



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

TAYLOR GONCHOROSKI

**MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-
NATAL AO ÁCIDO VALPROICO: EFEITOS SOBRE NEURÔNIOS E GLIA DE
GÂNGLIOS MIOENTÉRICOS**

PORTO ALEGRE

2017

TAYLOR GONCHOROSKI

**MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-
NATAL AO ÁCIDO VALPROICO: EFEITOS SOBRE NEURÔNIOS E GLIA DE
GÂNGLIOS MIOENTÉRICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Neurociências, no
Curso de Pós-Graduação em Neurociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Gottfried

Co-orientadora: Profa. Dra. Patricia Castelucci

PORTO ALEGRE

2017

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Daiane, por ter feito o possível e o impossível por mim e por meus irmãos, e pelo amor incondicional.

Ao Thiago, ser humano raríssimo e companheiro de todas as horas, pela atenção, carinho, entendimento e pelo amor.

Ao PPGNeuro, por possibilitar muito aprendizado e muitos amigos ao longo de uma jornada de (mais de) dois anos, e pelo tratamento humano e acolhedor recebido dos professores e outros funcionários.

À minha orientadora, Carmem, a qual não tenho como agradecer devidamente, por toda a compreensão e, mesmo em momentos difíceis, tratamento humano e respeitoso, indo muito além das atribuições técnicas de uma orientadora.

Aos meus amigos, aqueles que fazem valer a pena ser um primata social.

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por prejuízos na comunicação e interação social, assim como por comportamentos repetitivos. O TEA pode apresentar diversas comorbidades, como alterações gastrointestinais – incluindo constipação crônica, refluxo gastroesofageal, doença celíaca e cólicas intestinais. A etiologia do TEA ainda é desconhecida, mas pode envolver alterações genéticas e a fatores de risco ambientais durante a gestação, como a exposição ao ácido valproico (VPA). Dessa forma, a exposição embrionária ao VPA tornou-se uma ferramenta confiável para a indução de alterações do tipo autista em roedores. O presente estudo teve como objetivo avaliar alterações no sistema nervoso entérico (SNE) de animais expostos ao VPA durante a gestação. Para isso, ratas Wistar prenhes receberam uma única dose (injeção intraperitoneal) de 600 mg/kg de VPA ou solução fisiológica (salina) no dia embrionário 12,5 (E12,5). A prole de machos, com 30 dias de vida pós-natal, sofreu eutanásia e então removeu-se o íleo, que passou por delaminação. No plexo mioentérico ileal foram avaliados por imunofluorescência, neurônios totais (HuC/D⁺), neurônios excitatórios (ChAT⁺), neurônios inibitórios (NOS⁺) e células gliais (GFAP⁺). A análise apresentou menor densidade neuronal nos gânglios mioentéricos ileais no grupo VPA ($p < 0,05$); área ganglionar semelhante; mesmo perfil de densidade e corpo celular para neurônios inibitórios; menor densidade de neurônios excitatórios com maior área do corpo celular ($p < 0,05$) e aumento no número de células gliais em 2,3 vezes ($p < 0,001$). Dessa forma, os resultados do trabalho mostram importantes alterações neurogлияis no plexo mioentérico ileal mediadas pela exposição pré-natal ao VPA, abrindo novos caminhos ao entendimento da fisiopatologia do TEA.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by social interaction and communication deficits and repetitive behavior. The ASD may present several comorbidities, as gastrointestinal alterations – including chronic constipation, gastroesophageal reflux, celiac disease and intestinal cramps. The ASD etiology might be related to genetic alteration and environmental risk factors during pregnancy, as exposure to valproic acid (VPA), which became a reliable tool for induce autism-like alterations in rodents. The present study aimed to evaluate alterations in enteric nervous system (ENS) in an animal model of ASD prenatally exposed to VPA. Pregnant Wistar females received a single intraperitoneal injection of 600 mg/kg VPA or physiological saline (Control) on embryonic day 12.5 (E12.5). The 30 days old male offspring were euthanized by perfusion, and the ileum was removed and delaminated, followed by ileal myenteric ganglia (IMG) evaluation of total neurons (HuC/D⁺); excitatory neurons (ChAT⁺); inhibitory neurons (NOS⁺) and glial cells (GFAP⁺). The results showed less total neuronal density ($p < 0.05$); no difference in ganglionic area; no difference in the inhibitory neurons population (density and body area); decreased neuronal density and increased body area of excitatory neurons ($p < 0.05$) and 2.3 times increased in the number of glial cells ($p < 0.001$). In conclusion, our results show important neuron-glia alterations in IMG mediated by prenatal exposure to VPA, opening new clues in the understanding of ASD pathophysiology.

LISTA DE ABREVIATURAS

TEA - Transtorno do Espectro Autista.

FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, Food & Drug Administration).

CDC - Centro para o Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, Centers for Disease Control and Prevention)

ABA - Análise Comportamental Aplicada (do inglês, Applied Behavior Analysis)

TEACCH- Tratamento e Educação para TEA e Crianças com Deficiências relacionadas à Comunicação (do inglês, Treatment and Educational of Autistic and related Communication-handicapped Children)

CPF - Córtex Pré-Frontal

VPA- Ácido Valproico (do inglês, valproic acid).

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (do inglês Brain-Derived Neurotrophic Factor)

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SNC - Sistema Nervoso Central

SNE - Sistema Nervoso Entérico

NOS - Óxido Nítrico Sintase (do inglês, Nitric Oxide Synthase)

NO - Óxido Nítrico (do inglês, nitric oxide)

ATP - Adenosina Trifosfato

CGE - Células Gliais Entéricas

GFAP - Proteína Ácida Fibrilar Glial (do inglês, Glial Fibrillary Acidic Protein)

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B (do inglês, Nuclear Factor kappa B)

ChAT - Acetilcolina Transferase (do inglês, Choline Acetyltransferase)

Cx43 - Conexina 43

PPA - Ácido Propiônico (do inglês, Propionic Acid)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVO GERAL	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 CAPÍTULO I – MANUSCRITO	
NEURON-GLIA ALTERATION IN ENTERIC NERVOUS SYSTEM FROM AUTISM	
MODEL INDUCED BY PRENATAL EXPOSURE TO VALPROIC ACID	13
ABSTRACT	15
INTRODUCTION	16
MATERIALS & METHODS	18
Animals	18
Tissue preparation	18
Immunohistochemistry analysis	19
Statistical analysis	20
RESULTS	21
DISCUSSION	21
REFERENCES	23
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é parte de um grupo de transtornos do neurodesenvolvimento que apresenta alta prevalência na população (Mayes et al., 2014). Estudos recentes do Centro para o Controle e Prevenção de Doenças (CDC) revelaram que a prevalência de TEA é um para 68 em crianças de oito anos nos Estados Unidos da América (EUA) (John Doe & Jane Smith, 2013). Embora exista certa escassez de estudos epidemiológicos no Brasil, estudos pilotos realizados na cidade de Atibaia, analisando 1470 crianças de até 15 anos encontrou uma prevalência de aproximadamente 0,3% (Paula, Ribeiro, Fombonne, & Mercadante, 2011). Tal índice pode se dar pela falta de estudos de prevalência em diferentes regiões do país, assim como pela pouca conscientização a respeito do TEA por parte da população e profissionais locais, levando a registros inadequados e diagnósticos equivocados (Baio, 2008).

Atualmente há um aumento na prevalência de autismo na população, podendo dever-se, em parte, às mudanças nos critérios diagnósticos, gerando uma migração de indivíduos com outros transtornos para o TEA. Somente essa migração, entretanto, não é capaz de explicar totalmente o aumento visto nos últimos estudos (Fombonne et al., 2009), sendo os fatores ambientais possíveis responsáveis pelos aumentos observados na incidência do autismo (Bryson et al., 2003; Schneider & Przewlocki, 2005).

A palavra “autismo” vem do prefixo grego autós (αὐτός, significando "auto"), acrescido do sufixo -ismo (indicando um “estado”), tendo sido utilizada pela primeira vez em 1911 pelo psiquiatra suíço Paul Eugen Bleuler, ao descrever pacientes com esquizofrenia (Bleuler, 1911). Em 1938, essa terminologia foi utilizada por Hans Asperger em uma conferência em Viena, no Hospital Johns Hopkins, onde foram descritas características baseadas em seus estudos de caso (Asperger, 1938). O primeiro relato detalhado de pacientes com autismo foi publicado em 1943 por Leo Kanner, definindo como características presentes nesses pacientes a “solidão autista” e a “obsessiva insistência na preservação dos hábitos” (Kanner, 1943).

A etiologia do TEA é desconhecida, assim como possíveis biomarcadores,

desafiando pesquisadores a investigar quais alterações poderiam desencadear o TEA (Wing & Potter, 2002). Embora as alterações comportamentais no TEA sejam diversas, dois principais prejuízos comportamentais são utilizados para o diagnóstico, com diferentes níveis de expressão: padrões restritos de comportamentos ou interesses e prejuízos na comunicação e interação social (American Psychiatric Association, 2013).

Tratando-se de um transtorno multifatorial, o TEA apresenta fatores genéticos e ambientais que contribuem para sua etiologia, sendo o fator genético altamente variável dentre os indivíduos com o transtorno: mais de mil genes já associados com o TEA não são suficientes para explicar 25% dos casos (Gottfried & Bambini-Junior, 2013; Miles, 2011). De fato, o TEA é um transtorno tão heterogêneo, reunindo características tão distintas que muito raramente dois indivíduos compartilham o mesmo conjunto de sintomas (Gadia et al., 2004; Rapin & Tuchman, 2008). Podem acompanhar o diagnóstico de TEA alguns sintomas associados ao transtorno, como presença de comportamento agressivo, ansiedade, depressão, déficits cognitivos, crises epiléticas, hipersensibilidade a estímulos táteis, sonoros e luminosos, distúrbios do sono, disfunções do sistema imune e alterações gastrointestinais (Geschwind, 2009). Dessa forma, torna-se fundamental o estudo de como os fatores de risco ambientais durante o período gestacional podem desencadear alterações na vida pós-natal, sendo a ativação imune materna e a exposição a fatores teratogênicos os mais associados com uma elevação no risco de diagnóstico do TEA (Arndt, Stodgell, & Rodier, 2005; Bauman et al., 2014; Miyazaki, Narita, & Narita, 2005; Roullet, Wollaston, deCatanzaro, & Foster, 2010).

