



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

GUSTAVO DELLA FLORA NUNES

**Modelo Animal de Autismo por Exposição Pré-Natal ao
Ácido Valpróico: Análise de Sinapses Excitatórias e
Inibitórias**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM NEUROCIÊNCIAS

Porto Alegre
Agosto de 2015



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

**Modelo Animal de Autismo por Exposição Pré-Natal ao
Ácido Valpróico: Análise de Sinapses Excitatórias e
Inibitórias**

Trabalho de conclusão de curso de pós-graduação apresentado ao PPG Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

ORIENTADORA: Dr^a. Carmem Juracy Silveira Gottfried

CO-ORIENTADOR: Dr. Victorio Bambini Junior

Porto Alegre
Agosto de 2015

Agradecimentos

Este trabalho só pôde ser realizado devido ao suporte e auxílio de várias pessoas. É então justo, que os devidos créditos sejam dados a elas.

Gostaria de agradecer sinceramente os meus colegas de laboratório pelo grande auxílio, desde a preparação do projeto até a execução dos experimentos programados e a discussão dos resultados. Em especial, quero expressar minha gratidão pela Mellanie e pelo Mauro, que me auxiliaram nas análises de qRT-PCR e por todos os alunos de iniciação científica que trabalharam junto comigo na realização dos experimentos. Quero também agradecer pelo grande ambiente de amizade e companheirismo presente no laboratório. Com certeza levarei os amigos que aqui fiz para a vida toda.

Também aproveito a oportunidade para agradecer à Professora Carmem Gottfried, minha orientadora. Ela foi uma de minhas primeiras mentoras científicas e o modo como ela faz e discute ciência me inspiram e guiam muitas de minhas ações no laboratório. Sua habilidade em conduzir os projetos de pesquisa, suas ideias, seu caráter e seu coração de mãe, fazem com que todos no laboratório sintam-se uma grande família. Agora estou deixando o laboratório, mas nunca esquecerei seus ensinamentos. Espero um dia, me tornar um cientista um pouco parecido com ela.

Sou muito grato também ao Victorio Bambini, meu co-orientador. Ele exerceu um grande papel de instrutor de muitos aspectos da realização deste trabalho e foi fundamental para manter o laboratório produtivo durante o pós-doutorado da Professora Carmem. Além disso, ele me auxiliou em várias etapas deste trabalho, desde sua construção até os experimentos de western blot e discussão final dos resultados.

Gostaria também de agradecer profundamente ao meu pai Valdemir, à minha mãe Cecília e à minha irmã Raquel. Mesmo estando distantes, o apoio deles foi constante e fundamental para o término do mestrado. Eles me apoiaram das mais diferentes maneiras, fornecendo a sustentação para que eu tivesse as condições financeiras e emocionais para realizar o trabalho de mestrado sem maiores preocupações. Agradeço também pelos seus grandes exemplos de humildade e honestidade que me inspiram em todos os aspectos da vida. Estar longe deles é difícil, mas sei que eles estão sempre torcendo por mim e querem muito que eu busque os meus sonhos.

“Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre. Maintenant, il est temps de comprendre plus à craindre moins”

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos”

Marie Curie

Resumo

Transtorno do espectro do autismo (TEA), é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por perturbações na comunicação social recíproca e na manifestação de comportamentos, interesses e atividades repetitivos e restritos. Embora a etiologia do autismo ainda seja desconhecida, há fortes evidências de que esta condição é causada por uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais durante o desenvolvimento. Além disso, uma das características preponderantes a nível de circuitaria neural é o desequilíbrio entre excitação e inibição, com o predomínio do primeiro. A exposição ao ácido valpróico (VPA) durante a gestação é um dos conhecidos fatores de risco ambiental. Com base nesta informação, o VPA é comumente utilizado para desencadear um fenótipo do tipo autista em murinos. Nosso grupo demonstrou previamente que um tratamento subcrônico com resveratrol (RSV) aplicado a ratas prenhes é capaz de prevenir os prejuízos no comportamento social induzidos na prole pelo VPA. No presente trabalho, nós investigamos a influência do tratamento prenatal com o RSV nos níveis de expressão de proteínas sinápticas excitatórias (PSD-95 e neuroliquina-1) e inibitórias (gefirina e neuroliquina-2) no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo de filhotes machos aos 30 dias de vida. O balanço entre excitação e inibição nestas regiões encefálicas já foi associado de maneira causal com a modulação do comportamento social em camundongos. Algumas alterações que observamos no grupo VPA foram contrapostas pela ação do RSV. Em resumo, RSV leva a uma tendência de diminuição da proteína PSD-95 no CPFm nos animais do grupo VPA+RSV em comparação ao grupo VPA ($p=0,092$), provavelmente exercendo suas ações ao nível da tradução. Adicionalmente, RSV aumenta significativamente os níveis de expressão gênica de gefirina no CPFm e hipocampo. Portanto, nós identificamos dois mecanismos diferentes pelos quais o RSV poderia reduzir a excitabilidade neuronal neste modelo animal de autismo. Isto se soma às crescentes evidências sobre desregulações na razão excitação/inibição no autismo que se relacionam com alterações de comportamento, e pode ser a base da ação preventiva exercida pelo RSV.

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a group of neurodevelopmental disabilities characterized by sociability impairments accompanied by verbal and nonverbal communication deficits and stereotyped behavioral patterns. Although ASD etiology is still not known, there is growing evidence that this disorder is caused by a complex interplay of both genetic and environmental risk factors acting at the developmental stages and that a misbalance between excitation and inhibition (with predominance of the former) is a prominent characteristic at the circuitry level. One of the known risk factors is maternal use of valproic acid (VPA) during gestation. Based on this observation, VPA is commonly used to generate an ASD-like condition in rodents. We previously showed that a prenatal subchronic treatment of the pregnant rats with Resveratrol (RSV) prevented the social deficits generated by VPA in the male offspring. In this work, we aimed to investigate the influence of prenatal RSV treatment on the expression levels of synaptic proteins of excitatory (PSD-95 and neuroligin-1) and inhibitory (gephyrin and neuroligin-2) contacts of medial prefrontal cortex (mPFC) and hippocampus in young male rats. Excitation/inhibition balance in these two brain regions is implicated causally in the modulation of social behaviors in murines. We identified alterations in the VPA animal model of autism, some of which were corrected by the RSV treatment. In summary, we found that RSV leads to a trend of decrease in the level of protein PSD-95 in the mPFC of the VPA+RSV group animals compared to the VPA group ($p=0,092$), probably exerting its actions at the translation level. In addition, RSV increases gene expression of gephyrin in both mPFC and hippocampus. Therefore, we identified two different mechanisms of reduction of the neuronal excitability mediated by RSV treatment in this animal model of autism. This adds evidence to the growing body of findings about alteration of behaviors mediated by excitation/inhibition regulation in autism, and can be the basis for the phenotypic prevention exerted by RSV.

Lista de abreviaturas e siglas

- ABA** – Análise aplicada do comportamento (do inglês *Applied Behavior Analysis*)
- ADI-R** – Entrevista revisada para o diagnóstico do autismo (do inglês *Autism Diagnosis Interview-Revised*)
- BSA** – Albumina bovina sérica (do inglês *bovine serum albumine*)
- CARS** – Escala de Gradação do Autismo na Infância (do inglês *Childhood Autism Rating Scale*)
- CDC** – Centro para o controle e prevenção de enfermidades (do inglês *Center for Disease Control and Prevention*)
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CONCEA** – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CPFm** – Córtex pré-frontal medial
- CT** – Ciclo limiar (do inglês *cycle threshold*)
- DMSO** – Dimetil-sulfóxido
- dNTP** – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- DTT** – Ditiotreitól
- DSM** – Manual diagnóstico e estatístico das doenças mentais (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)
- EUA** – Estados Unidos da América
- FDA** – Agência de Alimentos e Medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration*)
- FISH** – Hibridização Fluorescente *in situ* (do inglês *Fluorescent in situ hybridization*)
- Fmr1** – gene 1 do retardo mental do X frágil (do inglês *fragile X mental retardation 1*)
- Fmrp** – Proteína do retardo mental do X frágil (do inglês *fragile X mental retardation protein*)
- GAPDH** – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- HCPA** – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
- IgG** – Imunoglobulina ioforma G
- LSD** – diferença significativa mínima (do inglês *least significant difference*)
- miRNA** – micro Ácido Ribonucleico

M-MLV – vírus da leucemia murina de Moloney (do inglês *Moloney Murine Leukemia Virus*)

mTOR – Alvo da rapamicina em mamíferos (do inglês *mammalian target of rapamycin*)

Nlgn – Neuroligina

PTEN – Fofatase homóloga à tensina (do inglês *phosphatase and tensin homolog*)

PSD-95 – Proteína de 95 KDa da densidade sináptica (do inglês *postsynaptic density protein 95*)

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

RSV – Resveratrol

Sin - Sinaptofisina

SNC – Sistema Nervoso Central

TBS – tampão Tris salina

TEA – Transtorno do Espectro do Autismo

TEACCH – Tratamento e educação de crianças com autismo e distúrbios de comunicação (do inglês *Treatment and Educational of Autistic and related Communication-handicapped Children*)

TSC – Complexo da Esclerose tuberosa (do inglês *tuberous sclerosis complex*)

UBE3A – Proteína 3A ligase da ubiquitina (do inglês *ubiquitin protein ligase 3A*)

UEA – Unidade de Experimentação Animal

VPA – Ácido valpróico (do inglês *valporic acid*)

WB – Imunodeteção (do inglês *Western blotting*)

Lista de figuras

Figura 1. Organização das sinapses excitatórias e inibitórias.....	7
Figura 2. Resumo temporal dos tratamentos aplicados aos animais.....	13
Figura 3. Posição e orientação do corte para a dissecação do CPFm.....	15
Figura 4. Esquema demonstrando a localização do hipocampo.....	16
Figura 5. Curvas de fusão (<i>melting curves</i>) para as análises realizadas no CPFm.....	21
Figura 6. Curvas de fusão (<i>melting curves</i>) para as análises realizadas no hipocampo.	22
Figura 7. Níveis de expressão gênica relativa (A-B) e proteicos (D-E) da proteína pós-sináptica PSD95 no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo.....	28
Figura 8. Níveis de expressão gênica relativa (A-B) e protéica (D-E) da proteína pós-sináptica gefirina no córtex pré-frontal medial (esquerda) e no hipocampo (direita)..	30
Figura 9. Níveis de expressão gênica relativa (A-B) e proteicos (D-E) da proteína pré-sináptica sinaptofisina no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo.	32
Figura 10. Níveis de expressão gênica relativa da proteína de organização sináptica neuroligina-1 no córtex pré-frontal medial (CPFm) (A) e no hipocampo (B)	33
Figura 11. Níveis de expressão gênica relativa (A-B) e proteicos (D-E) da neuroligina-2 no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo.	35
Figura 12. Razão entre os níveis gênicos da proteína PSD95 e da proteína gefirina (PSD95/Gefirina).	36
Figura 13. Figura representativa dos resultados do <i>western blot</i>	46
Figura 14. Quantificação dos resultados de western blot para a incubação com β -actina.. ...	47

Lista de tabelas

Tabela 1. Lista dos <i>primers</i> utilizados	20
Tabela 2. Resumo dos resultados da análise estatística para a qRT-PCR.	24
Tabela 3. Resumo dos resultados da análise estatística para o <i>western blot</i>	26
Tabela 4. Correlações entre os níveis de RNA mensageiro no córtex pré-frontal medial	37
Tabela 5. Correlações entre os níveis proteicos no córtex pré-frontal medial	38
Tabela 6. Correlações entre os níveis de RNA mensageiro no hipocampo	39
Tabela 7. Correlações entre os níveis proteicos no hipocampo	40
Tabela 8. Resumo dos resultados encontrados nas avaliações da expressão gênica e protéica neste trabalho	41

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Autismo.....	1
1.2. Modelo animal de autismo induzido por ácido valpóico	4
1.3. Desbalanço excitação/inibição no autismo	5
1.4. PSD-95 e Gefirina na regulação do balanço excitação/inibição	6
1.5. Neurexinas e Neuroliginas na regulação do balanço excitação/inibição .	6
1.6. Resveratrol como uma ferramenta de estudo.....	8
2. Hipóteses e vias de investigação	9
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo geral	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4. Metodologia	12
5. Resultados	24
6. Discussão	41
7. Conclusões	50
8. Perspectivas	51
9. Apoio Financeiro	52
10. Referências	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Autismo

O transtorno do espectro do autismo (TEA) é um grupo de distúrbios do neurodesenvolvimento caracterizado por perturbações na comunicação social recíproca e na manifestação de comportamentos, interesses e atividades repetitivos e restritos (Baker, 2013).

A palavra autismo vem do grego autós (αὐτός, significando "auto") e foi cunhada em 1910 pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler para descrever a característica dos pacientes com esquizofrenia de "retirarem-se para o mundo das suas fantasias" (Kuhn, 2004).

Entretanto, a terminologia atual somente foi empregada cerca de 30 anos depois. Hans Asperger utilizou a palavra autismo em 1938 em uma palestra no Hospital da Universidade de Viena (Asperger, 1938) e em 1943, Leo Kanner, do Hospital Johns Hopkins fez o primeiro relato detalhado de pacientes com autismo (Kanner, 1943). Kanner define como características presentes nos pacientes, a "solidão autista" e a "obcessiva insistência na preservação dos hábitos" (Baker, 2013).

O critério diagnóstico atual, definido na quinta edição do DSM (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), e publicado pela Associação Americana de Psiquiatria, envolve a presença de prejuízos na comunicação e interação social e padrões de comportamento, interesses e atividades restritos e repetitivos (APA, 2013).

Além disso, várias outras comorbidades geralmente afetam pacientes com autismo, tais como presença de comportamento agressivo, ansiedade, depressão, déficits cognitivos, crises epiléticas, alterações gastrointestinais, distúrbios do sono, disfunções do sistema imune e hipersensibilidade a estímulos táteis, sonoros e luminosos (Geschwind, 2009). Comumente, o termo autismo é utilizado de maneira genérica para englobar todos os graus dentro deste amplo espectro.

A prevalência de TEA elevou-se continuamente nas últimas décadas, e dados atuais do CDC (*Center for Disease Control*, EUA) estimam que 1 em cada 68 crianças americanas de oito anos de idade tem sido identificada com TEA, sendo 4.5 vezes mais prevalente no sexo masculino do que no feminino (CDC, 2014). Apesar de os motivos para tal aumento não serem completamente conhecidos, mudanças

no critério diagnóstico e maior conhecimento sobre a distúrbio por parte de profissionais de saúde e pela população em geral explicam não mais que metade desse valor (Weintraub, 2011), indicando a necessidade de se compreender as causas do gatilho do autismo e do aumento da prevalência.

1.1.1. Causas

Como avanço dos estudos, percebe-se que a etiologia do TEA é complexa e que uma ampla variedade de fatores genéticos e ambientais pode acarretar fenótipos similares. Os estudos de associação gênica, realizados com gêmeos e irmãos de pacientes com autismo, demonstram que o TEA apresenta uma das maiores herdabilidades dentre os transtornos neuropsiquiátricos (Williams, 2012). No entanto, mesmo após vários anos de estudo e identificação de mais de 1000 alterações genéticas associadas com o autismo, estas não explicam mais que 25% do total de casos (Miles, 2011). E cada vez fica mais claro o envolvimento dos fatores ambientais no gatilho do TEA, tornando-os tão importantes quanto os fatores genéticos para o desenvolvimento do autismo (Sandin et al., 2014).

Em termos de neuropatologia, várias regiões do encéfalo parecem ser alteradas, contribuindo para a expressão das características deste transtorno (Geschwind, 2009). Dentre elas, podemos citar o cerebelo, a amígdala, córtex pré-frontal, estriado, tálamo, hipocampo, córtex orbitofrontal, ínsula e córtex cingulado (Amaral et al., 2008). De maneira geral, há alterações no volume destas estruturas e tendência de aumento do volume do encéfalo; alterações na distribuição neuronal nas camadas corticais e na organização em micro e minicolunas; diminuição da quantidade de alguns subtipos neuronais, em especial neurônios inibitórios de camadas mais profundas do córtex cerebral (Amaral et al., 2008). Também são evidentes as alterações gliais, como maior ativação microglial (Suzuki et al., 2013), diminuição do número e comprimento dos processos astrocíticos (Cao et al., 2012) e redução e mudança na composição da mielina formada por oligodendrócitos (Zikopoulos and Barbas, 2010).

Pouco se sabe sobre como estas modificações podem gerar os sintomas do autismo, mas as maiores evidências apontam para mudanças no grau de conectividade neuronal local e a longa distância (Supekar et al., 2013), bem como mudanças no equilíbrio entre excitação e inibição, tendendo a favorecer o primeiro (Snijders et al., 2013; Zikopoulos et al., 2013). Entretanto, o grau de incerteza é

grande, e outras perturbações podem ainda estar passando despercebidas. Além disso, os mecanismos que geram estas alterações são ainda desconhecidos.

1.1.2. Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico clínico necessita uma equipe interdisciplinar e uma detalhada anamnese. Os critérios são baseados normalmente no DSM-V (APA, 2013) e em questionários como o ADI-R (do inglês *Autism Diagnosis Interview-Revised*) (Becker et al., 2012). A classificação da gravidade também segue os critérios do DSM-V e a avaliação clínica, além do uso de instrumentos como o CARS (do inglês *Childhood Autism Rating Scale*) (Pereira et al., 2008).

