979
AQP1 aCC (IV/V)	CON: 413.4±89.15 RSV: 384.2±68.89 VPA: 213.5±60.90 RSV+VPA: 256.6±107.4	Interaction: F (1, 14) = 0.839; p = 0.375 VPA: F (1, 14) = 17.29; p = 0.0010*** RSV: F (1, 14) = 0.0311; p = 0.863	CON vs RSV: 0.985 CON vs VPA: 0.024* CON vs RSV+VPA: 0.050# RSV vs VPA: 0.086# RSV vs RSV+VPA: 0.168 VPA vs RSV+VPA: 0.999
			CON vs RSV: 0.739 CON vs VPA: 0.013* CON vs RSV+VPA: 0.0007*** RSV vs VPA: 0.146 RSV vs RSV+VPA: 0.0080** VPA vs RSV+VPA: 0.686
AQP1 PrL (II/III)	CON: 440.8±84.40 RSV: 400.3±110.8 VPA: 226.7±39.04 RSV+VPA: 249.5±114.8	Interaction: F (1, 14) = 0.512; p = 0.486 VPA: F (1, 14) = 17.01; p = 0.0010** RSV: F (1, 14) = 0.039; p = 0.845	CON vs RSV: 0.780 CON vs VPA: 0.0108* CON vs RSV+VPA: 0.0324* RSV vs VPA: 0.111 RSV vs RSV+VPA: 0.294 VPA vs RSV+VPA: 0.996
			CON vs RSV: 0.982 CON vs VPA: 0.0236* CON vs RSV+VPA: 0.0132* RSV vs VPA: 0.086# RSV vs RSV+VPA: 0.0489* VPA vs RSV+VPA: >0.999
AQP1 PrL (IV/V)	CON: 444.4±79.13 RSV: 383.0±66.96 VPA: 262.1±52.99 RSV+VPA: 189.3±85.19	Interaction: F (1, 14) = 0.028; p = 0.869 VPA: F (1, 14) = 30.04; p < 0.0001**** RSV: F (1, 14) = 3.832; p = 0.0705	CON vs RSV: 0.780 CON vs VPA: 0.0108* CON vs RSV+VPA: 0.0324* RSV vs VPA: 0.111 RSV vs RSV+VPA: 0.294 VPA vs RSV+VPA: 0.996
			CON vs RSV: 0.982 CON vs VPA: 0.0236* CON vs RSV+VPA: 0.0132* RSV vs VPA: 0.086# RSV vs RSV+VPA: 0.0489* VPA vs RSV+VPA: >0.999
AQP1 IL (II/III)	CON: 438.1±84.61 RSV: 365.1±95.19 VPA: 205.0±41.25 RSV+VPA: 238.9±122.0	Interaction: F (1, 14) = 1.550; p = 0.2336 VPA: F (1, 14) = 17.51; p = 0.0009*** RSV: F (1, 14) = 0.2064; p = 0.6565	CON vs RSV: 0.982 CON vs VPA: 0.0236* CON vs RSV+VPA: 0.0132* RSV vs VPA: 0.086# RSV vs RSV+VPA: 0.0489* VPA vs RSV+VPA: >0.999
			CON vs RSV: 0.586 CON vs VPA: 0.064# CON vs RSV+VPA: 0.880 RSV vs VPA: 0.787 RSV vs RSV+VPA: 0.999 VPA vs RSV+VPA: 0.589
AQP4 aCC (II/III)	CON: 522.8±86.07 RSV: 400.5±94.07 VPA: 298.3±119.1 RSV+VPA: 433.3±213.3	Interaction: F (1, 16) = 4.879; p = 0.0421* VPA: F (1, 16) = 2.709; p = 0.1193 RSV: F (1, 16) = 0.01204; p = 0.9140	CON vs RSV: 0.093 CON vs VPA: 0.0058** CON vs RSV+VPA: 0.172 RSV vs VPA: 0.769 RSV vs RSV+VPA: >0.999 VPA vs RSV+VPA: 0.722
			CON vs RSV: 0.717 CON vs VPA: 0.0064** CON vs RSV+VPA: 0.337 RSV vs VPA: 0.134 RSV vs RSV+VPA: 0.987 VPA vs RSV+VPA: 0.500
AQP4 PrL (II/III)	CON: 555.4±160.3 RSV: 354.4±76.63 VPA: 254.0±42.98 RSV+VPA: 366.8±167.8	Interaction: F (1, 16) = 7.910; p = 0.0125* VPA: F (1, 16) = 6.711; p = 0.0197* RSV: F (1, 16) = 0.6246; p = 0.4409	CON vs RSV: 0.216 CON vs VPA: 0.216
AQP4	CON: 482.0±107.3	Interaction: F (1, 16) = 7.142; p = 0.0167*	CON vs RSV: 0.216

PrL (IV/IV)	RSV: 339.8±92.58	VPA: F (1, 16) = 7.278; p = 0.0158*	CON vs VPA: 0.0061**
	VPA: 227.3±49.74	RSV: F (1, 16) = 0.1057; p = 0.7493	CON vs RSV+VPA: 0.266
	RSV+VPA: 338.6±157.5		RSV vs VPA: 0.501
			RSV vs RSV+VPA: >0.999
AQP4 IL (II/III)	CON: 466.8±100.4	Interaction: F (1, 16) = 4.930; p = 0.0412*	VPA vs RSV+VPA: 0.576
	RSV: 356.7±105.0	VPA: F (1, 16) = 19.05; p = 0.0005***	CON vs RSV: 0.331
	VPA: 193.8±27.21	RSV: F (1, 16) = 0.1895; p = 0.6692	CON vs VPA: 0.0009***
	RSV+VPA: 267.8±111.5		CON vs RSV+VPA: 0.0237*
AQP4 IL (IV/IV)	CON: 446.3±70.78	Interaction: F (1, 16) = 7.073; p = 0.0171*	RSV vs VPA: 0.0736#
	RSV: 333.9±87.51	VPA: F (1, 16) = 10.13; p = 0.0058**	RSV vs RSV+VPA: 0.668
	VPA: 235.7±52.18	RSV: F (1, 16) = 0.2106; p = 0.6525	VPA vs RSV+VPA: 0.817
	RSV+VPA: 315.0±108.4		CON vs RSV: 0.184
			CON vs VPA: 0.0029**
			CON vs RSV+VPA: 0.122
			RSV vs VPA: 0.351
			RSV vs RSV+VPA: 0.999
			VPA vs RSV+VPA: 0.643

II/III: upper cortical layers; **IV/IV**: deeper cortical layers; **aCC**: anterior cingulate cortex; **IL**: infralimbic cortex; **PrL**: prelimbic cortex; **SD**: standard deviation. p < 0.05 was considered significant. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. Statistical analyses: two-way ANOVA parametric test followed by Sidak. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 5. "Mean" represents the mean of fluorescence.

Table 5 – Descriptive statistics of the AQP1 and AQP4 distribution profile in AmR

	Mean ± SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
AQP1	CON: 394.4±13.92	Interaction: F (1, 17) = 0.0279; p = 0.869 VPA: F (1, 17) = 18.95; p = 0.0004*** RSV: F (1, 17) = 3.226; p = 0.090	CON vs RSV: 0.8603
	RSV: 354.3±46.69		CON vs VPA: 0.0621#
	VPA: 291.2±67.83		CON vs RSV+VPA: 0.0049**
	RSV+VPA: 242.8±67.61		RSV vs VPA: 0.3386
			RSV vs RSV+VPA: 0.0249*
		VPA vs RSV+VPA: 0.6718	
AQP4	CON: 112.9±15.93	Interaction: F (1, 16) = 0.2881; p = 0.5988 VPA: F (1, 16) = 0.1118; p = 0.7425 RSV: F (1, 16) = 0.9222; p = 0.3512	CON vs RSV: 0.887
	RSV: 124.6±11.77		CON vs VPA: 0.991
	VPA: 119.7±10.60		CON vs RSV+VPA: 0.939
	RSV+VPA: 123.0±26.89		RSV vs VPA: 0.998
			RSV vs RSV+VPA: >0.999
		VPA vs RSV+VPA: 0.999	

AmR: amygdala region; **SD:** standard deviation. p <0.05 was considered significant. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Statistical analyses: two-way ANOVA parametric test followed by Sidak. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 5. "Mean" represents de mean of fluorescence.

Table 6 – Descriptive statistics of the AQP1 and AQP4 distribution profile in hippocampus.

	Mean ± SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
AQP1 DG	CON: 420.2±68.76 RSV: 315.9±121.7 VPA: 387.9±154.8 RSV+VPA: 260.1±123.2	Interaction: F (1, 18) = 0.049; p = 0.826 VPA: F (1, 18) = 0.697; p = 0.415 RSV: F (1, 18) = 4.837; p = 0.041*	CON vs RSV: 0.694 CON vs VPA: 0.999 CON vs RSV+VPA: 0.287 RSV vs VPA: 0.905 RSV vs RSV+VPA: 0.976 VPA vs RSV+VPA: 0.482
			CON vs RSV: 0.607 CON vs VPA: 0.841 CON vs RSV+VPA: 0.136 RSV vs VPA: 0.999 RSV vs RSV+VPA: 0.892 VPA vs RSV+VPA: 0.679
AQP1 CA1	CON: 418.9±72.71 RSV: 316.8±114.7 VPA: 341.8±107.7 RSV+VPA: 246.9±136.7	Interaction: F (1, 18) = 0.0057; p = 0.940 VPA: F (1, 18) = 2.413; p = 0.137 RSV: F (1, 18) = 4.340; p = 0.052#	CON vs RSV: 0.768 CON vs VPA: 0.895 CON vs RSV+VPA: 0.057 RSV vs VPA: >0.999 RSV vs RSV+VPA: 0.465 VPA vs RSV+VPA: 0.327
			CON vs RSV: 0.972 CON vs VPA: 0.997 CON vs RSV+VPA: 0.212 RSV vs VPA: 0.999 RSV vs RSV+VPA: 0.592 VPA vs RSV+VPA: 0.404
AQP1 CA2	CON: 424.1±50.26 RSV: 340.3±107.3 VPA: 356.3±126.8 RSV+VPA: 226.6±124.3	Interaction: F (1, 18) = 0.245; p = 0.626 VPA: F (1, 18) = 3.858; p = 0.065 RSV: F (1, 18) = 5.331; p = 0.033*	CON vs RSV: 0.967 CON vs VPA: 0.718 CON vs RSV+VPA: 0.929 RSV vs VPA: 0.997 RSV vs RSV+VPA: 0.437 VPA vs RSV+VPA: 0.135
			CON vs RSV: 0.935 CON vs VPA: 0.929 CON vs RSV+VPA: 0.982 RSV vs VPA: >0.999 RSV vs RSV+VPA: 0.505 VPA vs RSV+VPA: 0.447
AQP1 CA3	CON: 366.6±54.55 RSV: 316.9±105.5 VPA: 335.5±120.2 RSV+VPA: 217.8±124.0	Interaction: F (1, 18) = 0.564; p = 0.462 VPA: F (1, 18) = 2.071; p = 0.167 RSV: F (1, 18) = 3.418; p = 0.081#	CON vs RSV: 0.967 CON vs VPA: 0.718 CON vs RSV+VPA: 0.929 RSV vs VPA: 0.997 RSV vs RSV+VPA: 0.437 VPA vs RSV+VPA: 0.135
			CON vs RSV: 0.935 CON vs VPA: 0.929 CON vs RSV+VPA: 0.982 RSV vs VPA: >0.999 RSV vs RSV+VPA: 0.505 VPA vs RSV+VPA: 0.447
AQP4 DG	CON: 297.6±56.51 RSV: 338.4±50.03 VPA: 361.9±96.46 RSV+VPA: 251.4±95.38	Interaction: F (1, 19) = 4.936; p = 0.0387* VPA: F (1, 19) = 0.1120; p = 0.7415 RSV: F (1, 19) = 1.048; p = 0.3187	CON vs RSV: 0.967 CON vs VPA: 0.718 CON vs RSV+VPA: 0.929 RSV vs VPA: 0.997 RSV vs RSV+VPA: 0.437 VPA vs RSV+VPA: 0.135
			CON vs RSV: 0.935 CON vs VPA: 0.929 CON vs RSV+VPA: 0.982 RSV vs VPA: >0.999 RSV vs RSV+VPA: 0.505 VPA vs RSV+VPA: 0.447
AQP4 CA1	CON: 300.7±44.61 RSV: 346.4±66.26 VPA: 343.9±107.4 RSV+VPA: 267.2±65.51	Interaction: F (1, 19) = 3.456; p = 0.0786# VPA: F (1, 19) = 0.2992; p = 0.5908 RSV: F (1, 19) = 0.2202; p = 0.6442	CON vs RSV: 0.901 CON vs VPA: 0.979 CON vs RSV+VPA: 0.995 RSV vs VPA: 0.999 RSV vs RSV+VPA: 0.540 VPA vs RSV+VPA: 0.717
			CON vs RSV: 0.353 CON vs VPA: 0.967 CON vs RSV+VPA: >0.999 RSV vs VPA: 0.770 RSV vs RSV+VPA: 0.238 VPA vs RSV+VPA: 0.909
AQP4 CA2	CON: 307.7±73.17 RSV: 351.1±40.68 VPA: 336.3±79.70 RSV+VPA: 285.2±62.61	Interaction: F (1, 19) = 2.790; p = 0.1113 VPA: F (1, 19) = 0.4353; p = 0.5173 RSV: F (1, 19) = 0.01884; p = 0.8923	CON vs RSV: 0.353 CON vs VPA: 0.967 CON vs RSV+VPA: >0.999 RSV vs VPA: 0.770 RSV vs RSV+VPA: 0.238 VPA vs RSV+VPA: 0.909
			CON vs RSV: 0.353 CON vs VPA: 0.967 CON vs RSV+VPA: >0.999 RSV vs VPA: 0.770 RSV vs RSV+VPA: 0.238 VPA vs RSV+VPA: 0.909
AQP4 CA3	CON: 277.4±48.82 RSV: 342.3±27.86 VPA: 302.4±68.88 RSV+VPA: 272.6±51.07	Interaction: F (1, 19) = 4.422; p = 0.0490* VPA: F (1, 19) = 0.9866; p = 0.3331 RSV: F (1, 19) = 0.6090; p = 0.4448	CON vs RSV: 0.353 CON vs VPA: 0.967 CON vs RSV+VPA: >0.999 RSV vs VPA: 0.770 RSV vs RSV+VPA: 0.238 VPA vs RSV+VPA: 0.909
			CON vs RSV: 0.353 CON vs VPA: 0.967 CON vs RSV+VPA: >0.999 RSV vs VPA: 0.770 RSV vs RSV+VPA: 0.238 VPA vs RSV+VPA: 0.909

DG: dentate gyrus; SD: standard deviation. p <0.05 was considered significant.
*p<0.05. Statistical analyses: two-way ANOVA parametric test followed by Sidak.
N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 5. "Mean" represents de mean of fluorescence.

Table 7 – Descriptive statistics of the GFAP fluorescence and number of GFAP⁺ astrocytes in pSSA

	Mean ± SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
GFAP (II/III)	CON: 153.1±38.39	Interaction: F (1, 18) = 0.1940; p = 0.6649 VPA: F (1, 18) = 5.797; p = 0.0270* RSV: F (1, 18) = 2.023; p = 0.1721	CON vs RSV: 0.983
	RSV: 177.3±49.76		CON vs VPA: 0.6985
	VPA: 201.6±35.43		CON vs RSV+VPA: 0.105
	RSV+VPA: 247.4±93.58		RSV vs VPA: 0.978
			RSV vs RSV+VPA: 0.306
			VPA vs RSV+VPA: 0.746
			CON vs RSV: 0.822
GFAP (IV/V)	CON: 109.6±45.17	Interaction: F (1, 18) = 0.3125; p = 0.5831 VPA: F (1, 18) = 2.004; p = 0.1740 RSV: F (1, 18) = 5.017; p = 0.0380*	CON vs VPA: 0.991
	RSV: 146.5±32.95		CON vs RSV+VPA: 0.133
	VPA: 128.4±8.990		RSV vs VPA: 0.991
	RSV+VPA: 189.9±91.40		RSV vs RSV+VPA: 0.695
			VPA vs RSV+VPA: 0.324
			CON vs RSV: >0.999
			CON vs VPA: 0.459
Number (II/III)	CON: 66.40±19.51	Interaction: F (1, 18) = 0.7098; p = 0.4106 VPA: F (1, 18) = 10.99; p = 0.0038** RSV: F (1, 18) = 0.4752; p = 0.4994	CON vs RSV+VPA: 0.082#
	RSV: 65.00±28.09		RSV vs VPA: 0.341
	VPA: 89.00±22.12		RSV vs RSV+VPA: 0.051#
	RSV+VPA: 103.0±8.485		VPA vs RSV+VPA: 0.875
			CON vs RSV: 0.373
			CON vs VPA: 0.067#
			CON vs RSV+VPA: 0.0117*
Number (IV/V)	CON: 39.40±18.42	Interaction: F (1, 18) = 0.4240; p = 0.5232 VPA: F (1, 18) = 11.05; p = 0.0038** RSV: F (1, 18) = 4.086; p = 0.0584#	RSV vs VPA: 0.922
	RSV: 63.00±18.45		RSV vs RSV+VPA: 0.373
	VPA: 74.50±28.47		VPA vs RSV+VPA: 0.921
	RSV+VPA: 86.60±11.67		

II/III: upper cortical layers; IV/V: deeper cortical layers; pSSA: primary somatosensory area; SD: standard deviation. p < 0.05 was considered significant. *p < 0.05, **p < 0.01. Statistical analyses: two-way ANOVA parametric test followed by Sidak. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 5.

Table 8 – Descriptive statistics of the GFAP fluorescence and number of GFAP⁺ astrocytes in mPFC

	Mean ± SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
GFAP	CON: 316.5±48.96	Interaction: F (1, 14) = 2.882; p = 0.1117 VPA: F (1, 14) = 5.252; p = 0.0379* RSV: F (1, 14) = 0.5305; p = 0.4784	CON vs RSV: 0.980
	RSV: 366.6±87.41		CON vs VPA: 0.0789#
aCC (II/III)	VPA: 522.5±157.7		CON vs RSV+VPA: 0.869
	RSV+VPA: 397.2±130.6		RSV vs VPA: 0.269
			RSV vs RSV+VPA: 0.998
			VPA vs RSV+VPA: 0.554
GFAP	CON: 307.0±30.66	Interaction: F (1, 14) = 7.310; p = 0.0171* VPA: F (1, 14) = 3.549; p = 0.0805 RSV: F (1, 14) = 4.806; p = 0.0458*	CON vs RSV: 0.999
RSV: 319.9±44.57			CON vs VPA: 0.0348*
aCC (IV/V)	VPA: 422.3±49.83		CON vs RSV+VPA: >0.999
RSV+VPA: 299.3±81.86			RSV vs VPA: 0.071#
			RSV vs RSV+VPA: 0.993
			VPA vs RSV+VPA: 0.0321*
GFAP	CON: 297.9±35.88	Interaction: F (1, 14) = 1.234; p = 0.2853 VPA: F (1, 14) = 4.171; p = 0.0604# RSV: F (1, 14) = 0.4471; p = 0.5146	CON vs RSV: 0.999
RSV: 313.1±61.58			CON vs VPA: 0.231
PrL (II/III)	VPA: 406.1±79.69		CON vs RSV+VPA: 0.923
RSV+VPA: 345.0±106.4			RSV vs VPA: 0.377
			RSV vs RSV+VPA: 0.987
			VPA vs RSV+VPA: 0.825
GFAP	CON: 312.7±31.30	Interaction: F (1, 14) = 4.820; p = 0.0455* VPA: F (1, 14) = 3.930; p = 0.0674# RSV: F (1, 14) = 10.05; p = 0.0068**	CON vs RSV: 0.979
RSV: 288.5±44.65			CON vs VPA: 0.061#
PrL (IV/V)	VPA: 416.3±48.23		CON vs RSV+VPA: 0.960
RSV+VPA: 283.2±80.47			RSV vs VPA: 0.0158*
			RSV vs RSV+VPA: >0.999
			VPA vs RSV+VPA: 0.0173*
GFAP	CON: 338.2±49.43	Interaction: F (1, 14) = 0.3527; p = 0.5621 VPA: F (1, 14) = 1.659; p = 0.2186 RSV: F (1, 14) = 3.036; p = 0.1034	CON vs RSV: 0.955
RSV: 297.2±55.84			CON vs VPA: 0.746
IL (II/III)	VPA: 405.2±106.1		CON vs RSV+VPA: 0.999
RSV+VPA: 322.0±87.58			RSV vs VPA: 0.265
			RSV vs RSV+VPA: 0.997
			VPA vs RSV+VPA: 0.593
GFAP	CON: 316.5±24.27	Interaction: F (1, 14) = 2.159; p = 0.1638 VPA: F (1, 14) = 3.182; p = 0.0962# RSV: F (1, 14) = 10.84; p = 0.0053**	CON vs RSV: 0.723
RSV: 270.5±60.38			CON vs VPA: 0.204
IL (IV/V)	VPA: 398.6±70.81		CON vs RSV+VPA: 0.886
RSV+VPA: 278.4±50.56			RSV vs VPA: 0.0176*
			RSV vs RSV+VPA: >0.999
			VPA vs RSV+VPA: 0.0383*
Number	CON: 109.2±25.58	Interaction: F (1, 15) = 0.04255; p = 0.8393 VPA: F (1, 15) = 7.828; p = 0.0135* RSV: F (1, 15) = 1.705; p = 0.2113	CON vs RSV: 0.869
RSV: 139.8±61.92			CON vs VPA: 0.240
aCC (II/III)	VPA: 170.0±22.97		CON vs RSV+VPA: 0.075
RSV+VPA: 192.3±54.32			RSV vs VPA: 0.876
			RSV vs RSV+VPA: 0.451
			VPA vs RSV+VPA: 0.975
Number	CON: 85.00±21.71	Interaction: F (1, 15) = 1.542; p = 0.2334 VPA: F (1, 15) = 8.959; p = 0.0091** RSV: F (1, 15) = 0.033; p = 0.8572	CON vs RSV: 0.897
RSV: 113.6±48.03			CON vs VPA: 0.0443*
aCC (IV/V)	VPA: 170.0±25.50		CON vs RSV+VPA: 0.243
RSV+VPA: 148.8±70.04			RSV vs VPA: 0.303
			RSV vs RSV+VPA: 0.818
			VPA vs RSV+VPA: 0.979
Number	CON: 111.4±45.53	Interaction: F (1, 15) = 0.4302; p = 0.5218 VPA: F (1, 15) = 6.018; p = 0.0269* RSV: F (1, 15) = 0.5779; p = 0.4589	CON vs RSV: >0.999
RSV: 114.0±54.61			CON vs VPA: 0.756
PrL (II/III)	VPA: 156.2±30.54		CON vs RSV+VPA: 0.232
RSV+VPA: 191.5±81.46			RSV vs VPA: 0.801
			RSV vs RSV+VPA: 0.262
			VPA vs RSV+VPA: 0.921
Number	CON: 93.20±19.65	Interaction: F (1, 15) = 0.291; p = 0.5978	CON vs RSV: 0.998

PrL (IV/V)	RSV: 105.0±39.21	VPA: F (1, 15) = 20.99; p = 0.0004***	CON vs VPA: 0.0120*
	VPA: 188.2±21.46	RSV: F (1, 15) = 0.010; p = 0.9240	CON vs RSV+VPA: 0.0342*
	RSV+VPA: 180.0±70.15		RSV vs VPA: 0.0307*
			RSV vs RSV+VPA: 0.081#
			VPA vs RSV+VPA: 0.999
Number IL (II/III)	CON: 103.6±31.94	Interaction: F (1, 15) = 0.2208; p = 0.6452	CON vs RSV: >0.999
	RSV: 106.6±79.16	VPA: F (1, 15) = 5.935; p = 0.0278*	CON vs VPA: 0.678
	VPA: 158.0±49.46	RSV: F (1, 15) = 0.3345; p = 0.5716	CON vs RSV+VPA: 0.292
	RSV+VPA: 187.0±70.94		RSV vs VPA: 0.729
			RSV vs RSV+VPA: 0.328
Number IL (IV/V)	CON: 82.20±33.26	Interaction: : F (1, 15) = 4.55e-005; p = 0.9947	VPA vs RSV+VPA: 0.980
	RSV: 89.00±36.88	VPA: F (1, 15) = 14.41; p = 0.0018**	CON vs RSV: >0.999
	VPA: 166.4±50.58	RSV: F (1, 15) = 0.097; p = 0.7587	CON vs VPA: 0.084#
	RSV+VPA: 173.5±70.11		CON vs RSV+VPA: 0.074#
			RSV vs VPA: 0.128
		RSV vs RSV+VPA: 0.118	
		VPA vs RSV+VPA: >0.999	

II/III: upper cortical layers; **IV/V**: deeper cortical layers; **aCC**: anterior cingulate cortex; **IL**: infralimbic cortex; **PrL**: prelimbic cortex; **SD**: standard deviation. p <0.05 was considered significant. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Statistical analyses: two-way ANOVA parametric test followed by Sidak. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 5.

Table 9 – Descriptive statistics of the GFAP fluorescence and number of GFAP⁺ astrocytes in AmR

	Mean ± SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
GFAP	CON: 88.98±30.23	Interaction: F (1, 16) = 4.728; p = 0.0450* VPA: F (1, 16) = 3.357; p= 0.0856 RSV: F (1, 16) = 2.095; p = 0.1670	CON vs RSV: 0.996
	RSV: 75.56±14.83		CON vs VPA: >0.999
	VPA: 82.66±14.10		CON vs RSV+VPA: 0.187
	RSV+VPA: 149.6±74.12		RSV vs VPA: >0.999
		RSV vs RSV+VPA: 0.069#	
		VPA vs RSV+VPA: 0.119	
		CON vs RSV: 0.083#	
Number	CON: 33.80±7.463	Interaction: F (1, 16) = 14.26; p = 0.0017** VPA: F (1, 16) = 1.307; p = 0.2697 RSV: F (1, 16) = 0.01080; p = 0.9185	CON vs VPA: 0.398
	RSV: 11.40±5.225		CON vs RSV+VPA: 0.978
	VPA: 18.60±10.53		RSV vs VPA: 0.948
	RSV+VPA: 39.80±21.74		RSV vs RSV+VPA: 0.0185*
		VPA vs RSV+VPA: 0.111	

AmR: amygdala region; **SD:** standard deviation. p <0.05 was considered significant.
*p<0.05, **p<0.01. Statistical analyses: two-way ANOVA parametric test followed by Sidak. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 5.

Table 10 – Descriptive statistics of the GFAP fluorescence and number of GFAP⁺-astrocytes in hippocampus.

Mean ± SD		F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
GFAP	CON: 458.6±93.64	Interaction: F (1, 19) = 8.292; p = 0.0096** VPA: F (1, 19) = 1.130; p = 0.3012	CON vs RSV: 0.170
	RSV: 642.1±62.81		CON vs VPA: 0.751
DG	VPA: 553.7±135.4	RSV: F (1, 19) = 0.3929; p = 0.5382	CON vs RSV+VPA: 0.999
	RSV+VPA: 435.8±162.8		RSV vs VPA: 0.806
			RSV vs RSV+VPA: 0.0753#
			VPA vs RSV+VPA: 0.484
			CON vs RSV: 0.262
GFAP	CON: 445.0±121.7	Interaction: F (1, 19) = 6.811; p = 0.0172* VPA: F (1, 19) = 2.175; p = 0.1567	CON vs VPA: 0.964
CA1	RSV: 623.1±140.4		CON vs RSV+VPA: 0.988
	VPA: 509.1±168.7	RSV: F (1, 19) = 0.2951; p = 0.5933	RSV vs VPA: 0.656
	RSV+VPA: 392.4±81.06		RSV vs RSV+VPA: 0.0611#
			VPA vs RSV+VPA: 0.578
			CON vs RSV: 0.0323*
GFAP	CON: 409.5±170.2	Interaction: F (1, 19) = 6.286; p = 0.0214* VPA: F (1, 19) = 2.539; p = 0.1276	CON vs VPA: 0.987
CA2	RSV: 635.5±73.25		CON vs RSV+VPA: 0.998
	VPA: 453.4±109.4	RSV: F (1, 19) = 4.842; p = 0.0403*	RSV vs VPA: 0.077#
	RSV+VPA: 438.6±86.79		RSV vs RSV+VPA: 0.059#
			VPA vs RSV+VPA: >0.999
			CON vs RSV: 0.0023**
GFAP	CON: 427.0±97.55	Interaction: F (1, 19) = 9.676; p = 0.0058** VPA: F (1, 19) = 6.882; p = 0.0167*	CON vs VPA: 0.999
CA3	RSV: 682.6±36.56		CON vs RSV+VPA: 0.996
	VPA: 446.3±119.8	RSV: F (1, 19) = 11.25; p = 0.0033**	RSV vs VPA: 0.0023**
	RSV+VPA: 455.9±87.03		RSV vs RSV+VPA: 0.0047**
			VPA vs RSV+VPA: >0.999
			CON vs RSV: 0.069#
Number	CON: 80.80±11.73	Interaction: F (1, 19) = 6.965; p = 0.0162* VPA: F (1, 19) = 0.03032; p = 0.8636	CON vs VPA: 0.441
DG	RSV: 120.8±28.44		CON vs RSV+VPA: 0.928
	VPA: 104.4±22.65	RSV: F (1, 19) = 2.353; p = 0.1416	RSV vs VPA: 0.798
	RSV+VPA: 93.83±24.41		RSV vs RSV+VPA: 0.333
			VPA vs RSV+VPA: 0.959
			CON vs RSV: 0.307
Number	CON: 71.00±19.25	Interaction: F (1, 19) = 1.825; p = 0.1926 VPA: F (1, 19) = 0.04939; p = 0.8265	CON vs VPA: 0.965
CA1	RSV: 99.60±29.59		CON vs RSV+VPA: 0.908
	VPA: 81.71±19.49	RSV: F (1, 19) = 2.762; p = 0.1129	RSV vs VPA: 0.720
	RSV+VPA: 84.67±21.86		RSV vs RSV+VPA: 0.869
			VPA vs RSV+VPA: >0.999
			CON vs RSV: 0.0093**
Number	CON: 76.40±12.40	Interaction: F (1, 19) = 0.4575; p = 0.5069 VPA: F (1, 19) = 0.1254; p = 0.7272	CON vs VPA: 0.977
CA2	RSV: 118.8±16.63		CON vs RSV+VPA: 0.0107*
	VPA: 84.29±20.77	RSV: F (1, 19) = 23.66; p = 0.0001***	RSV vs VPA: 0.0253*
	RSV+VPA: 116.3±19.82		RSV vs RSV+VPA: >0.999
			VPA vs RSV+VPA: 0.0299*
			CON vs RSV: 0.0174*
Number	CON: 88.20±17.75	Interaction: F (1, 19) = 4.553; p = 0.0461* VPA: F (1, 19) = 6.695; p = 0.0181*	CON vs VPA: 0.999
CA3	RSV: 132.4±18.50		CON vs RSV+VPA: 0.999
	VPA: 84.29±21.88	RSV: F (1, 19) = 8.936; p = 0.0075**	RSV vs VPA: 0.0045**
	RSV+VPA: 91.67±22.23		RSV vs RSV+VPA: 0.0232*
			VPA vs RSV+VPA: 0.988

DG: dentate gyrus; SD: standard deviation. p <0.05 was considered significant. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Statistical analyses: two-way ANOVA parametric test followed by Sidak. N_{CON}: 5, N_{RSV}: 6, N_{VPA}: 6, N_{RSV+VPA}: 5.