Considerando que não há tratamento específico e eficaz para o TEA, a abordagem clínica padrão envolve uma equipe interdisciplinar de profissionais voltados à saúde associada ao uso de fármacos buscando amenizar aspectos específicos da sintomatologia do autismo (Riesgo, 2013). Os únicos medicamentos aprovados para uso no autismo pelo FDA (do inglês Food and Drug Administration – USA) são os antipsicóticos atípicos risperidona e aripiprazol, que têm como alvo o comportamento agressivo presente em alguns pacientes, entretanto os pacientes com TEA também podem utilizar medicamentos para controlar alterações de humor, transtornos gastrointestinais e outras comorbidades (Riesgo, 2013; Tsujino et al., 2007). Terapias comportamentais, como a ABA (do inglês Applied Behavior Analysis) e o TEACCH

(do inglês Treatment and Educational of Autistic related Communication-handicapped Children) são altamente indicadas para os pacientes diagnosticados com TEA (Riesgo, 2013).

Ainda que em parte obscura a relação de alterações encefálicas no TEA e os sintomas que definem o transtorno, muitos estudos têm como foco o córtex pré-frontal (CPF), com estudos relatando um aumento de 67% no número de neurônios em encéfalos de pacientes com autismo (Courchesne et al., 2001). Além disso, há consistentes alterações de conectividade, como a hipoconectividade a longa distância entre córtices frontal e temporal (Just et al., 2004; Koshino et al., 2005; Villalobos et al., 2005) e a hiperconectividade local no CPF (Courchesne and Pierce, 2005). Ainda, há alterações funcionais e genéticas cerebelares (Aldinger et al., 2012; Tan et al., 2010), alterações em estruturas límbicas, como um aumento no tamanho hipocampal e alterações de tamanho na amígdala (Groen et al., 2010), alterações nos núcleos da base e no estriado (Langen et al., 2007; Shafritz et al., 2008).

Valproato de sódio e o modelo de autismo

Estudos epidemiológicos indicam que o uso de substâncias teratogênicas durante o primeiro trimestre de gestação, um período crítico para o neurodesenvolvimento, poderia estar relacionado com o desencadeamento do autismo, destacando-se o ácido valproico (VPA, do inglês Valproic Acid) (Rouillet et al., 2013) e a talidomida (Imai et al., 2014). Cerca de 30% dos indivíduos expostos à talidomida durante o período gestacional, especialmente entre os dias 20 e 24, desenvolvem TEA (Miller & Stromland, 1999). A talidomida, entretanto, apresenta diferentes efeitos em primatas e em roedores, sendo que em primatas pode gerar anomalias nos membros. Já o VPA induz alterações similares tanto em roedores, quanto em humanos (Gottfried et al., 2013). Partindo destas informações a embriologista Patricia Rodier estabeleceu, pela primeira vez, em 1997, um modelo animal para o estudo do autismo, induzido farmacologicamente pela exposição pré-natal ao VPA (Rodier et al., 1997).

O modelo de autismo induzido por VPA mostrou-se, desde seu estabelecimento, capaz de mimetizar alterações típicas do TEA, não somente as alterações comportamentais, mas também alterações em estruturas neurais e encefálicas, na conectividade e no balanço excitatório-inibitório, e ainda alterações em nível

molecular (Christensen et al., 2013; Bambini-Junior et al., 2011; Kataoka et al., 2013; Schneider & Przewłocki, 2005; Banerjee et al., 2013; Bristot Silvestrin et al., 2013; Rouillet et al., 2010). Com relação às alterações comportamentais, o modelo VPA exhibe prejuízo em comportamento social, incluindo prejuízo em iniciar uma interação social. Ratos expostos ao VPA demonstram o mesmo interesse em explorar um objeto ou outro animal, enquanto um rato normal escolhe passar mais tempo socializando (Bambini-Junior et al., 2011). Além disso, o modelo VPA apresenta outras alterações comportamentais comparáveis às presentes em humanos, incluindo o comprometimento do ritmo circadiano, a maior rigidez comportamental, e comportamentos repetitivos (Tsujino et al., 2007; Bambini-Junior et al., 2011).

Alterações anatômicas e celulares desencadeadas no TEA também são, em grande parte, mimetizadas pelo modelo VPA, incluindo uma desregulação do sistema serotoninérgico, considerada um possível mecanismo na patofisiologia do autismo. A serotonina, associada com o controle das emoções e do humor, é parte de um grupo de neurotransmissores chamados “monoaminas” e é encontrada em níveis elevados na corrente sanguínea de pacientes com autismo (Anderson et al., 1990). No modelo VPA, foram encontradas diversas alterações no sistema monoaminérgico, incluindo elevados níveis de monoaminas no encéfalo e na corrente sanguínea, presença de neurônios serotoninérgicos anormais e diminuição de 46% nos níveis de serotonina no hipocampo (Narita et al., 2002; Tsujino et al., 2007; Miyazaki et al., 2005). A diminuição da serotonina hipocampal poderia refletir em uma alteração na sociabilidade, já que o hipocampo está ativado durante comportamentos sociais (Dufour-Rainfray et al., 2010).

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), envolvido na regulação e plasticidade neuronais, também encontra-se elevado na corrente sanguínea de pacientes com autismo. Em animais VPA há redução da expressão de BDNF cortical, acompanhada por mudanças comportamentais, como prejuízo na discriminação olfatória. Embora necessite de mais investigação, é possível que o BDNF tenha um papel no desenvolvimento de comportamentos do tipo do autismo, com a redução na expressão provavelmente contribuindo um desenvolvimento sináptico alterado (Nelson et al., 2001; Kolozsi et al., 2009). Outra molécula envolvida no desenvolvimento sináptico, a neuroligina, é encontrada em níveis alterados em pacientes com autismo e no modelo VPA. Camundongos VPA apresentam significativa redução na expressão de

neurologina-3 no córtex somatossensorial e nas regiões hipocâmpais CA1 e giro denteado (Kolozsi et al., 2009). Ainda, alterações comportamentais encontradas em camundongos incapazes de expressar a neurologina-3 são similares às encontradas em ratos VPA, incluindo prejuízos na resposta à novidade social (Kolozsi et al., 2009; Bambini-Junior et al., 2011).

Trato gastrointestinal e o TEA

Estudos da última década têm demonstrado importante interação cruzada entre o sistema nervoso periférico (SNP) e o sistema nervoso central (SNC) no TEA, com o sistema nervoso entérico (SNE) fazendo parte deste cenário (Ashwood et al., 2011; M. D. Bauman et al., 2014; Parker-Athill & Tan, 2010).

O SNE é composto pelos plexos mioentérico e submucoso, os quais contêm células neuronais e gliais que modulam importantes processos, como a motilidade intestinal, o transporte de fluidos da mucosa intestinal à corrente sanguínea local, a secreção gastrointestinal de importantes moléculas para digestão de partículas alimentares, a lubrificação intestinal, a captação de nutrientes, a regulação do pH local, e a eliminação de resíduos (Furness, 2012; Furness, 2000).

Há cerca de quarenta anos, a visão mais aceita acerca dos neurônios da parede intestinal descrevia uma constituição de apenas neurônios pós-ganglionares de vias extrínsecas parassimpáticas. Evidências acumuladas ao longo dos anos alteraram tal visão, incluindo tais neurônios como parte do SNE, estando envolvidos no reflexo intestinal e nas atividades integrativas deste sistema, os quais ocorrem mesmo na ausência de vias extrínsecas (Furness, 2000; Uesaka et al., 2016).

Os tipos neuronais presentes no plexo submucoso do SNE incluem neurônios secretomotores e vasodilatadores colinérgicos e não-colinérgicos, neurônios primários aferentes e neurônios excitatórios e inibitórios da lâmina *muscularis mucosae* (Furness, 2000; Grabauskas & Owyang, 2017) (Figura 1). Já os neurônios presentes no plexo mioentérico do SNE, em maior variedade, incluem neurônios motores excitatórios e inibitórios ao músculo circular, neurônios motores excitatórios e inibitórios ao músculo longitudinal, interneurônios ascendentes e descendentes – responsáveis pelos reflexos locais e secretomotores -, neurônios aferentes primários e neurônios intestino-fugais

(Furness, 2000) (Figura 1). Todas as regiões do trato gastrointestinal recebem inervação excitatória.