Não há tratamento eficaz para o TEA (Rudimar Riesgo, 2013). A abordagem clínica padrão envolve múltiplos profissionais (médicos, fonoaudiólogos, psicólogos, nutricionistas, terapeutas ocupacionais, etc.) e uso de fármacos buscando amenizar aspectos específicos da sintomatologia do autismo (Rudimar Riesgo, 2013). Atualmente, os únicos medicamentos aprovados para uso no autismo pelo FDA (do inglês *Food and Drug Administration* – EUA) são os antipsicóticos atípicos risperidona e aripiprazol, que têm como alvo o comportamento agressivo presente em alguns pacientes. Os pacientes com TEA também podem utilizar medicamentos para controlar alterações de humor, distúrbios do sono e outras comorbidades. Concomitantemente, é indicada a aplicação de terapias comportamentais, como a ABA e o TEACCH (Rudimar Riesgo, 2013). A ABA (do inglês *Applied Behavior Analysis*) visa ensinar, em estágios crescentes de complexidade, habilidades ausentes nas crianças. O TEACCH (do inglês *Treatment and Educational of Autistic and related Communication-handicapped Children*) visa adaptar a organização do ambiente e das rotinas de modo que a criança possa entendê-los mais facilmente e também saiba o que é esperado dela.

1.1.3. Pesquisa

É grande a necessidade de pesquisas que esclareçam aspectos básicos da patofisiologia dos TEA, especialmente aqueles potencialmente envolvidos em seu surgimento, uma vez que estes poderiam originar métodos mais precisos de terapia e diagnóstico.

Visto que o estudo do autismo na clínica apresenta vários complicadores (como a impossibilidade de estudar os mecanismos pelos quais o TEA surgiu, a

dificuldade de análise de alguns tecidos, em especial o Sistema Nervoso Central, e a variedade dos sintomas apresentados e do grau de gravidade), o uso de modelos para o estudo do autismo pode facilitar a investigação.

Partindo desta necessidade, uma ferramenta bastante útil é o uso de animais. Eles possibilitam investigações mais amplas de alterações morfológicas e bioquímicas, bem como a relação causa-consequência entre elas e a análise temporal de seu surgimento.

1.2. Modelo animal de autismo induzido por ácido valproico

Um modelo animal de autismo bem validado e estabelecido envolve a exposição pré-natal de roedores ao ácido valproico (VPA). O modelo surgiu devido a dados clínicos em que o VPA aumentava significativamente a incidência de autismo nos filhos de mães que faziam uso deste medicamento durante o primeiro trimestre de gestação (Harden, 2013). Baseado nestes estudos, surgiu a possibilidade de desenvolver um modelo animal induzido por administração de VPA durante o período gestacional em roedores. Esse modelo gera na prole muitas características análogas àquelas de pessoas com TEA, entre elas: comportamento repetitivo e estereotipado e prejuízo na sociabilidade e comunicação (Roullet et al., 2013); alterações anatômicas comuns em cerebelo (Ingram et al., 2000), nervos cranianos (Rodier et al., 1997), e outras regiões do encéfalo (Schmitz et al., 2005); padrões eletroencefalográficos anormais em resposta a estímulos auditivos (Gandal et al., 2010); e elevada ativação astrocítica e microglial (Lucchina and Depino, 2014). Interessantemente, algumas das características só estão presentes em machos (Kim et al., 2013; Schneider et al., 2008), o que corresponde a maior incidência de autismo em indivíduos do sexo masculino.

Sendo assim, o modelo de autismo induzido por exposição prenatal ao VPA apresenta validade de construto e validade de face, podendo ser explorado para investigação de alterações celulares e moleculares ligadas à manifestação dos sintomas clínicos do autismo. Além disso, é possível estudar em que parte do desenvolvimento ocorrem estas falhas que podem originar o fenótipo similar ao TEA, e como elas poderiam ser prevenidas.

1.3. Desequilíbrio excitação/inibição no autismo

Apesar de a etiologia do TEA ser ainda desconhecida, alguns pesquisadores têm sugerido que um dos pontos comuns são alterações sinápticas que levariam a um desequilíbrio excitação/inibição (Bourgeron, 2009; Ebert and Greenberg, 2013; Garber, 2007; Kelleher and Bear, 2008). Isto é amplamente apoiado por evidências de pesquisas em quatro principais áreas: 1) estudos de associação gênica, os quais revelaram a existência de diversas mutações no autismo relacionadas com a formação e função de sinapses (Huguet et al., 2013; Kenny et al., 2014); 2) estudos de transcriptômica em pacientes com autismo, que encontraram variações de quantidade de RNAm de genes relacionadas com função sináptica (Voineagu et al., 2011); 3) observações em animais geneticamente modificados, nos quais alterações sinápticas são correlacionadas com o surgimento de fenótipos similares ao do autismo (Delorme et al., 2013); 4) presença de modificações sinápticas em síndromes com alta prevalência de autismo, tais como Síndrome do X-Frágil e Esclerose Tuberosa (Auerbach et al., 2011).

Neste sentido, é de grande importância averiguar se as mesmas alterações estão presentes em modelos animais de autismo e, quais são os mecanismos moleculares que podem ocasioná-las. Por exemplo, já se sabe que ocorre aumento da plasticidade sináptica e de excitabilidade neuronal devido à hiperconectividade de sinapses glutamatérgicas no córtex somatossensorial primário (Rinaldi et al., 2008a), córtex pré-frontal medial (Rinaldi et al., 2008b) e amígdala (Markram et al., 2008) de ratos do modelo VPA.

É particularmente promissora a avaliação do balanço excitação/inibição no córtex pré-frontal medial (CPFm), visto que um predomínio da excitação nesta região foi demonstrado como fator causal de déficits na sociabilidade (Yizhar et al., 2011). Do mesmo modo, sinapses de neurônios da amígdala no hipocampo ventral acarretam modulação do comportamento social (Felix-Ortiz and Tye, 2014). Além disso, nosso grupo já encontrou alteração do metabolismo glutamatérgico hipocampal (Bristot Silvestrin et al., 2013), o que estimula a avaliação de sinapses no hipocampo.

1.4. PSD-95 e Gefirina na regulação do balanço excitação/inibição

Gefirina e PSD-95 (do inglês *Postsynaptic Density Protein 95*) são proteínas de ancoragem respectivamente de sinapses inibitórias e excitatórias (Sheng and Kim, 2011). Elas são expressas exclusivamente nas unidades pós-sinápticas neuronais e são importantes por associarem-se de maneira não covalente a uma infinidade de proteínas, tais como receptores de neurotransmissores, proteínas do citoesqueleto, moléculas de interação transsinápticas, proteínas de ancoragem e outras proteínas importantes para a cascata de sinalização desencadeada pelo neurotransmissor (Choi and Ko, 2015; Gomperts, 1996; Tyagarajan and Fritschy, 2014). O agrupamento destas moléculas permite que a ligação do neurotransmissor no seu receptor estabeleça uma ação coordenada localizada e de início rápido (Craven and Brecht, 1998; Kneussel and Betz, 2000).

Além destas funções, tanto PSD-95 quanto gefirina são essenciais no estabelecimento das sinapses, contribuindo para o recrutamento das suas proteínas constituintes e funcionando como fatores nucleadores da formação das unidades pós-sinápticas. De acordo com isso, alterações da expressão de PSD-95 geram mudanças correspondentes no número e tamanho de sinapses excitatórias (Maćkowiak et al., 2014) e um fenômeno semelhante é causado em sinapses inibitórias por alterações na quantidade e modificações pós-traducionais da gefirina (Tyagarajan et al., 2011; Yu et al., 2007).

1.5. Neurexinas e Neuroliginas na regulação do balanço excitação/inibição

Neuroliginas (Nlgns) são proteínas amplamente expressas no sistema nervoso adulto e presentes majoritariamente nas unidades pós-sinápticas neuronais, possuindo papéis no estabelecimento, maturação e estabilização dos contatos sinápticos (Bang and Owczarek, 2013). Estudos apontam evidências para a participação das Nlgns como um organizador essencial das unidades pós-sinápticas, contribuindo para o ancoramento de receptores e de complexos importantes para a transmissão do sinal mediado pelos neurotransmissores (Bourne and Marchot, 2014). As Nlgns estabelecem interações transsinápticas com as proteínas pré-sinápticas neurexinas (Bang and Owczarek, 2013). Estas, por sua vez, também estão envolvidadas na organização da unidade pré-sináptica, contribuindo para o recrutamento de proteínas responsáveis pela liberação do neurotransmissor (Dean

et al., 2003) (Figura 1). Surpreendentemente, a simples expressão das neuroliginas em células não-neuronais é capaz de levar à produção de terminais pós-sinápticos funcionais (Fu et al., 2003), enquanto a expressão de neurexinas induz a formação de uma unidade pré-sináptica funcional (Graf et al., 2004). Sendo assim, a regulação da quantidade destas proteínas pode estar diretamente relacionada à regulação do número de sinapses (Bang and Owczarek, 2013).

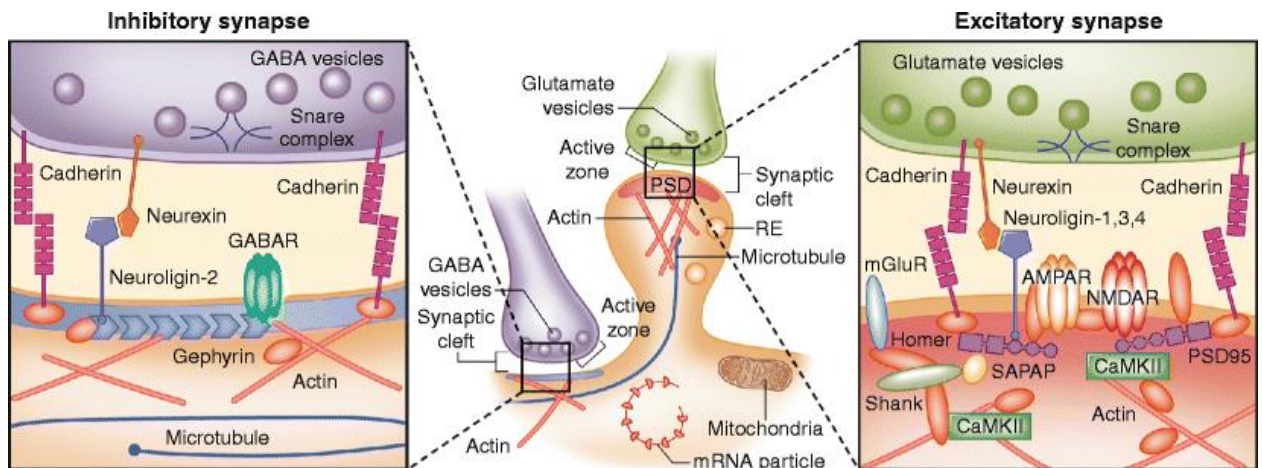


Figura 1. Organização das sinapses excitatórias e inibitórias. Gephyrina (na sinapse inibitória) e PSD-95 (na sinapse excitatória) são elementos centrais da organização sinática, funcionando como centros de associação de outras proteínas da unidade pós-sináptica. Neuroligina-2 (na sinapse inibitória) e neuroligina-1 (na sinapse excitatória) são importantes para formação e manutenção das sinapses através da interação e sinalização com neuroxinas expressas pela unidade pré-sináptica. Ver texto para mais detalhes. (Modificado de van Spronsen & Hoogenraad, 2010)

Interessantemente, ambas proteínas estão associadas a casos de autismo, tanto pela presença de mutações que podem estar relacionadas com aspectos importantes da patologia (Südhof, 2008), quanto pela presença de alterações nos níveis de expressão em tecidos de pacientes (Yasuda et al., 2011).

As isoformas Nlgn-3 e Nlgn-4 estão presentes tanto em contatos excitatórios, quanto inibitórios (Maćkowiak et al., 2014). Ademais, Nlgn-3 também é expressa durante o desenvolvimento em células gliais como astrócitos da retina, células de Schwann, astrócitos da medula espinal e glia embainhante olfatória, permanecendo com altos níveis nesta última também no adulto (Gilbert et al., 2001). Curiosamente, a isoforma Nlgn-1 é expressa somente em sinapses excitatórias, enquanto a Nlgn-2 está presente exclusivamente em sinapses inibitórias (Bang and Owczarek, 2013). Essa segregação das isoformas levou à investigação do papel das Nlgn e

neurexinas no estabelecimento do equilíbrio entre o número de sinapses excitatórias e inibitórias no SNC (Cline, 2005). Atualmente, há fortes evidências de que Nlgn e neurexinas realmente desempenham papéis essenciais nesta regulação (Bang and Owczarek, 2013; Pregno et al., 2013; Südhof, 2008). Sendo assim, a avaliação dos níveis de expressão destas proteínas em modelos animais de autismo poderia indicar um mecanismo pelo qual o balanço excitação/inibição poderia ser alterado.

1.6. Resveratrol como uma ferramenta de estudo

Em pesquisa recente de nosso grupo, um tratamento pré-natal com resveratrol (RSV) foi capaz de prevenir alterações na sociabilidade da prole neste modelo (Bambini-Junior et al., 2014). Adicionalmente, resultados preliminares de trabalhos em andamento apontam que o RSV pode prevenir outras características encontradas no modelo VPA, como alterações no comportamento de busca pelo ninho (*nest seeking*) e em microRNA (miRNA) específicos.

Assim, o RSV pode complementar o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de características do tipo autista neste modelo. É especialmente interessante a investigação de alterações teciduais e moleculares causadas pelo VPA e prevenidas pelo RSV, bem como o estudo de vias de sinalização que podem ser afetadas por ambos, mas de maneira oposta.

2. HIPÓTESE E VIAS DE INVESTIGAÇÃO

Levando em consideração as evidências para a existência de um desequilíbrio excitação-inibição no autismo, e a possibilidade de esta modificação estar implicada no surgimento das características específicas desta patologia, surgiu a proposta de analisar marcadores moleculares de sinapses excitatórias e inibitórias nos animais do modelo, correlacionando os resultados com as avaliações comportamentais em realização pelo grupo. Sendo assim, investigamos as seguintes hipóteses:

- Hipótese 1:

H0: Os níveis de RNAm e de proteína de componentes de sinapses excitatórias está elevado (em CPFm e hipocampo) em comparação àqueles de sinapses inibitórias nos animais de modelo VPA.

H1: Os níveis de RNAm e de proteína de componentes de sinapses excitatórias está diminuído ou não se altera em comparação àqueles de sinapses inibitórias nos animais de modelo VPA.

- Hipótese 2:

H0: A exposição prenatal ao RSV é capaz de restabelecer o equilíbrio entre os níveis dos componentes de sinapses excitatórias e de sinapses inibitórias no em CPFm e hipocampo.

H1: A exposição prenatal ao RSV não é capaz de restabelecer o equilíbrio entre os níveis dos componentes de sinapses excitatórias e de sinapses inibitórias no em CPFm e hipocampo.

- Hipótese 3:

H0: as alterações na quantidade de RNAm e proteína de sinapses excitatórias correlacionam-se com as mudanças nos níveis de expressão de Nlgn-1, enquanto os de sinapses inibitórias se relacionam com os níveis de Nlgn-2.

H1: as alterações na quantidade de RNAm e proteína de sinapses excitatórias não correlacionam-se com as mudanças nos níveis de expressão de Nlgn-1. O mesmo acontece em relação aos componentes de sinapses inibitórias e os níveis de Nlgn-2.

Com este fim, realizamos um estudo comparativo das sinapses hipocampais e do córtex pré-frontal medial em animais que receberam VPA, associado ou não com à administração de RSV, e seus respectivos Controles. Em especial, avaliamos indicadores da quantidade total de sinapses e da proporção entre sinapses

inibitórias e excitatórias para sinaptofisina (Sin) e proteínas específicas de cada um dos tipos de sinapse: PSD-95 (sinapse excitatória) e gepirina (sinapse inibitória). Adicionalmente, avaliamos a expressão gênica e protéica das proteínas Nlgn-1 e Nlgn-2. Elas estão envolvidas na formação de sinapses glutamatérgicas e GABAérgicas, respectivamente, e diversos estudos apontam sua associação com o autismo (Südhof, 2008). Com esta abordagem pretendemos encontrar novos alvos que possam contribuir para a compreensão da etiologia do autismo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar marcadores moleculares sinápticos envolvidos no balanço excitação/inibição no córtex pré-frontal medial e hipocampo de ratos do modelo de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA e no grupo Controle, bem como o possível papel protetor do RSV.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar o nível de expressão gênica e protéica de sinaptofisina no modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA com e sem tratamento com RSV;

- Avaliar os níveis de expressão de PSD-95 (sinapses excitatórias) e Gefirina (sinapses inibitórias), assim como os níveis de Nlgn-1 (sinapses excitatórias) e Nlgn-2 (sinapses inibitórias) no modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA com e sem tratamento com RSV;

- Interpretar os possíveis efeitos desencadeados por VPA e resveratrol, correlacionando com dados prévios e atuais de testes comportamentais no laboratório.

4. METODOLOGIA

4.1. Modelo animal de autismo induzido por exposição prenatal ao VPA.

Os animais utilizados foram ratos Wistar da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. No máximo 4 animais foram colocados por caixa (machos ficaram separados das fêmeas) e mantidos em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, bem como em condições padrão de umidade. O pareamento dos animais sempre teve início as 19 horas. A escolha desse horário reflete no horário em que ocorre a indução do modelo animal de autismo (entre 12h30 e 13h30 do dia de gestação 12,5) por exposição, via intraperitoneal, ao ácido valproico. Os animais foram retirados do pareamento às 7 horas do dia seguinte e realocados em suas caixas de convívio. No caso das fêmeas, a fecundação foi verificada por microscopia através da investigação do lavado vaginal (Bambini-Junior et al., 2011). Quando o procedimento de verificação da fecundação indicou prenhez, estas foram alocadas em pares com outras fêmeas prenhes até o dia 18 de gestação. Após esse período, foram alojadas em caixas individuais até o nascimento da prole.