List of Supplementary Tables

Supplementary Table 1 – Immunofluorescence and western blotting reagents information

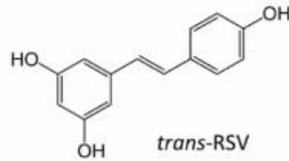
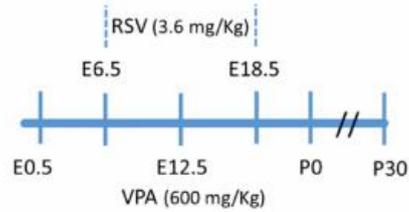
Immunofluorescence			
Reagent	Supplier	Code	Dilution
Anti-AQP1 (mouse)	Santa Cruz Biotechnology	sc-32737	1:500 in blocking solution – PBS-Triton 0.1% BSA 1%
Anti-AQP4 (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	sc-20812	1:500 in blocking solution – PBS-Triton 0.3% BSA 1%
Anti-GFAP (mouse)	Cell Signaling mAb	#3670	1:500 in blocking solution – PBS-Triton 0.3% BSA 1%
Anti-IgG (mouse) - Alexa 488	Molecular Probes	A11029	1:2000 in blocking solution – PBS-Triton 0.1% BSA 1%
Anti-IgG (rabbit) - Alexa 546	Molecular Probes	A11036	1:2000 in blocking solution – PBS-Triton 0.1% BSA 1%
DAPI Nucleic Acid Stain (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Invitrogen	MP01306	1:10000 in saline solution 0.9%
Mounting Medium Fluorshield	Sigma-Aldrich	F6182-20ML	
Western blotting			
Reagent	Supplier	Code	Dilution
Anti-AQP1 (mouse)	Santa Cruz Biotechnology	sc-32737	1:50 in blocking solution – 5% BSA-TTBS
Anti-AQP4 (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	sc-20812	1:50 in blocking solution – 5% BSA-TTBS
Anti-β-actin (mouse)	SIGMA Aldrich	A1978	1:3000 in TTBS
IgG-HRP (mouse)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2314	1:1000 in 5% milk-TTBS
IgG-HRP (rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	sc-2004	1:1000 in TTBS
Common reagents			
PBS	0.1 M pH 7.4 Phosphate-buffered saline		
SDS 10%	sodium dodecyl sulfate		
EDTA 100 mM	ethylenediamine tetraacetic acid		
TRIS/HCl buffer 500 mM pH 8	tris(hydroxymethyl)aminomethane and chloridric acid		
TBS	TRIS buffer		

Graphical abstract:

Autism Spectrum Disorder (ASD) animal model replicates the high brain volume described in ASD patients. Resveratrol (RSV) prevents changes in blood-brain barrier, aquaporin profile, edema formation, as well as promotes a functional amelioration in astrocytes.

Prenatal exposure to VPA in Wistar rats

- Altered the brain volume as described in ASD patients;
- Increased Evans blue dye permeability through the BBB;
- Changed the AQP1 and AQP4 pattern;
- Increased number of astrocytes and reactivity profile.



RSV prenatal treatment prevents

- Edema formation;
- Alterations in BBB organization;
- Altered AQP1 and AQP4 pattern;
- Increased number of astrocytes and reactivity profile.

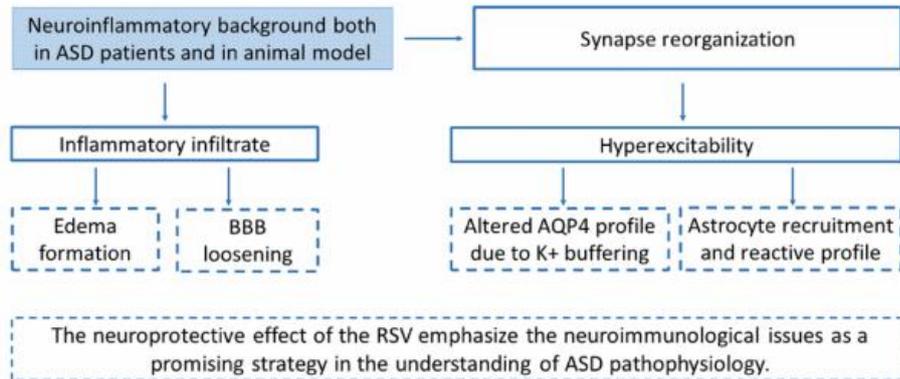


Figure 1

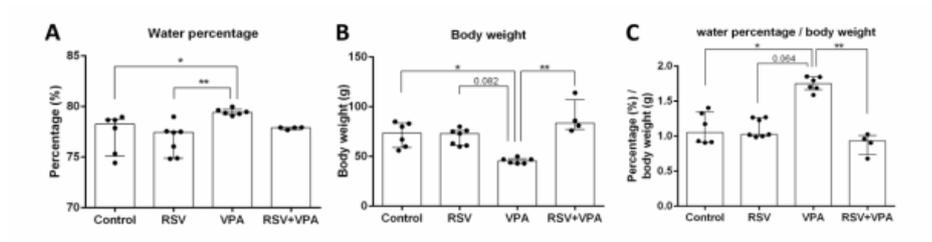


Figure 2

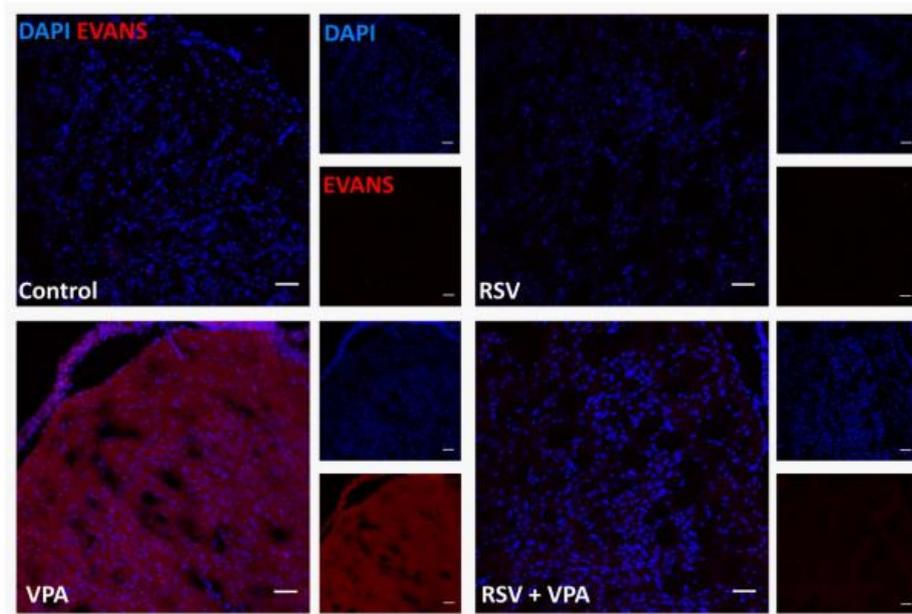


Figure 3

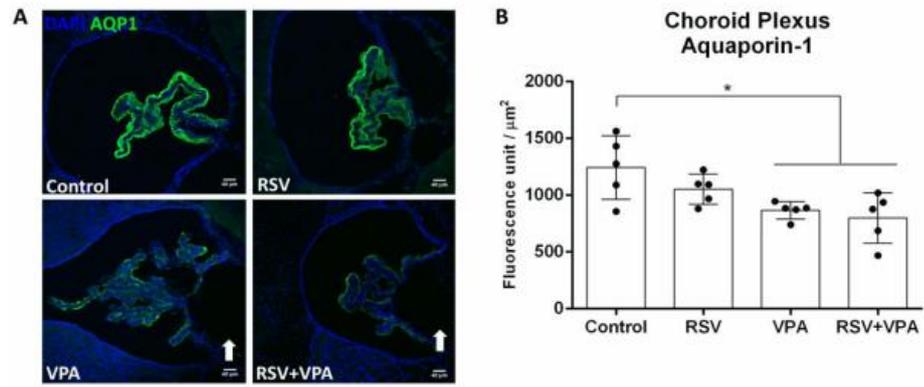


Figure 4

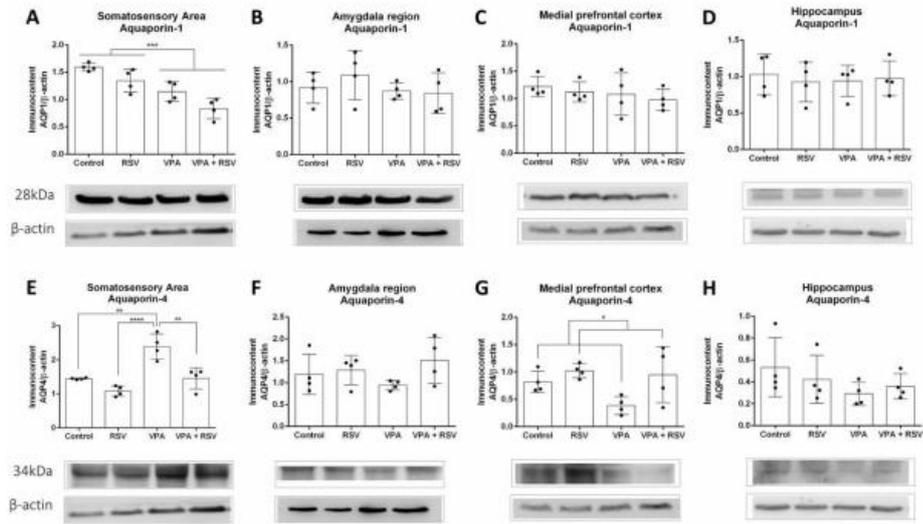
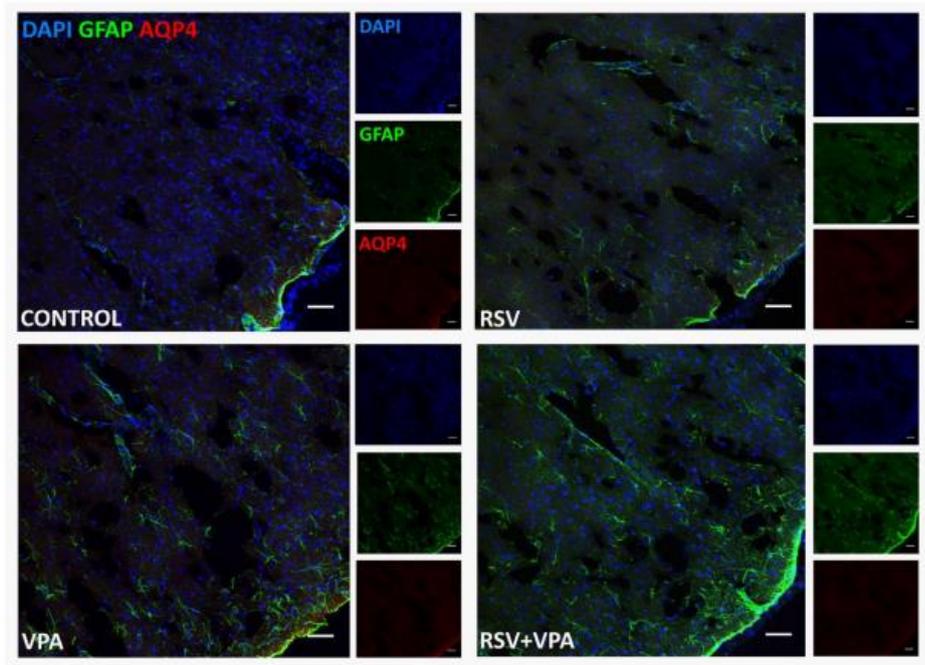
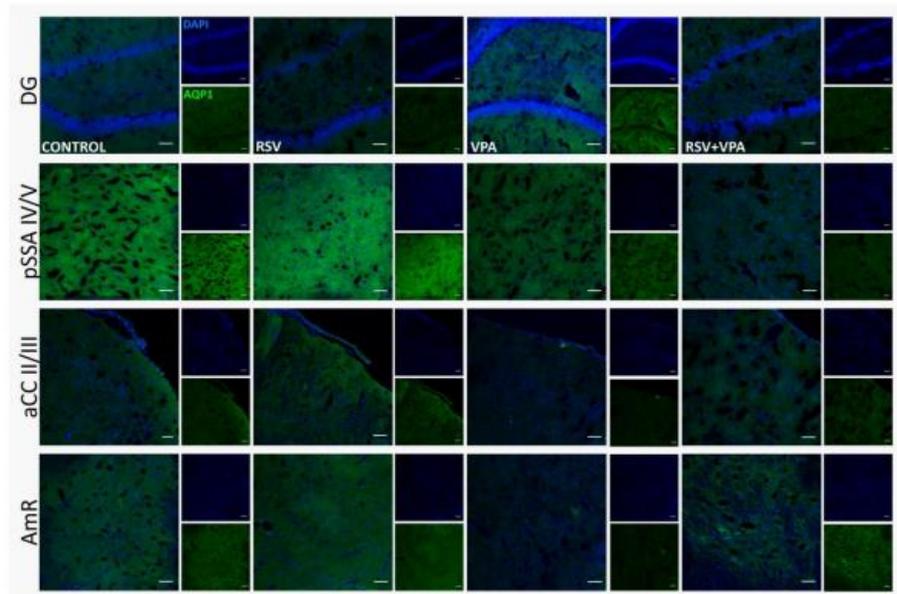


Figure 5

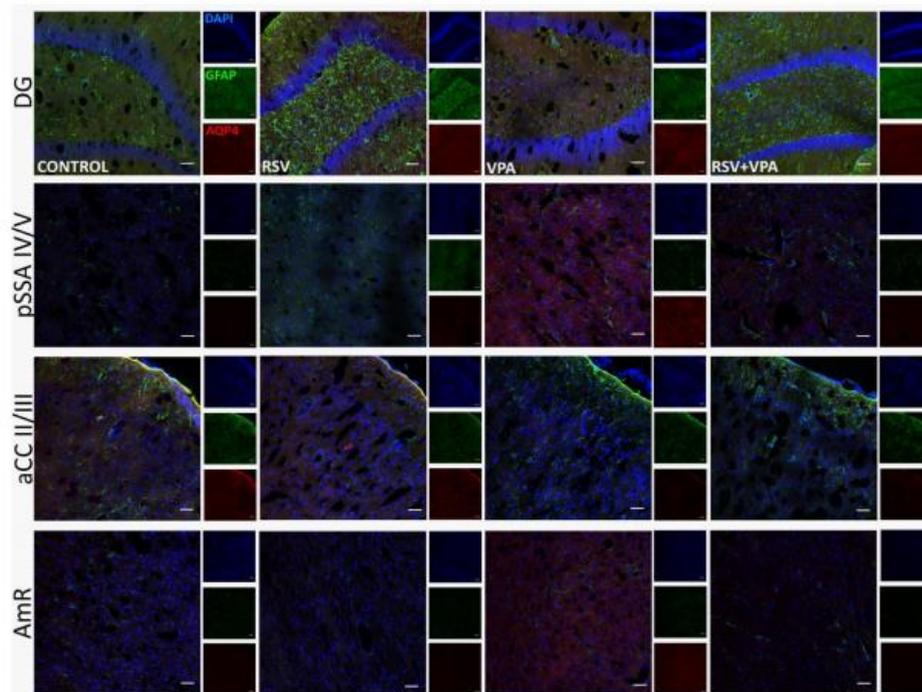


Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1 - Representative images of the AQP1 labeling. Illustrative images of DAPI (blue) and AQP1 (green) staining in the pSSA (layers IV/V), aCC (mPFC - layers II/III), DG (hippocampus) and AmR in the different experimental groups. Scale bar: 50 μ m.

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2 - Representative images of the AQP4 labeling. Illustrative images of DAPI (blue), GFAP (green) and AQP4 (red) staining in the pSSA (layers IV/V), aCC (mPFC - layers II/III), DG (hippocampus) and AmR in the different experimental groups. Scale bar: 50 μ m.

Capítulo II: revisão publicada

“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 (2018).

DOI: <https://doi.org/10.1159/000492113>

1 **Neuroimmune alterations in autism: a translational analysis focusing on**
2 **the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid**

3 Iohanna Deckmann^{1,2,3*}, Gustavo Brum Schwingel^{1,2,3}, Mellanie Fontes-
4 Dutra^{1,2,3}, Victorio Bambini-Junior^{1,3,4} and Carmem Gottfried^{1,2,3*}

5 1 Translational Research Group in Autism Spectrum Disorders-GETTEA,
6 Universidade Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, 90035-003 Porto Alegre,
7 RS, Brazil.

8 2 Neuroglial Plasticity Group, Department of Biochemistry, Universidade
9 Federal do Rio Grande do Sul -UFRGS, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

10 3 National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation-
11 INCT-NIM.

12 4 School of Pharmacology and Biomedical Sciences, University of Central
13 Lancashire, PR1 2HE, Preston, UK

14

15 *CORRESPONDING AUTHOR:

16 ID (iohanna.deckmann@gmail.com). CG (cgottfried@ufrgs.br)

17 Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do
18 Sul, Ramiro Barcelos, 2600 – 21111. CEP: 90035-003. Porto Alegre-RS, Brazil.

19

20

21

22

23

24

1 **ABSTRACT**

2 Autism Spectrum Disorder (ASD) is a highly prevalent developmental disorder
3 characterized by deficits in communication and social interaction and in
4 stereotyped or repetitive behaviors. Besides the classical behavioral dyad,
5 several comorbidities are frequently present in patients with ASD, such as
6 anxiety, epilepsy, sleep disturbances and gastrointestinal tract dysfunctions.
7 Although the etiology of ASD remains unclear, there is supporting evidence for
8 the involvement of both genetic and environmental factors. Valproic acid (VPA)
9 is an anticonvulsant and mood stabilizer that, when used during the gestational
10 period, increases the risk of ASD in the offspring. The animal model of autism
11 induced by prenatal exposure to VPA demonstrates important structural and
12 behavioral features that can be observed in individuals with autism, being an
13 excellent tool for testing new drug targets and developing novel behavior and
14 drug therapies. In addition, immunological alterations during pregnancy could
15 affect the developing embryo, since immune molecules can pass through the
16 placental barrier. In fact, exposure to pathogens during the pregnancy is a known
17 risk factor for ASD, and maternal immune activation can lead to autistic-like
18 features in animals. Interestingly, neuroimmune alterations are common in both
19 autistic individuals and in animal models of ASD. Thus, we summarize in the
20 present review important alterations on inflammatory markers, such cytokines
21 and chemokines in patients with ASD and in the VPA animal model.

22 **Keywords**

23 ASD, neuroimmune, cytokine, animal model, valproic acid

1 **INTRODUCTION**

2 Since the first descriptions, in the early 1940's by Leo Kanner and Hans
3 Asperger, new data has been shared to the scientific community about Autism
4 Spectrum Disorder (ASD) [1]. Currently, ASD is diagnosed by changes in two
5 behavioral domains: a) communication and social interaction impairments in
6 multiple contexts, including deficits in social reciprocity, non-verbal
7 communication used for social interaction and in skills to initiate, maintain and
8 understand relationships; and b) Repetitive behaviors, restricted and stereotyped
9 activities [2].

10 There is no clinical marker or quantitative examination in peripheral tissues
11 that can be used for an early diagnosis of this disorder [3]. Even though there are
12 many well accepted surveys for behavioral diagnosis, ASD is a highly complex
13 and heterogeneous disorder, presenting distinct manifestations, in which two
14 individuals hardly share the same set of symptoms [4,5]. The large heterogeneity
15 of the symptoms could potentially be explained by individual differences, for
16 example in the immune system. Alterations in cytokines levels are common in
17 autistic individuals, with a frequent observation of elevated levels of pro
18 inflammatory cytokines [6,7].

19 Genome-wide association studies (GWAS) have already described
20 interesting relations between immune system disruptions and neurological
21 disorders like autism and schizophrenia [8]. Specifically in ASD, an interesting
22 example is the dysregulated genes reported, as IL-1 β and IL-12, both involved in
23 cytokine-cytokine receptor interaction [9]. One study relating ASD and
24 neuroimmune genetic disruption shows an alteration on glutamate receptor
25 metabotropic 5 (GRM5) single nucleotide polymorphisms (SNPs) [10], which is

1 not exactly a neuroimmunological alteration, but this gene is highly expressed in
2 many neuronal regions implicated in ASD, besides acting on synaptic plasticity,
3 modulating innate immunity and microglia activation. When occurs a GRM5-
4 positive allosteric modulation, several negative behaviors described in ASD are
5 rescued, including stereotypies [10]. Taken together, the evidences showing
6 genes interaction and ASD diagnosis demonstrate important genetic contribution
7 in neuroimmunological imbalance in ASD.

8 According to the most recent epidemiological survey conducted in United
9 States, the current incidence of ASD is 1:68 [11]. Although the etiology of ASD
10 remains unknown, it is hypothesized that the onset of this disorder depends on
11 the interplay between genetic and environmental factors. Epidemiological
12 observations suggest that exposure to teratogens - especially in the first trimester
13 of pregnancy - could be closely related to ASD development. An important
14 example is the prenatal exposure to valproic acid (VPA) [12,13].

15 **Valproic acid (VPA) and VPA animal model**

16 The compound VPA is a drug widely used as an anticonvulsant and mood
17 stabilizer in the treatment of epilepsy and bipolar disorder [13,14]. Although VPA
18 is well tolerated and safe in adults, there is evidence of its teratogenicity [14].
19 Clinical studies over the years have shown that intrauterine exposure to VPA is
20 associated with birth defects, cognitive impairments, and increased risk of autism
21 [13]. In recent years, animal studies have investigated the anatomical, behavioral,
22 molecular, immunological and physiological outcomes related to exposure to
23 VPA [13].

24 Epidemiological observations demonstrate a strong correlation between
25 prenatal exposure to VPA and ASD [15–18]. Based on these observations, an

1 animal model for study of autism prenatally induced by VPA was established [19–
2 21]. Behavioral studies show that exposure to VPA in rats and mice leads to
3 several autistic-like behaviors in male offspring, including social behavior deficits,
4 increased repetitive behaviors, and communication deficits similar to those found
5 in ASD subjects [19–23], pointing out the animal model's translationality, as the
6 diagnosis of ASD is given through behavioral evaluation.

7 Since current diagnostic criteria for ASD are exclusively clinical and
8 resulted from behavioral analyses, the study of ASD in humans prior to the onset
9 of symptoms becomes a very challenging task. Animal models provide the
10 opportunity for analyzing the developmental changes that can trigger ASD-like
11 features [24,25]. They provide the possibility to study and manipulate biological
12 pathways for understanding and even preventing or reversing the appearance of
13 the morphological, functional and behavioral alterations found in ASD. In addition,
14 studies with animals can reveal some new important factors involved in the
15 etiology of this disorder.

16 **Histone-deacetylases inhibitors (HDACi) and neuroimmune alterations**

17 Autism and many other psychiatric disorders, like schizophrenia, bipolar
18 disorder and major depression present not only susceptibility to environmental
19 risk factors, but also a high genetic influence [26,27]. In the last years, there is
20 growing evidence indicating that epigenetic alterations may have an important
21 role in several psychiatric disorders.

22 Epigenetic regulation includes long-term changes, as DNA methylation,
23 and short-term changes, as modifications in histone proteins associated with
24 DNA [28]. Histones are small basic proteins that act as spools around which DNA
25 winds, regulating the packaging of DNA and allowing or inhibiting gene

1 expression. When the histone is acetylated by histone acetyltransferases
2 (HATs), this local alteration leads to chromatin decondensation, promoting gene
3 expression by the activation of the transcription machinery. On the other hand,
4 histone deacetylation - mediated by histone deacetylases (HDACs), results in
5 inhibition of transcription promoting a controlled gene expression [28,29].

6 Substantial epigenetic alterations were found in the regulatory regions of
7 many candidate genes for ASD, such as GABAergic genes, GAD67, Reelin,
8 Oxytocin receptor, BDNF, showing that the epigenetic component in ASD has
9 been widely studied [26]. The histone post-translational modifications, as
10 acetylation and methylation, play a key role in the gene expression regulation
11 [30]. These characteristics are crucial for important biological processes like the
12 action of immune system, in which HDACs modulate gene expression of toll-like
13 receptors and interferon signaling pathways [31].

14 The HDAC inhibitors drugs play an important role in immune context.
15 Studies showed an increased transcription of the major histocompatibility
16 complex (MHC) class II, located in the tumor cell surface in mouse and humans
17 [32], indicating an interesting effect on several immune cells. It leads to less
18 viability of T CD4 cells and decreases the production of pro-inflammatory
19 cytokines, making the T CD8 cells increase the secretion of pro-inflammatory
20 cytokines, modulating the activity of natural killer (NK), as well in cells and Treg
21 cells [33].

22 Hence, several drugs used as antidepressants and mood stabilizer are
23 characterized as HDAC inhibitors class. Valproate, a well-known HDAC inhibitor
24 drug, induces important delays in the neuronal maturation [34], already described
25 in ASD [35]. Moreover, VPA prenatal exposure alters the postnatal histone 3 (H3)

1 acetylation levels in cerebellum [36], stimulates glial cell proliferation in the
2 developing rat brain [37] and also induces changes in acetylation levels in
3 astrocytes of hippocampus and cortex in cell culture, more than other
4 antidepressants and mood stabilizer [38]. These unique effects of VPA,
5 especially in comparison to similar HDAC inhibitor drugs, indicate that the VPA
6 molecule might have exclusive properties which are still unclear, although some
7 evidence indicates a possible VPA binding in the catalytic center of HDACs [39].
8 Those epigenetics alterations occur before the well described neuroimmune
9 alterations, and, thus, epigenetics mechanisms may be involved in the immune
10 disturbance [36]. These data highlight the role of the valproic acid and HDAC
11 inhibitors as epigenetic modulators that could be underpinning the immunological
12 alteration, as well as the neurological outcomes, in psychiatric disorders.

13 **The intimate relationship between central nervous system and immune** 14 **system**

15 For a long time, immune and central nervous systems were considered
16 compartments that operate separately and independently. However, recent
17 studies demonstrate an active communication between these two systems,
18 modulating bi-directly each other with neurotransmitters and neuromodulators in
19 periphery. In addition, in a landmark study, lymphatic vessels were discovered in
20 central nervous system, putting in check the current view of the brain as an
21 "immune privileged site" and raising new possibilities for the crosstalk between
22 brain and immune system [40]. Anatomically the central nervous system (CNS)
23 is bathed by the cerebrospinal fluid (CSF) and surrounded by the meninges,
24 which contain lymphatic and blood vessels [41]. The brain parenchyma is
25 separated from the circulating blood by a blood-brain barrier (BBB), which

1 prevents the entry of pathogens, circulating immune cells, and other substances
2 from the blood.

3 The BBB is defined as a semipermeable membrane that separates the
4 circulating blood from the brain and extracellular fluid in the central nervous
5 system [42]. CNS blood vessels interact with different peripheral and brain-
6 resident immune cell populations, as perivascular macrophages and microglial
7 cells, respectively. The BBB is formed by the concerted action of endothelial and
8 glial cells. During development, at embryonic day 10 (E10), initial clues for
9 angiogenesis lead to the early properties of BBB in CNS by activation of the
10 Wnt/b-Catenin canonical pathway [43–45]. There is no consensus about the
11 exact time when the BBB is fully formed [46]. Nevertheless, at E15, pericytes,
12 which have crucial roles in BBB formation and maintenance, begin to interact
13 intimately with endothelial cells (EC) in the capillary walls [47]. In postnatal life,
14 endothelial cells from brain capillaries are covered up by mature pericytes,
15 sharing their basement membrane with endothelial cells [48]. Moreover, the
16 astrocytes project cellular terminations called “end feet” toward the capillaries,
17 providing the outer layer of the BBB. Pericytes and astrocytes also secrete
18 proteins involved in extracellular matrix formation and deposition of the basement
19 membrane [48,49].

20 The presence of this limiting barrier allows the CNS to control and fine tune
21 the flow of a variety of molecules from periphery, regulating its permeability to
22 seek homeostasis. In CNS physiology, there are extensive vessels where
23 monocytes, granulocytes and dendritic cells circulate [50]. In addition, the brain
24 parenchyma is populated with microglia, resident-cells from the immune lineage
25 that play crucial roles in brain surveillance and response against multiple types

1 of damage. Studies with rodents showed that, during neurodevelopment, specific
2 monocytes emerge at E7 and infiltrate the CNS at E9.5 as pre-macrophages,
3 expressing the chemotactic factor CX3C chemokine-receptor 1 (CX3CR1) [50].
4 The presence of cytokines as interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor growth factor
5 beta (TGF- β) allows the differentiation of pre-macrophages in early microglia at
6 E14.5, which then generate mature microglia at P14. In fact, TGF- β seems to be
7 crucial for microglial specification in CNS [51,52].

8 Microglial cells are capable to interact with almost all cell types in the CNS
9 modulating cell maturation during development and promoting tissue repair and
10 homeostasis. Moreover, in postnatal life, microglia play crucial roles in sensing
11 perturbations in encephalic environment, actively responding to even minor
12 pathological changes in CNS [53,54] by altering their shape and gene expression
13 profile. The term "microglial activation" has been considered as a shift from a
14 "resting" stage to an "activated" state when disturbance of tissue homeostasis is
15 detected or upon experimental stimulation. However, this term implies the
16 understanding of an "inactivated" phenotype when brain tissue is not facing any
17 changes in homeostasis. In fact, microglial cells are never inactive, showing
18 highly dynamic surveillance functions in CNS [50,55,56]. Many authors are
19 suggesting to rename this surveillance state of microglial cells to "surveying
20 microglia", instead of "resting microglia" [50]. These cells can shift from their
21 "surveying" or "resting" state to "activated" or "alerted" state when facing changes
22 in CNS homeostasis, as infections recognized by toll-like receptors [57], cell
23 damage or trauma. Recent studies have demonstrated that the
24 lipopolysaccharide (LPS) exposure downregulates the transcriptional factor Sal-
25 like protein 1 (SALL1) and promotes several alterations in microglial identity, with

1 a concomitant upregulation of genes associated to other resident macrophages,
2 indicating that SALL1 might be important for maintenance of microglial identity in
3 response to immune challenge [50,58]. Once activated, microglial cells can
4 commit to different phenotypes called “reactive”, having a large functional and
5 molecular diversity. These changes in microglia profile are correlated with the
6 type of challenge faced by the CNS. They can shift to a pro-inflammatory state
7 also called “M1 phenotype” [59] presenting highly phagocytic and neurotoxic
8 activities and releasing pro-inflammatory chemokines and cytokines in response
9 to an immune challenge, such as a microorganism invasion [60] or the presence
10 of pro inflammatory signals [61–63]. Once the immune stimulator is controlled,
11 microglial cells are able to shift to a more neuroprotective profile called “M2
12 phenotype” which involves anti-inflammatory responses [59,64]. Nonetheless,
13 the activated pro-inflammatory profile can progress in pathological conditions.
14 Although the immune challenge and the brain environment are responsible for
15 the early microglial responses, signals from CNS resident and infiltrating immune
16 cells can shape reactive profiles of microglial cells and play important roles in
17 many brain diseases [65–69]. All these stimuli could direct microglia’s fate to
18 alternative states, including microglial cell death, but there’s still scarce
19 information about the course of microglial activation, their reversibility to the
20 surveying state [70] or the preservation of molecular memory of previous stimuli.
21 Moreover, cells that infiltrate from the blood and differentiated into microglia could
22 also return to the periphery [65,71].