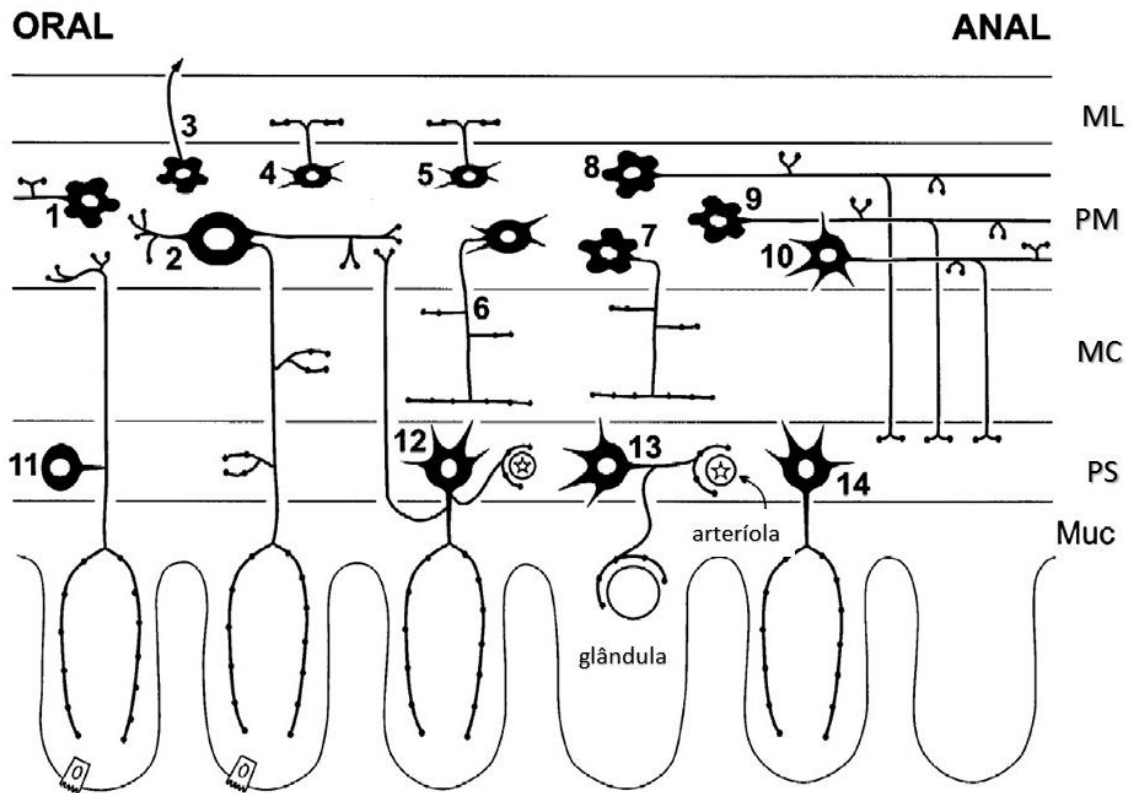


Figura 1: Tipos neuronais no SNE no intestino delgado (porco-da-índia), representados considerando sua localização, projeções e morfologia do corpo celular. 1. Interneurônio ascendente; 2. neurônio intrínseco aferente primário; 3. neurônio intestinofugal; 4. neurônio motor excitatório ao músculo longitudinal; 5. neurônio motor inibitório ao músculo longitudinal; 6. neurônio motor excitatório ao músculo circular; 7. neurônio motor inibitório ao músculo circular; 8. interneurônio descendente (reflexo local); 9. interneurônio descendente (reflexo secretomotor); 10. interneurônio descendente (complexo migratório mioelétrico); 11. neurônio aferente primário intrínseco da submucosa; 12. neurônio secretomotor/vasodilatador não-colinérgico; 13. neurônio secretomotor/vasodilatador colinérgico; 14. neurônio secretomotor (não-vasodilatador) colinérgico. ML: músculo longitudinal. PM: plexo mioentérico. MC: músculo circular. PS: plexo submucoso. Muc: mucosa. *Adaptado de Furness, 2000.*

Ainda a respeito dos neurônios da parede intestinal, há certa gama de dados indicando que estes são afetados pelo sistema imune no trato gastrointestinal, sendo pela excitação direta de neurônios ou por sua sensibilização a estímulos fisiológicos ou patológicos (Collins, 1996; Furness et al., 2000).

Neurônios entéricos também possuem associações estruturais e específicas com as placas de Peyer – conglomerados linfonodulares ileais -, sendo os neurônios do plexo submucoso mais intimamente relacionados com estas placas (Krammer, 1993; Green et al., 2003). Pode-se dividir a placa de Peyer em região de cúpula (domo), folículos e região interfolicular, sendo que a última contém a chamada “área de tráfego”, a qual fica mais próxima dos nervos entéricos e desempenha papel importante na captação e apresentação de antígenos (Krammer, 1993; Green et al., 2003).

Através da utilização de antagonistas específicos de receptores muscarínicos, entende-se atualmente que a transmissão excitatória no SNE apresenta um forte componente muscarínico, sendo a acetilcolina o principal neurotransmissor (Furness, 1993). Sabe-se, entretanto, haver excitação residual de neurônios entéricos mesmo com bloqueio dos receptores muscarínicos, predominantemente devido à liberação de taquicininas e, consistentemente, neurônios motores excitatórios apresentam imunoreatividade para a enzima colina acetil-transferase (ChAT) e para taquicininas (Galligan et al., 2000; Olsson & Holmgren, 2001). Além disso, os papéis da acetilcolina e das taquicininas são desiguais, sendo que agonistas muscarínicos inibem substancialmente a motilidade gastrointestinal *in vivo*, enquanto agonistas de receptores de taquicininas apresentam pouco efeito (Galligan et al., 1986; Olsson & Holmgren, 2001).

A neurotransmissão inibitória no SNE se dá principalmente através de neurônios que contêm a enzima óxido nítrico sintase (NOS), capaz de catalisar a reação que produz óxido nítrico (NO) através da L-arginina (Knowles & Moncada, 1994; Goyal & He, 1998; Salzman, 1995). Ainda que haja suficiente evidência de que o NO age como neurotransmissor nestes neurônios, experimentos de supressão (*knock-out*) da enzima NOS mostram neurotransmissão inibitória apenas parcialmente comprometida. A neurotransmissão residual é atribuída principalmente à adenosina trifosfato (ATP), agindo através de receptores purinérgicos (Furuya & Furuya, 2013).

Desde a descoberta das células gliais entéricas (CGE), os papéis que estas células desempenham estão impressionando pesquisadores e possibilitando o estudo de alterações gastrointestinais sob uma perspectiva neuroglial. As CGE são capazes de reconhecer, responder e regular a função neuronal pela liberação de gliotransmissores, os quais promovem a manutenção e sobrevivência neuronais (Gulbransen & Sharkey, 2012; Rühl, 2005). Estas células são, em geral, descritas como pequenas, apresentando formato de estrela, e interconectando neurônios dentro dos gânglios entéricos e nos feixes de fibra nervosa (Gabella, 1972). São similares aos astrócitos do SNC, ambas expressando o filamento intermediário conhecido como proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e a proteína de ligação ao cálcio S100B (Gershon & Rothman, 1991). Podem ser classificadas de acordo com sua morfologia, ocorrendo no SNE quatro tipos celulares: tipo I, ou *protoplasmático*, são células intragangliônicas com formato estrelado, apresentando processos irregulares semelhantes aos dos astrócitos do SNC; tipo II, ou *fibroso*, são células intergangliônicas alongadas, semelhantes aos astrócitos fibrosos dos tratos de substância branca no SNC; tipo III, ou *mucoso*, são células sub-epiteliais que apresentam diversos processos longos; e tipo IV, ou *intramuscular* são células alongadas que ocorrem próximas às fibras nervosas na musculatura (Furness, 2012) (Figura 2).

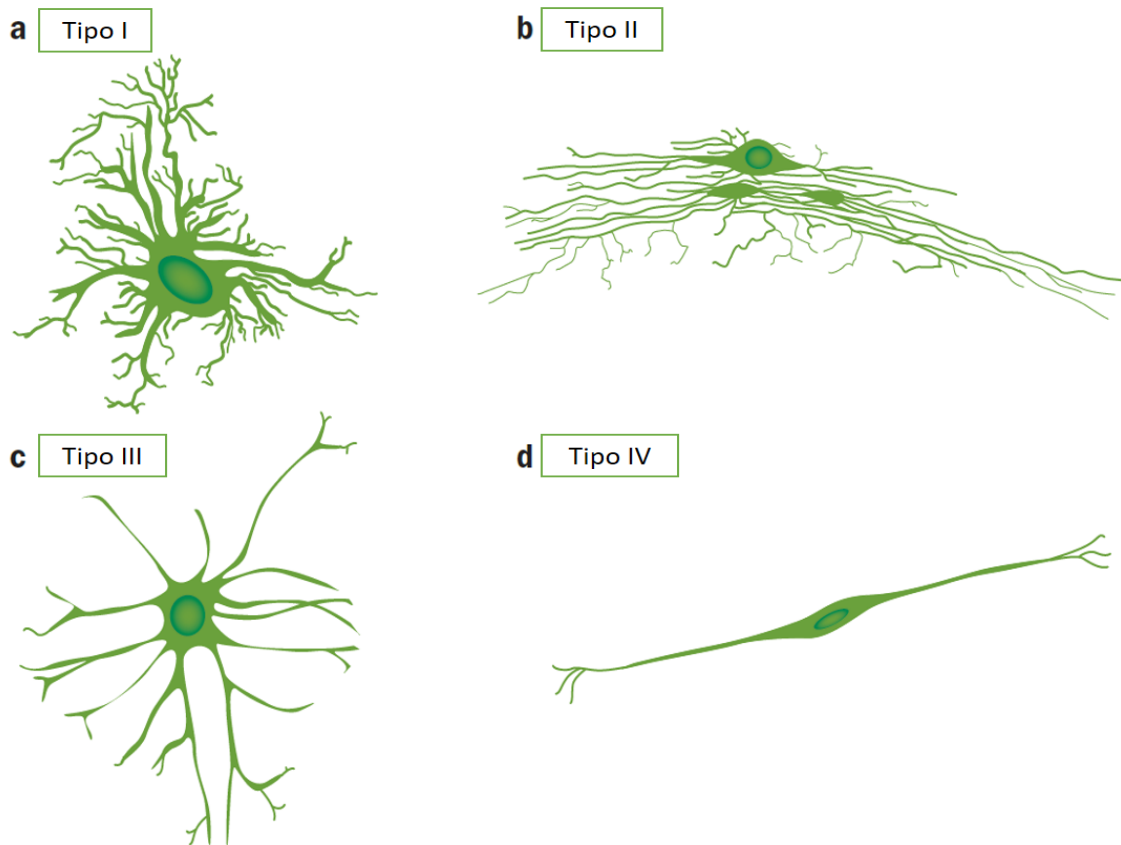


Figura 2: Tipos celulares gliais encontrados no SNE. a) célula glial entérica do tipo I, ou protoplasmática; b) célula glial entérica do tipo II, ou fibrosa; c) célula glial entérica do tipo III, ou mucosa; d) célula glial entérica do tipo IV, ou muscular. *Adaptado de Furness, 2012.*

Evidências experimentais mostram que as CGE podem desempenhar importante papel nos processos inflamatórios intestinais, e que o dano mediado pelo sistema imune às CGE pode participar do início e/ou da progressão de doenças inflamatórias intestinais (Bassotti, 2007; Gulbransen & Sharkey, 2012). De fato, as CGE interagem funcionalmente com linfócitos, respondem ativamente à inflamação e ativam-se como células apresentadoras de antígenos, atraindo células do sistema imune ao SNE. Assim, hipotetiza-se que alterações à rede de células gliais entéricas podem representar importante fator causal no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, especialmente a doença de Crohn, embora haja poucos dados provenientes de pesquisa clínica sobre o tema (Bassotti, 2007; Gulbransen & Sharkey, 2012).

Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento do trato gastrointestinal no TEA (Buie, Campbell, et al., 2010; Chen, Girgis, & El-Matary, 2010; Cook, 2009; de

Magistris et al., 2010; MacFabe, Cain, Boon, Ossenkopp, & Cain, 2011; McElhanon, McCracken, Karpen, & Sharp, 2014), devido à manifestação de patologias e/ou transtornos intestinais, como constipação crônica, refluxo gastroesofageal, doença celíaca (Genuis & Bouchard, 2010; Martínez-Bermejo & Polanco, 2002) e cólicas intestinais (Buie, Fuchs, et al., 2010; de Magistris et al., 2010; K Horvath, Papadimitriou, Rabsztyrn, Drachenberg, & Tildon, 1999), atribuídos a desbalanços no SNE (M. L. Bauman, 2010; Karoly Horvath & Perman, 2002).