Os tratamentos a seguir descritos foram aplicados às ratas prenhes. O modelo consiste na injeção intraperitoneal de 600 mg/Kg de valproato de sódio diluído em NaCl 0,9% no dia 12,5 de gestação, como previamente descrito (Bambini-Junior et al., 2014). Aos Controles, somente a salina foi aplicada neste dia. Dois grupos receberam, via administração subcutânea, 3,6 mg/Kg de RSV dissolvido em DMSO diariamente entre os dias embrionários 6,5 e 18,5 (E6,5 e E18,5), formando assim os quatro grupos experimentais (Figura 2):

- Controle (que recebeu DMSO do dia E6,5 ao E18,5 e salina no dia E12,5);
- VPA (que recebeu DMSO do dia E6,5 ao E18,5 e VPA no dia E12,5);
- RSV (que recebeu RSV do dia E6,5 ao E18,5 e salina no dia E12,5);
- VPA+RSV (que recebeu RSV do dia E6,5 ao E18,5 e VPA no dia E12,5).

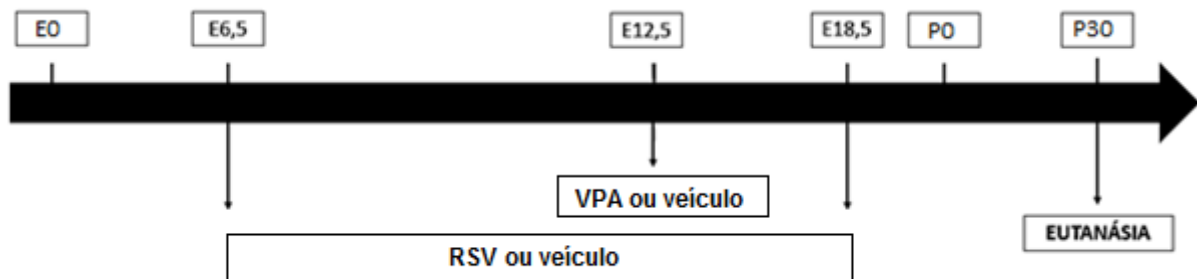


Figura 2. Resumo temporal dos tratamentos aplicados aos animais. RSV foi administrados diariamente por via subcutânea a dose de 3,6 mg/kg. VPA foi administrado via intraperitoneal em dose de 600 mg/kg . E0 - concepção. P0 - nascimento.

Devido às peculiaridades do modelo, somente os ratos machos da prole são objetos de estudo.

Foram mantidas proles entre 4 e 8 filhotes. Em caso de ninhadas com número inferior a 4, animais de idades semelhantes e do mesmo grupo experimental foram reunidos para formar a ninhada. Em caso de ninhadas com número de animais superior a 8, os filhotes sobressalentes foram submetidos à eutanásia. Tendo em vista que somente os machos desse modelo são analisados, nos casos necessários, foram priorizadas eutanásias de fêmeas.

Os filhotes do sexo masculino foram mortos utilizando uma injeção letal de cetamina (300 mg/Kg) e xilasina (40 mg/Kg) seguida de um método confirmatório da morte. Os ratos utilizados para procriação e os filhotes do sexo feminino foram mortos através da administração via inalatória de uma dose letal de isoflurano (6-9%).

4.2. Preceitos éticos

Todos os procedimentos foram realizados obedecendo aos preceitos éticos que competem à experimentação animal e estarão de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institute of Health, 2011) e com as últimas resoluções do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Toda a manipulação animal foi realizada com base na Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 e na Resolução Normativa N.12 do CONCEA. De acordo com a Resolução Normativa N. 13 (20 de setembro de 2013), os animais foram anestesiados antes de qualquer procedimento doloroso, exceto durante as injeções de VPA, RSV e DMSO. Uma vez que o modelo animal empregado nesse trabalho é

induzido quimicamente, a utilização de anestésicos nessa etapa representaria um novo agente estressor e com consequências desconhecidas no estabelecimento do modelo, inviabilizando as análises propostas.

O projeto foi submetido ao comitê de ética (CEUA-HCPA) em duas partes, de acordo com os procedimentos metodológicos, tendo os seguintes números de aprovação: 140367 e 140431

4.3. Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho amostral, o software G*Power v3.0 foi utilizado. Baseando-se em dados de experimentos anteriores do laboratório e da literatura e utilizando os seguintes parâmetros ($\alpha = 0.05$; poder = 0.8; efeito de tamanho = 0.8) um cálculo de tamanho amostral “A priori” foi realizado. Assim, para 4 grupos o tamanho amostral total indicado foi 20 animais, ou seja, $n=5$ por grupo. Uma vez que o VPA e RSV são administrados na mãe, o tratamento estatístico adequado é considerar cada ninhada como um único “n”. Ao fim, um indivíduo de cada ninhada ou uma média dos resultados da ninhada originam um n de 1. Então, ao total necessitamos de 5 ninhadas de cada grupo. Segundo dados prévios do laboratório, a média de machos por ninhada é de 4 animais. O VPA não altera este valor, mas interrompe 50% das gestações. Portanto, a realização dos pareamentos necessitou 30 fêmeas em idade fértil e 10 machos. Quatro fêmeas extras foram planejadas caso ocorressem perdas não esperadas.

Por fim, para a realização desse projeto e, levando em consideração o número médio de 4 animais machos por ninhada anteriormente citado, pelo menos 1 animal de 5 ninhadas diferentes compuseram os grupos experimentais do presente estudo, totalizando um n de pelo menos 5 animais por grupo (Controle, VPA, RSV e VPA+RSV).

4.4. Dissecção e preparação das amostras.

O CPFm e o hipocampo foram removidos através de dissecção utilizando técnica previamente padronizada no laboratório. Resumidamente, após a eutanásia, o encéfalo do animal foi retirado de dentro do crânio, o cérebro foi dividido na linha medial e um corte com bisturi a profundidade de 2 mm foi feito em localização ortogonal ao corpo caloso e à superfície de apoio (Figura 3); um corte em linha paralela a linha média e a 2 mm desta foi então realizado até a união com o primeiro

corde, isolando, assim, o CPFm. O hipocampo foi posteriormente dissecado através de cuidadosa separação deste do córtex temporal adjacente: a partir da linha média o córtex foi empurrado com a auxílio de pequenos pincéis de pintura até o hipocampo estar acessível e as suas conexões com o restante do encéfalo poderem ser separadas (Figura 4).

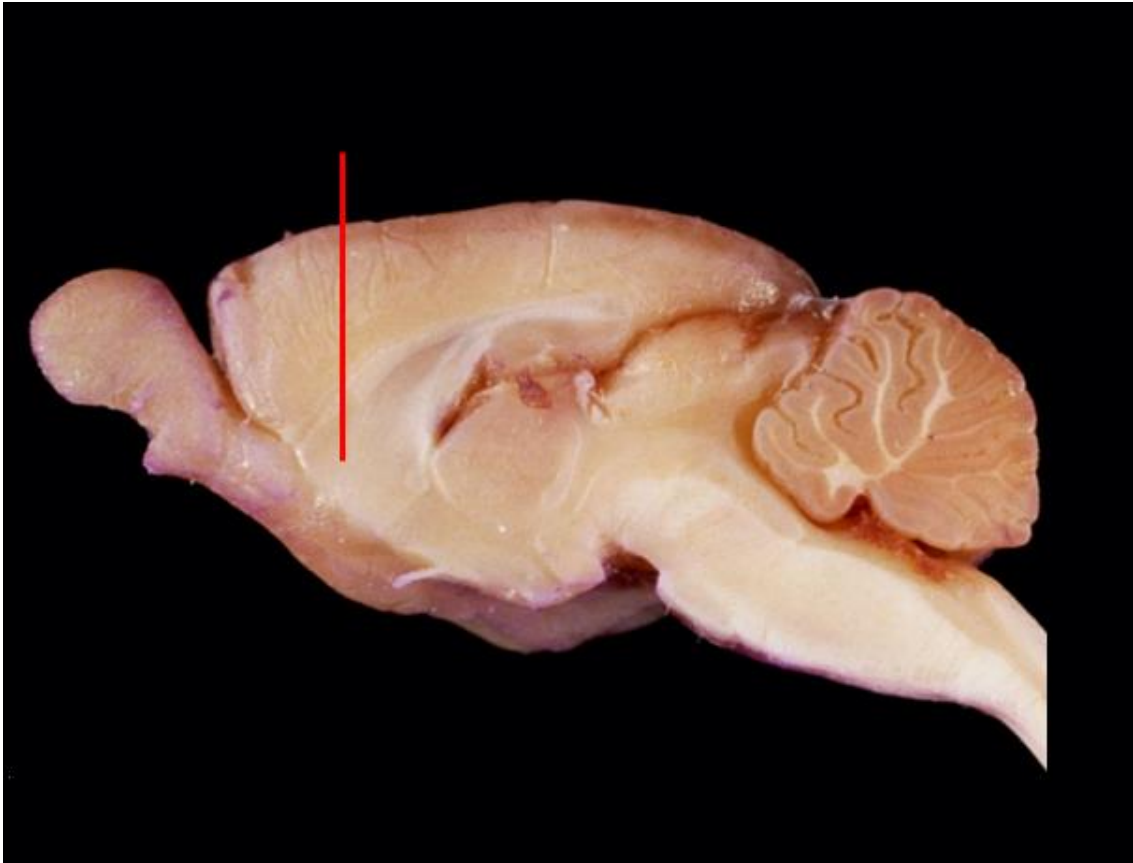


Figura 3. Posição e orientação do corte para a dissecção do CPFm. Uma região medial do telencéfalo com 2mm de espessura e anterior ao início do corpo caloso foi removida.

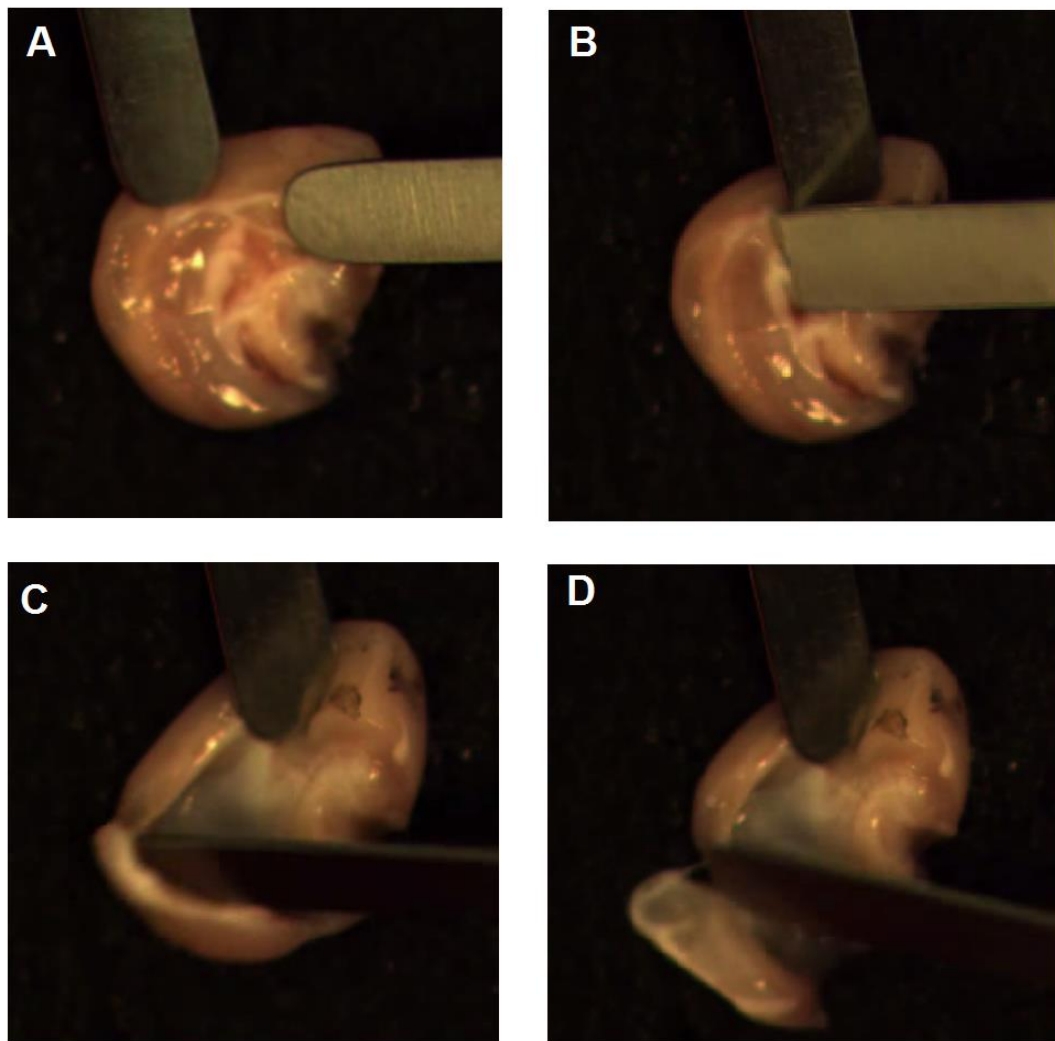


Figura 4. Esquema demonstrando a localização do hipocampo. Ele pode ser facilmente removido com o uso de espátulas ou pincéis pequenos.

Amostras do lado direito foram direcionadas para as análises de PCR, enquanto as amostras do lado esquerdo foram utilizadas para o *western blot*. Após dissecadas, as amostras foram preparadas de acordo com os requisitos de cada técnica, acondicionadas em tubos eppendorf e imediatamente congeladas em freezer -80°C até o uso.

4.5. Análise protéica por eletroforese e imunodeteção.

As análises foram efetuadas em 1 animal macho por ninhada. Aos 30 dias de vida os animais receberam uma dose letal de anestésico, cetamina e xilasina, e o encéfalo foi dissecado. O tecido neural de interesse foi isolado, homogeneizado e as proteínas totais foram extraídas utilizando um tampão de extração com Triton X-100

seguida de uma centrifugação a 14.000 g e coleta do sobrenadante. As proteínas foram então quantificadas pelo método de Lowry e preparadas em tampão Laemmli tal que 40 µg de proteína fosse utilizada para cada amostra.

A seguir, as proteínas foram separadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida para posterior imunodeteção seguindo protocolo prévio (Bristot Silvestrin et al., 2013). Em resumo, após a migração, a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose foi realizada utilizando o sistema de transferência *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* da *Bio Rad*. A transferência das proteínas foi averiguada utilizando o Ponceau e esta foi, então bloqueada utilizando 5% de leite em pó desnatado dissolvido em Salina tamponada com Tampão Tris adicionada de Tween-20 a 0,05% (TBS-Tween; TBS-t). A incubação com os anticorpos primários descritos ocorreu *overnight* em sala fria, enquanto a aplicação do anticorpo secundário correspondente foi realizada durante 1h30 em temperatura ambiente. Após a aplicação de cada anticorpo, 4 lavagens de 10 minutos utilizando TBS-t foram realizadas. O reagente ECL (*GE Healthcare Life Sciences*) foi então aplicado na membrana e a quimioluminescência foi detectada utilizando o imunodetector ImageQuant LAS 4000 (*GE HealthCare Life Sciences*). Quando necessário, o *stripping* da membrana foi realizado utilizando-se NaOH 1M, não excedendo o número de 3 *strippings* por membrana.

A quantificação da expressão relativa foi realizada com o software Image J v.1.49 utilizando as ferramentas intrínsecas deste programa para quantificação protéica. Primeiramente, os resultados foram normalizados pelos valores médios de cada membrana para cada região analisada a fim de permitir a comparação inter-experimento. A seguir, Uma razão entre a quantidade da proteína de interesse e o Controle endógeno β -actina foi calculada. Por fim, os resultados foram normalizados em relação ao grupo Controle. Em cada membrana estava 1 amostra de cada tecido de cada grupo analisado.

4.5.1. Anticorpos

Os seguintes anticorpos foram utilizados na técnica de Western blot:

- Anticorpo anti-sinaptofisina produzido em camundongo (Sigma S5768). Utilizado a uma diluição de 1:1000 TBS-t leite;
- Anticorpo anti-PSD-95 produzido em coelho (Abcam ab18258). Utilizado a uma diluição de 1:1000 em TBS-t leite;

- Anticorpo anti-geferina produzido em coelho (Abcam ab32206). Utilizado a uma diluição de 1:1000 em TBS-t leite;
- Anticorpo anti-neuroliquina-2 produzido em coelho (Abcam ab36602). Utilizado a uma diluição de 1:500 em TBS-t leite;
- Anticorpo anti-neuroliquina-1 produzido em coelho (Abcam ab26305). Tentativas de padronização não obtiveram sucesso;
- Anticorpo anti- β -actina produzido em coelho (Cell Signalling 4967). Utilizado a uma diluição de 1:1000 em TBS-t BSA;
- Anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra (BioRad 1706515). Utilizado a uma diluição de 1:1000 em TBS-t leite;
- Anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em burro (Santa Cruz sc-2318). Utilizado a uma diluição de 1:1000 em TBS-t leite.

4.6. PCR em tempo real

4.6.1. Extração de RNA total

Após a eutanásia dos animais, as estruturas encefálicas (hipocampo e córtex medial pré-frontal) foram dissecadas e o tecido foi pesado e homogeneizado em reagente TRIzol®, na proporção de 10 μ L de TRIzol® para cada 1 mg de tecido em 10 μ L de Trizol. Este homogeneizado foi armazenado em freezer -80°C até posterior processamento. A extração de RNA foi realizada da seguinte forma: clorofórmio foi adicionado, na proporção 1:5 (clorofórmio:TRIzol®), para promover a separação de fases. Após, a mistura foi centrifugada a 12000 G por 15 minutos, e a fase aquosa (contendo RNA total) foi isolada e transferida para um outro eppendorf. O RNA total foi precipitado através da adição de isopropanol, na proporção 1:2 (isopropanol:TRIzol®). Após centrifugação a 12000 G por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em etanol para remover impurezas. Por fim, a suspensão foi centrifugada por mais 5 minutos a 12000 G, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspenso em 30 μ L de água para injetáveis livre de RNases e armazenada em freezer -80°C para ser utilizado como molde na reação de transcrição reversa.