23 There is a low basal entry of immune cells from blood periphery into the
24 CNS in normal conditions. Studies have shown that, although microglial cells play
25 major roles in brain surveillance, the perivascular macrophages represent a

1 crucial immune regulator and sensor of perturbations in CNS and periphery.
2 These cells are derived from bone marrow and are intimately associated with the
3 bloodstream since they reside between endothelial cells and astrocyte's end feet
4 [72–74]. This privileged location of perivascular macrophages allow them to
5 simultaneously monitor the blood and the brain interstitial fluid, providing a fine
6 control of brain homeostasis and BBB integrity [72,75]. Although macrophages
7 display different locations, they can perform specific roles in these
8 microenvironments. In addition to perivascular space, macrophages can be
9 located within choroid plexus and meningeal space. In choroid plexus, which is
10 considered the major site of CNS immune surveillance, there are tissue-resident
11 macrophages called epiplexus cells disposed alongside the fourth ventricle with
12 dendritic cells (DC), monocytes and mast cells [76,77]. Referred by many authors
13 as the "immune regulatory gate", the choroid plexus is capable to induce specific
14 immune responses and allows cell migration between blood and CSF [78,79].
15 The meningeal macrophages are positioned in the subdural meninges and act as
16 sentinel cells for damage and infection in brain tissue, surveying the
17 cerebrospinal fluid (CSF) and the extracellular lumen of meningeal blood vessels
18 [80,81]. Thus, macrophages play critical roles in CNS surveillance, homeostasis
19 and disease. Nonetheless, there is a variety of other immune cell types in the
20 brain environment. In physiological condition, studies have observed the
21 presence of monocytes in meningeal spaces, although more evidence is still
22 needed [82]. Granulocytes (neutrophils, mast cells, eosinophils, and basophils)
23 can be found in meningeal spaces with mast cells also present in brain
24 parenchyma [72,83]. These cells are highly phagocytic and play important roles
25 in response to brain infections and tissue damage [72,84,85]. Dendritic cells (DC),

1 the main antigen-presenting cells in periphery, can also be found in CNS. They
2 are located in the choroid plexus, meningeal space, and are specially abundant
3 in lymphatic vessels in meninges [86–88]. The presence around these vessels
4 suggests important roles for DC in inflammatory diseases and brain infections
5 [40].

6 During inflammatory condition, there is extensive infiltration of immune
7 cells in the CNS. The barriers that regulate cellular entry are the blood-brain
8 barrier (BBB) within the CNS parenchyma, and the blood-cerebrospinal fluid
9 (blood-CSF) barrier within the choroid plexus" [89]. When brain homeostasis is
10 compromised, immune cells can infiltrate from the periphery to the brain
11 parenchyma due to the elevation in BBB permeability. This is generally observed
12 and investigated in the context of a pathological CNS inflammatory response [90–
13 92]. Under pathological conditions, microglia activation can lead to BBB
14 disruption, allowing a substantial cellular infiltrate and amplifying the inflammatory
15 response [93,94]. One of the key mediators in these processes is the release of
16 cytokines and chemokines by periphery and brain-resident immune cells. This
17 novel view of the immune system as an active player in brain function is modifying
18 our current view of neuropsychiatric disorders. Immune alterations are now seen
19 as central for the pathophysiology of many brain diseases and further
20 understanding of this neuroimmune axis can result in new therapies and
21 diagnostic tools.

22 **Neuroimmune alterations in ASD: from patients to the VPA animal model**

23 In the last decade, the immune system has caught the attention of
24 neuroscientists for the interplay between neurons and immune mediators, not
25 only in disease, but also in the homeostasis of the brain. In the past, the central

1 nervous system was called “an immune-privileged region”, once the blood brain
2 barrier controls the cross talking between brain and the periphery. However,
3 recent findings demonstrated that this privilege is not related to the absence of
4 immune modulation in brain activity and homeostasis, but a time-dependent
5 specific modulation in many regions during brain development [95]. Immune cells
6 and immune molecules, such as cytokines and chemokines, can modulate
7 cognitive, emotional and behavioral processes, triggering different responses in
8 neuronal and glial cells [96]. Cytokines are small signaling-molecules acting as
9 mediators of communication between immune cells. Their roles include
10 stimulation and regulation of cell development, maturation and response against
11 immune challenges [97,98]. Chemokines can be characterized as a vast group
12 of 8-10 kDa molecules from the super family of cytokines that induce chemotaxis
13 of immune cells. Once bound in their receptor, the complex chemokine-receptor
14 can activate signaling cascades that induce immune cell trafficking to the target
15 area. Also, this complex plays important roles as molecular signal in crosstalk
16 among neuronal and glial cells and immune resident cells in nervous system, as
17 microglia [99,100]. Since chemokines are capable to target different types of
18 receptor, they can modulate different cell processes, including cell adhesion,
19 proliferation, phagocytosis, apoptosis, angiogenesis, cytokine secretion and T
20 cell activation [101].

21 Lymphocytes are cells capable of recognizing any foreign antigens
22 displayed by antigen-presenting cells, constituting the main cells of adaptive
23 immunity [102]. Lymphocytes respond by proliferating and differentiating in
24 effector cells, whose function is the elimination of the pathogen and creation of
25 an immunological memory [103]. When naïve CD4+ T cells encounter specific

1 antigens, they can differentiate into a range of effector subgroups. Several
2 transcription factors are individually required for T-cell differentiation, generating
3 a specific lineage that express characteristic cytokines. That is, once specific
4 transcription factors are activated, they promote differentiation of naïve T cells,
5 which differentiate into specific immunological responses: Th1, Th2 and Th17. In
6 the presence of IFN- γ and IL-12, Signal transducer and activator of transcription
7 (STAT) 1 and STAT4 signal for the expression of the transcription factor T box
8 expressed in T cells (T-bet) and promotes response Th1. On the other hand, Th2
9 cell commitment occurs when IL-4 and STAT6 increase expression of GATA-
10 binding protein (GATA3) transcription factor. The presence of TGF- β associated
11 with IL-6 signaling via STAT3 generating the expression of retinoid-related
12 orphan receptor (ROR γ t) transcription factor, results in the differentiation of Th17
13 cells. Also, TGF- β , with IL-2 signaling via STAT5 is known to generate, at least
14 in vitro, inducible Treg cells, which express Foxp3 transcription factor (See Figure
15 1) [104].

16 The modulation of cytokine levels can alter significantly the brain
17 physiology and behavior. Recent studies highlight a link between immune
18 dysfunction and behavioral impairments [105]. For example, the relation between
19 IL-6 and several altered behaviors has already been established in the literature
20 [106–108]. Signs of neuroinflammation and altered inflammatory response are
21 seen in ASD subjects throughout life [109]. Therefore, some authors hypothesize
22 that the neuroimmune disturbances could be causal for ASD [110]. Below, we will
23 detail the main neuroimmunological findings (summarized in Tables 1 and 2) in
24 ASD subjects and in VPA animal model of autism:

25 *IL-1 β*

1 IL-1 β is a cytokine produced by fibroblasts, monocytes, tissue
2 macrophages, dendritic cells (DCs), B lymphocytes, epithelial cells, and natural
3 killer (NK) cells [111] that promotes inflammation by indirectly stimulating
4 lymphocyte function and activating macrophages [112,113]. IL-1 β has the ability
5 to increase the expression of adhesion molecules such as VCAM-1 and ICAM-
6 1, supporting the infiltration of inflammatory cells from the circulation into the
7 tissue and resulting in chronic IL-1-induced inflammation [112,113]. IL-1 β
8 stimulates expression of inflammatory mediators and induces T-helper type 17
9 (Th17) response. Furthermore it can also play important roles as a mediator of
10 the anti-inflammatory response [112,113].

11 Both elevation and reduction in IL-1 β levels have already been reported in
12 ASD subjects. Increased levels of IL-1 β were found in plasma [114,115], serum
13 [116,117], and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [118–120] whereas
14 decreased levels were described in neonatal dried blood samples (n-DBSS)
15 [121]. In VPA animal model, IL-1 β was increased in hippocampus [122,123], in
16 LPS-exposed hippocampus [109] and in whole brain homogenate [124].
17 Increased levels of this cytokine are associated with increased stereotypy [120],
18 one of the main characteristics of ASD.

19 *IL-2*

20 Interleukin-2 has an important role in controlling the survival of immature
21 and mature T cells [125] and is mainly secreted by CD8⁺ and CD4⁺ T cells after
22 recognition of the antigen and co-stimulators [111]. IL-2 is the most important
23 cytokine for promoting the clonal expansion of antigen-activated T cells [126].
24 The only report in ASD is a reduction of IL-2 levels in neonatal dried blood
25 samples (n-DBSS) [121].

1 *IL-4*

2 IL-4 is the main cytokine of Th2 response and is primarily produced by T
3 cells and mast cells. IL-4 promotes proliferation of B cells and cytotoxic T cells
4 and stimulates IgG and IgE production [97], besides stimulating leukocytes
5 recruitment and promoting the expression of adhesion molecules [127].
6 Increased levels of this cytokine were associated with greater impairments in non-
7 verbal communication [120]. In ASD subjects, reduced level of IL-4 in n-DBSS
8 [121] and elevated levels in amniotic fluid [128] have been reported.

9 *IL-5*

10 IL-5 is a cytokine produced by T cells that acts as an activator of
11 eosinophils [129]. IL-5 promotes eosinophil proliferation and maturation,
12 stimulating IgA and IgM production [97]. In ASD patients, a decrease in IL-5 in n-
13 DBSS [121] and an increase in plasma samples [115] were described.

14 *IL-6*

15 The main source of IL-6 are T-helper cells, macrophages and fibroblasts.
16 IL-6 targets activated B-cells and plasma cells, promoting differentiation into
17 plasma cells and IgG production [97]. IL-6 is also involved in induction of Th17
18 response and has a dual profile pro- and anti-inflammatory [112,113]. Studies
19 have demonstrated essential involvement of IL-6 in triggering core symptoms
20 related to pro-inflammatory response in autistic model of maternal immune
21 activation (MIA) [130].

22 Increased levels of IL-6 are associated with increased stereotypy in ASD
23 [120], impaired cognitive abilities, abnormal anxiety and decreased social
24 interactions [107]. Here, we review the main findings about IL-6 levels in ASD: IL-
25 6 is elevated in brain tissue (cerebellum, frontal cortex and anterior cingulated

1 gyrus) [7,131,132], and in serum and PBMC [116–120], while it is reduced in
2 plasma and n-DBSS [114,121]. In the VPA animal model of autism, higher levels
3 of IL-6 were reported in hippocampus [123], hippocampus and spleen after LPS
4 challenge [109] and whole brain homogenate [124].

5 *IL-8*

6 Interleukin-8 is a chemoattractant cytokine produced mainly by
7 macrophages that specifically targets neutrophils, promoting their activation
8 [133]. So, its major functions result from its chemotactic and pro-inflammatory
9 activities [97]. Elevated levels of this cytokine were associated with increased
10 hyperactivity, stereotypy, and lethargy [120]. Higher levels of IL-8 was described
11 in frontal cortex [132], plasma [115], cerebrospinal fluid (CSF) [134], PBMCs [120]
12 and n-DBSS [121] of ASD subjects.

13 *IL-10*

14 This cytokine can be produced by several cellular types including DCs,
15 macrophages, mast cells, NK cells, eosinophils, neutrophils and B cells [135],
16 and is able to regulate growth and/or differentiation of B cells, NK cells, cytotoxic
17 and helper T cells, mast cells, granulocytes, dendritic cells, keratinocytes, and
18 endothelial cells, exerting a primarily anti-inflammatory activity [97,135]. IL-10 is
19 important to fine tune the immune response against invading pathogens,
20 maintaining the homeostatic state [135]. In ASD patients, increased levels to IL-
21 10 were found in anterior cingulate gyrus and amniotic fluid [128,134], while IL-
22 10 levels is decreased in PBMCs [96].

23 *IL-12*

24 IL-12 is produced by T cell and acts in naïve T-cells and NK cells,
25 activating them [97], and inducing IFN γ production, which is critical for the

1 induction of Th1 cells [136]. Plasma, PBMCs and serum of ASD subjects show
2 higher levels of IL-12 [115,117,120] whereas n-DBSS show lower IL-12 levels
3 [121]. Increased IL-12 levels were associated with increased stereotypy and
4 lethargy in ASD patients [120].

5 *IL-13*

6 Similarly to IL-4, IL-13 is involved in type-2 immunity and is produced by
7 T-cells. However, basophils, eosinophils and NK cells can also produce IL-13
8 [137]. The only report in autistic patients shows increased plasma levels of IL-13
9 [115].

10 *IL-17*

11 Interleukin-17 has an important role in immunity against intra and
12 extracellular pathogens [138]. IL-17-producing cells including natural killer T cells
13 and innate lymphoid cells play crucial roles in inflammation-associated diseases,
14 such as infection, autoimmunity and tumors [139]. Also was described the effector
15 role of IL-17a in onset of offspring behavioral abnormalities of mothers MIA-
16 induced, showing the important crosstalk between the neuroinflammatory state
17 and behavioral manifestations [140]. Increase levels of IL-17 have been reported
18 in plasma and serum [115,141] of patients with ASD.

19 *IL-23*

20 Considered a pro-inflammatory cytokine essential for the differentiation of
21 Th17 lymphocytes [142], IL-23 is produced by macrophages, dendritic cells,
22 keratinocytes and other antigen-presenting cells after recognition of
23 microorganisms [143]. IL-23 is critically involved in autoimmune diseases
24 responses [144]. In autistic patients, elevated IL-23 levels in serum samples were
25 reported [117].

1 *TNF- α*

2 The tumor necrosis factor alpha (TNF α) is an endotoxin-induced serum
3 factor promoting phagocyte cell activation [97], whose main targets and
4 producers are macrophages. TNF α is in higher levels both in patients (frontal
5 cortex [132], PBMC [96,118,119,145], serum [117] and amniotic fluid [128]) and
6 in the VPA animal model of autism (hippocampus and spleen responding to LPS
7 [109] and whole brain tissue [124]).

8 *IFN- γ*

9 Interferon- γ (IFN- γ) plays an important role in host defense against
10 intracellular pathogens. It is produced by NK T cells, CD8+ T cells, and T-helper
11 1 (Th1) CD4+ T cells and its functions include supporting Th1 differentiation [146],
12 and macrophage activation and increasing neutrophil and monocyte function [97].
13 Patients with ASD have increased levels of IFN- γ in frontal cortex [132], plasma
14 [147], CSF [134] and PBMC [96] and reduced levels in n-DBSS [121].

15 *TGF β 1*

16 TGF- β is primarily secreted by T cells and B cells, and acts in activated T
17 and B cells. The major function of this cytokine is to inhibit hematopoiesis and T
18 and B cell proliferation [97]. Higher levels to TGF β 1 were reported in anterior
19 cingulated gyrus and CSF [134] of ASD subjects.

20 *MCP-1*

21 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) or C-C chemokine ligand 2
22 (CCL2) signals to cells that contain the specific CCR2 receptor, stimulating their
23 migration to sites where CCL2 is produced and facilitating the amplification of
24 neuroinflammation [148]. Higher levels of MCP-1 were observed in plasma [149],
25 CSF [134] and amniotic fluid [128] of autistic subjects. Increased levels in plasma

1 were associated with greater impairments in visual reception, fine motor skills
2 and expressive language [149].

3 *GM-CSF*

4 Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is produced
5 by T cells, macrophages and fibroblasts and targets stem cells. Its major function
6 is to stimulate production of granulocyte, monocyte and eosinophils [97].
7 Diminished levels of GM-CSF were described in n-DBSS of ASD pediatric
8 subjects [121].

9 *G-CSF*

10 The main source of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) are
11 fibroblasts and endothelial cells and its targets are stem cells in the bone marrow.
12 G-CSF has a hematopoietic function and stimulates granulocyte production [97].
13 Higher levels of this cytokine were described in plasma of autistic patients [114].

14 *EGF*

15 Epidermal growth factor (EGF) is a small chemoattractant peptide
16 produced by activated T cells that is involved with wound healing by attracting
17 fibroblasts and epithelial cells [114]. Higher levels of this chemokine were
18 reported in plasma samples from autistic patients [114].

19 *RANTES*

20 Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
21 (RANTES) chemokine or CCL5 is involved in immune cell transport to the
22 inflammation site, promoting polarization towards an Th1 response [150]. Higher
23 levels were associated with increased severity of lethargy, stereotypy and
24 hyperactivity [149] in ASD patients.

25 *Eotaxin*

1 The CC chemokine eotaxin/CCL11 is known to bind to the receptor CCR3
2 on eosinophils and Th2-type lymphocytes [151]. Increased levels of Eotaxin were
3 associated with increased severity of lethargy, stereotypy and hyperactivity in
4 ASD subjects [149].

5 **Final considerations**

6 Autistic Spectrum Disorder has a high prevalence and a growing incidence
7 over the last few years. This has driven investments in public health and
8 mobilized researchers and health professionals worldwide. There has been a
9 significant progress in ASD research since the disorder was first described, but
10 to date, its etiology remains unclear. An interesting hypothesis is that
11 dysregulation of neuroimmune communication is involved in the onset of ASD. In
12 this review, we summarized the main neuroimmune alterations found both in ASD
13 subjects and in the VPA animal model of autism. Noticeably, several changes in
14 the VPA model reflect the alterations found in patients with ASD (Figure 2).
15 Animal models that present face and construct validity, such as the VPA model,
16 can be an effective tool for the investigation of pathways and tissue alterations
17 involved with the pathogenesis of ASD.

18 **Acknowledgements**

19 This work was supported by development agencies: Conselho Nacional
20 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de
21 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Instituto Nacional de
22 Ciência e Tecnologia em NeuroImunoModulação (INCT-NIM). The authors have
23 no conflicts of interest.

24

1 **References**

- 2 1 Leo Kanner: Autistic disturbance of affective contact. *Pathology* 1943
3 [cited 2018 Jan 27];2:217–250.
- 4 2 APA - American Psychiatric Association: DSM-5 Diagnostic Classification;
5 in : *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American
6 Psychiatric Association, 2013. DOI:
7 10.1176/appi.books.9780890425596.x00DiagnosticClassification
- 8 3 Huerta M, Lord C: Diagnostic Evaluation of Autism Spectrum Disorders.
9 *Pediatr Clin North Am* 2012;103–111.
- 10 4 Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT: Autismo e doenças invasivas de
11 desenvolvimento. *J Pediatr* 2004 [cited 2018 Jan 27];S83–S94.
- 12 5 Rapin I, Tuchman RF: Autism: Definition, Neurobiology, Screening,
13 Diagnosis. *Pediatr Clin North Am* 2008;55:1129–1146.
- 14 6 Tonhajzerova I, Ondrejka I, Mestanik M, Mikolka P, Hrtanek I,
15 Mestanikova A, et al.: Inflammatory Activity in Autism Spectrum Disorder;
16 in : *Advances in experimental medicine and biology*. 2015, pp 93–98.
- 17 7 Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA:
18 Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with
19 autism. *Ann Neurol* 2005;57:67–81.
- 20 8 Autism Spectrum Disorders Working Group of The Psychiatric Genomics
21 Consortium TASDWG of TPG: Meta-analysis of GWAS of over 16,000
22 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at
23 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Mol Autism*
24 2017;8:21.
- 25 9 Lintas C, Sacco R, Persico AM: Genome-wide expression studies in

- 1 Autism spectrum disorder, Rett syndrome, and Down syndrome.
2 Neurobiol Dis 2012;45:57–68.
- 3 10 Skafidas E, Testa R, Zantomio D, Chana G, Everall IP, Pantelis C:
4 Predicting the diagnosis of autism spectrum disorder using gene pathway
5 analysis. Mol Psychiatry 2014;19:504–510.
- 6 11 Christensen DL, Baio J, Braun KVN, Bilder D, Charles J, Constantino JN,
7 et al.: Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder
8 Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities
9 Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. MMWR Surveill Summ
10 2016;65:1–23.
- 11 12 Smith V, Brown N: Prenatal valproate exposure and risk of autism
12 spectrum disorders and childhood autism. Arch Dis Child Educ Pract Ed
13 2014;99:198.
- 14 13 Rouillet FI, Lai JKY, Foster JA: In utero exposure to valproic acid and
15 autism - A current review of clinical and animal studies. Neurotoxicol
16 Teratol 2013;36:47–56.
- 17 14 Ranger P, Ellenbroek BA: Perinatal Influences of Valproate on Brain and
18 Behaviour: An Animal Model for Autism; in : Current topics in behavioral
19 neurosciences. 2015, pp 363–386.
- 20 15 Christianson AL, Chester N, Kromberg JGR: Fetal Valproate Syndrome:
21 Clinical and Neuro-developmental Features in Two Sibling Pairs. Dev
22 Med Child Neurol 1994;36:361–369.
- 23 16 Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, Glover S, Lloyd DJ, Montgomery T, et
24 al.: A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. J
25 Med Genet 2000 [cited 2018 Jan 29];37:489–497.

- 1 17 Williams G, King J, Cunningham M, Stephan M, Kerr B, Hersh JH: Fetal
2 valproate syndrome and autism: additional evidence of an association.
3 Dev Med Child Neurol 2001;43:202–206.
- 4 18 Williams PG, Hersh JH: A male with fetal valproate syndrome and autism.
5 Dev Med Child Neurol 1997;39:632–634.
- 6 19 Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Moreira JCF, Riesgo R,
7 Gottfried C: Animal model of autism induced by prenatal exposure to
8 valproate: behavioral changes and liver parameters. Brain Res
9 2011;1408:8–16.
- 10 20 Schneider T, Przewlocki R: Behavioral Alterations in Rats Prenatally
11 Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism.
12 Neuropsychopharmacology 2005;30:80–89.
- 13 21 Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B,
14 Schneider K, et al.: Gender-specific behavioral and immunological
15 alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to
16 valproic acid. Psychoneuroendocrinology 2008;33:728–740.
- 17 22 Rouillet FI, Wollaston L, Decatanzaro D, Foster JA: Behavioral and
18 molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the
19 anti-epileptic drug valproic acid. Neuroscience 2010;170:514–22.
- 20 23 Baronio D, Castro K, Gonchoroski T, de Melo GM, Nunes GDF, Bambini-
21 Junior V, et al.: Effects of an H3R Antagonist on the Animal Model of
22 Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. PLoS One
23 2015;10:e0116363.
- 24 24 Favre MR, Barkat TR, Lamendola D, Khazen G, Markram H, Markram K:
25 General developmental health in the VPA-rat model of autism. Front

- 1 Behav Neurosci 2013;7:88.
- 2 25 Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T: Autism-like
3 behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated
4 prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013;16:91–
5 103.
- 6 26 Zhubi A, Cook EH, Guidotti A, Grayson DR: Epigenetic mechanisms in
7 autism spectrum disorder. ed 1 Elsevier Inc., 2014. DOI: 10.1016/B978-0-
8 12-801311-3.00006-8
- 9 27 Uher R: Gene-environment interactions in severe mental illness. *Front*
10 *psychiatry* 2014;5:48.
- 11 28 Misztak P, Pańczyszyn-Trzewik P, Sowa-Kućma M: Histone deacetylases
12 (HDACs) as therapeutic target for depressive disorders. *Pharmacol*
13 *Reports* 2018;70:398–408.
- 14 29 Koprinarova M, Schnekenburger M, Diederich M: Role of Histone
15 Acetylation in Cell Cycle Regulation. *Curr Top Med Chem* 2015;16:732–
16 744.
- 17 30 Nadal S, Raj R, Mohammed S, Davis BG: Synthetic post-translational
18 modification of histones. *Curr Opin Chem Biol* 2018;45:35–47.
- 19 31 Hu Y, Suliman BA: Roles of HDACs in the Responses of Innate Immune
20 Cells and as Targets in Inflammatory Diseases. *Adv Exp Med Biol*
21 2017;1024:91–110.
- 22 32 Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C,
23 et al.: Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone
24 deacetylase inhibitors. *J Immunol* 2000 [cited 2018 Mar 18];165:7017–24.
- 25 33 Kroesen M, Gielen PR, Brok IC, Armandari I, Hoogerbrugge PM, Adema

- 1 GJ: HDAC inhibitors and immunotherapy; a double edged sword?
2 Oncotarget 2014;5:6558–6572.
- 3 34 Kawanai T, Ago Y, Watanabe R, Inoue A, Taruta A, Onaka Y, et al.:
4 Prenatal Exposure to Histone Deacetylase Inhibitors Affects Gene
5 Expression of Autism-Related Molecules and Delays Neuronal
6 Maturation. *Neurochem Res* 2016;41:2574–2584.
- 7 35 Marchetto MC, Belinson H, Tian Y, Freitas BC, Fu C, Vadodaria K, et al.:
8 Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic
9 autistic individuals. *Mol Psychiatry* 2017;22:820–835.
- 10 36 Kazlauskas N, Campolongo M, Lucchina L, Zappala C, Depino AM:
11 Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups
12 prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*
13 2016;72:11–21.
- 14 37 Lee HJ, Dreyfus C, DiCicco-Bloom E: Valproic acid stimulates
15 proliferation of glial precursors during cortical gliogenesis in developing
16 rat. *Dev Neurobiol* 2016;76:780–798.
- 17 38 Perisic T, Zimmermann N, Kirmeier T, Asmus M, Tuorto F, Uhr M, et al.:
18 Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on
19 global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary
20 astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 2010;35:792–805.
- 21 39 Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, et al.:
22 Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing
23 differentiation of transformed cells. *EMBO J* 2001;20:6969–78.
- 24 40 Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et
25 al.: Structural and functional features of central nervous system lymphatic

- 1 vessels. *Nature* 2015;523:337–41.
- 2 41 Louveau A, Harris TH, Kipnis J: Revisiting the Mechanisms of CNS
3 Immune Privilege. *Trends Immunol* 2015;36:569–577.
- 4 42 Daneman R, Prat A: The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect
5 Biol* 2015;7:a020412.
- 6 43 Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM, Nathans J:
7 Norrin/Frizzled4 Signaling in Retinal Vascular Development and Blood
8 Brain Barrier Plasticity. *Cell* 2012;151:1332–1344.
- 9 44 Zhou Y, Nathans J: Gpr124 Controls CNS Angiogenesis and Blood-Brain
10 Barrier Integrity by Promoting Ligand-Specific Canonical Wnt Signaling.
11 *Dev Cell* 2014;31:248–256.
- 12 45 Zhou Y, Wang Y, Tischfield M, Williams J, Smallwood PM, Rattner A, et
13 al.: Canonical WNT signaling components in vascular development and
14 barrier formation. *J Clin Invest* 2014;124:3825–3846.
- 15 46 Hagan N, Ben-Zvi A: The molecular, cellular, and morphological
16 components of blood-brain barrier development during embryogenesis.
17 *Semin Cell Dev Biol* 2015;38:7–15.
- 18 47 Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic B V: Establishment and
19 Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* 2015;163:1064–1078.
- 20 48 Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA: Pericytes are required for
21 blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*
22 2010;468:562–566.
- 23 49 Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, et al.:
24 Pericytes Control Key Neurovascular Functions and Neuronal Phenotype
25 in the Adult Brain and during Brain Aging. *Neuron* 2010;68:409–427.

- 1 50 Li Q, Barres BA: Microglia and macrophages in brain homeostasis and
2 disease. *Nat Rev Immunol* 2017; DOI: 10.1038/nri.2017.125
- 3 51 Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely
4 G, et al.: Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and
5 functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 2014;17:131–143.
- 6 52 Bohlen CJ, Bennett FC, Tucker AF, Collins HY, Mulinyawe SB, Barres
7 BA: Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and
8 Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron* 2017;94:759–
9 773.e8.
- 10 53 Kreutzberg GW: Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.
11 *Trends Neurosci* 1996 [cited 2018 Mar 23];19:312–8.
- 12 54 Raivich G, Banati R: Brain microglia and blood-derived macrophages:
13 molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal
14 models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Res Rev*
15 2004;46:261–281.
- 16 55 Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F: Resting Microglial Cells Are
17 Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science* (80-)
18 2005;308:1314–1318.
- 19 56 Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J: Resting
20 Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and
21 Determine the Fate of Ischemic Terminals. *J Neurosci* 2009;29:3974–
22 3980.
- 23 57 Olson JK, Miller SD: Microglia initiate central nervous system innate and
24 adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 2004
25 [cited 2018 Mar 23];173:3916–24.