O modelo animal de VPA passa por mudanças anormais na estrutura e função do trato gastrointestinal. A exposição ao VPA diminui a espessura da *tunica mucosa* e da *tunicamuscularis* no estômago e íleo (Figura 3), além de causar atrofia nas células absorptivas do íleo nas células parietais estomacais.

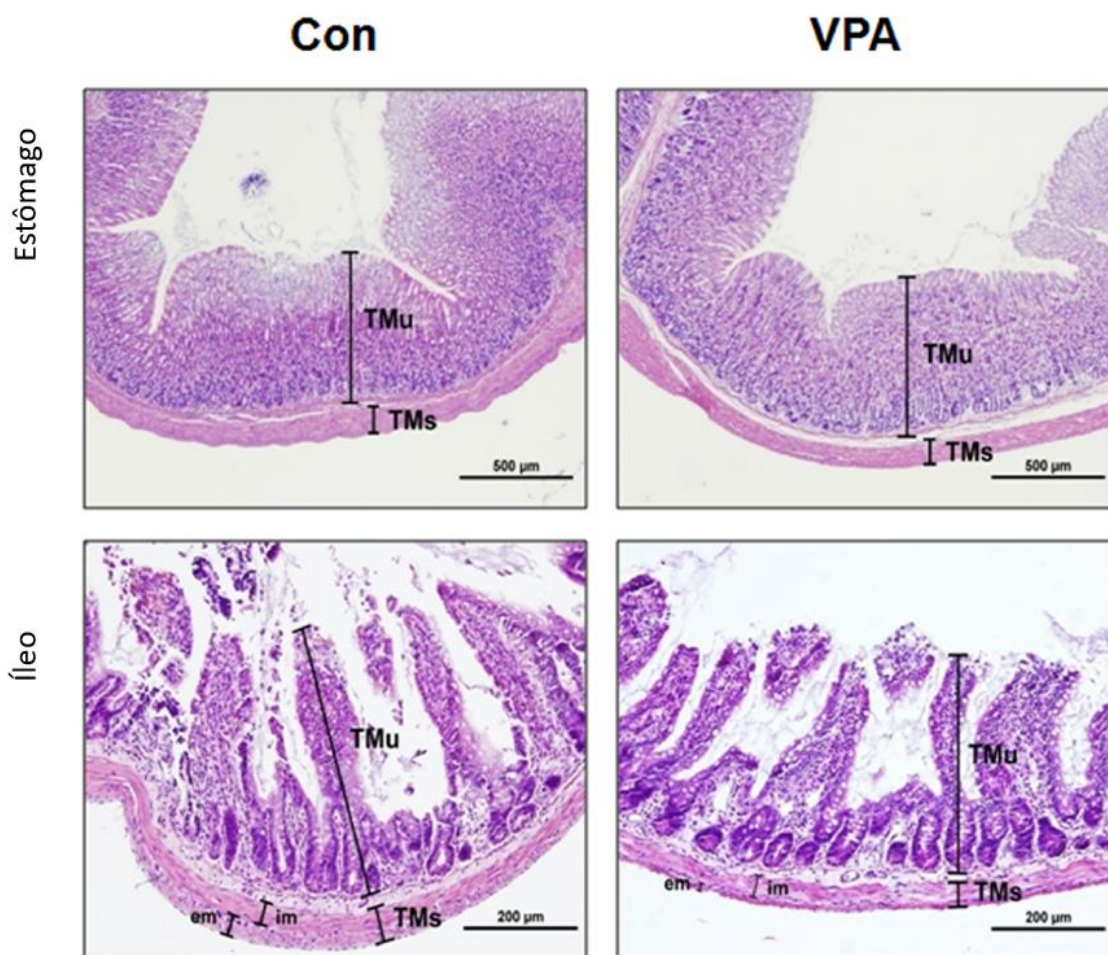


Figura 3: Alterações teciduais no estômago e íleo de animais do modelo VPA. O modelo VPA – segunda coluna – apresenta redução em espessura das túnica mucosa e muscularis no estômago e íleo. (Con) controle (VPA) modelo VPA (TMu) túnica

mucosa; (TMs) túnica muscularis; (im) túnica muscularis interna; (em) túnica muscularis externa. *Adaptado de Kim e colaboradores, 2013.*

Além disso, há diminuição da coloração em células epiteliais ileais marcadas com hematoxilina e eosina, observadas sob microscopia de alta resolução. Ainda, o modelo apresenta menor motilidade no trato gastrointestinal (Kim et al., 2013). Entretanto, há poucos trabalhos mostrando alterações em nível neuronal e glial.

Assim, considerando as alterações gastrointestinais já encontradas em pacientes com autismo, torna-se muito importante o estudo de alterações no SNE em modelos animais de TEA. Dessa forma, por meio do modelo induzido por exposição pré-natal ao VPA, o presente trabalho surge como uma importante proposta para avaliar no SNE, possíveis alterações em populações de neurônios e de células gliais.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a plasticidade glial e de diferentes tipos neuronais do sistema nervoso entérico de ratos expostos pré-natalmente ao ácido valproico.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a densidade neuronal (células HuC/D⁺) e glial (células GFAP⁺), assim como a morfologia neuronal (área, diâmetro máximo e diâmetro mínimo) do plexo mioentérico.
2. Verificar a presença e proporção de neurônios colinérgicos (ChAT⁺) e nitrérgicos (NOS⁺) do plexo mioentérico.

CAPÍTULO I

Manuscrito intitulado: NEURON-GLIA ALTERATION IN ENTERIC NERVOUS SYSTEM FROM AUTISM MODEL INDUCED BY PRENATAL EXPOSURE TO VALPROIC ACID

Após as alterações sugeridas pela banca examinadora, o manuscrito será submetido para a revista *Frontiers in Cellular Neuroscience* (IF 4,6).

NEURON-GLIA ALTERATION IN ENTERIC NERVOUS SYSTEM FROM AUTISM MODEL INDUCED BY PRENATAL EXPOSURE TO VALPROIC ACID

Taylor Gonchoroski^{1,2,3,4}, Mellanie Fontes-Dutra^{1,2,3,4}, Cristina Eusébio Mendes⁵, Vivaldo Moura-Neto⁶, Victorio Bambini-Junior^{1,4,7}, Patricia Castelucci⁵, Carmem Gottfried^{1,2,3,4}

¹Translational Research Group in Autism Spectrum Disorders-GETTEA., Federal University of Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Graduate Program in Neuroscience, Institute of Basic Health Sciences (ICBS) Federal University of Rio Grande do Sul -UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Department of Biochemistry, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation-INCT-NIM.

⁵Department of Anatomy, University of São Paulo-USP, São Paulo, SP

⁶Paulo Niemeyer Brain Institute, Federal University of Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁷School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire-UCLan, Preston-UK.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by social interaction and communication deficits and repetitive behavior. The ASD may present several comorbidities, as gastrointestinal alterations – including chronic constipation, gastroesophageal reflux, celiac disease and intestinal cramps. Although unknown, it is hypothesized that ASD etiology is triggered by environmental risk factors, as exposure to valproic acid (VPA) during pregnancy, which became a reliable tool for induce autism-like alterations in rats and mice. The present study aimed to evaluate alterations in enteric nervous system (ENS) in an animal model of ASD prenatally exposed to VPA. Pregnant Wistar females received a single intraperitoneal injection of 600 mg/kg VPA or physiological saline (Control) on embryonic day 12.5 (E12.5). The 30 days old male offspring were euthanized by perfusion, and the ileum was removed and delaminated. Total, excitatory and inhibitory neuronal cells in ileal myenteric ganglia (IMG) was labeled with anti-HuC/D; anti-ChAT and anti-NO, respectively. Glial cells were labeled with anti-GFAP. All data were analyzed applying one way ANOVA and $p < 0.05$ was considered statistically significant. The results showed less neuronal density in IMG in VPA group compared to the Control group ($p < 0.05$). Furthermore, the ganglionic area had no difference between the groups. Evaluating inhibitory neurons, no differences were observed in neuronal density and body area. Considering excitatory neurons, VPA group presented decreased neuronal density ($p < 0.05$;) and increased neuronal body area ($p < 0.05$). Interestingly, the number of glial cells increased 2.3 times in VPA group ($p < 0.001$). In conclusion, our results show important neuron-glia alterations in IMG mediated by prenatal exposure to VPA, opening new clues in the understanding of ASD pathophysiology.

INTRODUCTION

The Autism Spectrum Disorder (ASD) is part of a group of neurodevelopmental disorders presenting high prevalence in population, behavioral-based diagnosis and unknown biomarkers or etiology, challenging researchers to find out which alterations could lead to ASD in post-natal life (Mayes et al., 2014; Wing & Potter, 2002). Recent studies from the Centers for Disease and Control Prevention (CDC) revealed that the prevalence of ASD is one for 68 in 8-years old children in USA. The behavioral alterations in ASD are vast, but two main deficits lead to the final diagnosis, with variable levels of expression: deficits in social communication or interaction and repetitive or restricted patterns of interest or behavior (American Psychiatric Association, 2013).

As a multifactorial disorder, ASD presents both genetic and environmental factors contributing to its etiology (Gottfried et al., 2013). The genetic factor is variable among ASD individuals and even with more than 1.000 genetic alterations detected, it is not enough to explain 25% of the cases (Miles, 2011). These data lead the researchers to consider how environmental risk factors during the gestational period could trigger alterations in post-natal life. Maternal immune activation and exposure to teratogenic factors in critical periods of gestation are associated with an increased risk for ASD diagnosis in post-natal life (Arndt et al., 2005; Bauman et al., 2014; Miyazaki et al., 2005; Roullet et al., 2010). An important epidemiological study considering the presence of an environmental factor during the first trimester of gestation and ASD diagnosis in post-natal life reinforced that valproic acid (VPA) is an important risk factor for autism (Christensen et al., 2013). These clinical studies, associated with the characterization of the autism model induced by prenatal exposure to VPA, confirm that this model is a reliable tool in the study of autism-like alterations in rats and mice, not only behavioral alterations (Bambini-Junior et al., 2011a; Kataoka et al., 2013; Schneider & Przewłocki, 2005), but also alterations in neural and brain structures (Banerjee et al., 2013; BristotSilvestrin et al., 2013), connectivity and excitatory-inhibitory balance (Gogolla et al., 2009; Lin et al., 2013; Wang et al., 2012) and at molecular level (Kolozsi et al., 2009; Roullet et al., 2010). In neuroscience history, researchers have been looking for explanations regarding behavioral alterations in brain structures or their connection among each other. Nevertheless, studies from the last

decade have been demonstrating an important crosstalk between peripheral system and CNS, with important modulation of brain function (Ashwood et al., 2011; M. D. Bauman et al., 2014; Parker-Athill & Tan, 2010) and enteric nervous system (ENS) took part of this scenario.