4.6.2. Transcrição Reversa e Reação em cadeia da polimerase

A expressão relativa de RNA mensageiros maduros foi avaliada pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-

qPCR). Inicialmente, o extrato de RNA foi quantificado e qualificado por espectrofotometria. A concentração de RNA total (em ng/ μ L) foi realizada através da leitura de absorbância no comprimento de onda (λ) de 260 nm. Além disso, a qualidade do RNA foi avaliada através dos índices A260/A230 e A260/A280. Apenas os extratos de RNA com índices maiores que 1,70 foram utilizados.

A partir do extrato de RNA obtido para cada amostra, foi sintetizado DNA complementar a partir da reação de transcrição reversa, utilizando 1,5 μ g de RNA total, 1 μ L de primer oligodT, 1 μ L de uma mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados (mix de dNTP) a 10 nM cada e água para injetáveis em quantidade suficiente para um volume de 12 μ L. Essa mistura foi incubada em um termociclador a 65°C por 5 minutos. Em seguida, 4 μ L de tampão de transcrição reversa concentrado 5x, 2 μ L de ditioneitol (DTT) 0,1 M e 1 μ L de inibidor de ribonucleases (40 unidades/ μ L) foi adicionado à mistura inicial, e uma nova incubação a 37 °C por 2 minutos foi realizada. Por fim, 1 μ L da enzima transcriptase reversa MMLV foi adicionado à mistura, e uma incubação final a 37 °C por 50 minutos foi realizada, seguida da inativação da enzima a 70 °C por 15 minutos, resultando um volume final de 20 μ L de DNA complementar.

Antes da quantificação dos RNA mensageiro avaliados, os primers específico foram testados através de uma matriz de quantidades de DNA complementar e de cada par de primer utilizados. Foram testadas três concentrações de primer (100, 200 e 300 nM) e três diluições de DNA complementar (1:10, 1:20, 1:30, a partir do extrato bruto resultante da reação de transcrição reversa).

A reação em cadeia da polimerase quantitativa foi realizada utilizando o DNA complementar (após diluição adequada para cada RNA mensageiro avaliado - 1:20) como molde para a reação, juntamente com uma mistura mix reacional contendo 2,5 μ L do tampão concentrado 10x, 0,8 μ L do cofator MgCl₂ 50 mM, 2,5 μ L do fluoróforo SYBR-Green®, 0,5 μ L de uma mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (mix de dNTP) a 10 mM cada, 0,25, 0,50 ou 0,75 μ L de cada primer específico (10 μ M), dependendo da concentração ideal para o RNA mensageiro avaliado, 0,1 μ L da enzima Taq DNA Polimerase e água para injetáveis em quantidade suficiente para 25 μ L de reação. O fluoróforo SYBR-Green® foi utilizado para detectar amplificação, de forma que os valores de CT (*Cycle Threshold*) foram utilizados para cálculo de expressão relativa de cada RNA mensageiro através do método $-\Delta\Delta$ CT (Livak and Schmittgen, 2001), utilizando GAPDH como gene controle endógeno. Após

amplificação, a fluorescência da amostra foi medida numa rampa de temperatura de 60° a 95°C, para obtenção da curva de melting dos produtos amplificados. A metodologia de RT-qPCR foi realizada num aparelho StepOne System da Applied Biosystems.

4.6.3. Primers

Os primers utilizados neste trabalho foram buscados de outros trabalhos da literatura ou desenhados especificamente a partir do genoma referência de *Rattus norvegicus* do *GenBank*. Para o desenho de primers, a ferramenta *Oligo Explorer* foi utilizada. Todos os primers foram analisados pela ferramenta *Oligo Analyzer* para evitar a formação de dímeros de primers e de *hairpins*. Adicionalmente, a especificidade do primer foi testada online pela ferramenta Primer BLAST. A lista dos *primers* utilizados está descrita na Tabela 1.

Gene	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
PSD95	CTTCTCAGCCATCGTAGAGG	GAGAGGTCTTCAATGACACG
Geferina	ACCCTCGCCCAGAATACCAC	GCTCATCAGACGGCTGCTCA
Sinaptofisina	TCAGGACTCAACACCTCAGTGG	AACACGAACCATAAGTTGCCAA
Neuroliquina-1	TCCATATGCTGCTCCACCAA	CGGATATCAGACCAGGGAGATG
Neuroliquina-2	CCAAAGTGGGCTGTGACC	CCAAAGGCAATGTGGTAGC

Tabela 1. Lista dos *primers* utilizados.

A figuras 5 e 6 mostram as curvas de melting para os pares de *primers* utilizados, respectivamente no CPFm e Hipocampo, evidenciando que eles são específicos e levam à formação de um único amplicon.

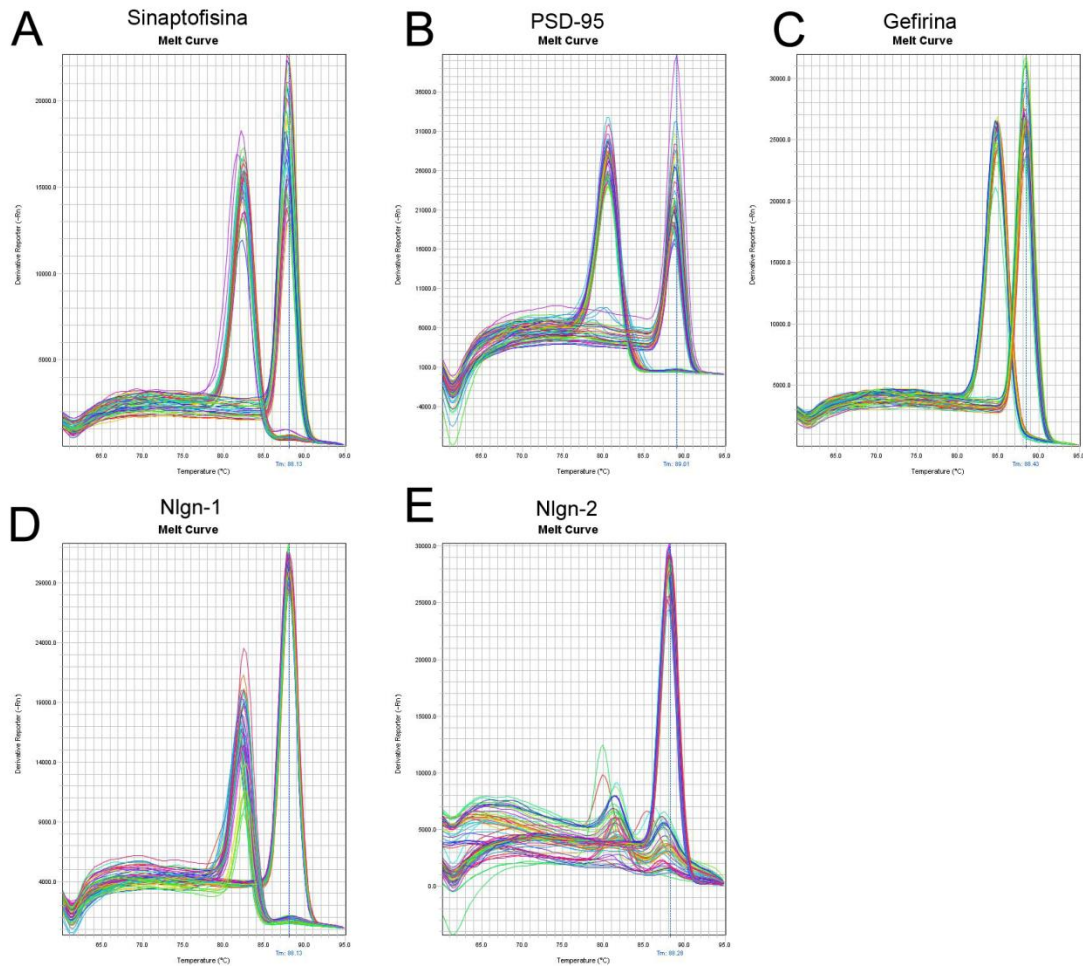


Figura 5. Curvas de fusão (*melting curves*) para as análises realizadas no CPFm. Cada linha nos gráficos representa uma amostra (amostras foram analisadas em triplicata) e cada gráfico é oriundo de uma placa diferente. A análise com os primers para GAPDH foi realizada para as mesmas amostras na mesma placa e sujeito às mesmas condições de amplificação do cDNA. Assim, evidenciamos 2 picos na curva de fusão, o da esquerda, referente às amostras com os *primers* de interesse, e o da direita, para os *primers* para GAPDH. **A)** Sinaptofisina. **B)** PSD-95. **C)** Gefirina. **D)** Nlgn-1. **E)** Nlgn-2. Note que um único aplicon pode ser identificado para todas as análises (para cada primer), à exceção para a Nlgn-2. Dada a qualidade da amplificação de Nlgn-2, os dados referentes a este transcrito devem ser interpretados com cuidado.

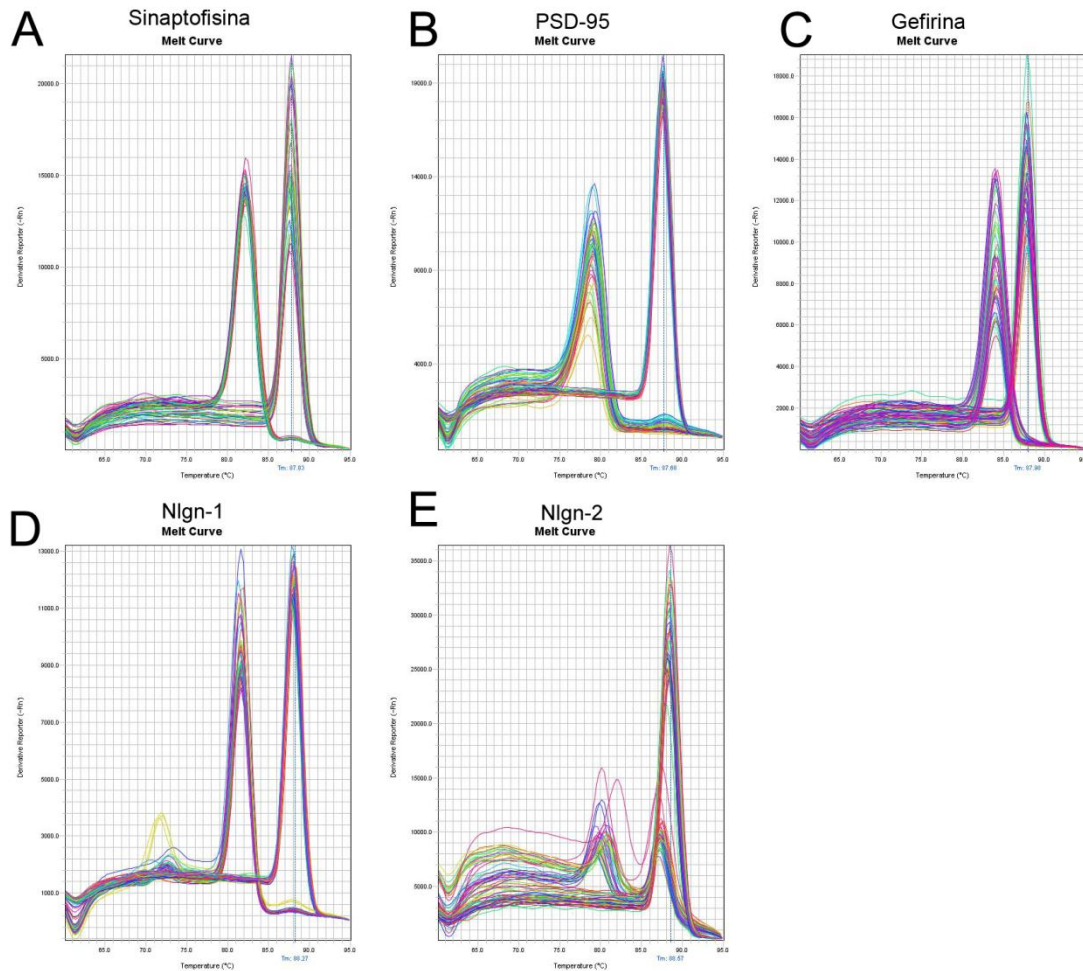


Figura 6. Curvas de fusão (*melting curves*) para as análises realizadas no Hipocampo. Cada linha nos gráficos representa uma amostra (amostras foram analisadas em triplicata) e cada gráfico é oriundo de uma placa diferente. A análise com os primers para GAPDH foi realizada para as mesmas amostras na mesma placa e sujeito às mesmas condições de amplificação do cDNA. Assim, evidenciamos 2 picos na curva de fusão, o da esquerda, referente às amostras com os *primers* de interesse, e o da direita, para os *primers* para GAPDH. **A)** Sinaptofisina. **B)** PSD-95. **C)** Gefirina. **D)** Nlgn-1. **E)** Nlgn-2. Note que um único aplicon pode ser identificado para todas as análises (para cada primer), à exceção para a Nlgn-2. Dada a qualidade da amplificação de Nlgn-2, os dados referentes a este transcrito devem ser interpretados com cuidado.

4.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do Programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL). Os dados foram comparados através de uma ANOVA de 2 vias tendo os tratamentos com RSV e VPA como fatores. Primeiro, identificamos o efeito de cada um destes tratamentos, e posteriormente, o efeito da interação. Um pós-teste utilizando o algoritmo da mínima diferença significativa (LSD, do inglês *least*

significant difference) foi realizado. Para os dados de PCR da Neuroliquina-2 no Córtex pré-frontal medial, um Teste-t de Student foi realizado, uma vez que somente os grupos Controle e VPA puderam ser avaliados devido à curva de amplificação tardia.

Para os dados de correlação entre os níveis de expressão de diferentes RNAm ou proteínas, foi calculado o nível de correlação linear utilizando o Software Graphpad. O r^2 para o coeficiente de correlação de Pearson foi determinado. Esse coeficiente indica quanto da variação total é comum aos elementos que constituem os pares analisados. O coeficiente r^2 varia entre 0 (zero) e 1 (um) e quanto mais próximo da unidade for o coeficiente de determinação, maior será a validade da regressão. Para estas análises, os diferentes dados dos animais de todos os grupos foram pareados de acordo com a ninhada do animal utilizada e comparados em pares, entre si.

4.8. Cuidados de biossegurança e descarte de materiais e resíduos

Os profissionais designados para a experimentação animal possuíam instrução prévias sobre os cuidados de biossegurança a serem tomados. Os equipamentos de proteção individual, tais como luvas, máscaras e jalecos, foram utilizados sempre que necessários. Adicionalmente, atenção especial foi dada à utilização e descarte dos materiais perfurocortantes, assim como os cuidados de biossegurança necessários na manipulação animal e de resíduos químicos e biológicos.

O descarte e tratamento dos resíduos seguiu as rotinas estabelecidas pela Comissão de Gestão Ambiental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O material biológico de descarte dos animais foi acondicionado em saco plástico e armazenado em freezer, para posterior incineração. Os materiais perfurocortantes foram descartados em coletores padronizados e os resíduos químicos foram armazenados em recipientes específicos até o recolhimento pelo serviço de higienização.

5. RESULTADOS

A avaliação da expressão gênica relativa, através da método do $\Delta\Delta C_t$ (Delta Delta C(T)), revelou alterações importantes entre os quatro grupos avaliados nesse trabalho. Os níveis de expressão de todas as sequências analisadas foram normalizados para os níveis do grupo Controle, e o *primer housekeeping* escolhido foi o GAPDH.

Os níveis proteicos, avaliados através de *western blot*, revelaram alterações e tendências (p -valor <0.1) importantes de variação entre os quatro grupos avaliados nesse trabalho. Para a normalização dos níveis proteicos e Controle de aplicação, foi utilizada a proteína de citoesqueleto, a β -actina.

Todos os resultados são divididos por tipo de proteína analisada e região do SNC e reportados como médias \pm erro padrão. Nesse contexto, todas as figuras contemplam, inicialmente, dados de expressão gênica seguidos pelas análises protéicas. As Tabelas 2 e 3 resumem os resultados da análise estatística realizada para os dados de *qRT-PCR* e *Western blot*, respectivamente.