- 1 58 Buttgereit A, Lelios I, Yu X, Vrohllings M, Krakoski NR, Gautier EL, et al.:
2 Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function.
3 Nat Immunol 2016;17:1397–1406.
- 4 59 Parisi C, Napoli G, Pelegrin P, Volonté C: M1 and M2 Functional
5 Imprinting of Primary Microglia: Role of P2X7 Activation and miR-125b.
6 Mediators Inflamm 2016;2016:2989548.
- 7 60 Hanisch U-K, Prinz M, Angstwurm K, Hausler KG, Kann O, Kettenmann
8 H, et al.: The protein tyrosine kinase inhibitor AG126 prevents the massive
9 microglial cytokine induction by pneumococcal cell walls. Eur J Immunol
10 2001 [cited 2018 Mar 23];31:2104–2115.
- 11 61 Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H,
12 et al.: Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines
13 and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-
14 stimulated mouse microglia and macrophages. Eur J Neurosci 2002 [cited
15 2018 Mar 23];16:2113–22.
- 16 62 Škuljec J, Sun H, Pul R, Bénardais K, Ragancokova D, Moharregh-
17 Khiabani D, et al.: CCL5 induces a pro-inflammatory profile in microglia in
18 vitro. Cell Immunol 2011;270:164–171.
- 19 63 Zarruk JG, Greenhalgh AD, David S: Microglia and macrophages differ in
20 their inflammatory profile after permanent brain ischemia. Exp Neurol
21 2018;301:120–132.
- 22 64 Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, et al.: Microglial and
23 macrophage polarization—new prospects for brain repair. Nat Rev Neurol
24 2015;11:56–64.
- 25 65 Hanisch U-K, Kettenmann H: Microglia: active sensor and versatile

- 1 effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*
2 2007;10:1387–1394.
- 3 66 Friedman BA, Srinivasan K, Ayalon G, Meilandt WJ, Lin H, Huntley MA, et
4 al.: Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial
5 Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in
6 Mouse Models. *Cell Rep* 2018;22:832–847.
- 7 67 Koyama R, Ikegaya Y: Microglia in the pathogenesis of autism spectrum
8 disorders. *Neurosci Res* 2015;100:1–5.
- 9 68 Hansen D V., Hanson JE, Sheng M: Microglia in Alzheimer's disease. *J*
10 *Cell Biol* 2018;217:459–472.
- 11 69 Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF,
12 Lassmann H, et al.: Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple
13 Sclerosis. *N Engl J Med* 2011;365:2188–2197.
- 14 70 Antonietta Ajmone-Cat M, Mancini M, De Simone R, Cilli P, Minghetti L:
15 Microglial polarization and plasticity: Evidence from organotypic
16 hippocampal slice cultures. *Glia* 2013;61:1698–1711.
- 17 71 Serhan CN, Savill J: Resolution of inflammation: the beginning programs
18 the end. *Nat Immunol* 2005;6:1191–1197.
- 19 72 Herz J, Filiano AJ, Smith A, Yogev N, Kipnis J: Myeloid Cells in the
20 Central Nervous System. *Immun Rev* 2017; DOI:
21 10.1016/j.immuni.2017.06.007
- 22 73 Serrats J, Schiltz JC, García-Bueno B, van Rooijen N, Reyes TM,
23 Sawchenko PE: Dual Roles for Perivascular Macrophages in Immune-to-
24 Brain Signaling. *Neuron* 2010;65:94–106.
- 25 74 Williams K, Alvarez X, Lackner AA: Central nervous system perivascular

- 1 cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral
2 immune system. *Glia* 2001 [cited 2018 Mar 23];36:156–64.
- 3 75 He H, Mack JJ, Güç E, Warren CM, Squadrito ML, Kilarski WW, et al.:
4 Perivascular Macrophages Limit Permeability Highlights. *Arterioscler
5 Thromb Vasc Biol* 2016;36:2203–2212.
- 6 76 Shechter R, London A, Schwartz M: Orchestrated leukocyte recruitment
7 to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates.
8 *Nat Rev Immunol* 2013;13:206–218.
- 9 77 Quintana E, Fernández A, Velasco P, de Andrés B, Liste I, Sancho D, et
10 al.: DNGR-1⁺ dendritic cells are located in meningeal membrane and
11 choroid plexus of the noninjured brain. *Glia* 2015;63:2231–2248.
- 12 78 Meeker RB, Williams K, Killebrew DA, Hudson LC: Cell trafficking through
13 the choroid plexus. *Cell Adh Migr* 2012;6:390–6.
- 14 79 Mendez-Gomez HR, Galera-Prat A, Meyers C, Chen W, Carrion-Vazquez
15 M, Muzyczka N: Crossing the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier in the
16 Mouse Choroid Plexus With an Engineered Receptor/Ligand System. *Mol
17 Ther* 2015;23:S65.
- 18 80 Kierdorf K, Prinz M, Gomez Perdiguero E: Development and function of
19 tissue resident macrophages in mice. *Semin Immunol* 2015;27:369–378.
- 20 81 Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T, Koretsky AP, Latour LL, McGavern DB:
21 Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury.
22 *Nature* 2014;505:223–228.
- 23 82 Mildner A, Mack M, Schmidt H, Brück W, Djukic M, Zabel MD, et al.:
24 CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of
25 autoimmunity in the central nervous system. *Brain* 2009;132:2487–2500.

- 1 83 Dong H, Zhang X, Qian Y: Mast cells and neuroinflammation. *Med Sci*
2 *Monit Basic Res* 2014;20:200–6.
- 3 84 Prinz M, Priller J: The role of peripheral immune cells in the CNS in
4 steady state and disease. *Nat Neurosci* 2017;20:136–144.
- 5 85 Nau R, Zettl U, Gerber J, Trostdorf F, Michel U, Böttcher T, et al.:
6 Granulocytes in the subarachnoid space of humans and rabbits with
7 bacterial meningitis undergo apoptosis and are eliminated by
8 macrophages. *Acta Neuropathol* 1998;96:472–480.
- 9 86 McMenamin PG, Wealthall RJ, Deverall M, Cooper SJ, Griffin B:
10 Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus:
11 three-dimensional localisation by environmental scanning electron
12 microscopy and confocal microscopy. *Cell Tissue Res* 2003;313:259–
13 269.
- 14 87 Chinnery HR, Ruitenberg MJ, McMenamin PG: Novel Characterization of
15 Monocyte-Derived Cell Populations in the Meninges and Choroid Plexus
16 and Their Rates of Replenishment in Bone Marrow Chimeric Mice. *J*
17 *Neuropathol Exp Neurol* 2010;69:896–909.
- 18 88 Anandasabapathy N, Victora GD, Meredith M, Feder R, Dong B, Kluger
19 C, et al.: Flt3L controls the development of radiosensitive dendritic cells in
20 the meninges and choroid plexus of the steady-state mouse brain. *J Exp*
21 *Med* 2011;208:1695–1705.
- 22 89 Prendergast CT, Anderton SM: Immune cell entry to central nervous
23 system--current understanding and prospective therapeutic targets.
24 *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2009 [cited 2018 Mar
25 23];9:315–27.

- 1 90 Fabis MJ, Phares TW, Kean RB, Koprowski H, Hooper DC: Blood– brain
2 barrier changes and cell invasion differ between therapeutic immune
3 clearance of neurotrophic virus and CNS autoimmunity. PNAS 2008 [cited
4 2018 Mar 23];Available from:
5 <http://www.pnas.org/content/pnas/105/40/15511.full.pdf>
- 6 91 Arima Y, Kamimura D, Sabharwal L, Yamada M, Bando H, Ogura H, et
7 al.: Regulation of immune cell infiltration into the CNS by regional neural
8 inputs explained by the gate theory. *Mediators Inflamm*
9 2013;2013:898165.
- 10 92 Dendrou CA, Fugger L, Friese MA: Immunopathology of multiple
11 sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2015;15:545–558.
- 12 93 da Fonseca ACC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C,
13 et al.: The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain
14 diseases. *Front Cell Neurosci* 2014;8:362.
- 15 94 Phares TW, Kean RB, Mikheeva T, Hooper DC: Regional Differences in
16 Blood-Brain Barrier Permeability Changes and Inflammation in the
17 Apathogenic Clearance of Virus from the Central Nervous System. *J*
18 *Immunol* 2006;114:1761–5.
- 19 95 Bilbo SD, Block CL, Bolton JL, Hanamsagar R, Tran PK: Beyond infection
20 - Maternal immune activation by environmental factors, microglial
21 development, and relevance for autism spectrum disorders. *Exp Neurol*
22 2018;299:241–251.
- 23 96 Ashwood P, Wills S, Van de Water J: The immune response in autism: a
24 new frontier for autism research. *J Leukoc Biol* 2006;80:1–15.
- 25 97 Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ: Cytokines and

- 1 chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory
2 disease. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843:2563–2582.
- 3 98 Masi A, Glozier N, Dale R, Guastella AJ: The Immune System, Cytokines,
4 and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. *Neurosci Bull*
5 2017;33:194–204.
- 6 99 Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT: Cytokines and chemokines at the
7 crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic
8 pain. *Mediators Inflamm* 2013;2013:480739.
- 9 100 Biber K, Vinet J, Boddeke HWGM: Neuron-microglia signaling:
10 Chemokines as versatile messengers. *J Neuroimmunol* 2008;198:69–74.
- 11 101 Réaux-Le Goazigo A, Van Steenwinckel J, Rostène W, Mélik
12 Parsadaniantz S: Current status of chemokines in the adult CNS. *Prog*
13 *Neurobiol* 2013;104:67–92.
- 14 102 Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ:
15 Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Garland
16 Science, 2001, [cited 2018 Mar 18]. Available from:
17 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27092/>
- 18 103 Metz DP, Bottomly K: Function and regulation of memory CD4 T cells.
19 *Immunol Res* 1999;19:127–141.
- 20 104 Amedei A, Prisco D, D'Elios M: Multiple Sclerosis: The Role of Cytokines
21 in Pathogenesis and in Therapies. *Int J Mol Sci* 2012;13:13438–13460.
- 22 105 Vijayakumar NT, Judy M V.: Autism spectrum disorders: Integration of the
23 genome, transcriptome and the environment. *J Neurol Sci* 2016; DOI:
24 10.1016/j.jns.2016.03.026
- 25 106 Erta M, Giralt M, Esposito FL, Fernandez-Gayol O, Hidalgo J: Astrocytic

- 1 IL-6 mediates locomotor activity, exploration, anxiety, learning and social
2 behavior. *Horm Behav* 2015;73:64–74.
- 3 107 Wei H, Chadman KK, McCloskey DP, Sheikh AM, Malik M, Brown WT, et
4 al.: Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and
5 mediates autism-like behaviors. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*
6 2012;1822:831–842.
- 7 108 Bluthé RM, Michaud B, Poli V, Dantzer R: Role of IL-6 in cytokine-induced
8 sickness behavior: a study with IL-6 deficient mice. *Physiol Behav* 2000
9 [cited 2018 Mar 19];70:367–73.
- 10 109 Lucchina L, Depino AM: Altered Peripheral and Central Inflammatory
11 Responses in a Mouse Model of Autism. *Autism Res* 2013;7:273–289.
- 12 110 Gottfried C, Bambini-Junior V, Francis F, Riesgo R, Savino W: The
13 Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. *Front*
14 *psychiatry* 2015;6:121.
- 15 111 Musolino C, Allegra A, Innao V, Allegra AG, Pioggia G, Gangemi S:
16 Inflammatory and Anti-Inflammatory Equilibrium, Proliferative and
17 Antiproliferative Balance: The Role of Cytokines in Multiple Myeloma.
18 *Mediators Inflamm* 2017;2017:1852517.
- 19 112 Dinarello CA: Immunological and Inflammatory Functions of the
20 Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519–550.
- 21 113 Gray SM, Bloch MH: Systematic review of proinflammatory cytokines in
22 obsessive-compulsive disorder. *Curr Psychiatry Rep* 2012;14:220–8.
- 23 114 Manzardo AM, Henkhaus R, Dhillon S, Butler MG: Plasma cytokine levels
24 in children with autistic disorder and unrelated siblings. *Int J Dev Neurosci*
25 2012;30:121–127.

- 1 115 Suzuki K, Matsuzaki H, Iwata K, Kameno Y, Shimmura C, Kawai S, et al.:
2 Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism
3 spectrum disorders. *PLoS One* 2011;6:1–6.
- 4 116 Emanuele E, Orsi P, Boso M, Broglio D, Brondino N, Barale F, et al.: Low-
5 grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neurosci Lett*
6 2010;471:162–165.
- 7 117 Ricci S, Businaro R, Ippoliti F, Lo Vasco VR, Massoni F, Onofri E, et al.:
8 Altered cytokine and BDNF levels in autism spectrum disorder. *Neurotox*
9 *Res* 2013;24:491–501.
- 10 118 Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P: Differential
11 monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum
12 disorders. *Brain Behav Immun* 2010;24:64–71.
- 13 119 Jyonouchi H, Sun S, Le H: Proinflammatory and regulatory cytokine
14 production associated with innate and adaptive immune responses in
15 children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J*
16 *Neuroimmunol* 2001;120:170–179.
- 17 120 Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de
18 Water J: Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide
19 evidence of immune dysfunction and are associated with impaired
20 behavioral outcome. *Brain Behav Immun* 2011;25:40–45.
- 21 121 Abdallah MW, Larsen N, Mortensen EL, Atladóttir HÓ, Nørgaard-
22 Pedersen B, Bonefeld-Jørgensen EC, et al.: Neonatal levels of cytokines
23 and risk of autism spectrum disorders: An exploratory register-based
24 historic birth cohort study utilizing the Danish Newborn Screening
25 Biobank. *J Neuroimmunol* 2012;252:75–82.

- 1 122 Theije CGM, Wu J, Koelink PJ, Korte-Bouws GAH, Borre Y, Kas MJH, et
2 al.: Autistic-like behavioural and neurochemical changes in a mouse
3 model of food allergy. *Behav Brain Res* 2014;261:265–274.
- 4 123 Wu H, Wang X, Gao J, Liang S, Hao Y, Sun C, et al.: Fingolimod
5 (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments,
6 neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. *Life Sci*
7 2017;173:43–54.
- 8 124 Hegazy HG, Ali EHA, Elgoly AHM: Interplay between pro-inflammatory
9 cytokines and brain oxidative stress biomarkers: Evidence of parallels
10 between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain
11 physiopathology in autism rat model. *Cytokine* 2015;71:173–180.
- 12 125 Kelly E, Won A, Refaeli Y, Van Parijs L: IL-2 and related cytokines can
13 promote T cell survival by activating AKT. *J Immunol* 2002 [cited 2018
14 Mar 20];168:597–603.
- 15 126 Malek TR: The main function of IL-2 is to promote the development of T
16 regulatory cells. *J Leukoc Biol* 2003;74:961–965.
- 17 127 Fukuda T, Fukushima Y, Numao T, Ando N, Arima M, Nakajima H, et al.:
18 Role of interleukin-4 and vascular cell adhesion molecule-1 in selective
19 eosinophil migration into the airways in allergic asthma. *Am J Respir Cell*
20 *Mol Biol* 1996;14:84–94.
- 21 128 Abdallah MW, Larsen N, Grove J, Rgaard-pedersen BNØ, Thorsen P,
22 Mortensen EL, et al.: Amniotic fluid inflammatory cytokines: Potential
23 markers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *World*
24 *J Biol Psychiatry* 2013;528–538.
- 25 129 Greenfeder S, Umland SP, Cuss FM, Chapman RW, Egan RW: Th2

- 1 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic
2 disease. *Respir Res* 2001;2:71–9.
- 3 130 Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH: Maternal Immune
4 Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *J*
5 *Neurosci* 2007 [cited 2018 May 3]; Available from:
6 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2387067/pdf/nihms42804.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2387067/pdf/nihms42804.pdf)
7 pdf
- 8 131 Wei H, Zou H, Sheikh AM, Malik M, Dobkin C, Brown WT, et al.: IL-6 is
9 increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell
10 adhesion, migration and synaptic formation. *J Neuroinflammation*
11 2011;8:1–10.
- 12 132 Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, et al.: Elevated
13 immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol*
14 2009;207:111–116.
- 15 133 Bickel M: The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of
16 regulation. *J Periodontol* 1993 [cited 2018 Mar 20];64:456–60.
- 17 134 Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA:
18 Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with
19 autism. *Ann Neurol* 2005;57:67–81.
- 20 135 Ma X, Yan W, Zheng H, Du Q, Zhang L, Ban Y, et al.: Regulation of IL-10
21 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells.
22 *F1000Research* 2015;4. DOI: 10.12688/f1000research.7010.1
- 23 136 Gee K, Guzzo C, Che Mat NF, Ma W, Kumar A: The IL-12 family of
24 cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflamm*
25 *Allergy Drug Targets* 2009 [cited 2018 Mar 20];8:40–52.

- 1 137 Bao K, Reinhardt RL: The differential expression of IL-4 and IL-13 and its
2 impact on type-2 immunity. *Cytokine* 2015;75:25–37.
- 3 138 Kuwabara T, Ishikawa F, Kondo M, Kakiuchi T: The Role of IL-17 and
4 Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators*
5 *Inflamm* 2017;2017:1–11.
- 6 139 ZHONG F, CUI D, TAO H, DU H, XING C: IL-17A-producing T cells and
7 associated cytokines are involved in the progression of gastric cancer.
8 *Oncol Rep* 2015;34:2365–2374.
- 9 140 Choi GB, Yim YS, Wong H, Kim S, Kim H, Kim S V, et al.: The maternal
10 interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in
11 offspring. *Science* 2016;351:933–9.
- 12 141 AL-Ayadhi LY, Mostafa GA: Elevated serum levels of interleukin-17A in
13 children with autism. *J Neuroinflammation* 2012;9:595.
- 14 142 Toussiot E: The IL23/Th17 pathway as a therapeutic target in chronic
15 inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2012 [cited 2018
16 Mar 20];11:159–68.
- 17 143 Fischer K, Przepiera-Będzak H, Sawicki M, Walecka A, Brzosko I,
18 Brzosko M: Serum Interleukin-23 in Polish Patients with Systemic Lupus
19 Erythematosus: Association with Lupus Nephritis, Obesity, and Peripheral
20 Vascular Disease. *Mediators Inflamm* 2017; DOI: 10.1155/2017/9401432
- 21 144 Ziblat A, Nuñez SY, Raffo Iraolagoitia XL, Spallanzani RG, Torres NI,
22 Sierra JM, et al.: Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN- γ Secretion by
23 CD56bright Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells
24 Activation. *Front Immunol* 2018;8:1959.
- 25 145 Jyonouchi H, Sun S, Itokazu N: Innate immunity associated with

- 1 inflammatory responses and cytokine production against common dietary
2 proteins in patients with autism spectrum disorder. *Neuropsychobiology*
3 2002;46:76–84.
- 4 146 Mah AY, Cooper MA: Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- γ
5 Production. *Crit Rev Immunol* 2016;36:131–147.
- 6 147 Tostes MHFS, Teixeira HC, Gattaz WF, Brandão MAF, Raposo NRB:
7 Altered neurotrophin, neuropeptide, cytokines and nitric oxide levels in
8 autism. *Pharmacopsychiatry* 2012;45:241–243.
- 9 148 Gutiérrez IL, González-Prieto M, García-Bueno B, Caso JR, Feinstein DL,
10 Madrigal JLM: CCL2 Induces the Production of β 2 Adrenergic Receptors
11 and Modifies Astrocytic Responses to Noradrenaline. *Mol Neurobiol*
12 2018;1–14.
- 13 149 Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah IN, Van de
14 Water J: Associations of impaired behaviors with elevated plasma
15 chemokines in autism spectrum disorders. *J Neuroimmunol* 2011; DOI:
16 10.1016/j.jneuroim.2010.10.025
- 17 150 Fichna M, Żurawek M, Budny B, Komarowska H, Niechcial E, Fichna P, et
18 al.: Elevated serum RANTES chemokine in autoimmune Addison's
19 disease. *Polish Arch Intern Med* 2018; DOI: 10.20452/pamw.4221
- 20 151 Cheng SS, Lukacs NW, Kunkel SL: Eotaxin/CCL11 suppresses IL-
21 8/CXCL8 secretion from human dermal microvascular endothelial cells. *J*
22 *Immunol* 2002 [cited 2018 Mar 20];168:2887–94.
- 23 152 Ahmad SF, Zoheir KMA, Ansari MA, Nadeem A, Bakheet SA, AL-Ayadhi
24 LY, et al.: Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T regulatory cell-related
25 transcription factor signaling in children with autism. *Mol Neurobiol*

1 2017;54:4390–4400.

2 153 Ashwood P, Anthony A, Torrente F, Wakefield AJ: Spontaneous mucosal
3 lymphocyte cytokine profiles in children with autism and gastrointestinal
4 symptoms: Mucosal immune activation and reduced counter regulatory
5 interleukin-10. *J Clin Immunol* 2004;24:664–673.

6 154 Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P: Differential
7 monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum
8 disorders. *Brain Behav Immun* 2010;24:64–71.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

1 **Legend of figures**

2

3 **Figure 1. Th1, Th2, Th17 commitment lineage from naïve CD4+ T cells.** The main
4 functions of each immune response and the signature cytokine are highlighted in the
5 boxes. APC: antigen-presenting cell; NK: natural killer cell; T-bet: T box expressed in T
6 cells; GATA: GATA-binding protein; ROR: Retinoid-related orphan receptor; IL:
7 Interleukin; IFN: Interferon; TGF: Transforming growth factor.

8

9 **Figure 2. Main results of cytokines altered both in ASD subjects and in VPA**
10 **animal model.** At the interface of the columns and rows are shown the common
11 findings both to humans and to animal model in different biological sources. The
12 references are already cited in Table 1.

13

Table 1. Main cytokines with altered levels in autism subjects

DSM	Severity	Described comorbidities	Age (years)	Source	Outcome	Analysis method	Reference
ASD	ND	ND	neonatal	amniotic fluid	↑ MCP-1, IL-4, IL-10, TNF- α and TNF- β	Flow cytometry	[128]
ASD	ND	ND	neonatal	n-DBSS	↓ IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- γ ↑ sIL-6R α , IL-8	Flow cytometry	[121]
ASD (DSM-IV)	Mild, moderate and Severe	ND	2-21	Serum	↑ IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, TNF- α	ELISA	[117]
ASD (DSM-5)	ND	ND	3-11	PBMCs	↓ CD4+, FOXP3+, T cells ↓ mRNA and protein expression FoxP3 ↑ Tbet, ↑ STAT3, ↑ GATA3	Flow cytometry, PCR and Western Blotting	[152]
ASD (DSM-5)	ND	ND	3-11	PBMCs	↑ ROR- γ t in CD4	PCR and Western Blotting	[152]
ASD (DSM-III-R/DSM-IV)	ND	GI issues	2-16	Duodenal Lamina Propria	↑ CD3+/TNF α + ↓ CD3+/IL-10+	Flow cytometry	[153]
ASD (DSM-III-R/DSM-IV)	ND	GI issues	2-16	Epithelium	↑ CD3+/TNF α + ↓ CD3+/IL-10+	Flow cytometry	[153]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	1-17	PBMCs	↑ TNF- α	ELISA	[145]
ASD (DSM-IV)	ND	GI issues	4-15	PBMCs	↑ TNF- α , IFN- γ ↓ IL-10	Flow cytometry	[96]
ASD (DSM-IV)	Severe (nonverbal adult patients)	ND	18-44	Serum	↑ IL-1 β , IL-6	ELISA	[116]

ASD (DSM-IV)	ND	ND	2.9-4.3	PBMCs	↑ IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 p40	Multiplexing bead immunoassays	[120]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	2-14	PBMCs	↑ TNF-α, TNFRI, TNFRII, IL-6, IL-1β	ELISA	[119]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	2.2-5	PBMCs	↑ 1L-1β, IL-6, TNF-α	Flow cytometry	[154]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	5-44	<i>post mortem</i> brain tissue	↑ IL-6, IL10, TGFβ1 (anterior cingulated gyrus)	Human cytokine array kits	[7]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	5-44	CSF	↑ IFNγ, TGFβ2, IL-8, MCP1	Human cytokine array kits	[7]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	4-37	<i>post mortem</i> brain tissue	↑ IFNγ, IL-6, IL-8, TNF-α (frontal cortex)	Multiplex Bead Immunoassays	[132]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	4-14	<i>post mortem</i> brain tissue	↑ IL-6 (cerebellum)	Immunohistochemistry	[131]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	7-15	Plasma	↑ IL-1β, IL-1RA, IL-5, IL-8, IL-12 (p70), IL-13, IL-17	ELISA	[115]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	3-4.5	Plasma	↑ MCP-1, RANTES, Eotaxin	Multiplexing bead immunoassays	[149]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	4.7-10.1	Plasma	↑ IFN-γ	ELISA	[147]
ASD (DSM-IV)	Mild to moderate and Severe	ND	6-11	Serum	↑ IL-17A (proportional increase to severity of autism)	ELISA	[141]
ASD (DSM-IV)	ND	ND	5-10	Plasma	↑ IL-1a ↓ IL-6, G-CSF, EGF	ELISA	[114]

DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; **CSF:** cerebrospinal fluid; **ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay; **IFN:** interferon; **IL:** interleukin; **ND:** not described; **n-DBSS:** neonatal dried blood samples; **PBMC:** peripheral blood mononuclear cells; **PCR:** polymerase chain reaction; **TNF:** tumor necrosis factor.

Table 2. Main cytokines with altered levels in the valproic acid animal model of autism

Animal	Dosage	Embryonic day	Administration via	Source	Age	Outcome	Analysis method	References
BALB/c	600 mg/Kg	E11	Subcutaneous	Dorsal hippocampus	P28	↑ IL-1 β	PCR	[122]
BALB/c	400 mg/Kg and 600 mg/Kg	E12.5	Subcutaneous	Spleen	8-10 weeks	Only VPA did not onset inflammatory response, but showed exacerbated response to a LPS challenge: ↑ IL-1 β , IL-6 and TNF- α expression	PCR	[109]
BALB/c	400 mg/Kg and 600 mg/Kg	E12.5	Subcutaneous	Hippocampus/ Cerebellum	8-10 weeks	↑ IL-6 and TNF- α expression in VPA animals exposed to a LPS challenge	PCR	[109]
Wistar	600 mg/Kg	E12.5	Intraperitoneal	Hippocampus	P40	↑ IL-6, ↑ IL-1 β	ELISA	[123]
Wistar	800 mg/Kg	E12.5	Gavage	Whole brain	P21	↑ IL-1 β , IL-6, TNF- α	ELISA	[124]

IL: interleukin; PCR: polymerase chain reaction.

Figure 1

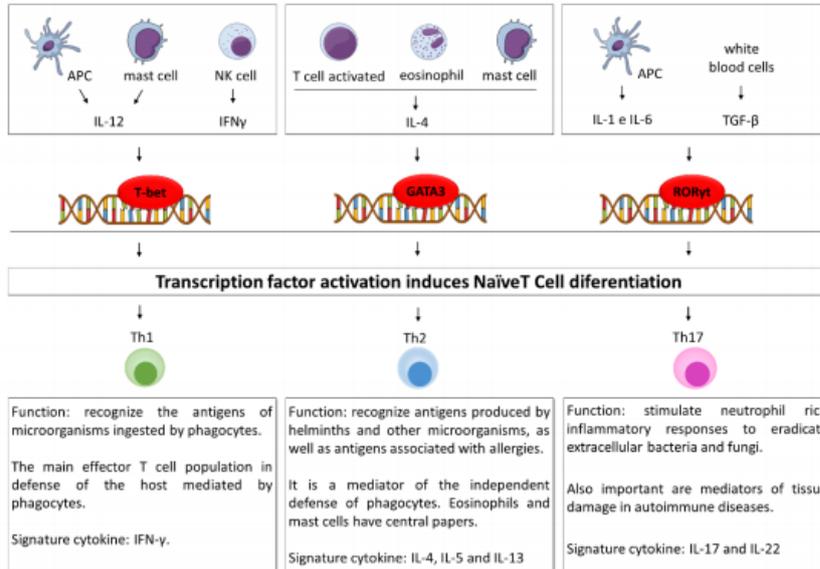
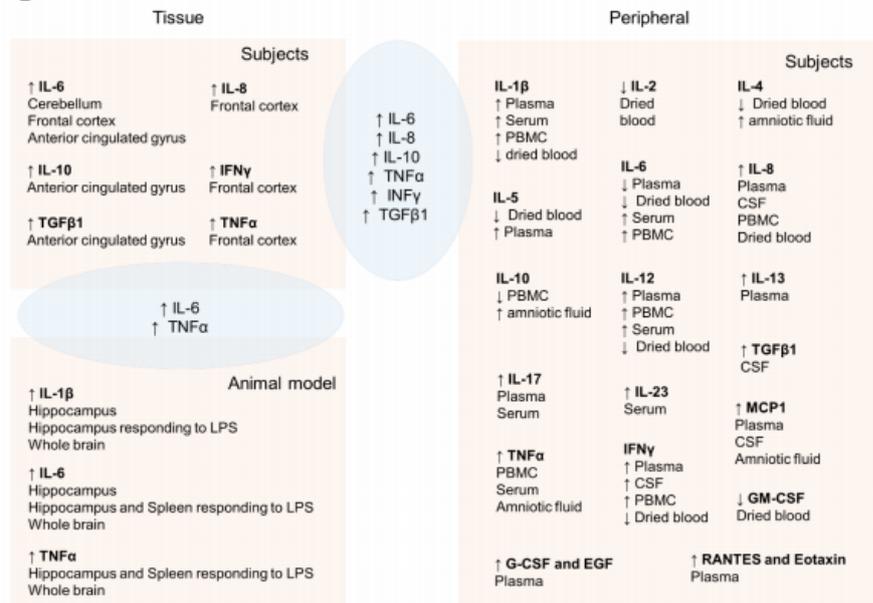


Figure 2



Capítulo III: capítulo de livro aceito para publicação na editora *Springer Nature*

“Purinergic signaling in autism spectrum disorder”

Tópico de pesquisa *“Purinergic Signaling in Neurodevelopment, Neuroinflammation and Neurodegeneration”*

3. DISCUSSÃO GERAL

No presente trabalho, utilizamos um dos modelos animais de autismo mais consolidados na literatura, o qual (como já ressaltado anteriormente) apresenta as validades de face (replica a sintomatologia encontrada em pacientes) e de construto (o mesmo agente etiológico reproduz a condição em humanos e modelos animais), além de possibilitar amplas investigações dentro da validade preditiva (possibilidade de desenvolvimento de estratégias terapêuticas) (MABUNGA et al., 2015).

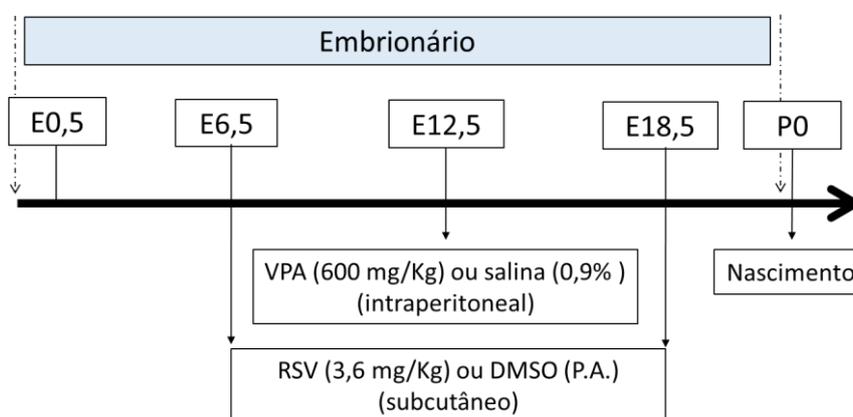
O nosso grupo de pesquisa (Grupo de Estudos Translacionais em Transtorno do Espectro Autista – GETTEA) atua em diferentes frentes para compreender a fisiopatologia do TEA sob diferentes óticas: análises em pacientes, análises *in silico*, análises *in vitro* e análises *in vivo* a partir do modelo animal VPA, sendo pioneiros na utilização dessa ferramenta de estudo no Brasil. Demonstramos previamente diversas alterações comportamentais (BAMBINI-JUNIOR et al., 2011, 2014; FONTES-DUTRA et al., 2018; HIRSCH et al., 2018), moleculares (HIRSCH et al., 2018) e celulares (FONTES-DUTRA et al., 2018; SANTOS-TERRA et al., 2021) induzidas pelo VPA bem como a prevenção dessas alterações pela administração intraútero do polifenol RSV. Sendo assim, os modelos animais se apresentam como ferramentas extremamente importantes e úteis no estudo de diversas condições, uma vez que permitem a aquisição de amostras biológicas, estudos comportamentais inviáveis em seres humanos, bem como a análise de vias biológicas e alterações metabólicas potencialmente associadas à fisiopatologia do transtorno – especialmente no TEA, que se mostra como uma desordem altamente heterogênea e de diagnóstico exclusivamente comportamental.