Several studies have shown the gastrointestinal (GI) involvement in ASD (Buie, Campbell, et al., 2010; Chen, Girgis, & El-Matary, 2010; Cook, 2009; de Magistris et al., 2010; MacFabe, Cain, Boon, Ossenkopp, & Cain, 2011; McElhanon, McCracken, Karpen, & Sharp, 2014), due to the manifestation of pathologies and/or intestinal disorders, such as chronic constipation, gastroesophageal reflux, celiac disease (Genuis & Bouchard, 2010; Martínez-Bermejo & Polanco, 2002) and intestinal cramps (Buie & Fuchs, 2010; de Magistris et al., 2010; Horvath et al., 1999) attributed to an imbalance in the ENS (Bauman, 2010; Horvath & Perman, 2002).

The ENS is composed by myenteric and submucosal plexuses containing neuron and glial cells modulating important processes, such as intestinal motility, fluid transport from the intestinal mucosa and local blood flow, gastrointestinal secretion of molecules important for food particle digestion, intestinal lubrication, nutrient uptake, pH regulation, solute concentration and waste product elimination (Furness, 2012).

Since the discovering of glial cells in ENS, the roles that these cells play in the enteric system are stunning researchers and highlighting new ways to study gastrointestinal alterations in a neuroglial perspective. The EGC can sense, respond, and regulate neuronal function by releasing gliotransmitters, promoting neuronal maintenance and survival (Gulbransen & Sharkey, 2012; Rühl, 2005). Glial cells at the ENS are described as small, stellate-shaped cells interconnecting neurons inside of the enteric ganglia and nerve fiber bundles (Gabella, 1972), being similar to astrocytes from the central nervous system, which express the intermediate filament glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the calcium-binding protein, S100B (Gershon & Rothman, 1991).

The VPA animal model undergoes abnormal changes in the GI structure and function, including the decrease in the thickness of tunica mucosa and tunica muscularis in the stomach and ileum, as well as the decreasing in GI motility (Kim et al., 2013), but there are few works showing evidence of alterations at neural level. The present study investigated ENS alterations at neural level in an animal model of autism induced by prenatal exposure to VPA, analyzing qualitatively and quantitatively neurons (inhibitory

nitrenergic and excitatory cholinergic neurons) and glial cells.

MATERIALS & METHODS

This study was conducted according to current regulations regarding animal experiments at the Clinical Hospital of Porto Alegre (Protocol number: 140367).

Animals

Female Wistar rats were obtained from the local breeding colony (HCPA-Federal University of Rio Grande do Sul), with 12:12 light cycle (lights on at 7:00 and lights off at 19:00), controlled temperature ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), water and food *ad libitum*. They were handled in accordance to the governmental and Brazilian Experimental Biology Societies Federation guidelines. The estrous cycle was monitored and females were mated overnight. The first day of gestation was considered when spermatozoa were found in the vaginal smear. Valproic acid (Sigma-Aldrich, USA) was purchased as the sodium salt and dissolved in 0.9% saline for a concentration of 250 mg/mL. Females received a single intraperitoneal injection of valproic acid (600 mg/kg, 250 mg/mL diluted in NaCl 0.9%) in the 12.5th day of pregnancy and control females received physiological saline at the same time as previously described (Bambini-Junior et al., 2011b; Schneider & Przewłocki, 2005). Females were housed individually and were allowed to raise their own litters until they reach 21 post-natal day. The offspring rats were housed separately by sex at this period. Male rats were conducted to transcardiac perfusion with deep anesthesia at postnatal day 120 by xylazine and ketamine hydrochloride.

Tissue preparation

The distal section of the ileum region was removed cleaned and placed in PBS solution (0.15 M NaCl in 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2). An incision was made along the mesenteric attachment of the selected section. The tissue sections were pinned (mucosa down) to balsa wood sheets without being stretched and fixed in 4% formaldehyde overnight. After the fixation, the sections were stored in fridge in a solution of PBS and azide (1%). The fixed tissues were sub dissected to remove the mucosa, submucosa, and circular layers, yielding whole mounts of longitudinal muscle-myenteric plexus.

Immunohistochemistry analysis

In order to analyze the myenteric plexus ganglia and its cells, we used HuC/D immunoreactivity to identify total neurons per ganglion and per area, NOS immunoreactivity to identify inhibitory motor neurons, ChAT immunoreactivity to identify excitatory neurons and GFAP immunoreactivity to identify glial cells. The use of these cell-specific markers in rat ileum is consistent with others studies in rodents and small mammals (Furness, 2012; Qu et al., 2008). Whole-mount tissue sections preparations were incubated with anti-HuC/D, NOS and ChAT primary antibodies (Table 1) for 12 hours at 4°C. Dual labeling was achieved using the combinations of antibody listed in Table 1. After incubation in primary antisera, tissues were washed three times for 10 minutes in PBS and incubated with the secondary antibodies Donkey anti-mouse IgG 594, Donkey anti-sheep IgG 594 and Donkey anti-goat IgG 594 (Molecular Probes). PBS washes were repeated, and the tissue was mounted in glycerol buffered with 0.5 M sodium carbonate (pH 8,6). Preparations were examined using a Nikon 80i fluorescence microscope. Images were captured using a digital camera and the NIS Nikon software package and were analyzed for the ganglia area and the neuronal density, as well as the body area, maximum and minimum body diameters (supplementary figure 1) and cell density of total neurons, excitatory cholinergic neurons and inhibitory nitrergic neurons. Glial cells were also analyzed regarding its density in the tissue.

The morphological profiles of the cells were measured by examining the whole-mount preparations at 100x magnification. Immunoreactive neuronal cell bodies and glial cells in the myenteric ganglia were counted in each visual microscopic field (0.04909 mm²). For quantification of the wholemound preparations (1.0 cm² each), counts were made in 40 microscopic fields that were chosen at random for each antigen in each animal. The cell perikarya profile areas (μm²) of 100 randomly selected neurons and glial cells from each animal were obtained using a semiautomatic morphometry device and measured using the Image Pro Plus software package.

TABLE 1: PRIMARY AND SECONDARY ANTIBODIES.

Primaryantibody	Host	Dilution	Source
Anti-HuC/D	Mouse	1:100	Molecular Probes
NOS	Sheep	1:2000	EMSO
ChAT	Goat	1:50	Chemicon
Secondaryantibody	Host	Dilution	Source
Anti-mouse IgG 488	Donkey	1:200	Molecular Probes
Anti-sheep IgG 594	Donkey	1:100	Molecular Probes
Anti-goatIgG 594	Donkey	1:500	Molecular Probes

STATISTICAL ANALYSIS

All the data were analyzed statistically by Student's t test, presented by Mean \pm SE and $p \leq 0.05$ was considered as statistically significant. All analyses were carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software.

Results

Evaluation pf HuC/D(pan)-Positive Neurons and Ganglion Profile in Ileal Myenteric Ganglia.

Total neuron per ganglion and ganglion area are showed in Figure 1. The VPA group presented a significant decrease in HuC/D(pan)-positive neurons per ganglion (Control=22.75 \pm 1.315; VPA=15.75 \pm 1.315 $p < 0.05$) However, the ganglion area did not differ between groups.

As expected, the pan-neuronal density per area (Figure 2A) was also decreased in VPA group (Control=20125 \pm 778.2; VPA=13582 \pm 1342; $p < 0.01$). In order of verify if the decreased number of neuronal cells per area of ganglion could be compensated by an increased neuronal body area, we also evaluated this parameter and curiously the neuronal body area did not differ between groups

Evaluation of Nos-Positive Neurons and ChAT-Positive Neurons in Ileal Myenteric Ganglion.

As observed in Figure 3, the number of NOS-positive neurons per area and

neuronal body area did not differ between groups. The NOS-immunoreactive neurons had a Dogiel type I morphology in control and VPA groups. Interestingly, as demonstrated in Figure 4, VPA group presented a significant decrease in ChAT-positive neurons (Control=17243 ± 2070; VPA=9592 ± 427.9; p<0.05) and an increased neuronal body area (Control=343.3 ± 11.91; VPA=404.2 ± 13.21; p<0.05).

Evaluation of GFAP-Positive Cells in Ileal Myenteric Ganglion

The analysis of glial cells is showed in Figure 5. As can be observed in the representative images, glial cells are distributed through the whole ganglia. Interestingly, the density of GFAP-positive cells was hugely increased (2.6 times) in VPA group (Control=7408 ± 887.5; VPA=17257 ± 820.5; p<0.001), indicating also an unbalance of glial cells, at least in number, in the ENS of these animals.

DISCUSSION

The present study demonstrates for the first time to our knowledge, important neuron-glia alteration in the ENS of rats exposed prenatally to valproic acid as a model of autism (Bambini-Junior et al., 2011a; Kataoka et al., 2013; Schneider & Przewłocki, 2005).

Considering that the neuronal density per ganglion decreased in VPA rats we investigated whether differences in neuronal density might be explained by differences in neuron-glia rate per ganglion or by a reduction in a specific neuronal type in the VPA group. We observed a decreased number of excitatory cholinergic neurons, followed by increased neuronal body area. As cholinergic system has crucial role in intestinal motility and in the maintenance of the intestinal barrier function through the modulation of enteric glial cells, the differences observed in this system in VPA model might explain functional alterations already found in the model (Cheadle et al., 2014; Furness, 2012; Kim et al., 2013). Taken together, these data point out important roles of cholinergic neurons in, at least, some gastrointestinal alterations in VPA animal model. These findings are consistent with a previous study from Kim and colleagues (2013), in which a decreasing in gastrointestinal tract motility is presented in the model.