Área do SNC	RNAm	ANOVA de 2 vias			Pós-teste
		Efeito	F	p-valor	
CPFm	PSD-95	VPA	1.657	0.222	
		RSV	3.068	0.105	
		Interação	2.25	0.159	RSV-VPA+RSV: $p=0.072$; VPA-VPA+RSV: $p=0.04$
	Gefirina	VPA	8.87	0.014	
		RSV	10.082	0.01	
		Interação	8.283	0.016	RSV-VPA+RSV: $p=0.003$; VPA-VPA+RSV: $p=0.002$
	Sinaptofisina	VPA	0.11	0.746	
		RSV	0.563	0.467	
		Interação	1.746	0.211	
	Nlgn-1	VPA	0.862	0.372	
		RSV	3.007	0.108	
		Interação	2.644	0.13	Controle-VPA: $p=0.096$; Controle-RSV: $p=0.035$
	Nlgn-2	Controle*VPA	-	0.778	Teste-t de Student
	Razão PSD-95 / Gefirina	VPA	0.052	0.824	
		RSV	0.183	0.676	
		Interação	0.18	0.679	

Hipocampo	PSD-95	VPA	2.382	0.149	
		RSV	0.077	0.786	
		Interação	0.74	0.407	
	Gefirina	VPA	0.18	0.679	
		RSV	10.589	0.007	
		Interação	4.872	0.048	RSV-VPA+RSV: p=0.087; VPA-VPA+RSV: p=0.002
	Sinaptofisina	VPA	1.704	0.216	
		RSV	0.04	0.845	
		Interação	0.017	0.899	
	Nlgn-1	VPA	0.642	0.439	
		RSV	0.002	0.967	
		Interação	4.225	0.062	RSV-VPA+RSV: p=0.066
	Nlgn-2	VPA	1.456	0.251	
		RSV	0.002	0.963	
		Interação	7.414	0.019	RSV-VPA+RSV: p=0.017; Controle-RSV: p=0.083; VPA-VPA+RSV: p=0.074
	Razão PSD-95/ Gefirina	VPA	3.59	0.082	
		RSV	4.597	0.053	
		Interação	5.193	0.042	Controle-VPA: p=0.012; VPA-VPA+RSV: p=0.009

Tabela 2. Resumo dos resultados da análise estatística para a qRT-PCR. F e p-valor para a ANOVA de 2 vias seguida de pós-teste *Least Significant Difference* (LSD) estão descritos. Para a Nlgn-2 o teste-t de student foi realizado, uma vez que possuíamos dados de somente 2 grupos.

Área do SNC	Proteína	ANOVA de 2 vias			Pós-teste
		Efeito	F	p-valor	
CPFm	PSD-95	VPA	0.071	0.794	VPA-VPA+RSV: p=0.023
		RSV	2.484	0.141	
		Interação	4.466	0.056	
	Gefirina	VPA	0.918	0.357	
		RSV	0.64	0.439	
		Interação	0.852	0.374	
	Sinaptofisina	VPA	3.517	0.079	
		RSV	0.809	0.382	
		Interação	0.117	0.737	
	Nlgn-2	VPA	1.098	0.31	
		RSV	2.321	0.147	
		Interação	0.009	0.924	
	Razão PSD-95/ Gefirina	VPA	0.005	0.944	
		RSV	0.03	0.866	
		Interação	0.118	0.737	
Hipocampo	PSD-95	VPA	0.001	0.979	
		RSV	1.22	0.291	
		Interação	0.157	0.699	
	Gefirina	VPA	2.145	0.171	
		RSV	1.021	0.334	
		Interação	0.169	0.689	
	Sinaptofisina	VPA	0.022	0.883	
		RSV	0.357	0.559	
		Interação	0.002	0.967	
	Nlgn-2	VPA	5.709	0.03	Controle-VPA: p=0.061
		RSV	2.638	0.124	
		Interação	0.213	0.651	
	Razão PSD-95/ Gefirina	VPA	1.991	0.186	
		RSV	0.072	0.794	
		Interação	0.188	0.673	

Tabela 3. Resumo dos resultados da análise estatística para o *western blot*. F e p-valor para a ANOVA de 2 vias seguida de pós-teste *Least Significant Difference* (LSD) estão descritos.

5.1 PSD95

No córtex pré-frontal medial (figura 7A), apesar do grupo VPA e do grupo RSV manterem os níveis similares ao Controle, o grupo VPA+RSV apresenta tendência a aumentar os níveis de RNAm para a proteína de pós-sinapse excitatória PSD95 (Controle: $1,04 \pm 0,15$, RSV: $1,09 \pm 0,18$, VPA: $0,99 \pm 0,04$, VPA+RSV: $1,67 \pm 0,34$, $n=4$; ANOVA de duas vias; RSV-VPA+RSV: $p=0,072$; pós-teste LSD: VPA-VPA+RSV: $p=0,04$). No hipocampo (figura 7B), os tratamentos com RSV e VPA não alteraram significativamente os níveis de cDNA de PSD95 (Controle: $1,05 \pm 0,17$, RSV: $1,24 \pm 0,08$, VPA: $1,82 \pm 0,37$, VPA+RSV: $1,46 \pm 0,49$, $n=4$). As figura 7D e 7E mostram dados dos níveis proteicos para a proteína PSD95 no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo, respectivamente. No CPFm (figura 7D), os níveis proteicos de PSD95 no grupo VPA+RSV apresentam uma tendência de diminuição (Controle: $1 \pm 0,18$, RSV: $1,11 \pm 0,21$, VPA: $1,48 \pm 0,25$, VPA+RSV: $0,73 \pm 0,17$, $n=4$; ANOVA de duas vias, p-valor para a interação VPA*RSV = $0,056$; pós-teste LSD: VPA-VPA+RSV: $p=0,023$). No hipocampo (figura 7E), os níveis proteicos de PSD95 são similares nos quatro grupos (Controle: $1 \pm 0,25$, RSV: $1,32 \pm 0,08$, VPA: $1,08 \pm 0,08$, VPA+RSV: $1,23 \pm 0,3$, $n=4$).

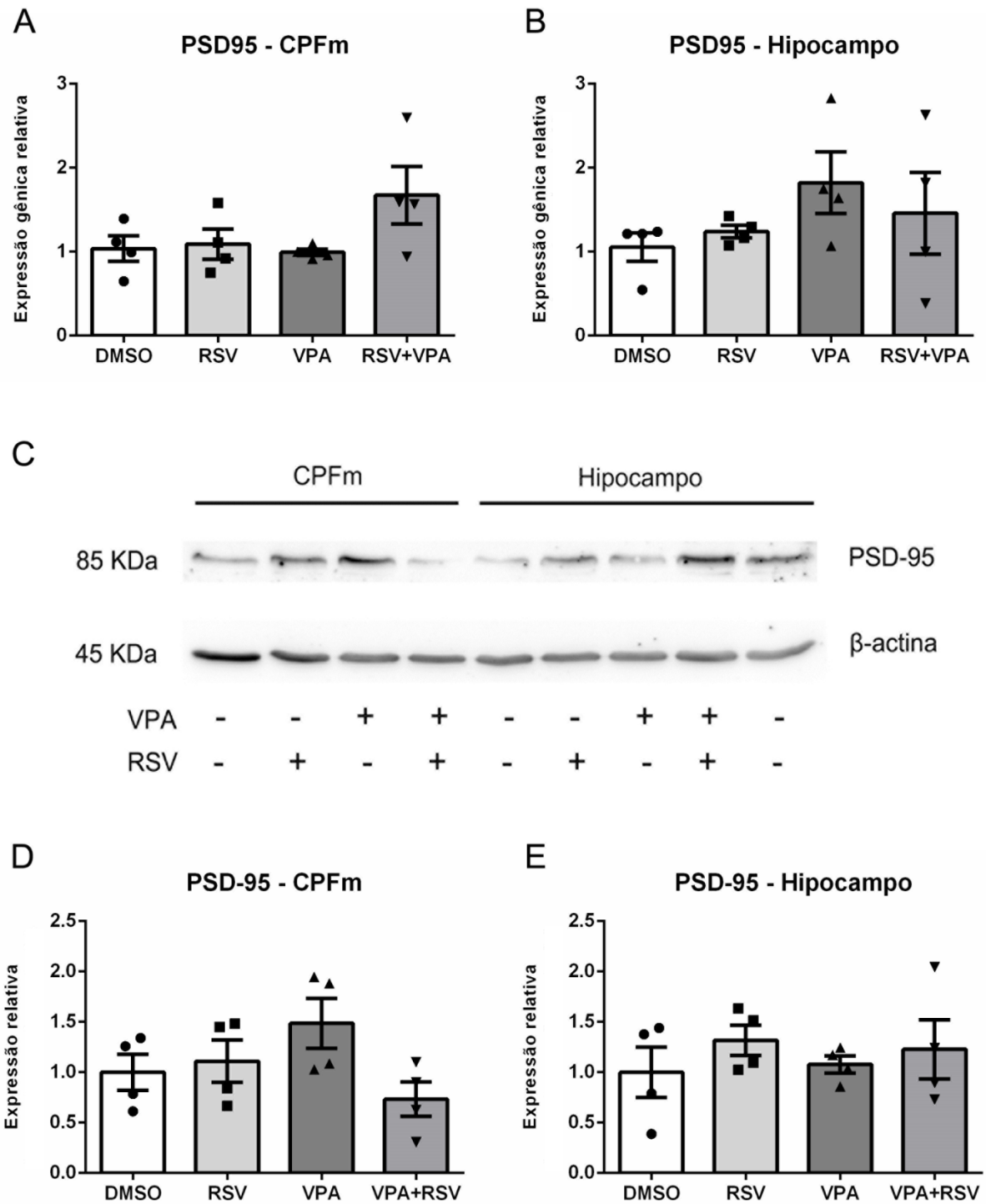


Figura 7. Níveis de expressão gênica relativa (A-B) e proteicos (D-E) da proteína pós-sináptica PSD95 no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo. Em C, imagem representativa de uma membrana de *western blot*. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

5.2 Gefirina

Na região do CPFm (figura 8A), o tratamento com VPA e RSV elevou significativamente os níveis de RNAm desse grupo (Controle: $1,06 \pm 0,22$, $n=4$, RSV: $1,27 \pm 0,32$, $n=3$, VPA: $1,13 \pm 0,05$, $n=4$, VPA+RSV: $5,35 \pm 1,6$, $n=3$; ANOVA de duas vias - efeito do VPA: $F=8.87$, $p=0.014$, efeito do RSV: $F=10.082$, $p=0.01$; efeito da interação VPA*RSV: $F=8.238$, $p=0.016$, pós-teste LSD: RSV-VPA+RSV: $p=0.003$; VPA-VPA+RSV: $p=0.002$). No entanto, no hipocampo (figura 8B), essa elevação no grupo VPA+RSV dos níveis de RNAm para gefirina só é observada e estatisticamente significativa em relação ao grupo VPA (Controle: $1,01 \pm 0,06$, RSV: $1,12 \pm 0,03$, VPA: $0,82 \pm 0,11$, VPA+RSV: $0,4 \pm 0,17$, $p<0,05$, $n=4$; ANOVA de duas vias - efeito da interação VPA*RSV: $F=4.872$, $p=0.048$, pós-teste LSD: VPA-VPA+RSV: $p=0.002$). Além disso, um efeito significativo do RSV foi demonstrado, levando à aumento dos níveis de RNAm para gefirina (ANOVA de duas vias - efeito do RSV: $F=10.589$, $p=0.007$). No entanto, no CPFm (figura 8D) os níveis proteicos no grupo VPA+RSV permaneceram similares àqueles encontrados no grupo Controle e RSV (Controle: $1 \pm 0,25$, RSV: $1,02 \pm 0,11$, VPA: $1,41 \pm 0,23$, VPA+RSV: $1,03 \pm 0,26$, $n=4$). No hipocampo (figura 8E), também não foram encontradas mudanças significativas entre os grupos a nível proteico (Controle: $1 \pm 0,42$, $n=4$, RSV: $1,27 \pm 0,27$, $n=4$, VPA: $1,47 \pm 0,32$, $n=4$, VPA+RSV: $2,10 \pm 0,8$, $n=3$).

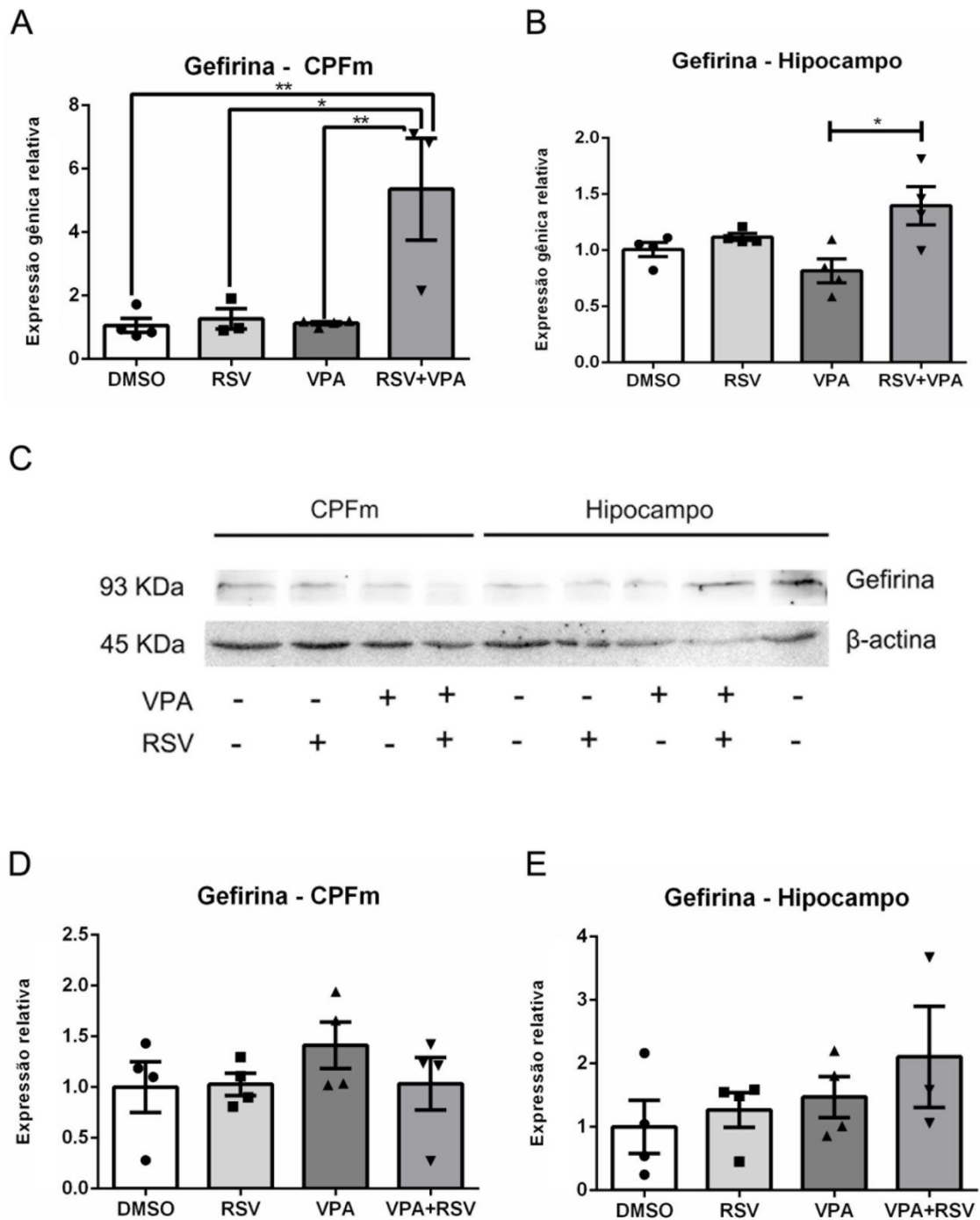


Figura 8. Níveis de expressão gênica relativa (**A-B**) e protéica (**D-E**) da proteína pós-sináptica gefirina no córtex pré-frontal medial (esquerda) e no hipocampo (direita). **A.** níveis de cDNA para a gefirina significativamente elevados no grupo VPA+RSV em relação a todos os outros grupos estudados (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). **B.** o tratamento com resveratrol no grupo VPA+RSV elevou significativamente os níveis de cDNA para a gefirina apenas em relação a o grupo VPA (* $p < 0,05$). Em **C**, imagem representativa de uma membrana de *western blot*. Em **D-E**, níveis proteicos da gefirina no córtex pré-frontal medial (CPFm) e hipocampo. Os grupos experimentais estão organizados na ordem: Controle, RSV, VPA e VPA+RSV em todos os casos. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

5.3 Sinaptofisina

Entre os grupos não foram encontradas diferenças de expressão de RNAm para sinaptofisina nem em CPFm (Figura 9A; Controle: $1,06 \pm 0,21$, RSV: $0,96 \pm 0,17$, VPA: $0,89 \pm 0,09$, VPA+RSV: $1,25 \pm 0,19$, $n=4$) nem em hipocampo (Figura 9B; Figura 3B; Controle: $1,01 \pm 0,06$, RSV: $1,06 \pm 0,24$, VPA: $0,823 \pm 0,13$ $n=4$, VPA+RSV: $0,83 \pm 0,12$, $n=4$). Entretanto, uma tendência de aumento nos níveis proteicos da sinaptofisina no CPFm foi identificada nos grupos que receberam VPA (figura 9D; Controle: $1 \pm 0,06$, RSV: $1,11 \pm 0,13$, VPA: $1,3 \pm 0,25$, VPA+RSV: $1,53 \pm 0,26$ $n=5$; ANOVA de duas vias, Efeito do VPA: $F=3.517$, $p=0.079$). Enquanto isso, no hipocampo os valores permanecem similares entre os grupos (figura 9E; Controle: $1 \pm 0,24$, RSV: $0,89 \pm 0,17$, VPA: $1,1 \pm 0,3$, VPA+RSV: $0,9 \pm 0,04$, $n=5$).