Nos propusemos a entender e investigar possíveis mecanismos subjacentes à macrocefalia, um relato clínico presente em, aproximadamente, 20% das crianças diagnosticadas com TEA (CHAWARSKA et al., 2011; HAZLETT et al., 2005) cuja causa ainda é desconhecida. Apesar de, na maioria dos casos, se apresentar como um evento transitório, o aumento do perímetro cefálico em idades pontuais pode estar relacionado às principais disfunções do TEA. Macrocefalia é a condição na qual o perímetro cefálico de uma criança está acima de 2 desvios-padrão, ou seja, que está acima do percentil 97. Embora usado como sinônimo de megalencefalia – designa o aumento da estrutura encefálica –, a macrocefalia é um termo amplo que abrange não só a megalencefalia, mas também outras causas de aumento do tamanho da cabeça

sem necessariamente o crescimento excessivo do cérebro, como por exemplo, acúmulo de fluido subdural (JONES; SAMANTA, 2021).

No capítulo I da presente tese são apresentados os experimentos realizados em ratos Wistar, bem como os 4 grupos experimentais que são utilizados na maioria das nossas pesquisas: 1) grupo controle (recebe apenas solução salina 0,9% e DMSO P.A. em volume equivalente – veículos para solubilidade do VPA e do RSV, respectivamente), 2) grupo RSV (recebe RSV na dose de 3,6 mg/Kg via subcutânea do dia E6,5 ao dia E18,5, e uma única injeção intraperitoneal de salina 0,9% no dia E12,5), 3) grupo VPA (recebe DMSO – veículo do RSV – via subcutânea entre E6,5 e E18,5, e uma única injeção intraperitoneal de VPA na dose de 600 mg/Kg no dia E12,5) e 4) grupo RSV+VPA (recebe RSV na dose de 3,6 mg/Kg via subcutânea do dia E6,5 ao dia E18,5, e uma única injeção intraperitoneal de VPA na dose de 600 mg/Kg no dia E12,5). Esse esquema está representado na Figura 3.

Figura 3 – Representação da linha do tempo para formação dos grupos experimentais



E: dia embrionário; P: dia pós-natal.

Primeiramente, avaliamos o conteúdo encefálico de água (também chamado de “medida de edema” na literatura) por meio da desidratação do encéfalo após retirada à fresco. A exposição pré-natal ao VPA alterou o conteúdo absoluto de água, aumentando a porcentagem de água livre no encéfalo de animais do grupo VPA, ao passo que esse fenômeno não se observa nos outros grupos. Além disso, considerando trabalhos prévios (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005), esperávamos encontrar um menor peso corporal dentre os animais do grupo VPA em relação aos outros grupos experimentais. Não só se confirmou, como também observamos uma

prevenção completa do RSV nesse parâmetro analisado. Por fim, ponderamos os resultados das porcentagens pelo peso corporal de cada animal, o que evidenciou ainda mais a maior proporção do volume de líquido encefálico no grupo VPA; isso significa dizer que esses animais apresentam um conteúdo encefálico maior que o grupo controle em uma estrutura corporal menor (o que se assemelha à condição clínica). Aqui, novamente, o tratamento pré-natal com RSV foi capaz de prevenir completamente o parâmetro analisado.

Um dos fatores envolvidos no desenvolvimento do edema encefálico é o dano à BHE; esse dano pode ser tanto iniciado quanto regulado por diversos mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, os quais regulam a magnitude do aporte de leucócitos no parênquima cerebral, bem como agem diretamente nas células endoteliais encefálicas, levando ao afrouxamento das junções oclusivas entre as células endoteliais e à formação de edema vasogênico (STAMATOVIC et al., 2006). A patogênese do edema encefálico é classificada como vasogênico ou citotóxico: o primeiro é definido como o acúmulo extracelular de líquido resultante da ruptura ou afrouxamento da BHE e consequente extravasamento de proteínas séricas (lesão vascular), enquanto que o segundo é caracterizado pelo inchaço celular causado pelo acúmulo intracelular de líquido (lesão de células parenquimatosas) (MICHINAGA; KOYAMA, 2015). No caso do TEA, ainda não é elucidado qual tipo é predominante, embora seja mais provável que envolva mecanismos de lesão vascular.

Sendo assim, demos sequência aos experimentos avaliando a permeabilidade da BHE a ao corante azul de Evans. A exposição pré-natal ao VPA causou nítido aumento na permeabilidade da BHE ao corante (evidenciado pela intensidade da fluorescência vermelha nas imagens representativas) principalmente nas regiões encefálicas pertencentes ao neocórtex (área somatossensorial – camadas 2/3 e 4/5 – e todas as sub-regiões do córtex pré-frontal medial – cingulado anterior, límbico e infralímbico, tanto em camadas profundas quanto em superficiais), mas também no plexo coroide (em contato com o neocórtex). Hipocampo e amígdala não apresentaram alterações de permeabilidade. Em todas as regiões onde houve alteração, o tratamento com o RSV foi capaz de prevenir completamente a permeabilidade da BHE ao corante, conforme observado no grupo RSV+VPA. Anteriormente, apenas Kumar e colegas (KUMAR; SHARMA; SHARMA, 2015; KUMAR; SHARMA, 2016a, 2016b) haviam demonstrado aumento de permeabilidade

a esse corante no modelo VPA, porém de forma macroscópica; aqui, refinamos a técnica demonstrando que as alterações são região-específica, bem como são passíveis de serem prevenidas pelo tratamento com o RSV. Apesar desse importante resultado, trata-se de uma técnica bastante inespecífica e com pouca precisão acerca de pormenores envolvidos no aumento da permeabilidade da BHE, uma vez que o corante azul de Evans não é metabolicamente inerte, é tóxico em altas dosagens e liga-se à albumina. Não existe um único marcador adequado para avaliação de BHE e todos os métodos conhecidos apresentam vantagens e desvantagens. No entanto, uma combinação de dextrans visualizáveis de diferentes tamanhos e moléculas radiomarcadas atualmente parece ser a abordagem mais apropriada para uma avaliação qualitativa e quantitativa mais robusta da integridade da BHE (SAUNDERS et al., 2015).

Seguindo nessa linha de raciocínio, investigamos a expressão e distribuição de AQP em diferentes regiões do SNC. Essas proteínas-canais desempenham diversos papéis, facilitando o movimento de água tanto para dentro quanto para fora do SNC (ROSU et al., 2019). A AQP1 apresentou um perfil diminuído em praticamente todas as regiões avaliadas no grupo VPA: plexo coroide, camadas profundas da área somatossensorial primária, região da amígdala e todas as sub-regiões do córtex pré-frontal medial. O plexo coroide é uma região particularmente importante na produção e liberação do LCR: animais nocaute para AQP1 apresentam redução de até 25% na taxa de secreção de LCR (OSHIO et al., 2003). Nessa região também observamos uma alteração morfológica bastante significativa em ambos os grupos expostos ao VPA prenatalmente. Uma lesão semelhante foi observada em um modelo de edema isquêmico cerebral (AKDEMIR et al., 2016), mas no presente estudo consideramos que não haja qualquer associação entre esta alteração morfológica e a fisiopatologia do TEA, o que pode ser simplesmente um efeito teratogênico *per se* do VPA.

Já a AQP4 apresentou perfis diversos de forma região-dependente: observou-se aumento no grupo VPA na área somatossensorial primária nas camadas mais profundas, com prevenção pelo RSV, além de uma diminuição em todas as sub-regiões do córtex pré-frontal medial, sem prevenção pelo RSV. Previamente, já havia sido demonstrado alterações no perfil de AQP4 em tecido encefálico *post mortem* de indivíduos com TEA. Um estudo de 2008 demonstra diminuição de 3% na área 9 de Brodmann (BA9 - equivalente ao córtex frontal), bem como uma expressão aumentada

de 39% no BA40 (córtex parietal, onde está localizada a área sensorial primária). Além disso, os autores observaram aumento da expressão da conexina 43 (CX43 - a principal proteína componente das *gap junctions* astrocíticas) no BA9, o que poderia significar aumento da sinalização neurônio-glia, indicando um aprimoramento da comunicação célula-célula no lobo frontal (uma área integrativa) (FATEMI et al., 2008). Ainda, a AQP4 tem sido relacionada ao sistema neuroimunológico (IKESHIMA-KATAOKA, 2016), o que representa um achado interessante no contexto de TEA, uma vez que o componente imunológico desse distúrbio está bem estabelecido (GOTTFRIED et al., 2015). Finalmente, estudos têm relacionado o nocaute de AQP4 tanto com redução no inchaço encefálico no edema citotóxico quanto com piora significativa de edema encefálico vasogênico (PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2007).

A mudança de expressão região-dependente chama atenção por si só, mas também pelo fato de a AQP4 ser um canal colocalizado com os canais Kir4.1 (STROHSCHEIN et al., 2011) nos pés astrocíticos. Eventos como neuroinflamação aguda contribuem para a reorganização sináptica, resultando em alterações de longo prazo em relação à hiperexcitabilidade de todo o circuito neural (CLARKSON et al., 2017). Além disso, uma das principais teorias acerca da fisiopatologia do TEA envolve o desequilíbrio entre o delicado balanço excitatório-inibitório em algumas regiões específicas do SNC levando a alterações eletrofisiológicas. A presença de epilepsia ou episódios de convulsão em aproximadamente 30% dos indivíduos com TEA reforça o caráter excitatório predominante no TEA (SPENCE; SCHNEIDER, 2009). A atividade neuronal ocorre dentro da faixa fisiológica específica a partir de uma concentração extracelular de K^+ basal. O K^+ extracelular é crítico na definição do potencial de repouso da membrana de neurônios e astrócitos e, durante uma atividade excessiva, como em uma convulsão, seus níveis atingem um platô, o que influencia a transmissão sináptica e a plasticidade. Uma vez atingido esse platô, mesmo durante a atividade elétrica contínua, não ocorre aumento da concentração de K^+ devido ao mecanismo de remoção desse íon da fenda sináptica por meio da recaptação de K^+ pela glia via canais como o Kir4.1 (OLSEN et al., 2015), o que é vital para manter a homeostase cerebral (BELLOT-SAEZ et al., 2017). Provavelmente, a AQP4 é necessária para manter a depuração de K^+ eficiente, uma vez que alterações do fluxo de água são associadas a aumento da intensidade de convulsões epiléticas (AMIRY-

MOGHADDAM et al., 2003) e atraso no tamponamento de K⁺ em camundongos nocaute para AQP4 (LU et al., 2008).

Infelizmente, por questões de pandemia, não foi possível analisar a expressão dos canais Kir4.1 no modelo VPA. Dessa forma, o nosso último experimento investigativo foi a avaliação tanto da imunomarcagem quanto do número de astrócitos GFAP⁺. Observamos aumento tanto da imunofluorescência de GFAP quanto do número de astrócitos GFAP⁺ no córtex pré-frontal medial e na área somatossensorial primária pela exposição pré-natal ao VPA, o que corrobora com estudos anteriores que mostram ativação neuroglial em pacientes com TEA e modelos animais (BRISTOT SILVESTRIN et al., 2013; EDMONSON; ZIATS; RENNERT, 2014; VARGAS et al., 2005; ZHAO et al., 2019). Aqui, observamos um importante efeito preventivo do RSV nas camadas profundas das sub-regiões do córtex pré-frontal medial analisadas, retornando os níveis da imunofluorescência de GFAP para os níveis do grupo controle. Com base em dados anteriores, que indicam o efeito neuroprotetor de doses mais baixas de RSV em fatias de hipocampo (através da melhora da captação de glutamato pelos astrócitos e modulação da plasticidade sináptica) (BOBERMIN et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2008; QUINCOZES-SANTOS et al., 2013; QUINCOZES-SANTOS; GOTTFRIED, 2011) e melhora no quadro de neuroinflamação (uma marca registrada do TEA) em um modelo animal de TEA (AHMAD et al., 2018c; BHANDARI; KUHAD, 2017), seria possível que, também neste contexto, tenhamos um efeito benéfico sobre o metabolismo e função dos astrócitos, uma vez que este tratamento é eficaz na melhoria de diversos comprometimentos comportamentais em modelo animal de VPA (BAMBINI-JUNIOR et al., 2014; FONTES-DUTRA et al., 2018; HIRSCH et al., 2018).

Apesar de alguns estudos não terem demonstrado alterações nos parâmetros de astrócitos em tecidos *post mortem* de pessoas com TEA (LEE et al., 2017; MORGAN et al., 2014), os modelos animais da Síndrome do X Frágil (distúrbio com alta sobreposição ao TEA) apresentam uma perturbação específica na constituição das camadas corticais mais profundas, apresentando aumento do número de astrócitos (LEE et al., 2019). Essa dinâmica da desorganização cortical é amplamente descrita no TEA. Um dos achados mais relevantes em pacientes com TEA é a identificação de distúrbios na organização das minicolunas corticais (CASANOVA, 2007) e a presença de manchas com perda de delimitação das camadas corticais

(DENARDO et al., 2015; STONER et al., 2014), sendo as camadas mais profundas as mais afetadas.

Curiosamente, o hipocampo e a região da amígdala parecem ser mais vulneráveis aos efeitos do RSV quando se trata de astrócitos; especulamos que talvez a janela biológica de origem embrionária dessas estruturas possa ter participação no resultado obtido. Os núcleos amigdalares se originam em momentos diferentes entre os dias E10-E12 em ratos, antes da indução do modelo animal (em E12.5) e durante o tratamento pré-natal com RSV (entre E6.5 a E18.5) (SOMA et al., 2009). Sobre o hipocampo, embora sua origem embrionária seja em torno de E15 (HAYASHI et al., 2015), os efeitos da exposição pré-natal ao VPA parecem ser progressivos e de início tardio (SANTOS-TERRA et al., 2021). Mesmo o RSV apresentando importantes efeitos neuroprotetores, nesse caso, ele foi capaz de desempenhar um efeito *per se* no hipocampo no dia pós-natal (P) P30. Nós interpretamos esse resultado como algo positivo, considerando que o RSV talvez esteja desenvolvendo um *background* celular prévio para suportar melhor o dano progressivo induzido pelo VPA, uma vez que esse efeito progressivo se acentua na idade adulta.

Frequentemente, são descritas na literatura alterações na espessura cortical em indivíduos com TEA. Poderia ser uma das hipóteses relacionadas à macrocefalia transitória na primeira infância se esse dado não fosse tão controverso. Apesar de estudos demonstrarem que não há diferenças na espessura cortical entre indivíduos com TEA e indivíduos com neurodesenvolvimento típico entre 6 e 30 anos de idade (NUNES et al., 2020), há relatos de maior espessura cortical a partir da mesma faixa etária em crianças com esse transtorno, com diferenças diminuindo durante a idade adulta e a gravidade dos sintomas relacionados ao afeto social e à comunicação associada a essas anormalidades corticais (KHUNDRAKPAM et al., 2017). Já em adolescentes com alta funcionalidade, há relatos de diminuição da espessura cortical no lobo frontal inferior direito (correlacionado com maior prejuízo social), aumento da espessura cortical no lobo temporal direito e cíngulo posterior (associadas a piores escores no domínio de comunicação) e maiores áreas de superfície cortical em várias regiões do encéfalo, incluindo o cíngulo, lobos temporais e amígdala, bem como aumento da girificação em regiões associadas com a codificação de memórias visuais e áreas do componente sensório-motor (PEREIRA et al., 2018).

Especula-se também que o crescimento excessivo encefálico em crianças com TEA envolva aumento no número e no tamanho de neurônios no córtex pré-frontal. Numa avaliação *post mortem* do córtex pré-frontal de 7 indivíduos com TEA com idades entre 2 e 16, constatou-se um aumento de 67% no número de neurônios em comparação com indivíduos neurotípicos (COURCHESNE et al., 2011). A amígdala parece exibir o mesmo perfil de alteração (em amostra *post mortem* de indivíduos entre 2-48 anos), com aumento excessivo no número de neurônios maduros seguido por um declínio na idade adulta à medida que os neurônios imaturos são incorporados aos núcleos amigdalares, propondo um componente degenerativo com o passar do tempo (AVINO et al., 2018). Sabe-se que a AIM regula positivamente a expressão gênica do ciclo celular e a proliferação celular e pode causar crescimento excessivo do encéfalo (LOMBARDO et al., 2018; OSKVIG et al., 2012; SMITH; ELLIOTT; ANDERSON, 2012), podendo induzir a produção excessiva de neurônios (SMITH; ELLIOTT; ANDERSON, 2012), aumentar a espessura cortical (LE BELLE et al., 2014; SMITH; ELLIOTT; ANDERSON, 2012) e o tamanho do cérebro (LE BELLE et al., 2014). Além disso, as alterações de expressão gênica também envolvem processos de migração neuronal (OSKVIG et al., 2012), o que pode estar por trás da estratificação cortical anormal observada, com um aumento de 24% no número de neurônios nas camadas corticais 2/3 (SOUMIYA; FUKUMITSU; FURUKAWA, 2011). Curiosamente, em nossos estudos prévios, não encontramos alterações no número de neurônios totais nem no número de células não-neuronais em animais de 30 dias, ao passo que foi visto apenas intensa desorganização laminar entre as camadas com provável defeito de migração celular na área somatossensorial primária e região da amígdala (FONTES-DUTRA et al., 2018), o que nos leva a pensar que, pelo menos em animais, os mecanismos adjacentes à formação de edema não passam por aumento de celularidade (e conseqüentemente apoptose) e provavelmente envolvem mecanismos menos complexos, como aumento de líquido intracraniano como consequência do afrouxamento da BHE, que leva ao infiltrado inflamatório oriundo da periferia em direção ao SNC.

Considerando todos os dados, levantamos a hipótese de que as deficiências encefálicas induzidas pelo modelo VPA incluem um fundo de neuroinflamação desencadeado no encéfalo em desenvolvimento do embrião, o que contribui para o aumento da permeabilidade da BHE (e, conseqüentemente, edema devido à entrada

de água e infiltrado inflamatório). Em consequência, há uma diminuição nos níveis de AQP1 e AQP4 para manter a homeostase da água no cérebro. Paralelamente, a neuroinflamação desencadeia o processo de excitotoxicidade, levando a um fenótipo astrocítico reativo. O aumento da atividade astrocítica leva a um aumento da necessidade de tamponamento de K^+ , que por sua vez aumenta os níveis de Kir4.1 e, conseqüentemente, de AQP4 de uma maneira específica da região (que, por sua vez, poderia ser o principal início da formação de edema cerebral). A impressão digital causada pelo VPA ocorre em várias regiões; uma vez que a área somatossensorial primária é uma área de processamento primário, tanto o impacto causado pelo VPA quanto os mecanismos de prevenção pelo RSV podem ser mais expressivos e menos complexos do que os que ocorrem no córtex pré-frontal medial, uma região associativa e mais complexa. Aqui, o RSV preveniu com sucesso as deficiências em relação à formação de edema, à permeabilidade da BHE, ao aumento de AQP4 na área somatossensorial primária, bem como possibilitou uma melhora funcional na reatividade glial no córtex pré-frontal medial. Desse modo, com base em evidências que apontam para o RSV como um estabilizador do ambiente neural, o RSV também poderia normalizar os níveis de K^+ e reestruturar as conexões sinápticas na área somatossensorial primária considerando a colocalização dos canais AQP4 e Kir4.1.

Um tema bastante recorrente nos estudos sobre TEA são as alterações neuroimunológicas, conforme abordado no Capítulo II da presente tese. Sabe-se que a AIM desencadeia diversas desordens neuropsiquiátricas, entre elas, TEA (ESTES; MCALLISTER, 2016); complementarmente, a literatura mais recente em modelos animais vem destacando a associação de processos inflamatórios maternos durante períodos críticos do desenvolvimento embrionário com crescimento excessivo do encéfalo e desencadeamento de comportamentos associados ao autismo na prole, possivelmente por meio de sinalização redox alterada em células-tronco e progenitores neurais (LE BELLE et al., 2014). Nesse sentido, para compreendermos melhor como as alterações imunológicas se apresentam dentro da fisiopatologia do TEA, foi necessário um extenso compilado da literatura, principalmente devido à carência de informações translacionais acerca do componente imunológico em modelos animais e em pacientes com TEA. Nesse sentido, escrevemos uma revisão contendo não só um levantamento das principais alterações reportadas como também comparando quais alterações são comuns entre humanos e o modelo animal VPA

separando por tipo de amostra biológica, com o objetivo de facilitar estudos posteriores do grupo e de outros pesquisadores sobre a neuroimunologia do TEA. Foi observado que o aumento de IL-6 e de TNF- α são alterações comuns tanto ao modelo animal quanto a estruturas encefálicas em humanos, bem como o aumento nos níveis de IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN γ e TGF β 1 são achados tanto em amostras encefálicas quanto tecidos periféricos em humanos (representado na Figura 2 da revisão presente no capítulo II). Dessa forma, postulamos que a impressão digital causada pela exposição pré-natal ao VPA na prole poderia envolver mecanismos de AIM, uma vez que os animais do modelo animal VPA apresentam níveis aumentados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipocampo e outras regiões do cérebro (DECKMANN et al., 2018), além de níveis aumentados de TNF- α e ativação microglial após a exposição pré-natal ao VPA (ZAMBERLETTI et al., 2019).

Apesar dos muitos mecanismos já elucidados, a fisiopatologia do TEA ainda permanece um quebra-cabeças longe de ser solucionado. Sabe-se que algumas vias biológicas estão intimamente relacionadas ou com o provável desencadeamento ou com a manutenção do transtorno. São alguns exemplos as vias:

- Da NOTCH, a qual já foi associada a regulação de processos inflamatórios (PARK et al., 2015), bem como se mostrou alterada tanto em modelo VPA (ZHANG et al., 2019) quanto em BTBR (AHMAD et al., 2021);
- Da PTEN, amplamente associada ao TEA (ABDELLI; SAMSAM; NASER, 2019; HOOSHMANDI; WONG; KHOUTORSKY, 2020; SHIN; SANTI; HUANG, 2021). Mais recentemente, a diminuição de seus níveis vem sendo correlacionada com o aumento nos níveis do coativador-1 'alfa' do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α) e ciclo-oxigenase (COX) IV (e consequente disfunção mitocondrial) em hipocampo e córtex de camundongos do modelo animal VPA. O provável mecanismo é de que a PTEN pode desfosforilar AKT para inibir sua atividade, levando à diminuição da fosforilação da glicogênio sintase cinase 3 beta (GSK-3 β , a qual fica ativada), aumentando a fosforilação de PGC-1 α para promover sua degradação (FENG et al., 2021);
- Da GSK-3 β , a qual parece ser crítica para a plasticidade sináptica nas sinapses glutamatérgicas na amígdala (WU et al., 2017) e está relacionada ao comportamento social, uma vez que seus níveis alterados encontrados na

amígdala (WU et al., 2017) e no córtex cingulado anterior (HOU et al., 2021; WANG et al., 2019) foram correlacionados com alterações de sociabilidade. Além disso, a nível molecular, a exposição pré-natal ao VPA aumenta a expressão de Wnt e ativa a via GSK-3 β / β -catenina, o que foi correlacionado com macrocefalia e estruturas encefálicas alteradas observadas em encéfalos de animais do modelo VPA (GO et al., 2012);

- Da Wnt, sendo essa proteína crucial na sinalização de diversas outras proteínas das cascatas, como GSK-3 β , β -catenina e mTOR. Quando expostos ao VPA, os animais apresentaram ativação da sinalização da Wnt por meio da regulação positiva da β -catenina e da fosfo-GSK-3 β . Essa via, bem como a ativação da sinalização de mTOR, foram suprimidas após um tratamento com anti-inflamatório (QIN; DAI; YIN, 2016). O mesmo estudo também observou que a exposição ao VPA ativou a sinalização de mTOR e suprimiu a autofagia no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de ratos do modelo animal de TEA, caracterizada por fosfo-mTOR e fosfo-S6 aumentados, diminuição de Beclina-1, Atg5, Atg10, LC3-II e formação de autofagossomos;
- Além de outras sinalizações, como o caso do sistema purinérgico (conforme abordado no Capítulo III da presente tese).

Sabe-se que o desenvolvimento encefálico na vida embrionária é finamente regulado por uma variedade de processos biológicos; sinalizações como, por exemplo, a purinérgica, desempenham um papel essencial na organização tanto do desenvolvimento embrionário e fetal quanto na organogênese de forma tempo-dependente, controlando moléculas de sinalização purinérgica, como ATP, a liberação de Ca²⁺ da glia radial, expressão diferencial de subtipos de receptores, entre outros (FUMAGALLI et al., 2017; ULRICH; ABBRACCHIO; BURNSTOCK, 2012). No caso do TEA, já foram identificados polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes dos receptores de adenosina A2A (ADORA2A) (FREITAG et al., 2009) e A3 (ADORA3), induzindo níveis aumentados de cGMP e resultando no aumento da atividade do transportador de serotonina (CAMPBELL et al., 2013). Também foi identificado, em tecido *post mortem*, enriquecimento da ontologia gênica para genes de sinalização purinérgica em um grupo de genes associados ao comportamento social prejudicado (GINSBERG et al., 2012), associação entre a atividade da adenilil ciclase e concentração de AMP cíclico (AMPC) com traços de TEA (TAKAHASHI et al., 2020),

além de presença diferencial de metabólitos derivados do metabolismo da purina na urina de indivíduos com TEA, indicando o impacto geral do metabolismo purinérgico nesse transtorno (GEVI et al., 2016). Por fim, a expressão de fosfodiesterases (PDE) demonstrou resultados diferenciais, estando alguns subtipos reduzidos em cerebelo e outros aumentados em BA9, o que é importante uma vez que essas enzimas regulam os níveis de AMPc, um segundo mensageiro na sinalização purinérgica (BRAUN et al., 2007).

Em modelos animais de TEA, a sinalização purinérgica também já se demonstrou alterada. Em modelo de AIM, o aumento da abertura dos canais Cx43 e Panx1 nos astrócitos do hipocampo foi associado à liberação de ATP e glutamato, os quais aumentaram os níveis de Ca^{2+} , levando a um perfil ativado em astrócitos e morte celular em neurônios (AVENDAÑO et al., 2015; CHÁVEZ et al., 2019). Quando ATP exógeno foi administrado, os animais exibiram um amplo espectro de alterações, incluindo características semelhantes às do TEA (ZOLKIPLI-CUNNINGHAM et al., 2021). Na cepa de camundongos BTBR, um modelo genético de TEA, observou-se diminuição da função do receptor A2A (SQUILLACE et al., 2014). Outro modelo genético de TEA, por deleção de um regulador de PDE4, induziu déficits de memória espacial e níveis reduzidos de AMPc no hipocampo (ZAMARBIDE et al., 2019). Por fim, no modelo VPA, foi observada aumento da hidrólise de AMP, da expressão de RNAm de A2R1 e do catabolismo de ATP/ADP no encéfalo de peixe-zebra (ZIMMERMANN et al., 2017), enquanto que em roedores foi observado aumento da razão AMP/ATP no mesencéfalo e redução da mesma no córtex – induzindo um desequilíbrio de sinalização purinérgica (HEGAZY; ALI; ELGOLY, 2015) –, bem como aumento da expressão dos receptores P2X4 e P2Y2 em hipocampo e P2X4 no córtex pré-frontal medial (HIRSCH et al., 2020).

Ainda sobre a influência da sinalização purinérgica em mecanismos subjacentes à fisiopatologia do TEA, quando há liberação de ATP extracelular de origem mitocondrial, ocorre uma sinalização indicando dano liberada pelas células sob estresse, uma vez que esse ATP pode desencadear processos inflamatórios (CHAN; GOLD; VON AHSEN, 2011; FAAS; SÁEZ; DE VOS, 2017) e induzir reações autoimunes (THEOHARIDES; ASADI; PATEL, 2013; ZHANG et al., 2012), o que é bem característico do TEA. De forma complementar, crianças com TEA apresentam níveis elevados de DNA mitocondrial circulante (PICARD et al., 2014); dessa forma, o

metabolismo energético mitocondrial comprometido (presente no TEA) tem sido proposto como um dos fatores desencadeadores desse transtorno (PASTURAL et al., 2009; PATOWARY et al., 2017). Além disso, os receptores purinérgicos do tipo P2X7 regulados por ATP estão emergindo como importantes reguladores da neuroinflamação e como novos alvos terapêuticos (DI VIRGILIO, 2015). Como os P2X7 possuem baixa afinidade por ATP, são considerados importantes sensores de danos e inflamação teciduais – condições nas quais os níveis de ATP extracelular aumentam consideravelmente – e sua ativação desencadeia respostas imunológicas que medeiam a maturação e a secreção de interleucinas, como a IL-1 β (DENLINGER et al., 2001; SURPRENANT et al., 1996).

Em um estudo *in vitro* a partir da cocultura de astrócitos e células endoteliais (simulando as condições da BHE) foi observado que a ativação do receptor P2X7 por ATP induziu a liberação de IL-1 β , a qual aumentou a atividade da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) que por sua vez promoveu a ruptura da BHE pela degradação das proteínas de junção oclusiva ZO-1 e ocludina (YANG et al., 2016). A MMP-9 é uma enzima com atividade proteolítica zinco-dependente com habilidade em degradar o colágeno do tipo IV que compõe a lâmina basal cujos níveis aumentados já foram correlacionados com distúrbios do neurodesenvolvimento, incluindo TEA (REINHARD; RAZAK; ETHELL, 2015).

O receptor P2X7 parece estar intimamente relacionado com a funcionalidade da BHE. Substâncias como o 3,4-metilenodioximetamfetamina (*ecstasy*) são capazes de alterar a permeabilidade da BHE por meio do receptor P2X7, que por sua vez leva ao aumento da atividade de MMP-9 e MMP-3 e degradação da matriz extracelular (RUBIO-ARAIZ et al., 2014). Também foi relatado que a supressão do receptor P2X7 foi capaz de preservar a integridade da BHE após hemorragia intracerebral por meio da inibição da ativação do membro da família Ras homólogo A (RhoA, do inglês *Ras homolog family member A*) (ZHAO et al., 2016). Além disso, o receptor P2X7 localizado nos pericitos (co-expresso com PDGF β R, um marcador de pericitos) contribuiu para os mecanismos patológicos subjacentes à encefalomielite autoimune experimental em microvasos encefálicos influenciando a integridade da BHE por meio da diminuição da expressão de claudina-5 (GRYGOROWICZ; DAŁBROWSKA-BOUTA; STRUŻYŃSKA, 2018).