Glial cells are not excitable cells like neurons because they do not generate

action potentials. However, they form vast communication networks through a complex repertoire of Ca²⁺ signals that enables these cells to integrate information transmitted by neurons, glial cells, immune cells, or other cells in the gut microenvironment (Ochoa-Cortes et al., 2016). Recently, novel roles for enteric glial cells have been studied. Glial cells are capable of sensing, responding, and regulating neuronal function by releasing gliotransmitters, promoting neuronal maintenance and survival and also forming a cellular and molecular bridge between enteric nerves, enteroendocrine cells, immune cells, and epithelial cells (Gulbransen & Sharkey, 2012; Rühl, 2005; Sharkey, 2015). The increasing in glial cell density in the myenteric plexus, which could also contribute to explain the maintenance of ganglia area besides the decreasing in neuronal density, may be caused by a defensive reaction of glial cells, as well as the astrocytes of central nervous system, conceivably aimed at handling the acute stress, limiting tissue damage, and restoring homeostasis, also inhibiting adaptive neural plasticity mechanisms underlying recovery of function (Pekny & Pekna, 2014; von Boyen & Steinkamp, 2010). Consistently, the ablation and functional inhibition of enteric glial cells lead to severe GI inflammation (Bush et al., 1998) and decreased gut motility (Nasser et al., 2006), in which an important molecule that might be involved is connexin 43 (Cx43), probably by releasing factors via Cx43 hemichannels and/or cell-to-cell coupling via Cx43 gap junctions. Changes in Cx43 expression, subcellular localization and function have the potential to directly affect motility, epithelial permeability, and inflammatory processes of the gut (Grubišić & Parpura, 2015). Still, Cx43 expression is increased in the brains of subjects with autism (Fatemi et al., 2008).

In summary, this study is the first to investigate enteric alterations at neuronal and glial levels in autism. Together, our results point out to enteric neuronal and glial alterations that might explain deficits in motility and open the possibility of understanding and treating gastrointestinal diseases associated with autism through the ENS.

Acknowledgements: This work was supported by the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa- Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), PROPESQ-UFRGS and National Institute of Science and Technology in Neuroimmunomodulation (INCT-NIM).

REFERENCES

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5)*. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition TR. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>

Arndt, T. L., Stodgell, C. J., & Rodier, P. M. (2005). The teratology of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.11.001>

Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., & Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.003>

Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G. A., Moreira, J. C. F., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2011). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. *Brain Research*, 1408, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.015>

Banerjee, A., García-Oscos, F., Roychowdhury, S., Galindo, L. C., Hall, S., Kilgard, M. P., & Atzori, M. (2013). Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(6), 1309–1318. <https://doi.org/10.1017/S1461145712001216>

Bauman, M. D., Iosif, A.-M., Smith, S. E. P., Bregere, C., Amaral, D. G., & Patterson, P. H. (2014). Activation of the Maternal Immune System During Pregnancy Alters Behavioral Development of Rhesus Monkey Offspring. *Biological Psychiatry*, 75(4), 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.06.025>

Bauman, M. L. (2010). Medical comorbidities in autism: challenges to diagnosis and treatment. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7(3), 320–7. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.06.001>

BristotSilvestrin, R., Bambini-Junior, V., Galland, F., Daniele Bobermim, L., Quincozes- Santos, A., Torres Abib, R., Gottfried, C. (2013). Animal model of autism

induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Research*, 1495, 52–60.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.11.048>

Buie, T., Campbell, D. B., Fuchs, G. J., Furuta, G. T., Levy, J., VandeWater, J., Winter, H. (2010). Evaluation, Diagnosis, and Treatment of Gastrointestinal Disorders in Individuals With ASDs: A Consensus Report. *Pediatrics*, 125(Supplement 1).

Buie, T., Fuchs, G. J., Furuta, G. T., Kooros, K., Levy, J., Lewis, J. D., Winter, H. (2010). Recommendations for evaluation and treatment of common gastrointestinal problems in children with ASDs. *Pediatrics*, 125 Suppl, S19-29.

<https://doi.org/10.1542/peds.2009-1878D>

Bush, T. G., Savidge, T. C., Freeman, T. C., Cox, H. J., Campbell, E. A., Mucke, L., ... Sofroniew, M. V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell*, 93(2), 189–201. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9568712>

Cheadle, G. A., Costantini, T. W., Bansal, V., Eliceiri, B. P., & Coimbra, R. (2014). Cholinergic Signaling in the Gut: A Novel Mechanism of Barrier Protection through Activation of Enteric Glia Cells. *Surgical Infections*, 15(4), 387–393.

<https://doi.org/10.1089/sur.2013.103>

Chen, B., Girgis, S., & El-Matary, W. (2010). Childhood autism and eosinophilic colitis. *Digestion*, 81(2), 127–9. <https://doi.org/10.1159/000252765>

Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*, 309(16), 1696–703.

<https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>

Cook, E. H. (2009). Gastrointestinal symptoms in ASD, brain structure of identical twins with ASD. *Autism Research*, 2(5), 285–286. <https://doi.org/10.1002/aur.95>

de Magistris, L., Familiari, V., Pascotto, A., Sapone, A., Froli, A., Iardino, P., ... Bravaccio, C. (2010). Alterations of the Intestinal Barrier in Patients With Autism Spectrum Disorders and in Their First-degree Relatives. *Journal of Pediatric*

Gastroenterology and Nutrition, 51(4), 418–424.

<https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181dcc4a5>

Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Reutiman, T. J., & Lee, S. (2008). Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synapse*, 62(7), 501-507. doi: 10.1002/syn.20519

Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(5), 286–294.

<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>

Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum.

Journal of Anatomy, 111(Pt 1), 69–97. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4335909>

Genuis, S. J., & Bouchard, T. P. (2010). Celiac Disease Presenting as Autism. *Journal of Child Neurology*, 25(1), 114–119. <https://doi.org/10.1177/0883073809336127>

Gershon, M. D., & Rothman, T. P. (1991). Enteric glia. *Glia*, 4(2), 195–204.

<https://doi.org/10.1002/glia.440040211>

Gogolla, N., LeBlanc, J. J., Quast, K. B., Südhof, T. C., Fagiolini, M., & Hensch, T. K. (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 1(2), 172–181.

<https://doi.org/10.1007/s11689-009-9023-x>

Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Baronio, D., Zanatta, G., Silvestrin, R. B., Vaccaro, T., & Riesgo, R. (2013). Valproic acid in autism spectrum disorder: from an environmental risk factor to a reliable animal model. In *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders-Volume I*. InTech. <https://doi.org/10.5772/54824>

Grubišić, V., & Parpura, V. (2015). The second brain in autism spectrum disorder: could connexin 43 expressed in enteric glial cells play a role? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 242. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00242>

Gulbransen, B. D., & Sharkey, K. A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(11), 625–632. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.138>

Horvath, K., Papadimitriou, J. C., Rabszty, A., Drachenberg, C., & Tildon, J. T. (1999). Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *The Journal of Pediatrics*, 135(5), 559–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547242>

Horvath, K., & Perman, J. A. (2002). Autism and gastrointestinal symptoms. *Current Gastroenterology Reports*, 4(3), 251–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12010627>

Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>

Kim, J.-W., Choi, C. S., Kim, K. C., Park, J. H., Seung, H., Joo, S. H., ... Park, S. H. (2013). Gastrointestinal tract abnormalities induced by prenatal valproic Acid exposure in rat offspring. *Toxicological Research*, 29(3), 173–9. <https://doi.org/10.5487/TR.2013.29.3.173>

Kolozsi, E., Mackenzie, R. N., Rouillet, F. I., Decatanzaro, D., & Foster, J. A. (2009). Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic adhesion molecule neuroligin 3 in mice. *Neuroscience*, 163(4), 1201–1210. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.021>

Lin, H.-C., Gean, P.-W., Wang, C.-C., Chan, Y.-H., & Chen, P. S. (2013). The Amygdala Excitatory/Inhibitory Balance in a Valproate-Induced Rat Autism Model. *PLoS ONE*, 8(1), e55248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055248>

MacFabe, D. F., Cain, N. E., Boon, F., Ossenkopp, K.-P., & Cain, D. P. (2011). Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.005>

Martínez-Bermejo, A., & Polanco, I. (2002). Neuropsychological changes in coeliac disease. *Revista de Neurologia*, 34 Suppl 1, S24-33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447786>

- Mayes, S. D., Calhoun, S. L., Murray, M. J., Pearl, A., Black, A., & Tierney, C. D. (2014). Final DSM-5 under-identifies mild Autism Spectrum Disorder: Agreement between the DSM-5, CARS, CASD, and clinical diagnoses. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 8(2), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.rasd.2013.11.002>
- McElhanon, B. O., McCracken, C., Karpen, S., & Sharp, W. G. (2014). Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Pediatrics*. <http://doi.org/10.1542/peds.2013-3995>
- Miles, J. H. (2011). Autism spectrum disorders—A genetics review. *Genetics in Medicine*, 13(4), 278–294. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba>
- Miyazaki, K., Narita, N., & Narita, M. (2005). Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(2–3), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.004>
- Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C. M., Ho, W., Oland, L. D., Tibbles, L. A., ... Sharkey, K. A. (2006). Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(5), G912–G927. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00067.2006>
- Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A., Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., Christofi, F. L. (2016). Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(2), 433–49. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000667>
- Parker-Athill, E. C., & Tan, J. (2010). Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: Interleukin-6 Signaling as a Key Mechanistic Pathway. *Neurosignals*, 18(2), 113–128. <https://doi.org/10.1159/000319828>
- Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiology Review*, 94, 1077–1098. Retrieved from <http://physrev.physiology.org/content/physrev/94/4/1077.full.pdf>
- Qu, Z.-D., Thacker, M., Castelucci, P., Bagyánszki, M., Epstein, M. L., & Furness, J. B.