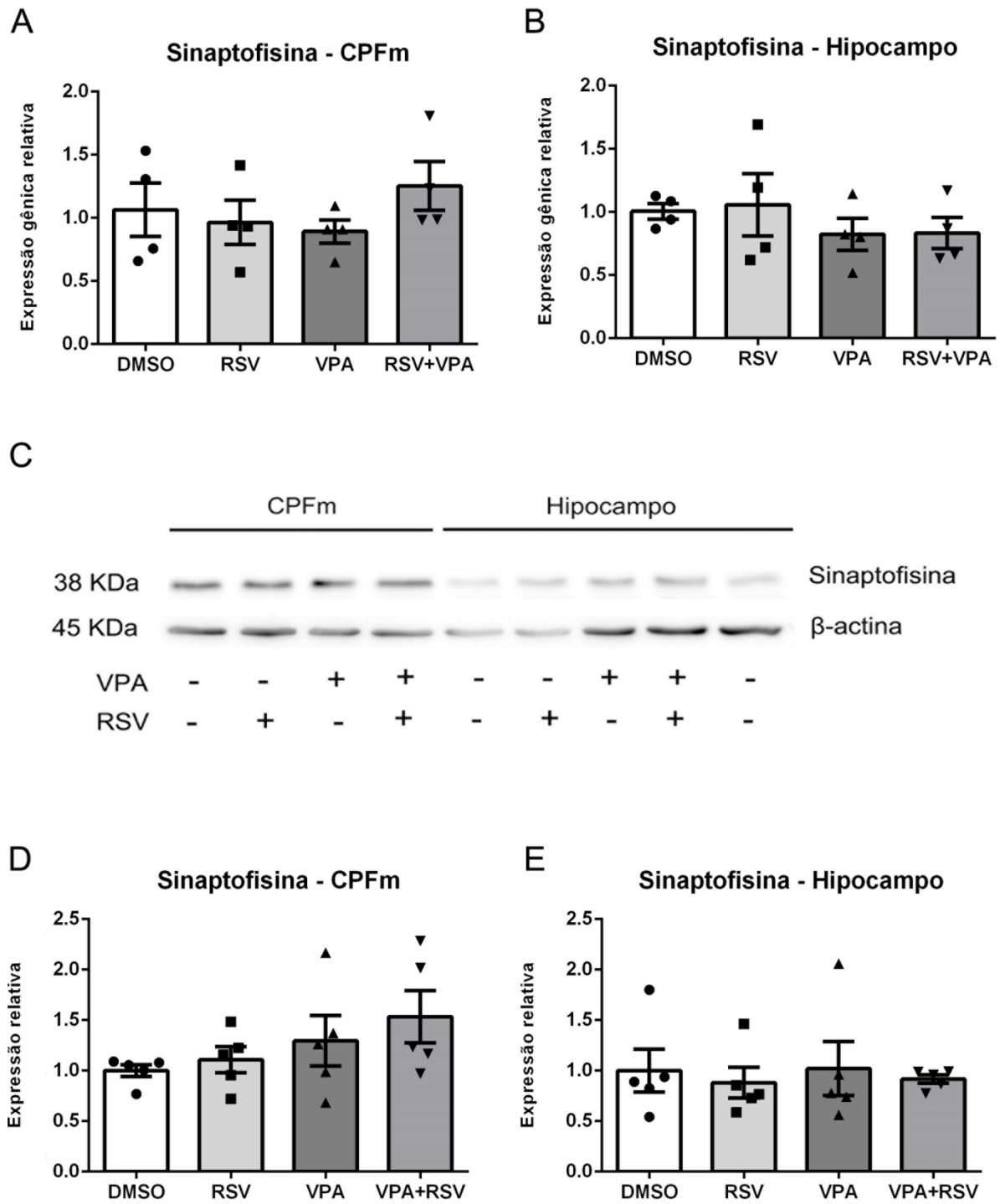


Figura 9. Níveis de expressão gênica relativa (A-B) e proteicos (D-E) da proteína pré-sináptica sinaptofisina no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo. Em C, imagem representativa de uma membrana de *western blot*. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tanto a nível de expressão gênica, quanto a nível proteico.

5.4 Neuroliquina-1

Foi observada tendência a alteração dos níveis de expressão gênica de neuroliquina-1 em córtex pré-frontal medial (figura 10A) nos grupos RSV e VPA (Controle: $1,02 \pm 0,11$, RSV: $0,56 \pm 0,12$, VPA: $0,67 \pm 0,13$, VPA+RSV: $0,66 \pm 0,17$, $n=4$; ANOVA de duas vias – efeito da interação VPA*RSV: $F=2.644$, $p=0.13$, pós-teste LSD: Controle-VPA: $p=0.096$; Controle-RSV: $p=0.035$), enquanto no hipocampo uma tendência de aumento na expressão no grupo VPA+RSV em comparação ao grupo RSV foi identificada (figura 10B; Controle: $1,01 \pm 0,11$, RSV: $0,5 \pm 0,13$, VPA: $0,73 \pm 0,14$, VPA+RSV: $1,21 \pm 0,4$, $n=4$; ANOVA de duas vias – efeito da interação VPA*RSV: $F=4.225$, $p=0.062$, pós-teste LSD: RSV-VPA+RSV: $p=0.066$). Dados de níveis proteicos não foram obtidos uma vez que o anticorpo adquirido não demonstrou reatividade quando empregado na técnica de *western blot*. Esta análise será feita posteriormente, com a aquisição de outro anticorpo.

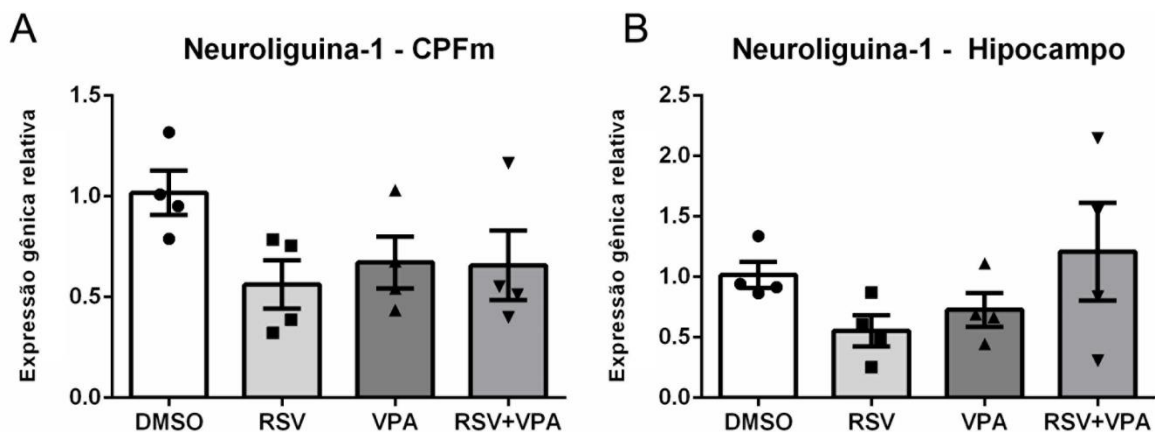


Figura 10. Níveis de expressão gênica relativa da proteína de organização sináptica neuroliquina-1 no córtex pré-frontal medial (CPFM) (A) e no hipocampo (B). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

5.5. Neuroliquina-2

Apesar da ausência de análise da expressão gênica para Neuroliquina-2 dos grupos RSV e VPA+RSV no córtex pré-frontal medial devido a curvas de amplificação tardias, é possível observar que os níveis de RNAm para essa proteína permanecem constantes entre o grupo Controle e o grupo VPA (figura 11A, Controle: $1,08 \pm 0,25$ $n=4$, VPA: $1,226 \pm 0,46$ $n=3$, teste-t de Student). No hipocampo, o tratamento combinado VPA+RSV tende a aumentar os níveis de expressão gênica

de Neuroligina-2 (figura 11B, Controle: $1,01 \pm 0,10$, RSV: $0,6 \pm 0,13$, VPA: $0,78 \pm 0,1$, VPA+RSV: $1,2 \pm 0,23$, $n=4$; ANOVA de duas vias – efeito da interação VPA*RSV: $F=2.644$, $p=0.13$, pós-teste LSD: RSV-VPA+RSV: $p=0.017$; VPA-VPA+RSV: $p=0.074$). Os níveis proteicos de neuroligina-2 no CPFm (figura 11D) permanecem constantes entre os grupos experimentais (Controle: $1 \pm 0,23$, RSV: $1,7 \pm 0,25$, VPA: $1,5 \pm 0,28$, VPA+RSV: $2,11 \pm 0,74$ $n=5$). No hipocampo, um efeito significativo do VPA foi detectado, levando a aumento da expressão proteica de neuroligina-2 (figura 11E, Controle: $1,06 \pm 0,13$, RSV: $1,46 \pm 0,2$, VPA: $1,76 \pm 0,38$, VPA+RSV: $2,08 \pm 0,33$ $n=5$; ANOVA de duas vias – efeito do VPA: $F=5.709$, $p=0.03$).

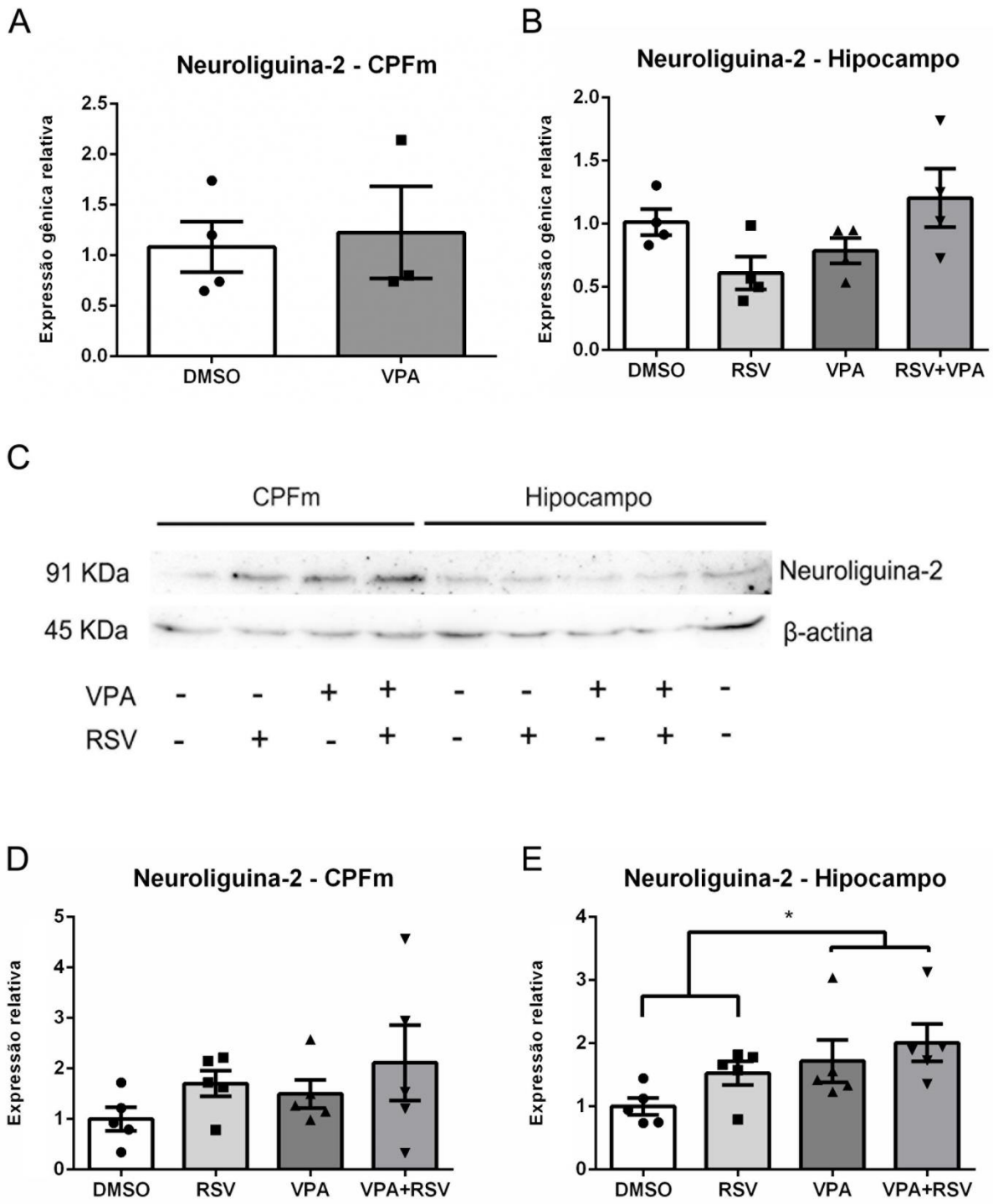


Figura 11. Níveis de expressão gênica relativa (A-B) e proteicos (D-E) da neuroligina-2 no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo. Em C, imagem representativa de uma membrana de *western blot*. No hipocampo, um efeito do VPA foi identificado levando a aumento da quantidade da proteína Nlgn-2. * $p < 0,05$

5.6 PSD95/Gefirina

A figura 8 é resultado da combinação das análises utilizando os dados de níveis de PSD95 e gefirina no córtex pré-frontal (figuras 12A e 12C) e no hipocampo (figuras 12B e 12D). Esta razão foi realizada com o intuito de verificar indícios sobre alterações no balanço excitatório-inibitório das regiões analisadas. Em termos de RNAm, esta razão não parece estar inalterada no CPFm, enquanto há uma tendência de efeito do VPA e RSV no hipocampo, além de aumento significativo para o grupo VPA em relação ao Controle, o qual é corrigido pelo RSV (figura 12b. Controle: $1,0 \pm 0,19$, RSV: $1,04 \pm 0,07$, VPA: $2,16 \pm 0,46$, VPA+RSV: $0,93 \pm 0,23$, $n=4$; ANOVA de duas vias – efeito do VPA: $F=3.59$, $p=0.082$; efeito do RSV: $F=4.597$, $p=0.053$; efeito da interação VPA*RSV: $F=5.193$, $p=0.042$, pós-teste LSD: Controle-VPA: $p=0.012$; VPA-VPA+RSV: $p=0.009$). Tanto no CPFm, quanto no hipocampo a razão PSD95/gefirina a nível proteico ocorre similarmente entre os grupos.

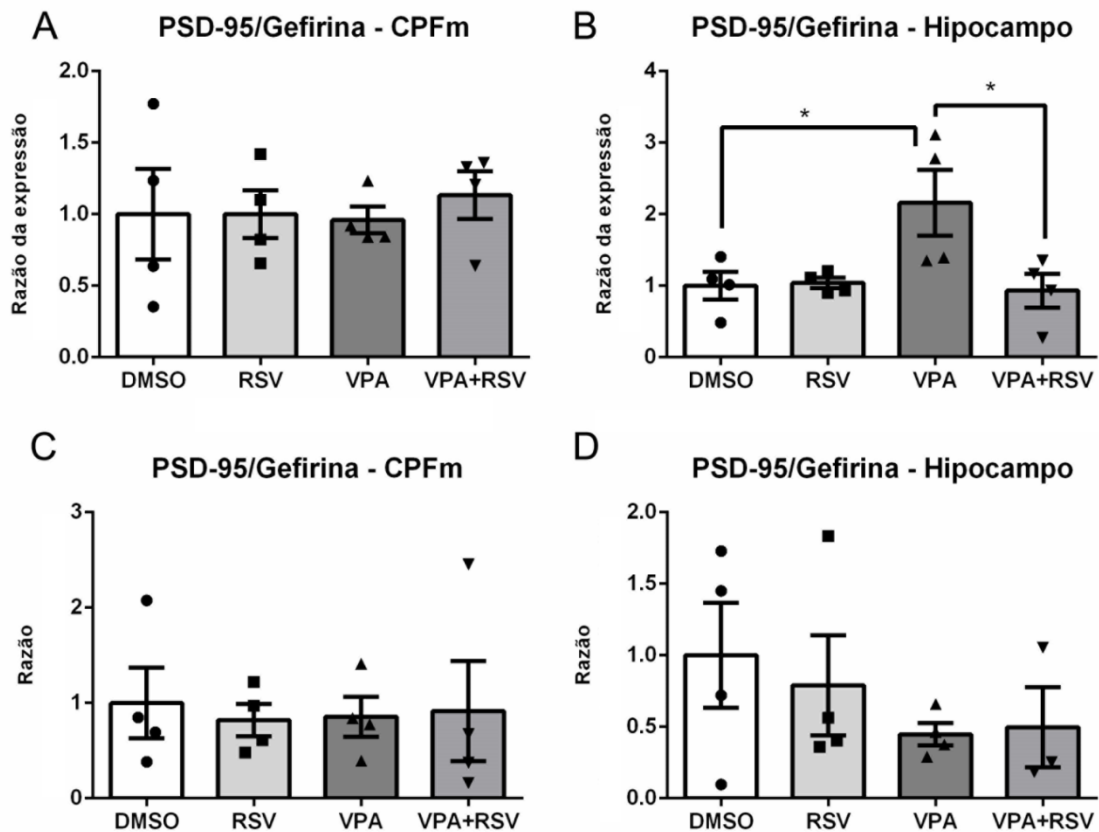


Figura 12. Razão entre os níveis gênicos da proteína PSD95 e da proteína gefirina (PSD95/Gefirina) no córtex pré-frontal medial (A) e no hipocampo (B) * $p<0.05$. Em (C) e (D) a razão entre a quantidade das proteínas PSD-95 e gefirina em CPFm e Hipocampo, respectivamente.

5.7. Correlações

A fim de entender o grau de relação entre as alterações na expressão gênica e nos níveis proteicos observados, foi calculado o nível de correlação linear utilizando o Software Graphpad. O r^2 para o coeficiente de correlação de Pearson foi determinado. Esse coeficiente indica quanto da variação total é comum aos elementos que constituem os pares analisados. O coeficiente r^2 varia entre 0 (zero) e 1 (um) e quanto mais próximo da unidade for o coeficiente de determinação, maior será a validade da regressão. Para estas análises, os diferentes dados dos animais de todos os grupos foram pareados de acordo com a ninhada do animal utilizada e comparados em pares, entre si.

5.7.1 Córtex pré-frontal medial

No córtex, as análises estatísticas apontaram uma correlação entre os níveis de RNAm para PSD95 e Gefirina, ambas proteínas sinápticas encontradas na pós-sinapse excitatória e na pós-sinapse inibitória, respectivamente (tabela 4, $p=0,0023$).