Interessantemente, parece que os receptores purinérgicos são necessários para o desencadeamento do fenótipo do tipo autista, uma vez que tanto a prole originada de mães heterozigotas ou nocaute para P2X7 quanto fêmeas tratadas com um antagonista P2X7 específico não apresentaram quaisquer características associadas ao TEA, enquanto os tipos selvagens (*wild-type*) oriundos do modelo de AIM apresentaram alterações como déficits de sociabilidade, estereotípias, aumento do conteúdo encefálico de IL-6, CXCL1 e TNF- α , malformação de sinapse, interrupção da laminação cortical, entre outros (HORVÁTH et al., 2019). Tomadas em conjunto, essas evidências demonstram o envolvimento da desregulação purinérgica tanto no desencadeamento quanto na manutenção do TEA.

Ao longo dos anos, diversas estratégias terapêuticas têm sido propostas como ferramentas de estudo com o intuito de estudar os prováveis mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TEA. No cenário nutracêutico, os polifenóis têm recebido grande atenção da comunidade científica devido ao seu potencial farmacológico; especialmente o RSV tem emergido como potencial estratégia devido às suas excelentes propriedades terapêuticas antioxidante e anti-inflamatória (VANG et al., 2011), agindo como neuroprotetor provavelmente contrapondo os efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios do VPA. Juntamente a isso, é capaz de atenuar disfunções de BHE e reverter o acúmulo encefálico de água em modelo animal de isquemia por meio da regulação da MMP-9 (WEI et al., 2015). Outros mecanismos pelos quais o RSV provavelmente age como antioxidante e anti-inflamatório já foram propostos, como a via do ácido araquidônico (LI et al., 2018), fator nuclear kappa B (NF- κ b) (FENG et al., 2016), proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (YE; MENG, 2021) e proteína ativadora-1 (AP-1) (THIEL; RÖSSLER, 2014). Além disso, previne o dano oxidativo celular por meio da via do fator nuclear 2 relacionado ao eritroide-2 (Nrf2, do inglês, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (GAO et al., 2018; YANG et al., 2018), bem como tem ação na via SIRT1/AMPK e Nrf2 (MENG et al., 2016).

Por ser um nutracêutico com amplos efeitos benéficos já demonstrados, recentemente propusemos um estudo-piloto (MARCHEZAN *et al.*, *manuscrito submetido*, Anexo 3 da presente tese) para avaliação da eficácia e segurança da suplementação de 200 mg de RSV por dia em crianças diagnosticadas com TEA de acordo com o DSM-V e recrutadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Cinco meninos com idades entre 10 e 13 anos compuseram o *n* amostral após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pais/responsáveis (FIPE-HCPA 170132/ CAAE 65862917100005327/ ReBEC número 6356). Os indivíduos receberam 200 mg de RSV diariamente durante 90 dias e foram avaliados antes, 45 dias e 90 dias após o início do tratamento. Foram aplicadas as escalas CGI (Impressão Clínica Global, do inglês *Clinical Global Impression*) e ABC (Lista de Verificação de Comportamento Aberrante, do inglês *Aberrant Behavior Checklist*). Além disso, também foi realizada a coleta de sangue periférico para avaliação de um perfil de microRNAs em células mononucleares do sangue periférico.

Nesse estudo, fomos os primeiros a mostrar que o tratamento de 90 dias com RSV foi capaz de melhorar substancialmente a pontuação de 3 dos 5 indivíduos na escala CGI. Já na escala ABC, houve uma diminuição significativa na pontuação total após o tratamento com RSV, sendo a subescala de irritabilidade a com maior diminuição significativa. A irritabilidade pode se manifestar de diversas formas, incluindo agressão, comportamento autolesivo e raiva, o que leva a dificuldades na interação social desses indivíduos. Curiosamente, todos os pacientes apresentaram um aumento estatisticamente significativo na expressão relativa do miR-195-5p após 90 dias de tratamento com RSV, o qual é envolvido em rotas relacionadas ao sistema imunológico, transdução de sinal, expressão gênica (transcrição), ciclo celular, morte celular programada, transporte de pequenas moléculas, doenças e respostas celulares a estímulos externos. Assim, um tratamento seguro, eficaz e sem efeitos colaterais capaz de modular o comportamento de irritabilidade (e, conseqüentemente, sociabilidade) poderia, sem dúvida, contribuir para uma melhora geral na funcionalidade desses indivíduos.

Cabe ressaltar que ainda existem muitos questionamentos em relação a utilização de suplementos à base de antioxidantes na dieta, principalmente em relação à suplementação em gestantes. No nosso modelo animal investigativo, o tratamento com RSV em ratas prenhes configura uma ferramenta de estudo, não sendo proposta de fato uma translacionalidade para suplementação em gestantes. Se em modelos animais essa administração se mostra segura e eficaz, em humanos poderia se supor o mesmo. No entanto, as gestantes são consideradas “cientificamente complexas” de serem incluídas em estudos, refletindo uma combinação de complexidade fisiológica e ética (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS,

2015). As questões éticas envolvem a necessidade de equilibrar os interesses da gestante e do bebê em desenvolvimento, o que, em geral, está alinhado entre si, pois a saúde de um reflete a saúde de outro; no entanto, os interesses científicos podem divergir, especialmente quando a pesquisa que não está focada em questões da gestação, parto ou saúde fetal (AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS, 2015). Devido a preocupações éticas sobre a exposição de mulheres grávidas e fetos aos riscos de pesquisas científicas, a gestação é considerada um motivo para exclusão de estudos de pesquisa, mesmo quando os riscos são insignificantes e o estudo aborda questões relevantes para a saúde materna ou fetal (LYERLY; FADEN, 2013).

Nos últimos anos, diversos estudos descrevem os potenciais benefícios à saúde da dieta com polifenóis, descrevendo principalmente suas propriedades antioxidantes (SPENCER et al., 2008). Embora haja um amplo debate sobre as doses eficazes de proteção, a ingestão de polifenóis tem sido associada à redução do risco de várias doenças crônicas (DEL BO et al., 2019). Realizamos um levantamento acerca dos benefícios da utilização de polifenóis durante a gestação e observamos que o RSV apresentou um efeito benéfico em diversos contextos devido ao seu efeito antioxidante (Anexo 4). Embora os mecanismos envolvidos na proteção fornecida pelo tratamento com RSV não sejam conhecidos, os dados em conjunto destacam o suco de uva, o extrato de *Vitis vinífera* (videira), o extrato de uva e o próprio RSV isolado como novas estratégias terapêuticas promissoras.

Os dados apresentados no estudo clínico (Anexo 3) e no levantamento (Anexo 4) demonstram que o tratamento com RSV teve elevada tolerabilidade, sem efeitos colaterais, capaz de modular tanto alterações comportamentais quanto moleculares, além de ter se mostrado relevante no contexto gestacional. Assim, essa molécula desponta como uma potencial estratégia terapêutica, tanto como monoterapia quanto como adjuvante a um baixo custo, reforçando o seu caráter translacional protetor.

Tomados em conjunto, os dados apresentados no presente trabalho evidenciam a possível contribuição da disfunção da BHE no maior conteúdo de água observado no grupo VPA (os quais, em conjunto, podem possuir um *background* neuroinflamatório envolvido), bem como um perfil diferenciado tanto das AQP 1 e 4 quanto de astrócitos. Também mostramos que o RSV foi capaz de prevenir diversas alterações nesse contexto, possivelmente devido à sua ação anti-inflamatória,

antioxidante e neuroprotetora. Demonstramos, por meio de uma revisão da literatura, a translacionalidade do modelo animal VPA e de humanos com TEA na questão neuroimunológica, bem como evidenciamos, através de um capítulo de livro, o papel do sistema purinérgico na fisiopatologia do TEA. Conforme trabalho clínico em anexo, também demonstramos a eficácia e segurança da suplementação de RSV em pacientes pediátricos com TEA, sendo pioneiros nesse tipo de abordagem. Por fim, ressaltamos que, apesar dos inúmeros efeitos benéficos do uso de polifenóis, deve-se ter cautela na utilização principalmente em momentos cruciais como a gestação. Dessa forma, a investigação de mecanismos envolvidos nas alterações neuroimunológicas (tanto em idades pós-natais quanto embrionárias), bem como a utilização do RSV como ferramenta de estudo de vias biológicas envolvidas são estratégias promissoras para a continuação desse trabalho.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

No presente trabalho, investigamos, em modelo animal, possíveis mecanismos subjacentes à macrocefalia presente em uma parcela de crianças com TEA. Além disso, avaliamos o efeito preventivo do RSV em todos os parâmetros analisados.

Observamos que a exposição pré-natal ao VPA levou à maior conteúdo encefálico de água livre (análogo à edema), prejudicou o crescimento corporal dos animais e promoveu maior permeabilidade de BHE ao corante azul de Evans. Além disso, também diminuiu o imunoc conteúdo e a imunomarcção da AQP1 em praticamente todas as regiões encefálicas analisadas (plexo coroide, região da amígdala, área somatossensorial e córtex pré-frontal medial) ao passo que levou a um perfil diferencial de AQP4 região-dependente: diminuído no córtex pré-frontal medial e aumentado na área somatossensorial primária. Finalmente, observamos um aumento no número de astrócitos bem como na imunomarcção da GFAP novamente no córtex pré-frontal medial e na área somatossensorial primária nos animais expostos ao VPA. Em conjunto, os dados demonstram um importante efeito preventivo da administração pré-natal do RSV ao promover uma melhora funcional significativa.

Além disso, propusemos investigações translacionais sobre as bases neuroimunológicas envolvidas no TEA – reforçando ainda mais as validades do modelo VPA e possibilitando a ampliação de estudos nesse sentido –, bem como sobre contribuição das alterações no metabolismo das purinas na fisiopatologia do TEA, destacando o sistema purinérgico como um alvo promissor de estudos na busca por estratégias terapêuticas no TEA.

Portanto, podemos reforçar o papel protetor do RSV tanto nas disfunções da BHE em modelo de TEA quanto nos possíveis mecanismos subjacentes à macrocefalia devido à prevenção observada não só na manutenção da integridade da BHE, mas também nas alterações na dinâmica do conteúdo de água, no perfil de aquaporinas e de expressão de GFAP e astrócitos. Além disso, propusemos investigações translacionais sobre as bases neuroimunológicas envolvidas no TEA, bem como sobre alterações na sinalização purinérgica envolvidas nesse transtorno, levantando algumas hipóteses sobre possíveis mecanismos envolvidos na fisiopatologia do TEA.

5. PERSPECTIVAS

Devido à pandemia, os experimentos previstos para compor a presente tese precisaram ser interrompidos e adiados. Assim, as principais perspectivas envolvem a complementação dos experimentos previstos, bem como novos experimentos para responder às perguntas que surgiram durante a análise dos dados obtidos.

Uma vez que a exposição pré-natal ao VPA modula o balanço neuroimunológico, altera o comportamento e causa alterações morfofuncionais, aumentando a permeabilidade das barreiras neurais, cogitamos um envolvimento da placenta no desencadeamento de tais alterações. Seria importante determinar se o tratamento pré-natal com RSV poderia modular células do sistema imunológico, tanto a nível circulatório quanto tecidual (encefálico) e se esse efeito benéfico já poderia ser visualizado a nível embrionário.

Considerando os resultados gerados, destacando as alterações imunológicas e purinérgicas como alvos em potencial para estudos sobre os mecanismos envolvidos na indução do fenótipo do tipo autista pelo VPA, bem como na prevenção conferida pelo RSV, surgem as seguintes perspectivas:

- Placenta (remoção no dia gestacional 19):
 - Analisar por imunofluorescência a quimiocina CCL2 e a infiltração de células sanguíneas, incluindo leucócito, linfócito T, macrófago, mastócito, linfócito B (por meio de marcadores CD45, CD3, CD13, carboxipeptidase A (CPA), CD19, respectivamente);
 - Avaliar expressão gênica e proteica de IL-6 e seu receptor (IL-6R).
- Encéfalo de embriões no dia 19 (E19):
 - Analisar possíveis alterações na microglia (pela marcação por CD11b);
 - Analisar infiltrado de células sanguíneas, incluindo leucócito, linfócito T, macrófago, mastócito, linfócito B (por meio dos marcadores CD45, CD3, CD13, CPA, CD19, respectivamente) e de quimiocina CCL2;
 - Analisar a expressão gênica e proteica de IL-6 e IL-6R;
 - Analisar parâmetros de barreira hematoencefálica (BHE), incluindo marcação de pericitos, endotélio, astrócitos e AQP4;
 - Analisar AQP1 e AQP4 no epêndima do terceiro ventrículo e no plexo coroide.
- Animais adultos (amostras já obtidas):

- Analisar a expressão do canal Kir4.1 no modelo VPA e os possíveis efeitos do RSV;
- Buscar na literatura e analisar proteínas com provável envolvimento tanto nas disfunções nas barreiras neurais quanto na proteção promovida pela RSV, como a MMP-9;
- Realizar experimentos para análise do metabolismo astrocítico no modelo VPA e o possível efeito protetor do RSV;
- Realizar o Método de Cavalieri em cortes histológicos a fim de determinar se no modelo animal também há alteração do volume encefálico, além de analisar a espessura cortical em diferentes regiões encefálicas, bem como o possível efeito protetor do RSV;
- Analisar o perfil de citocinas pró-inflamatórias tanto circulantes quanto em tecido encefálico e o possível efeito protetor do RSV;
- Analisar a presença de infiltrado inflamatório no tecido encefálico e o possível efeito protetor do RSV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, N. Joan et al. **Structure and function of the blood–brain barrier.** *Neurobiology of Disease*, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 13–25, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19664713>>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- ABBOTT, N. Joan. **Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery.** *Journal of Inherited Metabolic Disease*, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 437–449, 2013.
- ABBOTT, N. Joan; RÖNNBÄCK, Lars; HANSSON, Elisabeth. **Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier.** *Nature Reviews Neuroscience*, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 41–53, 2006.
- ABDELLI, Latifa S.; SAMSAM, Aseela; NASER, Saleh A. **Propionic Acid Induces Gliosis and Neuro-inflammation through Modulation of PTEN/AKT Pathway in Autism Spectrum Disorder.** *Scientific reports*, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31217543/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- ABGHARI, Fateme Zahedi; MORADI, Yousef; AKOUCHEKIAN, Mansoureh. **PTEN gene mutations in patients with macrocephaly and classic autism: A systematic review.** *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 52–59, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31086789/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- ADOLPHS, R. et al. **Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala.** *Nature* 1994 372:6507, [s. l.], v. 372, n. 6507, p. 669–672, 1994. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/372669a0>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- AHMAD, SF et al. **Toll-like receptors, NF-κB, and IL-27 mediate adenosine A2A receptor signaling in BTBR T+ Itpr3tf/J mice.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, [s. l.], v. 79, n. Pt B, p. 184–191, 2017. a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28668513/>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- AHMAD, SF et al. **Adenosine A2A receptor signaling affects IL-21/IL-22 cytokines and GATA3/T-bet transcription factor expression in CD4+ T cells from a BTBR T+ Itpr3tf/J mouse model of autism.** *Journal of*

- Neuroimmunology, [s. l.], v. 311, p. 59–67, 2017. b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28807491/>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- AHMAD, Sheikh F. et al. **Resveratrol Improves Neuroimmune Dysregulation Through the Inhibition of Neuronal Toll-Like Receptors and COX-2 Signaling in BTBR T+ Itpr3tf/J Mice**. *NeuroMolecular Medicine*, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 133–146, 2018. a.
- AHMAD, Sheikh F. et al. **Immune Alterations in CD8+ T Cells Are Associated with Neuronal C-C and C-X-C Chemokine Receptor Regulation Through Adenosine A2A Receptor Signaling in a BTBR T+ Itpr3tf/J Autistic Mouse Model**. *Molecular Neurobiology*, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 2603–2616, 2018. b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28421534/>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- AHMAD, Sheikh F. et al. **Resveratrol attenuates pro-inflammatory cytokines and activation of JAK1-STAT3 in BTBR T+ Itpr3tf/J autistic mice**. *European Journal of Pharmacology*, [s. l.], v. 829, p. 70–78, 2018. c. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29654783/>>. Acesso em: 7 jun. 2021.
- AHMAD, Sheikh F. et al. **Methylmercury chloride exposure aggravates proinflammatory mediators and Notch-1 signaling in CD14+ and CD40+ cells and is associated with imbalance of neuroimmune function in BTBR T+ Itpr3tf/J mice**. *NeuroToxicology*, [s. l.], v. 82, p. 9–17, 2021.
- AKDEMIR, Gökhan et al. **The time course changes in expression of aquaporin 4 and aquaporin 1 following global cerebral ischemic edema in rat**. *Surgical Neurology International*, [s. l.], v. 7, n. 1, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26298322/>>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- AKINTUNDE, Marjannie Eloi et al. **Increased production of IL-17 in children with autism spectrum disorders and co-morbid asthma**. *Journal of neuroimmunology*, [s. l.], v. 286, p. 33–41, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26298322/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- AKSHOOMOFF, Natacha et al. **Outcome classification of preschool children with autism spectrum disorders using MRI brain measures**. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 349–357, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15076269/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

- AL-AYADHI, Laila Yousef; MOSTAFA, Gehan Ahmed. **Elevated serum levels of interleukin-17A in children with autism.** Journal of Neuroinflammation, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 595, 2012. Disponível em: <<http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-2094-9-158>>
- AL-HAKBANY, Manan; AWADALLAH, Sitalbanat; AL-AYADHI, Laila. **The Relationship of HLA Class I and II Alleles and Haplotypes with Autism: A Case Control Study.** Autism research and treatment, [s. l.], v. 2014, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24672722/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. **Ethical Considerations for Including Women as Research Participants | ACOG.** 2015. Disponível em: <<https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/committee-opinion/articles/2015/11/ethical-considerations-for-including-women-as-research-participants>>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. DSM-5 Diagnostic Classification. In: **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.** [s.l.] : American Psychiatric Association, 2013.
- AMIRY-MOGHADDAM, Mahmood et al. **Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: Phenotypic defects in brains of α -syn-trophin-null mice.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [s. l.], v. 100, n. 23, p. 13615–13620, 2003. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2336064100>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- ANSARI, MA et al. **Activation of adenosine A2A receptor signaling regulates the expression of cytokines associated with immunologic dysfunction in BTBR T⁺ Itpr3tf/J mice.** Molecular and Cellular Neuroscience, [s. l.], v. 82, p. 76–87, 2017. a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28465254/>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- ANSARI, MA et al. **Adenosine A2A receptor modulates neuroimmune function through Th17/retinoid-related orphan receptor gamma t (ROR γ t) signaling in a BTBR T⁺ Itpr3tf/J mouse model of autism.** Cellular Signalling, [s. l.], v. 36, p. 14–24, 2017. b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28438638/>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

- ARCIENEGA, I. I. et al. **Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain**. *Neuroscience*, [s. l.], v. 167, n. 4, p. 1103–1114, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.059>>
- ASHWOOD, Paul et al. **Associations of impaired behaviors with elevated plasma chemokines in autism spectrum disorders**. *Journal of Neuroimmunology*, [s. l.], 2011. a.
- ASHWOOD, Paul et al. **Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome**. *Brain, Behavior, and Immunity*, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 40–45, 2011. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705131>>. Acesso em: 29 nov. 2019.
- ASHWOOD, Paul et al. **Altered T cell responses in children with autism**. *Brain, behavior, and immunity*, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 840–849, 2011. c. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20833247/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- ASPERGER, Hans. **Die "Autistischen Psychopathen" im Kindesalter**. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 76–136, 1944.
- AVENDAÑO, Beatriz C. et al. **Prenatal exposure to inflammatory conditions increases Cx43 and Panx1 unopposed channel opening and activation of astrocytes in the offspring effect on neuronal survival**. *GLIA*, [s. l.], v. 63, n. 11, p. 2058–2072, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/glia.22877>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- AVINO, Thomas A. et al. **Neuron numbers increase in the human amygdala from birth to adulthood, but not in autism**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s. l.], v. 115, n. 14, p. 3710–3715, 2018. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/115/14/3710>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- AYLWARD, E. H. et al. **Effects of age on brain volume and head circumference in autism**. *Neurology*, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 175–183, 2002. Disponível em: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.59.2.175%5Cnhttps://www.researchgate.net/publication/11245947_Effects_of_age_on_brain_Volume_and_head_circumference_in_autism%5Cnhttp://booksc.org/book/49047728>
- BADAUT, Jérôme et al. **Aquaporin and brain diseases**. *Biochimica et Biophysica*

- Acta - General Subjects, [s. l.], 2014.
- BAKHEET, SA et al. **Resveratrol Ameliorates Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T Regulatory Cell-Related Transcription Factor Signaling in a BTBR T + tf/J Mouse Model of Autism**. *Molecular Neurobiology*, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 5201–5212, 2017.
- BAKHEET, Saleh A. et al. **Resveratrol treatment attenuates chemokine receptor expression in the BTBR T + tf/J mouse model of autism**. *Molecular and Cellular Neuroscience*, [s. l.], v. 77, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2016.09.004>>
- BAMBINI-JUNIOR, Victorio et al. **Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate**: Behavioral changes and liver parameters. *Brain Research*, [s. l.], 2011.
- BAMBINI-JUNIOR, Victorio et al. **Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid**. *Neuroscience Letters*, [s. l.], 2014.
- BARON-COHEN, S.; ALLEN, J.; GILLBERG, C. **Can Autism be Detected at 18 Months?**: The Needle, the Haystack, and the CHAT. *The British Journal of Psychiatry*, [s. l.], v. 161, n. 6, p. 839–843, 1992. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/the-british-journal-of-psychiatry/article/abs/can-autism-be-detected-at-18-months/5C300575DE81B97AAAA2521DA69CCDDA>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- BARONE, Rita et al. **Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Resveratrol Effect in Fibroblasts from Patients with Autism Spectrum Disorder**. *Journal of personalized medicine*, [s. l.], v. 11, n. 6, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34199819/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- BARRETT, Catherine E. et al. **Developmental disruption of amygdala transcriptome and socioemotional behavior in rats exposed to valproic acid prenatally**. *Molecular Autism* 2017 8:1, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–17, 2017. Disponível em: <<https://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13229-017-0160-x>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- BAUMAN, Margaret; KEMPER, Thomas L. **Histoanatomic observations of the brain in early infantile autism**. *Neurology*, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 866–866, 1985.
- BAUMAN, Margaret L. **Medical Comorbidities in Autism: Challenges to**

- Diagnosis and Treatment.** *Neurotherapeutics*, [s. l.], v. 7(3), p. 320–327, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5084236/pdf/13311_2011_Article_70300320.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- BAUR, Joseph A.; SINCLAIR, David A. **Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence.** *Nature Reviews Drug Discovery*, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 493–506, 2006.
- BELLOT-SAEZ, Alba et al. **Astrocytic modulation of neuronal excitability through K⁺ spatial buffering.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, [s. l.], v. 77, p. 87–97, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763416307229>>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- BELMONTE, Matthew K.; BOURGERON, Thomas. **Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks.** *Nature Neuroscience*, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1221–1225, 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nn1765>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- BENARROCH, Eduardo E. Choroid plexus-CSF system: **Recent developments and clinical correlations.** *Neurology*, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 286–296, 2016.
- BENGA, Oana; HUBER, Vincent J. **Brain water channel proteins in health and disease.** *Molecular Aspects of Medicine*, 2012.
- BHANDARI, Ranjana; KUHAD, Anurag. **Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders.** *Neurochemistry International*, [s. l.], v. 103, p. 8–23, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.12.012>>
- BLANCHETTE, Marie; DANEMAN, Richard. **Formation and maintenance of the BBB.** *Mechanisms of Development*, [s. l.], v. 138, p. 8–16, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26215350>>. Acesso em: 21 nov. 2018.
- BLOCH, Orin; MANLEY, Geoffrey T. **The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema.** *Neurosurgical focus*, [s. l.], v. 22, n. 5, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17613234/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- BOBERMIN, Larissa Daniele et al. **Resveratrol Prevents Ammonia Toxicity in Astroglial Cells.** *PLoS ONE*, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 52164, 2012. Disponível em: <www.plosone.org>. Acesso em: 7 jun. 2021.

- BOSL, William J.; TAGER-FLUSBERG, Helen; NELSON, Charles A. **EEG Analytics for Early Detection of Autism Spectrum Disorder: A data-driven approach.** Scientific reports, [s. l.], v. 8, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29717196/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- BRAUN, Natalie N. et al. **Expression of phosphodiesterase 4 is altered in the brains of subjects with autism.** NeuroReport, [s. l.], v. 18, n. 17, p. 1841–1844, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18090323/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- BRAUNSCHWEIG, Daniel et al. **Behavioral correlates of maternal antibody status among children with autism.** Journal of autism and developmental disorders, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 1435–1445, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22012245/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- BRISTOT SILVESTRIN, Roberta et al. **Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus.** Brain Research, [s. l.], 2013.
- BROWN, Dennis. **The Discovery of Water Channels (Aquaporins).** Annals of Nutrition and Metabolism, [s. l.], v. 70, n. Suppl. 1, p. 37–42, 2017. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/463061>>. Acesso em: 6 fev. 2022.
- BROWN, W. T. et al. **Autism is associated with the fragile-X syndrome.** Journal of autism and developmental disorders, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 303–8, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7153204>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- BRUNI, Joseph; WILDER, B. Joe. **Valproic acid. Review of a new antiepileptic drug.** Archives of neurology, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 393–398, 1979. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/110294/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- BURTON, BS. **On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate.** American Chemistry Journal, [s. l.], v. 3, p. 385–395, 1882.
- BUSCH, Robyn M. et al. **Neurobehavioral phenotype of autism spectrum disorder associated with germline heterozygous mutations in PTEN.** Translational psychiatry, [s. l.], v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31594918/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- CAMPBELL, Nicholas G. et al. **Rare coding variants of the adenosine A3 receptor are increased in autism: on the trail of the serotonin transporter regulome.**

- Molecular Autism, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 28, 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3882891/>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- CARDOSO, Filipa Lourenço; BRITES, Dora; BRITO, Maria Alexandra. **Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches**. Brain Research Reviews, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 328–363, 2010.
- CASANOVA, Manuel et al. **Minicolumnar pathology in autism**. Neurology, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 428–32, 2002.
- CASANOVA, Manuel et al. **Minicolumnar abnormalities in autism**. Acta Neuropathologica, [s. l.], v. 112, n. 3, p. 287–303, 2006.
- CASANOVA, Manuel F. **The Neuropathology of Autism**. Brain Pathology, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 422–433, 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3639.2007.00100.x>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- CHAN, A.; GOLD, R.; VON AHSEN, N. **ATP-binding cassette transporters in inflammatory brain disease**. Current pharmaceutical design, [s. l.], v. 17, n. 26, p. 2803–2807, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21827405/>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- CHANG, Yi Shin et al. **Autism and Sensory Processing Disorders: Shared White Matter Disruption in Sensory Pathways but Divergent Connectivity in Social-Emotional Pathways**. PLoS ONE, [s. l.], v. 9, n. 7, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4116166/>. Acesso em: 13 mar. 2022.
- CHÁVEZ, Carolina E. et al. **The Opening of Connexin 43 Hemichannels Alters Hippocampal Astrocyte Function and Neuronal Survival in Prenatally LPS-Exposed Adult Offspring**. Frontiers in Cellular Neuroscience, [s. l.], v. 13, 2019.
- CHAWARSKA, Katarzyna et al. **Early Generalized Overgrowth in Boys With Autism**. Archives of General Psychiatry, [s. l.], v. 68, n. 10, p. 1021, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969460>. Acesso em: 21 nov. 2018.
- CHERONI, Cristina; CAPORALE, Nicolò; TESTA, Giuseppe. **Autism spectrum disorder at the crossroad between genes and environment: contributions, convergences, and interactions in ASD developmental pathophysiology**. Molecular Autism, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 69, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7488083/>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- CHIEN, Yi Ling et al. **Association of HLA-DRB1 alleles and neuropsychological**

- function in autism.** *Psychiatric genetics*, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 46–49, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21716163/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- CHOI, Gloria et al. **The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autismlike phenotypes in offspring.** *Science*, [s. l.], 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4782964/pdf/nihms759163.pdf>>. Acesso em: 3 maio. 2018.
- CHOI, Yoon Kyung; KIM, Kyu-Won. **Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication.** *BMB reports*, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 345–52, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18510863>>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- CHRISTENSEN, Jakob et al. **Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism.** *JAMA*, [s. l.], v. 309, n. 16, p. 1696–1703, 2013.
- CHRISTIANSON, Arnold L.; CHESTER, Nicole; KROMBERG, Jennifer G. R. **Fetal Valproate Syndrome: Clinical and Neuro- developmental Features in Two Sibling Pairs.** *Developmental Medicine & Child Neurology*, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 361–369, 1994.
- CLARKSON, Benjamin D. S. et al. **Inflammatory cytokine-induced changes in neural network activity measured by waveform analysis of high-content calcium imaging in murine cortical neurons.** *Scientific Reports*, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 9037, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-09182-5>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- COURCHESNE, Eric et al. **Neuron Number and Size in Prefrontal Cortex of Children With Autism.** *JAMA*, [s. l.], v. 306, n. 18, p. 2001, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068992>>. Acesso em: 15 jul. 2019.
- COURCHESNE, Eric et al. **The ASD Living Biology: from cell proliferation to clinical phenotype.** *Molecular Psychiatry* 2018 24:1, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 88–107, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41380-018-0056-y>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- COURCHESNE, Eric; CARPER, Ruth; AKSHOOMOFF, Natacha. **Evidence of Brain Overgrowth in the First Year of Life in Autism.** *Jama*, [s. l.], v. 290, n. 3, p. 1–8, 2003. Disponível em: <file:///Users/sschiff3/Dropbox/**Papers**/sschiff3's>

Library/Library.papers3/Files/Evidence of Brain Overgrowth in the First Year of Life in Autism: 2003.pdf%5Cpapers3://publication/uuid/CD4296CC-C131-42D0-BBD9-D352FC4A783D>

- CROONENBERGHS, Jan et al. **Activation of the inflammatory response system in autism.** *Neuropsychobiology*, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 1–6, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11803234/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- DE ALMEIDA, Lúcia Maria Vieira et al. **Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures.** *Neurochemical Research*, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 8–15, 2008. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/17594518>>. Acesso em: 7 jun. 2021.
- DECKMANN, Iohanna et al. **Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid.** *Neuroimmunomodulation*, [s. l.], p. 1–15, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30157484>>. Acesso em: 1 set. 2018.
- DEL BO, Cristian et al. **Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern?** *Nutrients*, [s. l.], v. 11, n. 6, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31208133/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- DELISI, Lynn E. et al. **Deficient natural killer cell (NK) activity and macrophage functioning in schizophrenic patients.** *Journal of neural transmission*, [s. l.], v. 58, n. 1–2, p. 99–106, 1983. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6655470/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- DEMEESTERE, Delphine; LIBERT, Claude; VANDENBROUCKE, Roosmarijn E. **Therapeutic implications of the choroid plexus-cerebrospinal fluid interface in neuropsychiatric disorders.** *Brain, Behavior, and Immunity*, [s. l.], v. 50, p. 1–13, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.010>>
- DEMENTIEVA, Yulia A. et al. **Accelerated head growth in early development of individuals with autism.** *Pediatric Neurology*, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 102–108, 2005.
- DENARDO, Laura A. et al. **Connectivity of mouse somatosensory and prefrontal cortex examined with trans-synaptic tracing.** *Nature neuroscience*, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 1687–1697, 2015. Disponível em:

- <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26457553>>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- DENLINGER, Loren C. et al. **Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide.** *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, [s. l.], v. 167, n. 4, p. 1871–1876, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11489964/>>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- DEVNANI, Preeti A.; HEGDE, Anaita U. **Autism and sleep disorders.** *Journal of Pediatric Neurosciences*, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 304, 2015. Disponível em: <</pmc/articles/PMC4770638/>>. Acesso em: 13 mar. 2022.
- DI VIRGILIO, Francesco. **P2X receptors and inflammation.** *Current medicinal chemistry*, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 866–877, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25524252/>>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- DINSTEIN, Ilan et al. **Disrupted neural synchronization in toddlers with autism.** *Neuron*, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 1218–1225, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21689606/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- DOVER, Clare J.; LE COUTEUR, Ann. **How to diagnose autism.** *Arch Dis Child*, [s. l.], v. 92, p. 540–545, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2066173/pdf/540.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- DUAN, Shumin et al. **P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes.** *Journal of Neuroscience*, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 1320–1328, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12598620/>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- DURKIN, Maureen S. et al. **Original Contribution Advanced Parental Age and the Risk of Autism Spectrum Disorder.** *American Journal of Epidemiology*^a, [s. l.], v. 168, n. 11, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2638544/pdf/kwn250.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- EDMONSON, Catherine; ZIATS, Mark N.; RENNERT, Owen M. **Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum.** [s.l: s.n.]. *Molecular Autism*, [s. l.] v. 5, n. 1, 2014. Disponível em: <<http://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/2040-2392-5-3>>. Acesso em 03 mar. 2021.