(2008). Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell and Tissue Research*, 334(2), 147–161. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0684-7>

Rouillet, F. I., Wollaston, L., deCatanzaro, D., & Foster, J. A. (2010). Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience*, 170(2), 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.069>

Rühl, A. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 17(6), 777–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00687.x>

Schneider, T., &Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 30, 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>

Sharkey, K. A. (2015). Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 918–925. <https://doi.org/10.1172/JCI76303>

von Boyen, G., &Steinkamp, M. (2010). The role of enteric glia in gut inflammation. *Neuron Glia Biology*, 6(4), 231–236. <https://doi.org/10.1017/S1740925X11000068>

Wang, C.-C., Chen, P. S., Hsu, C.-W., Wu, S.-J., Lin, C.-T., &Gean, P. W. (2012). Valproic acid mediates the synaptic excitatory/inhibitory balance through astrocytes — A preliminary study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 37(1), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.01.017>

Wing, L., & Potter, D. (2002). The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(3), 151–161. <https://doi.org/10.1002/mrdd.10029>

Supplementary figure

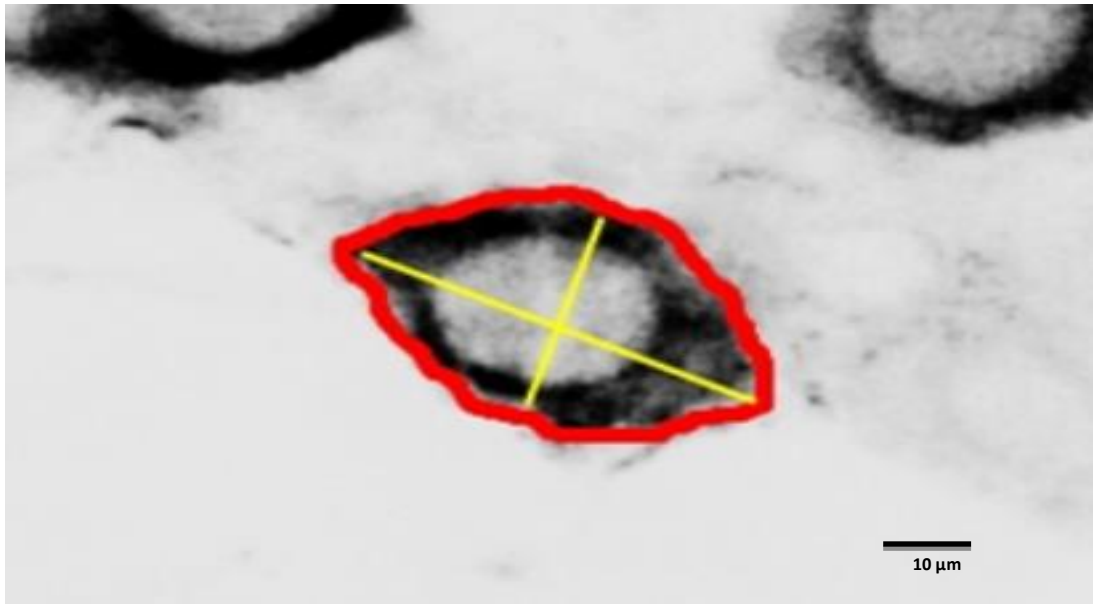
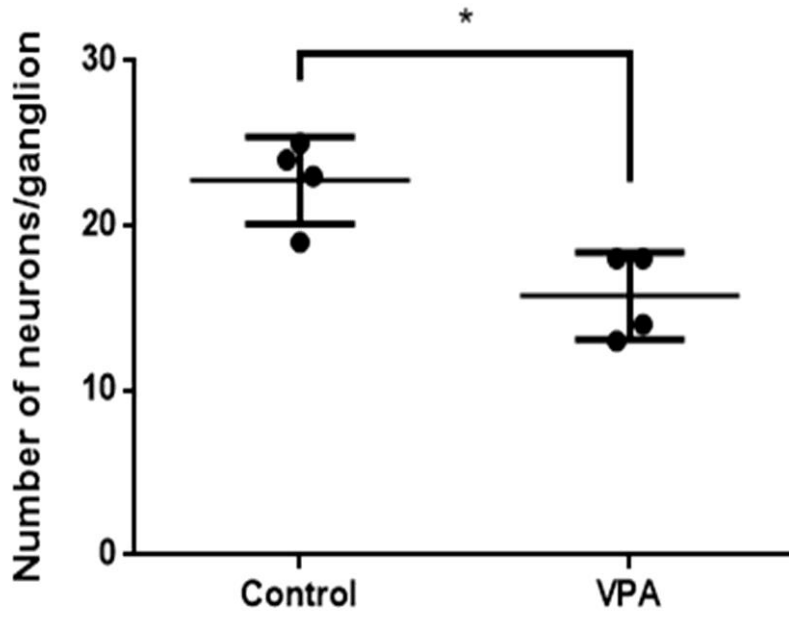


Fig 1

A



B

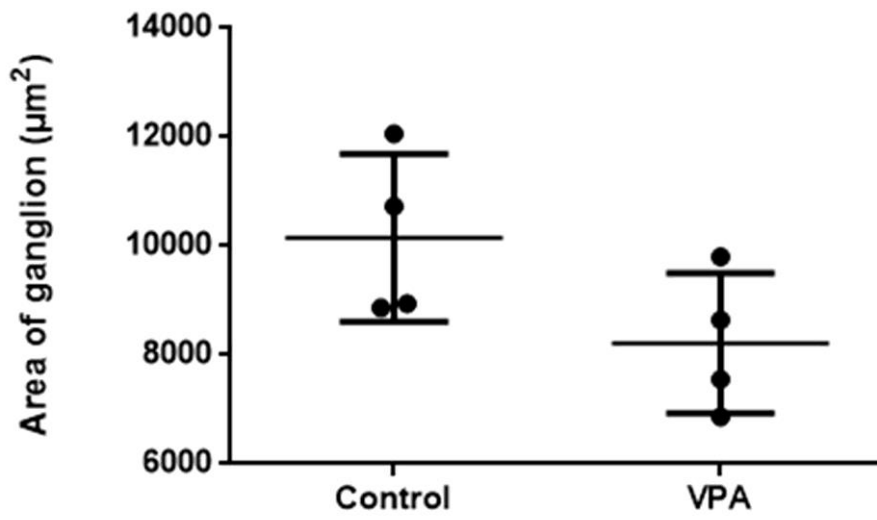


Fig 2

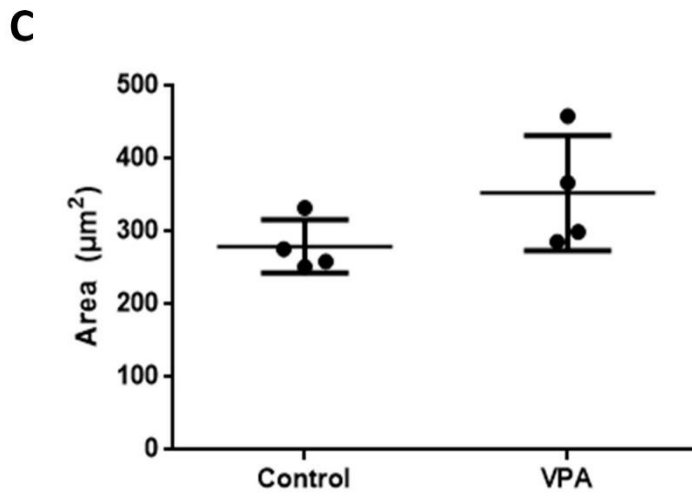
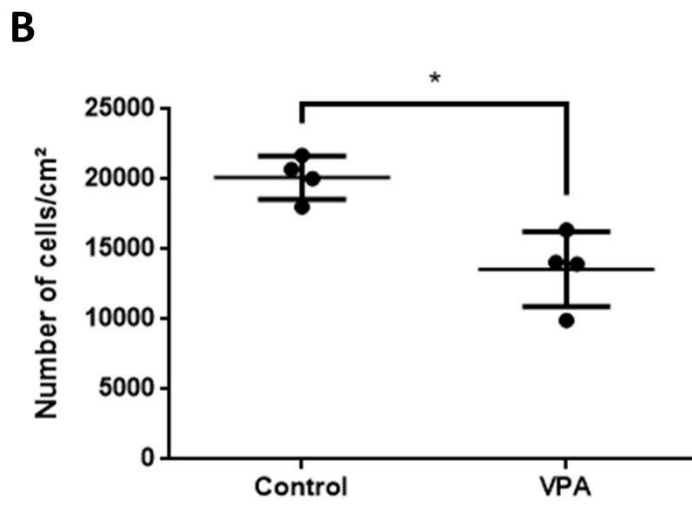
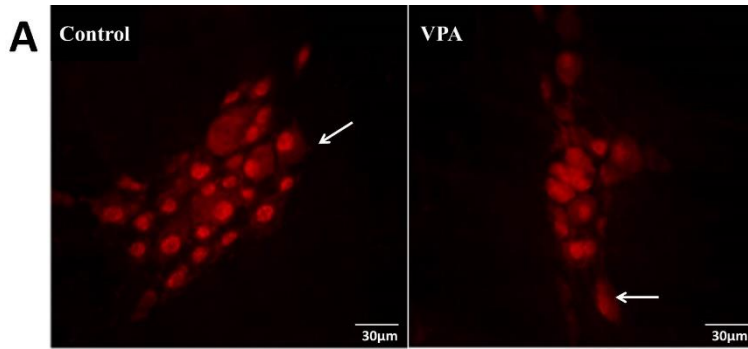


Fig 3

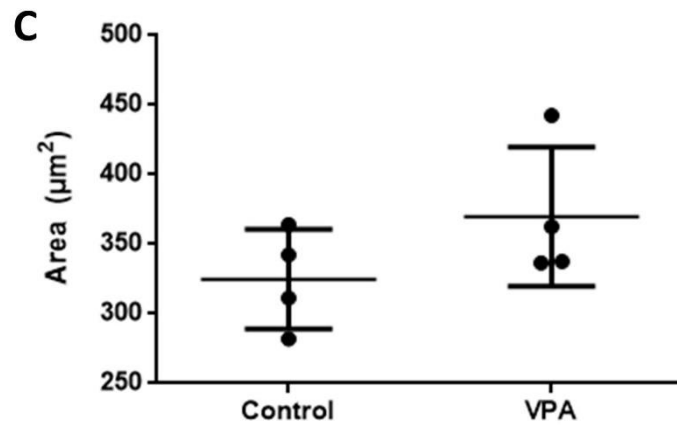
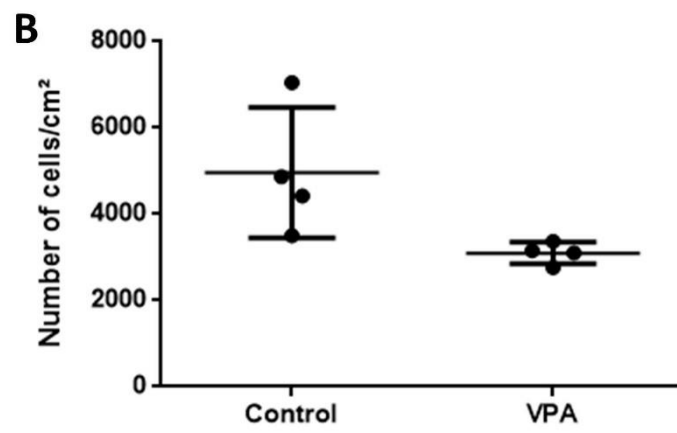
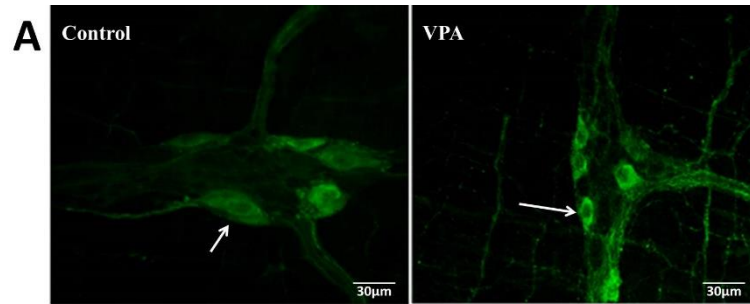