Correlações entre os níveis de RNAm no CPFm			
RNAm	r	r^2	p-valor
PSD-95 - Gefirina	0.7435	0.5528	0.0023 *
PSD-95 - Sinaptofisina	0.3822	0.1461	0.144
PSD-95 - Neuroliquina-1	-0.2261	0.0511	0.3998
Gefirina - Sinaptofisina	0.4859	0.2361	0.0781
Gefirina - Neuroliquina-1	-0.4051	0.1641	0.1508
Neuroliquina-1 - Sinaptofisina	-0.0864	0.0075	0.7504

Tabela 4. Correlações entre os níveis de RNA mensageiro no córtex pré-frontal medial. Os dados apontam uma correlação positiva entre os níveis de RNAm para PSD95 e Gefirina. * $p<0.05$

A análise de correlação entre os níveis proteicos no córtex pré-frontal medial está expressa na tabela 5. Note que realizamos também análises de correlação

entre as proteínas de interesse e o Controle endógeno β -actina, pois, como detalhado na discussão, suspeitávamos que β -actina não fosse um bom Controle de aplicação. Correlações entre os níveis de PSD95 e Gefirina ($p=0,005$), PSD95 e Sinaptofisina ($p=0,0152$), PSD95 e β -actina ($p= 0,0002$), PSD95 e Neuroliquina-2 ($p=0,0432$), Gefirina e β -actina ($p<0.0001$), Gefirina e Neuroliquina-2 ($p=0,0122$), Neuroliquina-2 e Sinaptofisina ($p=0,0044$) e β -actina e Sinaptofisina ($p<0.0001$) foram evidenciadas conforme a tabela 5.

Correlações entre os níveis de proteína no CPFm			
Proteínas	r	r ²	p-valor
PSD-95 - Gefirina	0.6014	0.3617	0.005 *
PSD-95 - Sinaptofisina	0.5344	0.2855	0.0152 *
PSD-95 - β -actina	0.7342	0.5391	0.0002 *
PSD-95 - Neuroliquina-2	0.4556	0.2076	0.0435 *
Gefirina - Sinaptofisina	0.3054	0.0933	0.1904
Gefirina - β -actina	0.765	0.5852	< 0.0001 *
Gefirina - Neuroliquina-2	0.549	0.3015	0.0122 *
β -actina - Neuroliquina-2	0.2003	0.0401	0.3972
Neuroliquina-2 - Sinaptofisina	0.6081	0.3698	0.0044 *
β -actina - Sinaptofisina	0.8411	0.7075	< 0.0001 *

Tabela 5. Correlações entre os níveis proteicos no córtex pré-frontal medial. Os dados apontam uma correlação positiva entre os níveis de proteína para PSD95-Gefirina, PSD95-Sinaptofisina, PSD95- β -actina, PSD95-Neuroliquina-2, Gefirina- β -actina, Gefirina-Neuroliquina-2, Neuroliquina-2-Sinaptofisina e β -actina -Sinaptofisina. * $p<0.05$

5.7.2 HIPOCAMPO

No hipocampo, as análises estatísticas apontaram uma correlação positiva entre os níveis de RNAm para Neuroliquina-1 e Neuroliquina-2 ($p= 0.0017$, tabela 6).

Correlações entre os níveis de RNAm no Hipocampo			
RNAm	r	r ²	p-valor
PSD-95 - Gefirina	0.1786	0.0319	0.5081
PSD-95 - Sinaptofisina	0.0680	0.0046	0.8024
PSD-95 - Neuroliquina-1	-0.2269	0.0515	0.3981
PSD-95 - Neuroliquina-2	-0.4008	0.1607	0.1239
Gefirina - Sinaptofisina	0.1956	0.0382	0.4679
Gefirina - Neuroliquina-1	0.2177	0.0474	0.4181
Gefirina - Neuroliquina-2	0.1732	0.0300	0.5211
Neuroliquina-1 - Neuroliquina-2	0.7185	0.5162	0.0017 *
Neuroliquina-1 - Sinaptofisina	0.2861	0.0819	0.2826
Neuroliquina-2 - Sinaptofisina	0.09	0.0081	0.7405

Tabela 6. Correlações entre os níveis de RNA mensageiro no hipocampo. Os dados apontam uma correlação positiva entre os níveis de RNAm para Neuroliquina-1-Neuroliquina-2. * $p<0.05$

A análise de correlação entre os níveis proteicos no hipocampo está expressa na tabela 7. Correlações positivas entre os níveis de Gefirina e Sinaptofisina ($p<0,0001$).

Correlações entre os níveis de proteína no Hipocampo			
Proteínas	r	r ²	p-valor
PSD-95 - Gefirina	-0.1631	0.0266	0.492
PSD-95 - Sinaptofisina	-0.3428	0.1175	0.1389
PSD-95 - β -actina	0.1317	0.0173	0.58
PSD-95 - Neuroligina-2	0.12	0.0144	0.6143
Gefirina - Sinaptofisina	0.8002	0.6404	< 0.0001 *
Gefirina - β -actina	-0.1903	0.0362	0.4351
Gefirina - Neuroligina-2	-0.2188	0.0479	0.354
β -actina - Neuroligina-2	-0.1406	0.0198	0.5658
Neuroligina-2 - Sinaptofisina	-0.0148	0.0002	0.9508
β -actina - Sinaptofisina	-0.0397	0.0016	0.868

Tabela 7. Correlações entre os níveis proteicos no hipocampo. Os dados apontam uma correlação positiva entre os níveis de proteína para Gefirina-Sinaptofisina. *p<0.05

6. DISCUSSÃO

Como visto nos resultados tanto VPA quanto RSV, quando administrados durante o período gestacional, são capazes de modular a expressão gênica e protéica de componentes sinápticos no córtex pré-frontal medial e no hipocampo dos filhotes machos com 30 dias de vida. Com o objetivo de facilitar a compreensão das relações entres estes resultados, a tabela 8 resume as alterações encontradas no modelo VPA (em comparação com o Grupo Controle) e as ações do RSV sobre os animais do modelo. Nela estão representados todos os dados estatisticamente significativos, além de tendências (p-valor <0.1). Os resultados com maior significado biológico serão discutidos a seguir.

Área do SNC	Proteína	Efeito no modelo VPA		Ação do RSV sobre o modelo VPA	
		qRT-PCR	WB	qRT-PCR	WB
CPFm	PSD-95	=	=	↑	↓
	Gefirina	=	=	↑*	=
	Sinaptofisina	=	↑	=	=
	Neuroliquina-1	↓	?	=	?
	Neuroliquina-2	=	=	?	=
	PSD-95/Gefirina	=	=	=	=
Hipocampo	PSD-95	=	=	=	=
	Gefirina	=	=	↑*	=
	Sinaptofisina	=	=	=	=
	Neuroliquina-1	=	?	=	?
	Neuroliquina-2	=	↑*	↑	=
	PSD-95/Gefirina	↑*	=	↓*	=

Tabela 8. Resumo dos resultados encontrados nas avaliações da expressão gênica e protéica neste trabalho. As conclusões do efeito no modelo VPA foram obtidas a partir da comparação dos animais do modelo com os animais do grupo Controle. Por sua vez, as conclusões sobre as ações do RSV sobre os animais do modelo derivam de comparações entre os grupos VPA e VPA+RSV . * p-valor<0.05. Os demais dados são tendências (p-valor<0.15). Dados do p-valor obtidos a partir de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey comparando os quatro grupos experimentais. qRT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real. WB: *Western blotting*.

6.1. Expressão protéica de PSD-95 tende a ser diminuída no CPFm pela exposição prenatal ao RSV no modelo VPA

Como anteriormente citado, o balanço entre excitação e inibição no córtex pré-frontal medial é implicado de maneira causal no Controle de comportamentos sociais em murinos (Yizhar et al., 2011). Através do uso de técnicas de optogenética, demonstrou-se que o predomínio da excitação sobre a inibição leva à diminuição com comportamento social, o qual pode ser normalizado tanto pela subsequente diminuição da excitação ou aumento correspondente na inibição (Yizhar et al., 2011).

Neste trabalho não encontramos alteração significativa da expressão gênica ou protéica de PSD-95 nos animais do modelo VPA, em nenhuma das regiões analisadas. Em 2013, análises similares do mesmo modelo demonstraram um aumento da quantidade da proteína PSD-95 tanto no hipocampo quanto em córtex total (Kim et al., 2013). Isto pode dever-se ao fato do referido trabalho utilizar animais da linhagem Sprague-Dale em vez da linhagem Wistar (utilizada neste trabalho de dissertação). Cabe ressaltar que tanto a metodologia, quanto a idade dos animais foi bastante parecida e esta dissertação utilizou um n de 4 animais provenientes de 4 ninhadas diferentes, enquanto Kim e colaboradores utilizaram um n de 3 (analisando 2 animais para cada uma das 3 ninhadas).

De toda forma, os neurônios do CPFm do grupo VPA possuem uma hiperconectividade e hiperplasticidade como avaliado por eletrofisiologia (Rinaldi et al., 2008b). Assim, a tendência de diminuição da quantidade da proteína PSD-95 mediada pelo RSV sobre animais do modelo VPA pode estar envolvida com a regularização do comportamento social presenciada nos animais deste grupo (Bambini-Junior et al., 2014). No entanto, outras análises fazem-se necessárias para confirmar essa reversão a nível de quantidade e função das sinapses.

Uma vez que o RNAm para PSD-95 possui tendência de aumento, como indicado pelo dado de qRT-PCR, é provável que esta ação do RSV esteja modulando a tradução e não diretamente a transcrição nos animais do grupo VPA+RSV. Este fato é de grande interesse, uma vez que muitas das proteínas da unidade pós-sináptica são sintetizadas localmente nos dendritos e mecanismos regulatórios dos níveis de tradução local, como a ativação das rotas de sinalização da mTOR/TSC, PTEN e Frmp estão alterados em pacientes com autismo (Bailey et

al., 2001; Tang et al., 2014) e modelos animais relacionados a este distúrbio (Auerbach et al., 2011; Lugo et al., 2014; Tang et al., 2014).

Alternativamente, a redução na quantidade da proteína PSD-95 no CPFm do grupo VPA+RSV pode ser mediada pelo aumento do catabolismo desta molécula. Um dos mecanismos essenciais para a sua degradação é a ubiquitinação, que em parte é mediada por UBEA3, uma proteína também já associada com casos de autismo (Yi et al., 2015).

6.2. Expressão gênica de gefirina é elevada tanto no CPFm quanto no hipocampo dos animais do modelo VPA expostos prenatalmente ao RSV

Um achado interessante do trabalho é que o RSV foi capaz de gerar uma elevação nos níveis de transcrito de gefirina no CPFm e no hipocampo dos animais do modelo VPA. Este poderia ser mais um ponto pelo qual o RSV restabelece o equilíbrio entre excitação/inibição, contribuindo para a melhora fenotípica evidenciada no comportamento social dos mesmos.

No entanto, não identificamos nenhuma alteração na quantidade da proteína gefirina nos animais do modelo VPA. Cabe ressaltar, no entanto, que a gefirina possui sua função altamente regulada por modificações pós-traducionais (Tyagarajan and Fritschy, 2014), e o estudo das mesmas poderia ser promissor para estender o entendimento sobre as alterações nas sinapses inibitórias dos animais do modelo VPA.

6.3. Expressão protéica de Nlgn-2 tende a elevar-se no hipocampo de animais do modelo VPA

Em acordo com o resultado no nível gênico para a gefirina, a quantidade de proteína Nlgn-2 possui tendência a elevar-se nos animais do modelo VPA. Isso pode indicar a tentativa de compensar o desequilíbrio entre excitação e inibição através de pelo menos estes dois mecanismos, aumento da expressão gênica da gefirina e elevação nos níveis de tradução da Nlgn-2. Interessantemente, reguladores da tradução da pós-sinapse, como as proteínas mTOR e PTEN, os quais já foram demonstradas alteradas em modelos e pacientes, são capazes de regular a tradução das neuroliginas (Gkogkas et al., 2013).

6.4. Expressão gênica de Nlgn-2 tende a elevar-se em animais do modelo VPA expostos ao RSV no período pré-natal

Em acordo com a hipótese de que animais do grupo VPA possuem um aumento da excitação em comparação aos animais do grupo Controle e que o RSV pode prevenir esta alteração, pelo menos parcialmente, os níveis gênicos de Nlgn-2 tendem a elevar-se tanto no hipocampo dos animais do grupo VPA+RSV.

Apesar desta mudança não refletir em nenhuma alteração significativa na quantidade de proteínas excitatórias, é possível que esse aumento influencie na disponibilidade de RNAm para a síntese local de proteínas próximas às sinapses, facilitando sua correta localização espacial e integração funcional (Chia et al., 2013). Sendo assim, estratégias experimentais que permitam avaliações de sítios mais específicos, como o uso de preparados de sinaptosomas contribuiriam para o entendimento dos resultados. Da mesma forma, uma investigação microscópica por imunofluorescência ou microscopia eletrônica possibilitaria a análise e quantificação das sinapses inibitórias aliado à identificação da proteína Nlgn-2 utilizando anticorpos.

6.5. A razão entre a expressão gênica de PSD-95 e Gefirina está aumentada no hipocampo dos animais do modelo VPA e é prevenida pela exposição dos animais do modelo ao RSV durante o período embrionário.

De maneira coerente com nossa hipótese, a análise da expressão gênica revelou que a razão entre RNAm para PSD-95 e para gefirina está aumentada no hipocampo dos animais VPA, o que é prevenido pela exposição prenatal ao RSV. Sendo assim esta é uma evidência direta para a alteração do equilíbrio excitação inibição no hipocampo do modelo VPA, e uma demonstração clara de que o RSV possui capacidade para contrapor as ações do VPA neste nível.

Mais análises se fazem necessárias para confirmar se esta prevenção também é percebida nos domínios funcional e de localização espacial e quantidade de sinapses envolvendo estas proteínas.

6.6. Não há alterações significativas nos níveis de sinaptofisina

De maneira surpreendente, nenhuma de nossas análises demonstrou alterações na quantidade de sinaptofisina, um marcador sináptico, seja a nível de RNAm ou de proteína. Entretanto identificamos uma tendência de aumento na proteína Sinaptofisina no CPFm dos animais expostos prenatalmente ao VPA. No estudo de 2013 já comentado anteriormente, Kim e colaboradores encontraram significativo aumento da expressão protéica de sinaptofisina no hipocampo e córtex dos animais do modelo VPA (Kim et al., 2013). Sendo assim, experimentos adicionais se fazem necessários para confirmar nossos dados e verificar a relação com os dados de Kim e colaboradores.

6.7. β -actina parece não ser um bom Controle de aplicação no CPFm

A partir das análises realizadas, surgiram dúvidas sobre a adequação do uso da β -actina como um Controle de aplicação. Embora seja muito utilizada em experimentos de *western blot*, podem haver variações significativas dependendo das condições experimentais analisadas (Dittmer and Dittmer, 2006).

Em nossos experimentos, todas as análises de *western blot* foram realizadas com a mesma quantidade de proteínas de cada amostra, o que resultou em uma coloração homogêna para o Ponceau aplicado à membrana. No entanto, constantemente, obtivemos diferenças entre as quantidades de β -actina entre os grupos, especialmente no CPFm (Figura 13).

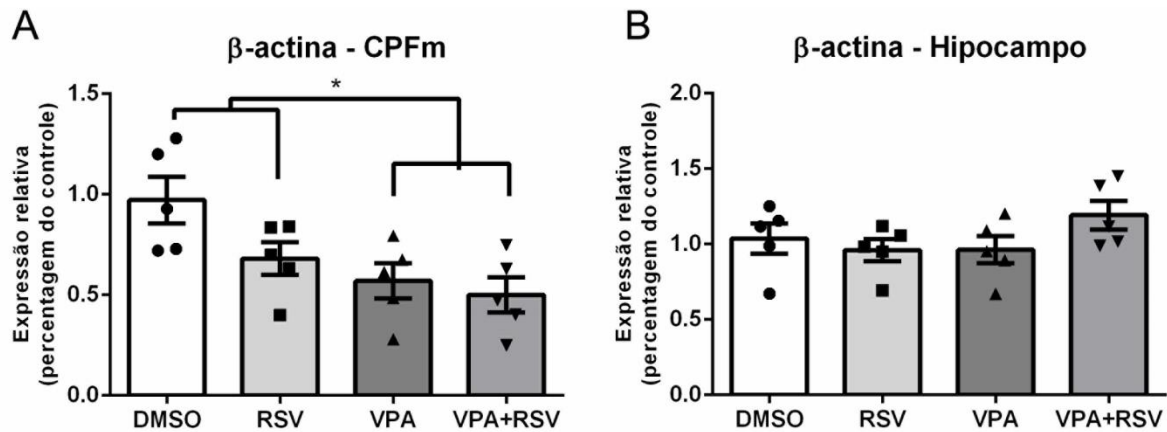


Figura 14. Quantificação dos resultados de western blot para a incubação com β -actina. Em **A**, é possível identificar uma redução significativa nos níveis de sua expressão no CPFm dos grupos que receberam VPA em comparação com o Controle, sugerindo que β -actina não é o Controle de aplicação adequado nesta região. * $p < 0,05$. Enquanto isso, no hipocampo (**B**), os níveis de expressão não variam significativamente entre os grupos.

Portanto, os dados encontrados no *Western blot* e reportados nesta dissertação devem ser encarados com cautela e os experimentos serão repetidos utilizando outra proteína como Controle de aplicação. Importaneamente, o dado mais saliente das análises, a diminuição da expressão proteica de PSD-95 no grupo VPA+RSV em comparação com o grupo VPA é mantido até mesmo quando utilizamos os dados absolutos de quantificação, sem a normalização pela β -actina (dados não mostrados).

Uma das explicações mais plausíveis para essa diferença na expressão proteica de β -actina no CPFm, é alteração no nível de espinhos dendríticos entre os grupos. Interessantemente, os valores absolutos quantificados para a β -actina são linearmente correlacionados com os valores absolutos para PSD-95 na mesma membrana ($r^2 = 0.5391$, $p = 0.0002$, Coeficiente de correlação linear de Pearson).