- EMERSON, Robert W. et al. **Functional neuroimaging of high-risk 6-month-old infants predicts a diagnosis of autism at 24 months of age.** *Science Translational Medicine*, [s. l.], v. 9, n. 393, 2017.
- ENGELHARDT, Britta et al. **Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system.** *Acta Neuropathologica*, [s. l.], v. 132, p. 317–338, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4992028/pdf/401_2016_Article_1606.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- ENGELHARDT, Britta; SOROKIN, Lydia. **The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: Function and dysfunction.** *Seminars in Immunopathology*, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 497–511, 2009.
- ENSTROM, Amanda M. et al. **Altered gene expression and function of peripheral blood natural killer cells in children with autism.** *Brain, behavior, and immunity*, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 124–133, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18762240/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- ENSTROM, Amanda M. et al. **Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders.** *Brain, behavior, and immunity*, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 64–71, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666104>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- ERIKSSON, UK. et al. **Subangstrom Resolution X-Ray Structure Details Aquaporin-Water Interactions.** *Science*, [s. l.], v. 340, n. 6138, p. 1346–1349, 2013.
- ESTES, Myka L.; MCALLISTER, A. Kimberley. **Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders.** *Science*, [s. l.], v. 353, n. 6301, p. 772–777, 2016.
- FAAS, M. M.; SÁEZ, T.; DE VOS, P. **Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses?** *Molecular Aspects of Medicine*, [s. l.], 2017.
- FARINA, Cinthia; ALOISI, Francesca; MEINL, Edgar. **Astrocytes are active players in cerebral innate immunity.** *Trends in Immunology*, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 138–145, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276138>>. Acesso em: 11 maio. 2019.
- FATEMI, S. Hossein et al. **Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism.** *Cellular and molecular neurobiology*, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 171–175,

2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12363198/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- FATEMI, S. Hossein et al. **Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism.** Synapse, [s. l.], 2008.
- FELICIANO, David M. et al. **A circuitry and biochemical basis for Tuberous Sclerosis symptoms:** From Epilepsy to Neurocognitive deficits. Int J Dev Neurosci, [s. l.], v. 31, n. 7, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3830611/pdf/nihms449233.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- FENG, Chenxi et al. **PTEN Regulates Mitochondrial Biogenesis via the AKT/GSK-3 β /PGC-1 α Pathway in Autism.** Neuroscience, [s. l.], v. 465, p. 85–94, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33895342/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- FENG, Yan et al. **Resveratrol attenuates neuronal autophagy and inflammatory injury by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway in experimental traumatic brain injury.** International Journal of Molecular Medicine, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 921–930, 2016. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2016.2495/abstract>>. Acesso em: 6 fev. 2022.
- FENLON, Laura R. et al. **Formation of functional areas in the cerebral cortex is disrupted in a mouse model of autism spectrum disorder.** Neural Development, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<https://neuraldevelopment.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13064-015-0033-y>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- FERNÁNDEZ, Marta et al. **Altered Cerebellar Response to Somatosensory Stimuli in the Cntnap2 Mouse Model of Autism.** eNeuro, [s. l.], v. 8, n. 5, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34593517/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- FERRARI, Davide et al. **Purinergic modulation of interleukin-1 β release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin.** Journal of Experimental Medicine, [s. l.], v. 185, n. 3, p. 579–582, 1997. Disponível em: <<http://rupress.org/jem/article-pdf/185/3/579/1110644/5402.pdf>>. Acesso em: 22

jun. 2021.

FILIPPIDIS, Aristotelis S.; CAROZZA, Richard B.; REKATE, Harold L. **Aquaporins in Brain Edema and Neuropathological Conditions**. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 18, n. 1, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5297690/>. Acesso em: 17 nov. 2021.

FISHMAN, Inna et al. **Atypical Functional Connectivity of Amygdala Related to Reduced Symptom Severity in Children With Autism**. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, [s. l.], v. 57, n. 10, p. 764- 774.e3, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30274651/>. Acesso em: 17 nov. 2021.

FONTES-DUTRA, Mellanie et al. **Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid**. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, [s. l.], v. 10, p. 9, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29872390>. Acesso em: 9 ago. 2018.

FONTES-DUTRA, Mellanie et al. **Maternal Immune Activation and Neuropsychiatric Disorders: The Intricate Puzzle of Autism Spectrum Disorder**. In: ANTONIO L. TEIXEIRA; DANIELLE MACEDO; BERNHARD T. BAUNE. (Eds.). *Perinatal Inflammation and Adult Psychopathology*. [s.l.] : Springer, Cham, 2020. p. 167–205.

FREITAG, Christine M. et al. **Adenosine A receptor gene () variants may increase autistic symptoms and anxiety in autism spectrum disorder Adenosine A 2A receptor gene (ADORA2A) variants may increase autistic symptoms and anxiety in autism spectrum disorder**. *European Child and Adolescent Psychiatry*, [s. l.], v. 19, n. 1, 2009. Disponível em: <http://www.hapmap.org>. Acesso em: 21 jun. 2021.

FUKUDA, A. M. et al. **Delayed increase of astrocytic aquaporin 4 after juvenile traumatic brain injury: possible role in edema resolution?** *Neuroscience*, [s. l.], v. 222, p. 366–378, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22728101/>. Acesso em: 17 nov. 2021.

FUMAGALLI, Marta et al. **Pathophysiological role of purines and pyrimidines in neurodevelopment: Unveiling new pharmacological approaches to congenital brain diseases**. *Frontiers in Pharmacology*, [s. l.], v. 8, n. DEC, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29375373/>. Acesso em: 21 jun. 2021.

- FUMAGALLI, Marta; LECCA, Davide; ABBRACCHIO, Maria P. **Role of purinergic signalling in neuro-immune cells and adult neural progenitors**. *Frontiers in Bioscience*, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 2326–2341, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21622179/>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- GABARD-DURNAM, Laurel J. et al. **Longitudinal EEG power in the first postnatal year differentiates autism outcomes**. *Nature Communications* 2019 10:1, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-12202-9>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- GAO, Yan et al. **Resveratrol mitigates the oxidative stress mediated by hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats via Nrf2/HO-1 pathway**. *Pharmaceutical biology*, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 440–449, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30460866/>>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- GARBETT, Krassimira et al. **Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism**. *Neurobiology of disease*, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 303–311, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18378158/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- GENG, Xiujuan; KANG, Xin; WONG, Patrick C. M. **Autism spectrum disorder risk prediction: A systematic review of behavioral and neural investigations**. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, [s. l.], v. 173, p. 91–137, 2020.
- GESCHWIND, Daniel H. **Advances in Autism**. *Annual Review of Medicine*, [s. l.], v. 60, p. 367–380, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3645857/pdf/nihms460725.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- GEVI, Federica et al. **Urinary metabolomics of young Italian autistic children supports abnormal tryptophan and purine metabolism**. *Molecular autism*, [s. l.], v. 7, p. 47, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27904735/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- GHERSI-EGEA, Jean François et al. **Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease**. *Acta neuropathologica*, [s. l.], v. 135, n. 3, p. 337–361, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29368213/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

- GIFFORD, Janace J. et al. **The effect of valproic acid exposure throughout development on microglia number in the prefrontal cortex, hippocampus and cerebellum.** *Neuroscience*, [s. l.], 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34780921/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- GINSBERG, Matthew R. et al. **Brain Transcriptional and Epigenetic Associations with Autism.** *PLoS ONE*, [s. l.], v. 7, n. 9, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22984548/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- GO, Hyo Sang et al. **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*, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 1028–1041, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22841957/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- GOTTFRIED, Carmem et al. **Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model.** In: *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I.* [s.l.] : InTech, 2013.
- GOTTFRIED, Carmem et al. **The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder.** *Frontiers in psychiatry*, [s. l.], v. 6, p. 121, 2015. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpsy.2015.00121/abstract>>. Acesso em: 1 fev. 2018.
- GRAHAMES, C. B. A. et al. **Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1 β release in human monocytes.** *British Journal of Pharmacology*, [s. l.], v. 127, n. 8, p. 1915–1921, 1999. Disponível em: <<http://www.stockton-press.co.uk/bjp>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- GREGG, Jeffrey P. et al. **Gene expression changes in children with autism.** *Genomics*, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 22–29, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18006270/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- GROEN, Wouter et al. **Amygdala and hippocampus enlargement during adolescence in autism.** *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, [s. l.], v. 49, n. 6, p. 552–560, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20494265/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- GRYGOROWICZ, Tomasz; DĄBROWSKA-BOUTA, Beata; STRUŻYŃSKA, Lidia. **Administration of an antagonist of P2X7 receptor to EAE rats prevents a decrease of expression of claudin-5 in cerebral capillaries.** *Purinergic*

- signalling, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 385–393, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30091000/>>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- GUERINI, Franca R. et al. **An HLA-G(*)14bp insertion/deletion polymorphism associates with the development of autistic spectrum disorders.** Brain, behavior, and immunity, [s. l.], v. 44, p. 207–212, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25451607/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- HA, Sungji et al. **Characteristics of Brains in Autism Spectrum Disorder: Structure, Function and Connectivity across the Lifespan.** Experimental neurobiology, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 273–84, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26713076>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- HARDAN, Antonio Y. et al. **Increased frontal cortical folding in autism: a preliminary MRI study.** Psychiatry research, [s. l.], v. 131, n. 3, p. 263–268, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15465295/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- HAYASHI, Kanehiro et al. **Cellular dynamics of neuronal migration in the hippocampus.** Frontiers in Neuroscience, [s. l.], v. 9, n. APR, p. 135, 2015. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4408843/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25451607/)>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- HAZLETT, Heather Cody et al. **Magnetic Resonance Imaging and Head Circumference Study of Brain Size in Autism.** Archives of General Psychiatry, [s. l.], v. 62, n. 12, p. 1366, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330725>>. Acesso em: 21 nov. 2018.
- HAZLETT, Heather Cody et al. **Early Brain Overgrowth in Autism Associated with an Increase in Cortical Surface Area Before Age 2 years.** Archives of General Psychiatry, [s. l.], v. 68, n. 5, p. 467–476, 2011.
- HAZLETT, Heather Cody et al. **Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder.** Nature, [s. l.], v. 542, n. 7641, p. 348–351, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28202961/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- HEGAZY, Hoda G.; ALI, Elham H. A.; ELGOLY, Amany H. Mahmoud. **Interplay between pro-inflammatory cytokines and brain oxidative stress biomarkers: Evidence of parallels between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain physiopathology in autism rat model.** Cytokine, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 173–180, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.027>>

- HERVAS, A.; RUEDA, I. **Conduct disorders in autism spectrum disorders**. Revista de Neurologia, [s. l.], v. 1, n. 66, p. 31–38, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29516450/>>. Acesso em: 13 mar. 2022.
- HIDEMA, Shizu et al. **Single administration of resveratrol improves social behavior in adult mouse models of autism spectrum disorder**. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, [s. l.], v. 84, n. 11, p. 2207–2214, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32698690/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- HIRSCH, Mauro Mozael et al. **Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA**. Food and Chemical Toxicology, [s. l.], v. 115, n. February, p. 336–343, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691518301352>>
- HIRSCH, Mauro Mozael et al. **Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acid-induced animal model of autism**. Neuropharmacology, [s. l.], p. 107930, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390819305015>>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- HOOSMANDI, Mehdi; WONG, Calvin; KHOUTORSKY, Arkady. **Dysregulation of translational control signaling in autism spectrum disorders**. Cellular signalling, [s. l.], v. 75, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32858122/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- HORVÁTH, Gergely et al. **P2X7 receptors drive poly(I:C) induced autism-like behavior in mice**. Journal of Neuroscience, [s. l.], v. 39, n. 13, p. 2542–2561, 2019. Disponível em: <</pmc/articles/PMC6435822/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- HOSHI, Akihiko et al. **Expression of Aquaporin 1 and Aquaporin 4 in the Temporal Neocortex of Patients with Parkinson's Disease**. Brain pathology (Zurich, Switzerland), [s. l.], v. 27, n. 2, p. 160–168, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26919570/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- HOU, Yilin et al. **LF-rTMS ameliorates social dysfunction of FMR1 -/- mice via modulating Akt/GSK-3 β signaling**. Biochemical and biophysical research communications, [s. l.], v. 550, p. 22–29, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33677132/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- HSU, M. S. et al. **Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4**

- in the mouse hippocampus.** Neuroscience, [s. l.], v. 178, p. 21–32, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21256195/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- HUBBARD, Jacqueline A. et al. **Expression of the astrocyte water channel aquaporin-4 in the mouse brain.** ASN Neuro, [s. l.], v. 7, n. 5, 2015. Disponível em: <<https://us.sagepub.com/en-us/nam/open-access-at-sage>>. Acesso em: 7 jun. 2021.
- IKESHIMA-KATAOKA, Hiroko. **Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes.** International Journal of Molecular Sciences, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1306, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27517922>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- ILIFF, Jeffrey J. et al. **Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury.** The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, [s. l.], v. 34, n. 49, p. 16180–16193, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25471560/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- IMAI, Kouhun et al. **Psychological and mental health problems in patients with thalidomide embryopathy in Japan.** Psychiatry and Clinical Neurosciences, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 479–486, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/pcn.12152>>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- INGRAM, Jennifer L. et al. **Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism.** Neurotoxicology and Teratology, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 319–324, 2000.
- JAIN, Priti; KUMAR WADHWA, Pankaj; RAMANLAL JADHAV, Hemant. **Reactive Astrogliosis: Role in Alzheimer’s Disease.** CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 872–879, 2015.
- JIN, Yan et al. **Identification of infants at high- risk for autism spectrum disorder using multiparameter multiscale white matter connectivity networks.** Human Brain Mapping, [s. l.], v. 36, n. 12, p. 4880, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25471560/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- JONES, Stephen; SAMANTA, Debopam. **Macrocephaly.** Schwartz’s Clinical Handbook of Pediatrics: Fifth Edition, [s. l.], p. 546–550, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560786/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.

- JUNG, Jin Sup et al. **Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [s. l.], v. 91, n. 26, p. 13052, 1994. Disponível em: </pmc/articles/PMC45579/?report=abstract>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- JUYBARI, Kobra Bahrampour et al. **Sex dependent alterations of resveratrol on social behaviors and nociceptive reactivity in VPA-induced autistic-like model in rats.** Neurotoxicology and teratology, [s. l.], v. 81, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32534151/>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- JYONOUCHI, Harumi et al. **Dysregulated innate immune responses in young children with autism spectrum disorders: their relationship to gastrointestinal symptoms and dietary intervention.** Neuropsychobiology, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 77–85, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15741748/>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- JYONOUCHI, Harumi; SUN, Sining; ITOKAZU, Nanae. **Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder.** Neuropsychobiology, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 76–84, 2002.
- KALRA, Simran et al. **No evidence of antibodies against GAD65 and other specific antigens in children with autism.** BBA CLI, [s. l.], v. 4, p. 81–84, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4564997/pdf/main.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- KANNER, L. **Autistic disturbances of affective contact.** Nervous Child, [s. l.], v. 2, p. 217–250, 1943.
- KATAOKA, Shunsuke et al. **Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid.** International Journal of Neuropsychopharmacology, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 91–103, 2013.
- KAYMAKCALAN, Hande et al. **Prevalence and clinical/molecular characteristics of PTEN mutations in Turkish children with autism spectrum disorders and macrocephaly.** Molecular genetics & genomic medicine, [s. l.], v. 9, n. 8, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34268892/>. Acesso em: 17 nov. 2021.

- KHAN, Sheraz et al. **Somatosensory cortex functional connectivity abnormalities in autism show opposite trends, depending on direction and spatial scale.** *Brain*, [s. l.], v. 138, n. 5, p. 1394, 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC5013931/>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- KHUNDRAKPAM, Budhachandra S. et al. **Cortical Thickness Abnormalities in Autism Spectrum Disorders Through Late Childhood, Adolescence, and Adulthood: A Large-Scale MRI Study.** *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 1721–1731, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28334080/>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- KLEIN, Steven D. et al. **Mutations in the sonic hedgehog pathway cause macrocephaly-associated conditions due to crosstalk to the PI3K/AKT/mTOR pathway.** *American journal of medical genetics. Part A*, [s. l.], v. 179, n. 12, p. 2517–2531, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31639285/>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- KLING, A.; BROTHERS, L. **The amygdala and social behaviour.** In: AGGLETON, J. (Ed.). *Neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction.* New York. p. 353–377.
- KLING, A.; STEKLIS, H. D. **A neural substrate for affiliative behavior in nonhuman primates.** *Brain, behavior and evolution*, [s. l.], v. 13, n. 2–3, p. 216–238, 1976. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/825190/>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- KONG, H. et al. **AQP4 knockout impairs proliferation, migration and neuronal differentiation of adult neural stem cells.** *Journal of Cell Science*, [s. l.], v. 121, n. 24, p. 4029–4036, 2008.
- KONG, Linghua et al. **Association of Preeclampsia and Perinatal Complications With Offspring Neurodevelopmental and Psychiatric Disorders.** *JAMA network open*, [s. l.], v. 5, n. 1, p. E2145719, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35089349/>. Acesso em: 14 mar. 2022.
- KOUSHKI, Mehdi et al. **Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment.** *Food Science and Nutrition*, Wiley-Blackwell, , 2018.
- KRAKOWIAK, Paula et al. **Neonatal Cytokine Profiles Associated With Autism Spectrum Disorder.** *Biological psychiatry*, [s. l.], v. 81, n. 5, p. 442–451, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26392128/>. Acesso em: 17

nov. 2021.

- KRESS, Benjamin T. et al. **Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain**. *Annals of neurology*, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 845–861, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25204284/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- KUHN, Roland. **Eugen Bleuler's concepts of psychopathology**. *History of psychiatry*, [s. l.], v. 15, n. 59 Pt 3, p. 361–366, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15386868/>>. Acesso em: 8 nov. 2021.
- KUMAR, Hariom; SHARMA, B. M.; SHARMA, Bhupesh. **Benefits of agomelatine in behavioral, neurochemical and blood brain barrier alterations in prenatal valproic acid induced autism spectrum disorder**. *Neurochemistry International*, [s. l.], 2015.
- KUMAR, Hariom; SHARMA, Bhupesh. **Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats**. *Brain Research*, [s. l.], 2016. a.
- KUMAR, Hariom; SHARMA, Bhupesh. **Memantine ameliorates autistic behavior, biochemistry & blood brain barrier impairments in rats**. *Brain Research Bulletin*, [s. l.], v. 124, p. 27–39, 2016. b.
- LAI, Char-Huei; KUO, Kuo-Hsing. **The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte**. *Brain research. Brain research reviews*, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 258–65, 2005.
- LANDA, Rebecca; GARRETT-MAYER, Elizabeth. **Development in infants with autism spectrum disorders: a prospective study**. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 629–638, 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-7610.2006.01531.x>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- LANGE, Nicholas et al. **Longitudinal volumetric brain changes in autism spectrum disorder ages 6-35 years**. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 82–93, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25381736>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- LANGEN, Marieke et al. **Caudate nucleus is enlarged in high-functioning medication-naive subjects with autism**. *Biological psychiatry*, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 262–266, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17224135/>>.

Acesso em: 17 nov. 2021.

- LAU-ZHU, Alex; FRITZ, Anne; MCLOUGHLIN, Gráinne. **Overlaps and distinctions between attention deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder in young adulthood**: Systematic review and guiding framework for EEG-imaging research. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, [s. l.], v. 96, p. 93, 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6331660/>. Acesso em: 13 mar. 2022.
- LE BELLE, Janel E. et al. **Maternal inflammation contributes to brain overgrowth and autism-associated behaviors through altered redox signaling in stem and progenitor cells**. *Stem cell reports*, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 725–34, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418720>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- LEE, Frankie et al. **Altered cortical Cytoarchitecture in the Fmr1 knockout mouse**. *Molecular Brain*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 56, 2019. Disponível em: <https://molecularbrain.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13041-019-0478-8>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- LEE, Ting Ting et al. **No preliminary evidence of differences in astrocyte density within the white matter of the dorsolateral prefrontal cortex in autism**. *Molecular autism*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 64, 2017. Disponível em: <https://molecularautism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13229-017-0181-5>. Acesso em: 1 jun. 2021.
- LEVITT, Jennifer G. et al. **Cortical sulcal maps in autism**. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 728–735, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12816888/>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- LI, X. et al. **Elevated immune response in the brain of autistic patients**. *J Neuroimmunol*, [s. l.], v. 207, n. 1–2, p. 111–116, 2009.
- LI, Xia et al. **Resveratrol inhibits the proliferation of A549 cells by inhibiting the expression of COX-2**. *OncoTargets and therapy*, [s. l.], v. 11, p. 2981, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5973427/>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- LIBERTO, Christina M. et al. **Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes**. *Journal of Neurochemistry*, [s. l.], v. 89, n. 5, p. 1092–1100, 2004.
- LIDDELOW, Shane A.; BARRES, Ben A. **Reactive Astrocytes**: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 957–967,

2017.

- LIN, Hsiang Yuan et al. **Regional brain volume differences between males with and without autism spectrum disorder are highly age-dependent.** *Molecular Autism*, [s. l.], 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4455336/pdf/13229_2015_Article_22.pdf>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- LIN, Hui-Ching Ching et al. **The Amygdala Excitatory/Inhibitory Balance in a Valproate-Induced Rat Autism Model.** *PLoS ONE*, [s. l.], v. 8, n. 1, p. e55248, 2013.
- LINTAS, Carla; SACCO, Roberto; PERSICO, Antonio M. **Genome-wide expression studies in Autism spectrum disorder, Rett syndrome, and Down syndrome.** *Neurobiology of Disease*, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 57–68, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996110003852?via%253Dihub>>. Acesso em: 21 jun. 2018.
- LIU, Shuo et al. **The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke.** *Current pharmaceutical design*, [s. l.], v. 18, n. 25, p. 3653–62, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22574979>>. Acesso em: 21 nov. 2018.
- LO, Jun Chih et al. **Activation of P2X7 receptors decreases glutamate uptake and glutamine synthetase activity in RBA-2 astrocytes via distinct mechanisms.** *Journal of Neurochemistry*, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 151–164, 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-4159.2007.05119.x>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- LOMBARDO, Michael V. et al. **Different functional neural substrates for good and poor language outcome in autism.** *Neuron*, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 567, 2015. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4610713/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4610713/)>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- LOMBARDO, M. V et al. **Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder.** *Molecular Psychiatry*, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 1001–1013, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/mp.2017.15>>. Acesso em: 10 maio. 2019.
- LOUVEAU, Antoine; HARRIS, Tajie H.; KIPNIS, Jonathan. **Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege.** *Trends in Immunology*, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 569–577, 2015. Disponível em:

- <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490615001982>>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- LU, Daniel C. et al. **Impaired olfaction in mice lacking aquaporin- 4 water channels**. The FASEB Journal, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 3216–3223, 2008. Disponível em: <pmc/articles/PMC2518258/>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- LYERLY, Anne Drapkin; FADEN, Ruth R. **Mothers matter: Ethics and research during pregnancy**. Virtual Mentor, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 775–778, 2013.
- MABUNGA, Darine Froy N. et al. **Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism**. Experimental neurobiology, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 285–300, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26713077%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4688329>>
- MAENNER, Matthew J. et al. **Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018**. MMWR. **Surveillance Summaries**, [s. l.], v. 70, n. 11, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/ss/ss7011a1.htm?s_cid=ss7011a1_w>. Acesso em: 16 dez. 2021.
- MALHOTRA, Ashim; BATH, Sundeep; ELBARBRY, Fawzy. **An Organ System Approach to Explore the Antioxidative, Anti-Inflammatory, and Cytoprotective Actions of Resveratrol**. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, [s. l.], v. 2015, p. 1–15, 2015.
- MARCO, Elysa J. et al. **Children with Autism Show Reduced Somatosensory Response: An MEG Study**. Autism research : official journal of the International Society for Autism Research, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 340, 2012. Disponível em: <pmc/articles/PMC3474892/>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- MARKRAM, K. et al. **Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism**. Neuropsychopharmacology, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 901–912, 2008.
- MAZUR-KOLECKA, Bozena et al. **Autoantibodies against neuronal progenitors in sera from children with autism**. Brain & development, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 322–329, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23838310/>>. Acesso

em: 17 nov. 2021.

MCGUIRE, Kelly et al. **Irritability and Problem Behavior in Autism Spectrum**

Disorder: A Practice Pathway for Pediatric Primary Care. Pediatrics, [s. l.], v.

137, n. Supplement_2, p. S136–S148, 2016. Disponível em:

</pediatrics/article/137/Supplement_2/S136/33995/Irritability-and-Problem-Behavior-in-Autism>. Acesso em: 19 nov. 2021.

MEFFORD, Heather C.; BATSHAW, Mark L.; HOFFMAN, Eric P. **Genomics,**

Intellectual Disability, and Autism. The New England journal of medicine, [s. l.],

p. 733–743, 2012. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4107681/pdf/nihms601688.pdf>.

Acesso em: 27 jan. 2018.

MELANI, Alessia et al. **ATP extracellular concentrations are increased in the rat**

striatum during in vivo ischemia. Neurochemistry International, [s. l.], v. 47, n.

6, p. 442–448, 2005.

MELTZER, Amory; VAN DE WATER, Judy. **The Role of the Immune System in**

Autism Spectrum Disorder. Neuropsychopharmacology, [s. l.], v. 42, n. 1, p.

284–298, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2016.158>

MENG, Tiantian et al. **Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol.**

Molecules 2021, Vol. 26, Page 229, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 229, 2021. Disponível

em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/1/229/htm>. Acesso em: 6 fev. 2022.

MENG, Zijun et al. **Resveratrol attenuated estrogen-deficient-induced cardiac**

dysfunction: role of AMPK, SIRT1, and mitochondrial function. American

Journal of Translational Research, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 2641, 2016. Disponível em:

</pmc/articles/PMC4931158/>. Acesso em: 4 jan. 2022.

MEUNIER, H. et al. **[Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid].**

Therapie, [s. l.], v. 18, p. 435–8, 1963. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13935231/>

MICHINAGA, Shotaro; KOYAMA, Yutaka. **Pathogenesis of Brain Edema and**

Investigation into Anti-Edema Drugs. International Journal of Molecular

Sciences, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 9949, 2015. Disponível em:

</pmc/articles/PMC4463627/>. Acesso em: 3 jan. 2022.

MOLLOY, Cynthia A. et al. **Elevated cytokine levels in children with autism**

spectrum disorder. Journal of neuroimmunology, [s. l.], v. 172, n. 1–2, p. 198–

205, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16360218/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

MONY, Tamanna Jahan et al. **Valproic Acid Exposure during Early Postnatal Gliogenesis Leads to Autistic-like Behaviors in Rats**. *Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology*, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 338–344, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27776385>>. Acesso em: 21 nov. 2018.

MOORE, S. J. et al. **A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes**. *J Med Genet*, [s. l.], v. 37, p. 489–497, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1734633/pdf/v037p00489.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2018.

MORGAN, John T. et al. **Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder**. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 110356, 2014. Disponível em: <www.plosone.org>. Acesso em: 1 jun. 2021.

MORRIS-ROSENDAHL, Deborah J.; CROCQ, Marc Antoine. **Neurodevelopmental disorders—the history and future of a diagnostic concept**. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 65, 2020. Disponível em: <<http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7365295/>>. Acesso em: 8 nov. 2021.

MOSTAFA, Gehan A.; AL SHEHAB, Abeer; FOUAD, Nermeen R. **Frequency of CD4+CD25high regulatory T cells in the peripheral blood of Egyptian children with autism**. *Journal of child neurology*, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 328–335, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19713552/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

MOSTAFA, Gehan A.; SHEHAB, Abeer A.; AL-AYADHI, Laila Y. **The link between some alleles on human leukocyte antigen system and autism in children**. *Journal of neuroimmunology*, [s. l.], v. 255, n. 1–2, p. 70–74, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23110937/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

MURAKAMI, James W. et al. **Reduced cerebellar hemisphere size and its relationship to vermal hypoplasia in autism**. *Archives of neurology*, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 689–694, 1989. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2730382/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

- NAGELHUS, Erlend A. et al. **Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 2506–2519, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9502811/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- NAGELHUS, Erlend A.; OTTERSEN, Ole P. **Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain.** *Physiological Reviews*, [s. l.], v. 93, n. 4, p. 1543–1562, 2013.
- NICO, B. et al. **Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier.** *J Cell Sci*, [s. l.], v. 114, p. 1297–1307, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11256996/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- NICOLINI, Chiara; FAHNESTOCK, Margaret. **The valproic acid-induced rodent model of autism.** *Experimental Neurology*, [s. l.], v. 299, p. 217–227, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>>
- NUMIS, A. L. et al. **Identification of risk factors for autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex.** *Neurology*, [s. l.], p. 981–987, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3271577/pdf/znl981.pdf>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- NUNES, Adonay S. et al. **Atypical age-related changes in cortical thickness in autism spectrum disorder.** *Scientific Reports* 2020 10:1, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-67507-3>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- OBERHEIM, Nancy Ann; GOLDMAN, Steven A.; NEDERGAARD, Maiken. **Heterogeneity of Astrocytic Form and Function.** In: *Astrocytes*. [s.l.] : Humana Press, 2012. p. 23–45.
- OBERMEIER, Birgit; DANEMAN, Richard; RANSOHOFF, Richard M. **Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier.** *Nature medicine*, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1584–96, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309662>>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- OKAZAKI, Tetsuya et al. **Clinical Characteristics of Fragile X Syndrome Patients in Japan.** *Yonago acta medica*, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 30–33, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33642901/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- OLSEN, J.; ZHU, J. L. RE: “**Advanced Parental Age and the Risk of Autism**

- Spectrum Disorder**". American Journal of Epidemiology, [s. l.], v. 169, n. 11, p. 1406–1406, 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwp064>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- OLSEN, Michelle L. et al. **New Insights on Astrocyte Ion Channels: Critical for Homeostasis and Neuron-Glia Signaling.** The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, [s. l.], v. 35, n. 41, p. 13827–35, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26468182>>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- OREŠKOVIĆ, Darko; RADOŠ, Milan; KLARICA, Marijan. **Role of choroid plexus in cerebrospinal fluid hydrodynamics.** Neuroscience, [s. l.], v. 354, p. 69–87, 2017.
- OSHIO, K. et al. **Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production.** Acta neurochirurgica. Supplement, [s. l.], v. 86, p. 525–8, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14753499>>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- OSHIO, K. et al. **Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord.** Neuroscience, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 685–693, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15283967/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- OSHIO, K. et al. **Impaired pain sensation in mice lacking Aquaporin-1 water channels.** Biochemical and biophysical research communications, [s. l.], v. 341, n. 4, p. 1022–1028, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16476579/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- OSKVIK, Devon B. et al. **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, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 623–634, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22310921>>. Acesso em: 10 maio. 2019.
- OTAZU, Gonzalo H. et al. **Neurodevelopmental malformations of the cerebellum and neocortex in the Shank3 and Cntnap2 mouse models of autism.** Neuroscience letters, [s. l.], v. 765, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34555490/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- PALMER, Alexandra L.; OUSMAN, Shalina S. **Astrocytes and Aging.** Frontiers in Aging Neuroscience, [s. l.], v. 10, p. 337, 2018. Disponível em:

- <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30416441>>. Acesso em: 21 nov. 2018.
- PAPADOPOULOS, Marios C.; VERKMAN, Alan S. **Aquaporin-4 and brain edema**. *Pediatric Nephrology*, 2007.
- PAPADOPOULOS, Marios C.; VERKMAN, Alan S. **Aquaporin water channels in the nervous system**. *Nature Reviews Neuroscience*, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 265–277, 2013.
- PARISI, Melissa A.; DOBYNS, William B. **Human malformations of the midbrain and hindbrain: Review and proposed classification scheme**. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2003.
- PARK, Jong Sung et al. **Inhibition of Notch signalling ameliorates experimental inflammatory arthritis**. *Annals of the Rheumatic Diseases*, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 267–274, 2015. Disponível em: <<https://ard.bmj.com/content/74/1/267>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- PASTURAL, Élodie et al. **Novel plasma phospholipid biomarkers of autism: Mitochondrial dysfunction as a putative causative mechanism**. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 253–264, 2009.
- PATOWARY, Ashok et al. **Next Generation Sequencing Mitochondrial DNA Analysis in Autism Spectrum Disorder**. *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research*, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1338–1343, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/aur.1792>>. Acesso em: 1 fev. 2018.
- PEARCE, J. M. S. **Kanner's infantile autism and Asperger's syndrome**. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, [s. l.], p. 200–205, 2005.
- PEREIRA, Alessandra M. et al. **Differences in cortical structure and functional MRI connectivity in high functioning autism**. *Frontiers in Neurology*, [s. l.], v. 9, n. JUL, p. 539, 2018.
- PETER, Saša et al. **Dysfunctional cerebellar Purkinje cells contribute to autism-like behaviour in Shank2-deficient mice**. *Nature Communications* 2016 7:1, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncomms12627>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- PETRELLI, Francesco; PUCCI, Luca; BEZZI, Paola. **Astrocytes and microglia and their potential link with autism spectrum disorders**. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, [s. l.], v. 10, n. FEB, p. 21, 2016. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 21 jun. 2021.

- PHIEL, Christopher J. et al. **Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen.** Journal of Biological Chemistry, [s. l.], v. 276, n. 39, p. 36734–36741, 2001.
- PICARD, Martin et al. **Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [s. l.], v. 111, n. 38, p. 4033–4042, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25192935/>>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- PONZIO, Nicholas M. et al. **Cytokine levels during pregnancy influence immunological profiles and neurobehavioral patterns of the offspring.** Annals of the New York Academy of Sciences, [s. l.], v. 1107, p. 118–128, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17804539/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- PRESTON, Gregory M. et al. **Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein.** Science (New York, N.Y.), [s. l.], v. 256, n. 5055, p. 385–387, 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1373524/>>. Acesso em: 6 fev. 2022.
- QIN, Liyan; DAI, Xufang; YIN, Yunhong. **Valproic acid exposure sequentially activates Wnt and mTOR pathways in rats.** Molecular and cellular neurosciences, [s. l.], v. 75, p. 27–35, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27343825/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- QUINCOZES-SANTOS, André et al. **Resveratrol Protects C6 Astrocyte Cell Line against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress through Heme Oxygenase 1.** PLoS ONE, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 64372, 2013. Disponível em: <www.plosone.org>. Acesso em: 6 jun. 2021.
- QUINCOZES-SANTOS, André; GOTTFRIED, Carmem. **Resveratrol modulates astroglial functions: Neuroprotective hypothesis.** Annals of the New York Academy of Sciences, [s. l.], v. 1215, n. 1, p. 72–78, 2011.
- RANSOHOFF, Richard M.; BROWN, Melissa A. **Innate immunity in the central nervous system.** The Journal of clinical investigation, [s. l.], v. 122, n. 4, p. 1164–1171, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22466658/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- REDCAY, Elizabeth; COURCHESNE, Eric. **When is the brain enlarged in autism?**

- A meta-analysis of all brain size reports.** *Biological Psychiatry*, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 1–9, 2005.
- REID, George et al. **Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor α , in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A.** *Oncogene*, [s. l.], v. 24, n. 31, p. 4894–4907, 2005.
- REINHARD, Sarah M.; RAZAK, Khaleel; ETHELL, Iryna M. **A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, [s. l.], v. 9, p. 280, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26283917>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- REINHOLD, Ak; RITTNER, HI. **Barrier function in the peripheral and central nervous system—a review.** *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2016 469:1, [s. l.], v. 469, n. 1, p. 123–134, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-016-1920-8>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- REYNOLDS, M.; SISK, E.; RASGON, N. **Valproate and Neuroendocrine Changes in Relation to Women Treated for Epilepsy and Bipolar Disorder: A Review.** *Current Medicinal Chemistry*, [s. l.], v. 14, n. 26, p. 2799–2812, 2007.
- RODIER, P. M. et al. **Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism.** *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, [s. l.], v. 11, n. 2–3, p. 417–22, 1997.
- RODIER, Patricia M. et al. **Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei.** *The Journal of Comparative Neurology*, [s. l.], v. 370, n. 2, p. 247–261, 1996.
- ROGGE, Nicky; JANSSEN, Juliette. **The Economic Costs of Autism Spectrum Disorder: A Literature Review.** *Journal of autism and developmental disorders*, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 2873–2900, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30976961/>>. Acesso em: 8 nov. 2021.
- ROJAS, Donald C. et al. **Hippocampus and amygdala volumes in parents of children with autistic disorder.** *The American journal of psychiatry*, [s. l.], v. 161, n. 11, p. 2038–2044, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15514404/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

- ROSENBERG, Rebecca E. et al. **Characteristics and Concordance of Autism Spectrum Disorders Among 277 Twin Pairs**. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine, [s. l.], v. 163, n. 10, p. 907–914, 2009. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamapediatrics/fullarticle/382225>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- ROSU, G. C. et al. **Distribution of Aquaporins 1 and 4 in the Central Nervous System**. Current health sciences journal, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 218–226, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31624651>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- ROULLET, Florence I.; LAI, Jonathan K. Y.; FOSTER, Jane A. **In utero exposure to valproic acid and autism** — A current review of clinical and animal studies. Neurotoxicology and Teratology, [s. l.], v. 36, p. 47–56, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036213000056>>. Acesso em: 3 jun. 2019.
- RUBIO-ARAIZ, Ana et al. **3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) disrupts blood-brain barrier integrity through a mechanism involving P2X7 receptors**. The international journal of neuropsychopharmacology, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 1243–1255, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24626059/>>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- RUMSEY, Judith M. et al. **Hemispheric asymmetries, fourth ventricular size, and cerebellar morphology in autism**. Journal of autism and developmental disorders, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 127–137, 1988. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3372454/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SACAI, Hiroaki et al. **Autism spectrum disorder-like behavior caused by reduced excitatory synaptic transmission in pyramidal neurons of mouse prefrontal cortex**. Nature Communications 2020 11:1, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-020-18861-3>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SANTOS-TERRA, Júlio et al. **Resveratrol prevents long-term structural hippocampal alterations and modulates interneuron organization in an animal model of ASD**. Brain research, [s. l.], v. 1768, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34331907/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SAUNDERS, Norman R. et al. **Markers for blood-brain barrier integrity: How**

- appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience*, [s. l.], v. 9, n. OCT, p. 1–16, 2015.
- SCHAAF, Christian P. et al. **A framework for an evidence-based gene list relevant to autism spectrum disorder**. *Nature Reviews Genetics* 2020 21:6, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 367–376, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41576-020-0231-2>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SCHNEIDER, Tomasz et al. **Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid**. *Psychoneuroendocrinology*, [s. l.], 2008.
- SCHNEIDER, Tomasz; PRZEWŁOCKI, Ryszard. **Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism**. *Neuropsychopharmacology*, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005.
- SCHOUSBOE, Arne; BAK, Lasse K.; WAAGEPETERSEN, Helle S. **Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA**. *Frontiers in Endocrinology*, [s. l.], v. 4, p. 102, 2013.
- SCHUMANN, Cynthia Mills et al. **The Amygdala Is Enlarged in Children But Not Adolescents with Autism; the Hippocampus Is Enlarged at All Ages**. *Journal of Neuroscience*, [s. l.], v. 24, n. 28, p. 6392–6401, 2004. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/24/28/6392>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SCHUMANN, Cynthia Mills; AMARAL, David G. **Stereological analysis of amygdala neuron number in autism**. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, [s. l.], v. 26, n. 29, p. 7674–7679, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16855095/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SHAFRITZ, Keith M. et al. **The neural circuitry mediating shifts in behavioral response and cognitive set in autism**. *Biological psychiatry*, [s. l.], v. 63, n. 10, p. 974–980, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17916328/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SHAYGANFARD, Mehran. **Molecular and biological functions of resveratrol in psychiatric disorders: a review of recent evidence**. *Cell and Bioscience*, BioMed Central Ltd, , 2020.
- SHEN, Mark D. et al. **Early brain enlargement and elevated extra-axial fluid in infants who develop autism spectrum disorder**. *Brain : a journal of neurology*,

- [s. l.], v. 136, n. Pt 9, p. 2825–2835, 2013. Disponível em:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23838695/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SHEN, Mark D. et al. **Increased Extra-axial Cerebrospinal Fluid in High-Risk Infants Who Later Develop Autism.** *Biological psychiatry*, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 186–193, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28392081/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SHEN, Mark D. et al. **Extra-axial cerebrospinal fluid in high-risk and normal-risk children with autism aged 2-4 years: a case-control study.** *The lancet. Psychiatry*, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 895–904, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30270033/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SHIELDS, Shannon D. et al. **Anatomical and functional analysis of aquaporin 1, a water channel in primary afferent neurons.** *Pain*, [s. l.], v. 131, n. 1–2, p. 8–20, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17257750>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- SHIN, Sangyep; SANTI, Andrea; HUANG, Shiyong. **Conditional Pten knockout in parvalbumin- or somatostatin-positive neurons sufficiently leads to autism-related behavioral phenotypes.** *Molecular brain*, [s. l.], v. 14, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33504340/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- SILVA, M. F. B. et al. **Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review.** *Journal of Inherited Metabolic Disease*, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 205–216, 2008.
- SINISCALCO, Dario et al. **Decreased Numbers of CD57+CD3- Cells Identify Potential Innate Immune Differences in Patients with Autism Spectrum Disorder.** *In Vivo*, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 83–89, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26912817/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- SMITH, Stephen E. P.; ELLIOTT, Robin M.; ANDERSON, Matthew P. **Maternal Immune Activation Increases Neonatal Mouse Cortex Thickness and Cell Density.** *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 529, 2012. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3672058/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22000000/)>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- SMITH, Victoria; BROWN, Nick. **Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism.** *Archives of disease in childhood*.

- Education and practice edition, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 198, 2014.
- SOLLE, Mike et al. **Altered cytokine production in mice lacking P2X7 receptors.** Journal of Biological Chemistry, [s. l.], v. 276, n. 1, p. 125–132, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11016935/>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- SOMA, Miho et al. **Development of the mouse amygdala as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation.** The Journal of Comparative Neurology, [s. l.], v. 513, n. 1, p. 113–128, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cne.21945>>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- SOUMIYA, Hitomi; FUKUMITSU, Hidefumi; FURUKAWA, Shoei. **Prenatal immune challenge compromises the normal course of neurogenesis during development of the mouse cerebral cortex.** Journal of neuroscience research, [s. l.], v. 89, n. 10, p. 1575–1585, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21732402/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- SPARKS, B. F. et al. **Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder.** Neurology, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 184–192, 2002. Disponível em: <<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.59.2.184>>
- SPENCE, Sarah J.; SCHNEIDER, Mark T. **The role of epilepsy and epileptiform EEGs in autism spectrum disorders.** Pediatric research, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 599–606, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454962>>. Acesso em: 26 nov. 2019.
- SPENCER, Jeremy P. E. et al. **Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research.** The British journal of nutrition, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 12–22, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17666146/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- SQUILLACE, M. et al. **Dysfunctional dopaminergic neurotransmission in asocial BTBR mice.** Translational Psychiatry, [s. l.], v. 4, n. 8, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25136890/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- SRIVASTAVA, Anand K.; SCHWARTZ, Charles E. **Intellectual disability and autism spectrum disorders: Causal genes and molecular mechanisms.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews, [s. l.], v. 46, n. P2, p. 161–174, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.02.015>>
- SSUCHAREWA, G. E. **Die schizoiden Psychopathien im Kindesalter.** (Part 1 of

- 2). *European Neurology*, [s. l.], v. 60, n. 3–4, p. 235–247, 1926.
- STAMATOVIC, S. M. et al. **Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors**. In: **Brain Edema XIII**. Vienna: Springer-Verlag, 2006. v. 96p. 444–450.
- STONER, Rich et al. **Patches of Disorganization in the Neocortex of Children with Autism**. *New England Journal of Medicine*, [s. l.], v. 370, n. 13, p. 1209–1219, 2014. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1307491>>
- STROHSCHHEIN, Susan et al. **Impact of aquaporin-4 channels on K⁺ buffering and gap junction coupling in the hippocampus**. *GLIA*, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 973–980, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21446052/>>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- SURPRENANT, A. et al. **The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)**. *Science (New York, N.Y.)*, [s. l.], v. 272, n. 5262, p. 735–738, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8614837/>>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- SUZUKI, Tomohisa et al. **Production and Release of Neuroprotective Tumor Necrosis Factor by P2X 7 Receptor-Activated Microglia**. *Journal of Neuroscience*, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 1–7, 2004. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/content/24/1/1>>. Acesso em: 22 jun. 2021.
- SYNOWITZ, Michael et al. **A1 adenosine receptors in microglia control glioblastoma-host interaction**. *Cancer Research*, [s. l.], v. 66, n. 17, p. 8550–8557, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16951167/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- TAKAHASHI, Nagahide et al. **Association of Genetic Risks with Autism Spectrum Disorder and Early Neurodevelopmental Delays among Children without Intellectual Disability**. *JAMA Network Open*, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 1921644, 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- TAKARAE, Yukari et al. **Atypical involvement of frontostriatal systems during sensorimotor control in autism**. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, [s. l.], v. 156, n. 2, p. 117–127, 2007. Disponível em: </record/2007-16631-003>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- TAMBUR, A. R.; ROITBERG, B. **Immunology of the central nervous system**. *Neurological Research*, [s. l.], v. 27, n. 7, p. 675–678, 2005. Disponível em:

- <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/016164105X49544>>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- TCHACONAS, Alexis; ADESMAN, Andrew. **Autism spectrum disorders: a pediatric overview and update**. *Current Opinion in Pediatrics*, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 130–143, 2013. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=23274432>>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- THEOHARIDES, Theoharis C.; ASADI, Shahrzad; PATEL, Arti B. **Focal brain inflammation and autism**. *Journal of Neuroinflammation*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <*Journal of Neuroinflammation*>
- THIEL, Gerald; RÖSSLER, Oliver G. **Resveratrol stimulates AP-1-regulated gene transcription**. *Molecular nutrition & food research*, [s. l.], v. 58, n. 7, p. 1402–1413, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24753227/>>. Acesso em: 6 fev. 2022.
- TORRES, Anthony R.; WESTOVER, Jonna B.; ROSENSPIRE, Allen J. **HLA Immune Function Genes in Autism**. *Autism research and treatment*, [s. l.], v. 2012, p. 1–13, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22928105/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- TSAI, Peter T. et al. **Autistic-like behavior and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice**. *Nature*, [s. l.], v. 488, n. 7413, p. 647, 2012. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3615424/](https://pmc/articles/PMC3615424/)>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- TSUJINO, Naohisa et al. **Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism**. *Neuroscience Research*, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 289–295, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168010206002914?via%253Dihub>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- TUMANI, Hayrettin; HUSS, André; BACHHUBER, Franziska. **The cerebrospinal fluid and barriers - anatomic and physiologic considerations**. *Handbook of clinical neurology*, [s. l.], v. 146, p. 3–20, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29110772/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- ULRICH, Henning; ABBRACCHIO, Maria P.; BURNSTOCK, Geoffrey. **Extrinsic Purinergic Regulation of Neural Stem/Progenitor Cells: Implications for CNS Development and Repair**. *Stem Cell Reviews and Reports*, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 755–767, 2012.

- VANG, Ole et al. **What Is New for an Old Molecule?** Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol. PLoS ONE, [s. l.], v. 6, n. 6, p. e19881, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21698226>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- VARGAS, Diana L. et al. **Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism.** Annals of Neurology, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 67–81, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.20315>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- VERKMAN, A. S.; MITRA, Alok K. **Structure and function of aquaporin water channels.** American Journal of Physiology-Renal Physiology, [s. l.], v. 278, n. 1, p. F13–F28, 2000.
- VOINEAGU, Irina et al. **Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology.** Nature, [s. l.], v. 474, n. 7351, p. 380–384, 2011.
- WANG, Li et al. **Altered nocifensive behavior in animal models of autism spectrum disorder: The role of the nicotinic cholinergic system.** Neuropharmacology, [s. l.], v. 111, p. 323–334, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27638450>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- WANG, Mengmeng et al. **Decrease of GSK-3 β Activity in the Anterior Cingulate Cortex of Shank3b $-/-$ Mice Contributes to Synaptic and Social Deficiency.** Frontiers in cellular neuroscience, [s. l.], v. 13, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31749684/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- WARREN, Reed et al. **Detection of maternal antibodies in infantile autism.** Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 873–877, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2273013/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- WARREN, Reed P.; FOSTER, Ann; MARGARETTEN, Nadine C. **Reduced natural killer cell activity in autism.** Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 333–335, 1987. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3597287/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- WASILEWSKA, Jolanta; KLUKOWSKI, Mark. **Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks – a possible new overlap syndrome.** Pediatric Health, Medicine and Therapeutics, [s. l.], v. 6, p. 153, 2015. Disponível

- em: </pmc/articles/PMC5683266/>. Acesso em: 13 mar. 2022.
- WEI, Haidong et al. **Resveratrol Attenuates the Blood-Brain Barrier Dysfunction by Regulation of the MMP-9/TIMP-1 Balance after Cerebral Ischemia Reperfusion in Rats.** *Journal of Molecular Neuroscience*, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 872–879, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330860>>. Acesso em: 25 nov. 2019.
- WETHERBY, Amy M. et al. **Early Indicators of Autism Spectrum Disorders in the Second Year of Life.** *Journal of Autism and Developmental Disorders* 2004 34:5, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 473–493, 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10803-004-2544-y>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- WILKINSON, Emma. **Reduced neuron number in autistic brains.** *The Lancet Neurology*, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 731, 2006. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S1474442206705403/fulltext>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- WILLIAMS, Gail et al. **Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association.** *Developmental medicine and child neurology*, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 202–6, 2001.
- WILLIAMS, P. Gail; HERSH, Joseph H. **A male with fetal valproate syndrome and autism.** *Developmental Medicine & Child Neurology*, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 632–634, 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8749.1997.tb07500.x>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- WILLS, Sharifia et al. **Detection of autoantibodies to neural cells of the cerebellum in the plasma of subjects with autism spectrum disorders.** *Brain, behavior, and immunity*, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 64–74, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18706993/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- WITTEKINDT, Oliver H.; DIETL, Paul. **Aquaporins in the lung.** *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 2018 471:4, [s. l.], v. 471, n. 4, p. 519–532, 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-018-2232-y>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- WU, Han Fang et al. **Alleviation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Dependent Long-Term Depression via Regulation of the Glycogen Synthase Kinase-3 β Pathway in the Amygdala of a Valproic Acid-Induced Animal Model of**

- Autism.** Molecular neurobiology, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 5264–5276, 2017.
Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27578017/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.
- XIAO, Ming; HU, Gang. **Involvement of Aquaporin 4 in Astrocyte Function and Neuropsychiatric Disorders.** CNS Neuroscience and Therapeutics, 2014.
- XIAO, Xiang et al. **Diagnostic model generated by MRI-derived brain features in toddlers with autism spectrum disorder.** Autism Research, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 620–630, 2017.
- XIE, Luokun; YANG, Shao Hua. **Interaction of Astrocytes and T Cells in Physiological and Pathological Conditions.** Brain research, [s. l.], v. 1623, p. 63, 2015. Disponível em: <</pmc/articles/PMC4569510/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- XIE, Weiguo et al. **Resveratrol ameliorates prenatal progesterin exposure-induced autism-like behavior through ER β activation.** Molecular autism, [s. l.], v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30123446/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- YANG, Fuxing et al. **ATP Induces Disruption of Tight Junction Proteins via IL-1 Beta-Dependent MMP-9 Activation of Human Blood-Brain Barrier In Vitro.** Neural plasticity, [s. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27795859/>>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- YANG, Jun et al. **Protection of Porcine Intestinal-Epithelial Cells from Deoxynivalenol-Induced Damage by Resveratrol via the Nrf2 Signaling Pathway.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 1726–1735, 2018. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.8b03662>>. Acesso em: 4 jan. 2022.
- YE, Ming jing; MENG, Ni. **Resveratrol acts via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway to protect retinal ganglion cells from apoptosis induced by hydrogen peroxide.** Bioengineered., [s. l.], v. 12, n. 1, p. 4878–4886, 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21655979.2021.1954742>>. Acesso em: 6 fev. 2022.
- YEUNG, Kit San et al. **Identification of mutations in the PI3K-AKT-mTOR**

- signalling pathway in patients with macrocephaly and developmental delay and/or autism.** *Molecular autism*, [s. l.], v. 8, n. 1, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29296277/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.
- YOCHUM, Carrie L. et al. **VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice.** *Brain Research*, [s. l.], v. 1203, p. 126–132, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899308000966?via%253Dihub>>. Acesso em: 29 jan. 2018.
- YOUNG, Andrew W. et al. **Facial expression processing after amygdalotomy.** *Neuropsychologia*, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 31–39, 1996.
- ZABOSKI, Brian A.; STORCH, Eric A. **Comorbid autism spectrum disorder and anxiety disorders: a brief review.** *Future neurology*, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 31–37, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29379397/>>. Acesso em: 13 mar. 2022.
- ZAMARBIDE, Marta et al. **Male-Specific cAMP Signaling in the Hippocampus Controls Spatial Memory Deficits in a Mouse Model of Autism and Intellectual Disability.** *Biological Psychiatry*, [s. l.], v. 85, n. 9, p. 760–768, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30732858/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.
- ZAMBERLETTI, Erica et al. **Cannabidiol Treatment Ameliorates Autism-Like Behaviors and Restores Hippocampal Endocannabinoid System and Glia Alterations Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rats.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, [s. l.], v. 13, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31447649/>>. Acesso em: 1 jun. 2021.
- ZEIDÁN-CHULIÁ, Fares et al. **The glial perspective of autism spectrum disorders.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, [s. l.], v. 38, p. 160–172, 2014.
- ZELDOVICH, L. **How History Forgot the Woman Who Defined Autism.** *Scientific American*. 2018.
- ZHANG, Bodi et al. **Stimulated Human Mast Cells Secrete Mitochondrial Components That Have Autocrine and Paracrine Inflammatory Actions.** *PLOS ONE*, [s. l.], v. 7, n. 12, p. e49767, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049767>>.

Acesso em: 4 jan. 2022.

ZHANG, Li Xue et al. **Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research**. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [s. l.], v. 143, p. 112164, 2021.

ZHANG, Wei et al. **Cerebral organoid and mouse models reveal a RAB39b-PI3K-mTOR pathway-dependent dysregulation of cortical development leading to macrocephaly/autism phenotypes**. *Genes & development*, [s. l.], v. 34, n. 7–8, p. 580–597, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32115408/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

ZHANG, Yinghua et al. **The Notch signaling pathway inhibitor Dapt alleviates autism-like behavior, autophagy and dendritic spine density abnormalities in a valproic acid-induced animal model of autism**. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, [s. l.], v. 94, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31075347/>>. Acesso em: 3 jan. 2022.

ZHAO, Hengli et al. **P2X7 Receptor Suppression Preserves Blood-Brain Barrier through Inhibiting RhoA Activation after Experimental Intracerebral Hemorrhage in Rats**. *Scientific reports*, [s. l.], v. 6, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26980524/>>. Acesso em: 4 jan. 2022.

ZHAO, Hui et al. **Maternal valproic acid exposure leads to neurogenesis defects and autism-like behaviors in non-human primates**. *Translational Psychiatry*, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41398-019-0608-1>>. Acesso em: 3 mar. 2021.

ZHAO, Li et al. **The mutual regulation between miR-214 and A2AR signaling plays an important role in inflammatory response**. *Cellular Signalling*, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 2026–2034, 2015. a.

ZHAO, Zhen et al. **Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier**. *Cell*, [s. l.], v. 163, n. 5, p. 1064–1078, 2015. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26590417>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

ZIKOPOULOS, Basilis; BARBAS, Helen. **Altered neural connectivity in excitatory and inhibitory cortical circuits in autism**. *Frontiers in Human Neuroscience*, [s. l.], n. SEP, 2013.

ZIMMERMAN, Andrew W. et al. **Maternal antibrain antibodies in autism**. *Brain, behavior, and immunity*, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 351–357, 2007. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17029701/>>. Acesso em: 17 nov. 2021.

ZIMMERMANN, Fernanda Francine et al. **Analysis of Extracellular Nucleotide Metabolism in Adult Zebrafish After Embryological Exposure to Valproic Acid**. *Molecular Neurobiology*, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 3542–3553, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27189619/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

ZOLKIPLI-CUNNINGHAM, Zarazuela et al. **Metabolic and behavioral features of acute hyperpurinergia and the maternal immune activation mouse model of autism spectrum disorder**. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 16, n. 3 March, 2021.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33735311/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

ZWAIGENBAUM, Lonnie et al. **Behavioral manifestations of autism in the first year of life**. *International Journal of Developmental Neuroscience*, [s. l.], v. 23, n. 2–3, p. 143–152, 2005.

ANEXOS

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



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 36229

Título: AVALIAÇÃO MOLECULAR DE MARCADORES DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE DE BARREIRAS NEURAIS EM MODELO ANIMAL DE AUTISMO

Vigência: 01/12/2018 à 01/03/2022

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARMEM JURACY SILVEIRA GOTTFRIED - coordenador desde 01/12/2018
MELLANIE FONTES DUTRA DA SILVA - Aluno de Doutorado desde 01/12/2018
IOHANNA DECKMANN - Aluno de Doutorado desde 01/12/2018
JÚLIO SANTOS TERRA MACHADO - Aluno de Doutorado desde 01/12/2018
Gustavo Brum Schwingel - Aluno de Doutorado desde 01/12/2018

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 11/02/2019 - Plenarinho - Andar Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre- RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de um total de 261 ratos Wistar, sendo 65 machos (com aproximadamente 80 dias) e 196 fêmeas (com aproximadamente 80 dias), oriundos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 21 de Fevereiro de 2019

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética

ANEXO 2 – Parecer de projeto de doutorado encaminhado para avaliação pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

**PPG-Ciências
Biológicas
Bioquímica**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Parecer de Projeto de Doutorado

O projeto da aluna **Iohanna Deckmann**, intitulado: “Avaliação molecular de marcadores de células do sistema imunológico no sistema nervoso central e alterações na permeabilidade de barreiras neurais em modelo animal de autismo.”, orientado pela Profa. Dra. Carmem Juracy Silveira Gottfried, encaminhado para avaliação pelo PPG - Bioquímica teve a seguinte análise e parecer:

ANÁLISE DO PROJETO

1. Mérito científico

- Relevante
 Sugestões de alterações:

2. Fundamentação

- Adequada
 Sugestões de alterações: Revisar erros de digitação, presentes ao longo de todo o texto.

3. Objetivos

- Bem definidos
 Sugestões de alterações:

4. Metodologia

- Adequada
 Sugestões de alterações:

5. Cálculo do número amostral

- Realizado: porém explicar o que será feito com as fêmeas das ninhadas e os machos genitores.

Não aplicável

Não realizado:

6. Considerações Éticas

Descritas

Não aplicável

Sugestões de alterações:

7. Descarte dos Resíduos Químicos e Biológicos

Descritos

Não aplicável

Sugestões de alterações:

8. Cronograma de Execução

Apresentado

Não apresentado

9. Referências Bibliográficas

Pertinentes

Sugestões de alterações: referência para a dose de resveratrol administrada.

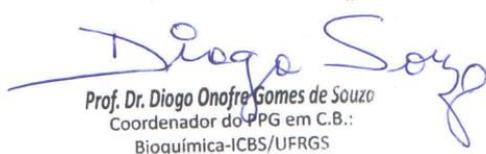
PARECER FINAL:

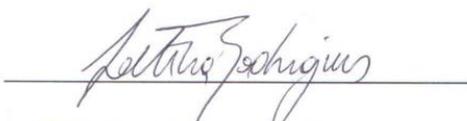
Aprovado

Diligência

Porto Alegre, 23 de maio de 2018

Atenciosamente,


Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza
Coordenador do PPG em C.B.:
Bioquímica-ICBS/UFRGS


LETÍCIA RODRIGUES
PÓS-DOUTORANDA DO PPG BIOQUÍMICA
C.P.F. 968.655.120-49

ANEXO 3 – Primeira autoria compartilhada em manuscrito submetido

“Resveratrol treatment of autism spectrum disorders – a pilot study”

ANEXO 4 – Levantamento acerca da suplementação com RSV no contexto gestacional