6.8. A expressão das proteínas analisadas é linearmente correlacionada uma à outra.

Através da correlação entre os valores relativos quantificados para RNAm e proteína dos mesmos animais, foi possível estabelecer correlações entre os níveis em nossos grupos experimentais.

Interessantemente, no CPFm os níveis de PSD-95 mostraram-se associados com os níveis de Gefirina, tanto a nível proteico ($r^2= 0.3617$, $p= 0.005$, Coeficiente de correlação linear de Pearson) quanto a nível gênico ($r^2= 0.5528$, $p= 0.0023$, Coeficiente de correlação linear de Pearson), demonstrando a existência de um mecanismo de manutenção do equilíbrio entre a produção destas proteínas, o que indica uma busca pelo equilíbrio entre excitação e inibição. De uma maneira similar, demonstrou-se uma associação entre os níveis de expressão gênica de Nlgn-1 e Nlgn-2 no hipocampo ($r^2= 0.5162$, $p= 0.0017$, Coeficiente de correlação linear de Pearson), o qual pode exercer uma função semelhante de busca do equilíbrio na excitabilidade neuronal.

Além disso, os dados demonstraram uma associação linear entre os níveis das proteínas PSD-95 e sinaptofisina no CPFm em nossos grupos experimentais ($r^2= 0.2855$, $p= 0.0152$, Coeficiente de correlação linear de Pearson), o que pode indicar a ocorrência de uma regulação no nível de sinapses excitatórias nessa região de acordo com o tratamento recebido prenatalmente.

De uma maneira antagônica, no hipocampo houve forte correlação linear entre os níveis das proteínas Gefirina e sinaptofisina ($r^2= 0.6404$, $p= < 0.0001$, Coeficiente de correlação linear de Pearson). Este pode ser um indicativo de que, nesta estrutura, as quantidades de sinapses inibitórias estão sendo ajustadas nos animais de acordo com o grupo experimental, buscando restabelecer o equilíbrio entre excitação e inibição.

6.9. A quantidade de RNAm não é proporcional à quantidade de proteínas.

Uma das observações que chama a atenção nos dados é que a quantidade de proteínas na maioria das vezes não acompanha os valores das quantidades de transcrito. Isto implica que mecanismos pós-transcricionais estão envolvidos no controle das quantidades de proteínas sinápticas nas condições analisadas. Como mencionado anteriormente, estes mecanismos podem ser diversos, como alterações no processamento dos RNAm, por exemplo através de micro RNAs (miRNAs), ou por modulação da síntese ou degradação proteicas, por exemplo através da ação direta ou indireta de VPA e RSV sobre mTOR/TSC, PTEN, Frmp e UBEA3. Em relação a isto é interessante o fato de que VPA modula os níveis de miRNAs que têm como alvo componentes da cascata da mTOR e Fmr1 (dados não publicados).

Infelizmente, como as análises ainda não estão completamente finalizadas, a correlação entre as quantidades de RNAm e proteína no mesmo animal ainda não são possíveis. Mas certamente, esta avaliação facilitará a compreensão dos resultados e a indicação de possíveis mecanismos. Também serão muito úteis as análises que possibilitem a avaliação mais específica dos níveis de RNAm e proteína nas proximidades das sinapses, como Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e Imunofluorescência.

7. CONCLUSÕES

Sendo assim, podemos concluir que diversas alterações em moléculas sinápticas envolvidas com excitação e inibição estão presentes no modelo VPA e algumas delas são corrigidas pela exposição subcrônica prenatal ao RSV. Isto poderia explicar o prejuízo na sociabilidade presente nos animais do modelo VPA e a capacidade preventiva exercida pelo RSV sobre este comportamento (Bambini-Junior et al., 2014).

Ademais, as correções mediadas pelo RSV são exercidas predominantemente ao nível proteico de proteínas excitatórias (como validado pela expressão de PSD-95) no CPFm e no nível gênico (para Gefirina) e proteico (para Nlgn-2) de proteínas inibitórias. Este fato é reforçado pelas correlações detectadas entre os níveis proteicos de PSD-95 e Sinaptofisina no CPFm e Gefirina e Sinaptofisina no Hipocampo, indicando que diferentes mecanismos de compensação da excitabilidade neuronal podem ocorrer nestas duas regiões.

A nível de análise técnica, este trabalho também contribuiu para a conclusão de que o uso dos Controles de aplicação deve ser avaliado caso a caso, de uma maneira dependente das condições experimentais e dos tecidos/tipos celulares avaliados, com risco de viéses na interpretação do resultado se este fator for menosprezado.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho estão:

- Completar o n experimental para as análises aqui reportadas, solucionando alguns problemas técnicos como as curvas de amplificação tardia para Nlgn-2 no CPFm. Nas análises que mostraram tendência, mais animais serão analisados para averiguar se a diferença é estatisticamente significativa;
- Repetir os experimentos de western blot utilizando outro Controle de aplicação para o CPFm;
- Realizar experimentos de imunofluorescência e co-localização dos pares de proteínas Sinaptofisina-PSD-95 e Sinaptofisina-Gefirina, como um parâmetro de quantificação do número de sinapses excitatórias e inibitórias. Os tecidos encontram-se coletados e a técnica está em fase de padronização para os anticorpos.
- Expandir as análises para outras regiões encefálicas importantes para o comportamento social e todos os comportamentos que forem prevenidos pelo RSV quando prenatalmente administrado nas ratas que receberam VPA. Uma avaliação comportamental completa dos animais dos mesmos 4 grupos experimentais aqui utilizados está em curso no laboratório, avaliando diversos fenótipos centrais e associados ao autismo. As regiões da amígdala, cerebelo e área somatossensorial primária dos animais avliados neste trabalho também foi removida e planejamos analisar estas regiões de acordo com os resultados dos testes comportamentais.
- Testar as ações de VPA e RSV *in vitro* em culturas neuronais;
- Estudar no desenvolvimento quais mecanismos poderiam desencadear as alterações percebidas nos animais jovens (30 dias de vida).

9. APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido primariamente devido ao aporte financeiro fornecido pelos projetos FIPE-HCPA 14-0367 e 14-0431. Além disso, foi apoiado pelo Edital Universal- CNPq 14/2013 nº 484145/2013-4 e por recursos do PROAP da PROPG-UFRGS, e os estudantes envolvidos com sua realização receberam bolsas de estudo do CNPq, CAPES ou PROPESQ-UFRGS.

10. REFERÊNCIAS

- Amaral, D.G., Schumann, C.M., and Nordahl, C.W. (2008). Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci.* 31, 137–145.
- APA (2013). Autism Spectrum Disorder, Diagnostic and statistical manual of mental disorders (American Psychiatric Publishing).
- Asperger, H. (1938). The psychically abnormal child. *Wien Klin Wochenschr.* 51, 1314–1317.
- Auerbach, B.D., Osterweil, E.K., and Bear, M.F. (2011). Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature* 480, 63–68.
- Bailey, D.B., Hatton, D.D., Skinner, M., and Mesibov, G. (2001). Autistic behavior, FMR1 protein, and developmental trajectories in young males with fragile X syndrome. *J. Autism Dev. Disord.* 31, 165–174.
- Baker, J.P. (2013). Autism at 70--redrawing the boundaries. *N. Engl. J. Med.* 369, 1089–1091.
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G.A., Moreira, J.C.F., Riesgo, R., and Gottfried, C. (2011). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res.* 1408, 8–16.
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., Nogueira Freire, V., Riesgo, R., and Gottfried, C. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci. Lett.* 583, 176–181.
- Bang, M.L., and Owczarek, S. (2013). A matter of balance: role of neurexin and neuroligin at the synapse. *Neurochem. Res.* 38, 1174–1189.
- Becker, M.M., Wagner, M.B., Bosa, C.A., Schmidt, C., Longo, D., Papaleo, C., and Riesgo, R.S. (2012). Translation and validation of Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) for autism diagnosis in Brazil. *Arq. Neuropsiquiatr.* 70, 185–190.
- Bourgeron, T. (2009). A synaptic trek to autism. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 231–234.
- Bourne, Y., and Marchot, P. (2014). The neuroligins and their ligands: from structure to function at the synapse. *J. Mol. Neurosci.* 53, 387–396.
- 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., et al. (2013). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res.* 1495, 52–60.

- Cao, F., Yin, A., Wen, G., Sheikh, A.M., Tauqeer, Z., Malik, M., Nagori, A., Schirripa, M., Schirripa, F., Merz, G., et al. (2012). Alteration of astrocytes and Wnt/ β -catenin signaling in the frontal cortex of autistic subjects. *J. Neuroinflammation* 9, 223.
- CDC (2014). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years, Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, Surveillance Summaries, .
- Chia, P.H., Li, P., and Shen, K. (2013). Cell biology in neuroscience: cellular and molecular mechanisms underlying presynapse formation. *J. Cell Biol.* 203, 11–22.
- Choi, G., and Ko, J. (2015). Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. *Exp. Mol. Med.* 47, e158.
- Cline, H. (2005). Synaptogenesis: a balancing act between excitation and inhibition. *Curr. Biol.* 15, R203–R205.
- Craven, S.E., and Bredt, D.S. (1998). PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell* 93, 495–498.
- Dean, C., Scholl, F.G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., and Scheiffele, P. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat. Neurosci.* 6, 708–716.
- Delorme, R., Ey, E., Toro, R., Leboyer, M., Gillberg, C., and Bourgeron, T. (2013). Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nat. Med.* 19, 685–694.
- Dittmer, A., and Dittmer, J. (2006). Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. *Electrophoresis* 27, 2844–2845.
- Ebert, D.H., and Greenberg, M.E. (2013). Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature* 493, 327–337.
- Felix-Ortiz, A.C., and Tye, K.M. (2014). Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. *J. Neurosci.* 34, 586–595.
- Fu, Z., Washbourne, P., Ortinski, P., and Vicini, S. (2003). Functional excitatory synapses in HEK293 cells expressing neuroligin and glutamate receptors. *J. Neurophysiol.* 90, 3950–3957.
- Gandal, M.J., Edgar, J.C., Ehrlichman, R.S., Mehta, M., Roberts, T.P.L., and Siegel, S.J. (2010). Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol. Psychiatry* 68, 1100–1106.
- Garber, K. (2007). Neuroscience. Autism's cause may reside in abnormalities at the synapse. *Science* 317, 190–191.
- Geschwind, D.H. (2009). Advances in autism. *Annu. Rev. Med.* 60, 367–380.

- Gilbert, M., Smith, J., Roskams, A.J., and Auld, V.J. (2001). Neuroligin 3 is a vertebrate gliotactin expressed in the olfactory ensheathing glia, a growth-promoting class of macroglia. *Glia* 34, 151–164.
- Gkogkas, C.G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D.B., Vasuta, C., Yee, S., Truitt, M., Dallaire, P., et al. (2013). Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493, 371–377.
- Gomperts, S.N. (1996). Clustering membrane proteins: It's all coming together with the PSD-95/SAP90 protein family. *Cell* 84, 659–662.
- Graf, E.R., Zhang, X., Jin, S.-X., Linhoff, M.W., and Craig, A.M. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119, 1013–1026.
- Harden, C.L. (2013). In utero valproate exposure and autism: long suspected, finally proven. *Epilepsy Curr.* 13, 282–284.
- Huguet, G., Ey, E., and Bourgeron, T. (2013). The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 14, 191–213.
- Ingram, J.L., Peckham, S.M., Tisdale, B., and Rodier, P.M. (2000). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 319–324.
- Kanner, L. (1943). Autistic Disturbances of Affective Contact. *Nerv. Child* 2, 217–250.
- Kelleher, R.J., and Bear, M.F. (2008). The autistic neuron: troubled translation? *Cell* 135, 401–406.
- Kenny, E.M., Cormican, P., Furlong, S., Heron, E., Kenny, G., Fahey, C., Kelleher, E., Ennis, S., Tropea, D., Anney, R., et al. (2014). Excess of rare novel loss-of-function variants in synaptic genes in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Mol. Psychiatry* 19, 872–879.
- Kim, K.C., Kim, P., Go, H.S., Choi, C.S., Park, J.H., Kim, H.J., Jeon, S.J., Dela Pena, I.C., Han, S.-H., Cheong, J.H., et al. (2013). Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *J. Neurochem.* 124, 832–843.
- Kneussel, M., and Betz, H. (2000). Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J. Physiol.* 525 Pt 1, 1–9.
- Kuhn, R. (2004). Eugen Bleuler's concepts of psychopathology. *Hist. Psychiatry* 15, 361–366.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

Lucchina, L., and Depino, A.M. (2014). Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. *Autism Res.* 7, 273–289.

Lugo, J.N., Smith, G.D., Arbuckle, E.P., White, J., Holley, A.J., Floruta, C.M., Ahmed, N., Gomez, M.C., and Okonkwo, O. (2014). Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins. *Front. Mol. Neurosci.* 7, 27.

Maćkowiak, M., Mordalska, P., and Wędzony, K. (2014). Neuroligins, synapse balance and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol. Rep.* 66, 830–835.

Markram, K., Rinaldi, T., La Mendola, D., Sandi, C., and Markram, H. (2008). Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 33, 901–912.

Miles, J.H. (2011). Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genet. Med.* 13, 278–294.

National Institute of Health (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (Washington (DC): National Academies Press),.

Pereira, A., Riesgo, R.S., and Wagner, M.B. (2008). Childhood autism: translation and validation of the Childhood Autism Rating Scale for use in Brazil. *J. Pediatr. (Rio J)*. 84, 487–494.

Pregno, G., Frola, E., Graziano, S., Patrizi, A., Bussolino, F., Arese, M., and Sassoè-Pognetto, M. (2013). Differential regulation of neurexin at glutamatergic and GABAergic synapses. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 35.

Rinaldi, T., Silberberg, G., and Markram, H. (2008a). Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. *Cereb. Cortex* 18, 763–770.

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

Rodier, P.M., Ingram, J.L., Tisdale, B., and Croog, V.J. (1997). Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod. Toxicol.* 11, 417–422.

Roulet, F.I., Lai, J.K.Y., and Foster, J.A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 36, 47–56.

Rudimar Riesgo, C.G. and M.B. (2013). *Clinical Approach in Autism: Management and Treatment*. In *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I*, M. Fitzgerald, ed. (InTech),.

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C.M., and Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA* 311, 1770–1777.

Schmitz, C., van Kooten, I.A.J., Hof, P.R., van Engeland, H., Patterson, P.H., and Steinbusch, H.W.M. (2005). Autism: neuropathology, alterations of the GABAergic system, and animal models. *Int. Rev. Neurobiol.* 71, 1–26.

Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., and Przewlocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 33, 728–740.

Sheng, M., and Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.

Snijders, T.M., Milivojevic, B., and Kemner, C. (2013). Atypical excitation-inhibition balance in autism captured by the gamma response to contextual modulation. *NeuroImage. Clin.* 3, 65–72.

Van Spronsen, M., and Hoogenraad, C.C. (2010). Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 10, 207–214.

Südhof, T.C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 455, 903–911.

Supekar, K., Uddin, L.Q., Khouzam, A., Phillips, J., Gaillard, W.D., Kenworthy, L.E., Yerys, B.E., Vaidya, C.J., and Menon, V. (2013). Brain hyperconnectivity in children with autism and its links to social deficits. *Cell Rep.* 5, 738–747.

Suzuki, K., Sugihara, G., Ouchi, Y., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Takebayashi, K., Yoshihara, Y., Omata, K., Matsumoto, K., Tsuchiya, K.J., et al. (2013). Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry* 70, 49–58.

Tang, G., Gudsnuk, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M.L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M.S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., et al. (2014). Loss of mTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits. *Neuron* 83, 1131–1143.

Tyagarajan, S.K., and Fritschy, J.-M. (2014). Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 141–156.

Tyagarajan, S.K., Ghosh, H., Yévenes, G.E., Nikonenko, I., Ebeling, C., Schwerdel, C., Sidler, C., Zeilhofer, H.U., Gerrits, B., Müller, D., et al. (2011). Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3beta-dependent phosphorylation of gephyrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 379–384.

Voineagu, I., Wang, X., Johnston, P., Lowe, J.K., Tian, Y., Horvath, S., Mill, J., Cantor, R.M., Blencowe, B.J., and Geschwind, D.H. (2011). Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* 474, 380–384.

Weintraub, K. (2011). The prevalence puzzle: Autism counts. *Nature* 479, 22–24.

Williams, S.C.P. (2012). Genetics: Searching for answers. *Nature* 491, S4–S6.

Yasuda, Y., Hashimoto, R., Yamamori, H., Ohi, K., Fukumoto, M., Umeda-Yano, S., Mohri, I., Ito, A., Taniike, M., and Takeda, M. (2011). Gene expression analysis in lymphoblasts derived from patients with autism spectrum disorder. *Mol. Autism* 2, 9.

Yi, J.J., Berrios, J., Newbern, J.M., Snider, W.D., Philpot, B.D., Hahn, K.M., and Zylka, M.J. (2015). An Autism-Linked Mutation Disables Phosphorylation Control of UBE3A. *Cell*.

Yizhar, O., Fenno, L.E., Prigge, M., Schneider, F., Davidson, T.J., O'Shea, D.J., Sohal, V.S., Goshen, I., Finkelstein, J., Paz, J.T., et al. (2011). Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477, 171–178.

Yu, W., Jiang, M., Miralles, C.P., Li, R.-W., Chen, G., and de Blas, A.L. (2007). Gephyrin clustering is required for the stability of GABAergic synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* 36, 484–500.

Zikopoulos, B., and Barbas, H. (2010). Changes in prefrontal axons may disrupt the network in autism. *J. Neurosci.* 30, 14595–14609.

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