Fig 4

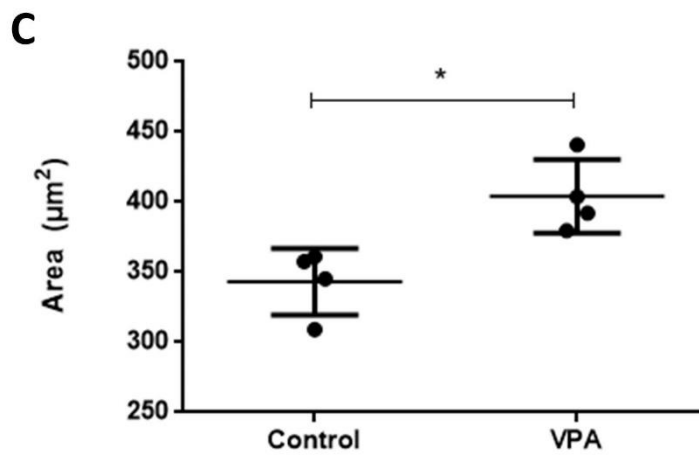
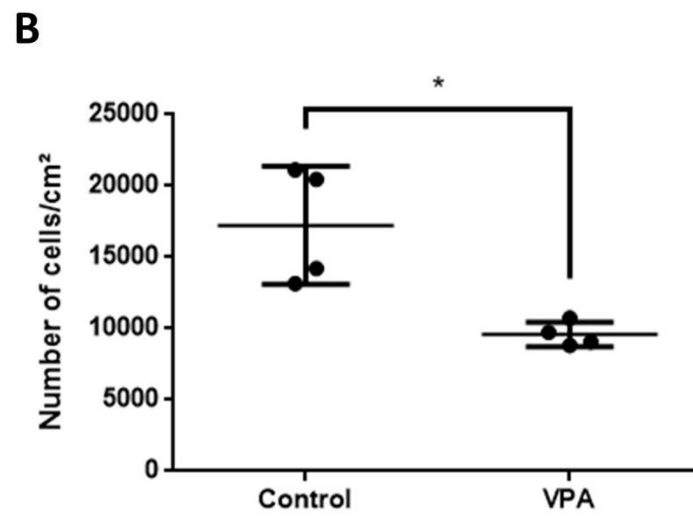
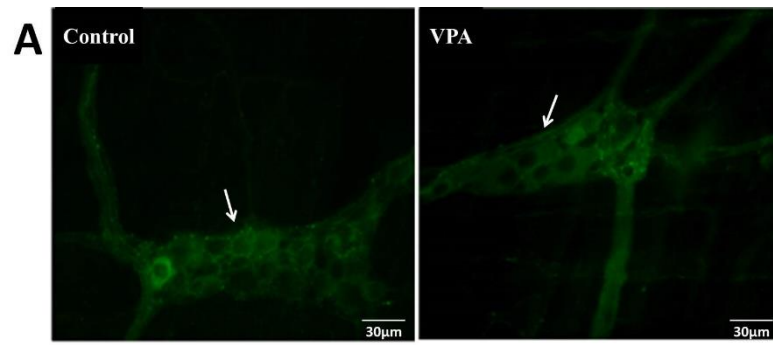
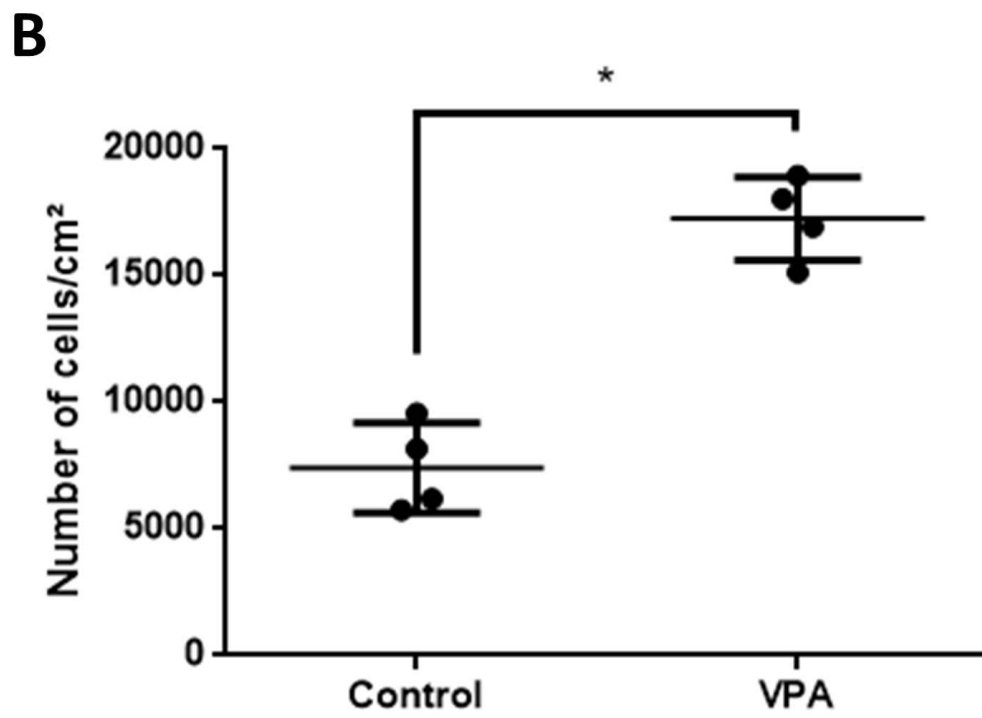
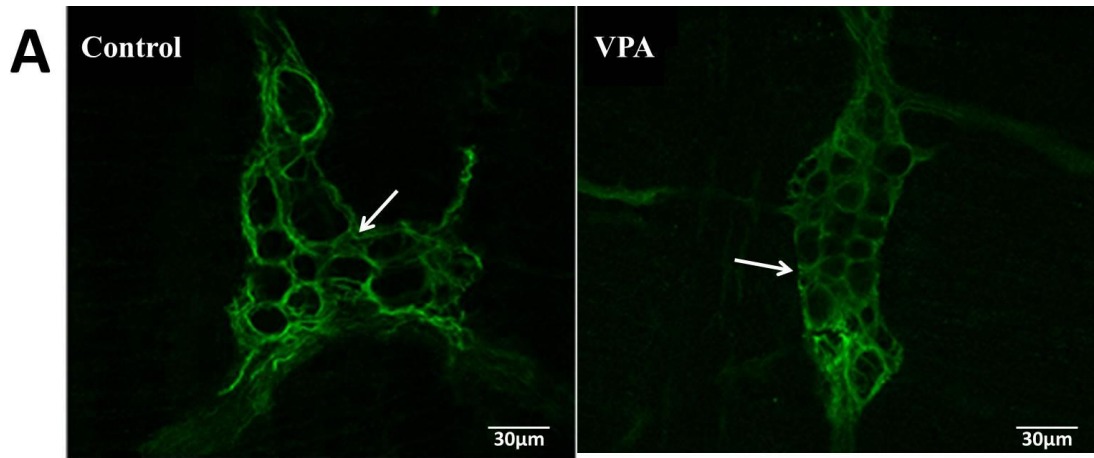


Fig 5



Legends of Figures

Supplementar material

Figure 1. Cell Body profile evaluation. Representative image showing the procedure of measuring neuronal area (red line) and its diameters (maximum and minimum) (yellow lines) using the Image Pro Plus software package.

Figures

Figure 1. Analysis of total myenteric neurons per ganglion and area of ganglion. (A) Neuronal density. (B) Total area of ganglion. * $p < 0.05$.

Figure 2. Analysis of total myenteric neurons per area and neuronal body area. (A) Representative images of HuC/D-positive cells in control and VPA groups. (B) Neuronal density. (C) Neuronal area. Arrows indicate labeled neurons. Scale bar: 30 μm . * $p < 0.01$.

Figure 3. Analysis of nitrergic myenteric neurons per area and neuronal body area. (A) Representative images of NOS positive cells in control and VPA groups. (B) neuronal density and (C) Neuronal area. Arrows indicate labeled neurons. Scale bar: 30 μm .

Figure 4. Analysis of cholinergic myenteric neurons per area and neuronal body area. (A) Representative images of ChAT-positive in control and VPA groups. (B) neuronal density and (C) Neuronal area. Arrows indicate labeled neurons. Scale bar: 30 μm . * $p < 0.05$.

Figure 5. Analysis of myenteric glial cells per area. (A) Representative images of GFAP-positive cells in control and VPA groups. (B) Glial cell density. Arrows indicate labeled enteric glial cells. Scale bar: 30 μm . * $p < 0.001$.

4. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra, pela primeira vez, importantes alterações neurais e gliais no SNE de ratos pré-natalmente expostos ao ácido valproico como modelo de autismo (Bambini-Junior et al., 2011; Kataoka et al., 2013; Schneider & Przewłocki, 2005).

Ratos do grupo VPA apresentam menor densidade neuronal por gânglio mioentérico, o que mostrou-se a partir da análise histológica, abrindo caminho para a investigação a respeito das diferenças na densidade neuronal podendo ser explicadas por diferenças na taxa neurônio/glia por gânglio ou ainda por uma redução em algum tipo neuronal específico no grupo VPA.

A partir disso, observou-se menor número de neurônios excitatórios colinérgicos, imunomarcados com anti-ChAT, e aumento, no grupo VPA, da área do corpo celular neste grupo neuronal. Tais dados podem explicar a diminuição no número total de neurônios, sendo que o sistema colinérgico tem papel importantíssimo na motilidade intestinal (John B. Furness, 2012) e na manutenção da função da barreira hemato-intestinal através da modulação de células glias entéricas (Cheadle, Costantini, Bansal, Eliceiri, & Coimbra, 2014).

Juntos estes dados indicam possíveis papéis de neurônios colinérgicos em, ao menos, algumas alterações gastrointestinais no modelo VPA. Estes achados são consistentes com um estudo publicado por Kim e colaboradores (2013) no qual há diminuição na motilidade do trato gastrointestinal no modelo VPA, além de alterações nas vilosidades ileais.

As células glias, também investigadas neste trabalho, não são excitáveis como neurônios, não gerando potenciais de ação. Entretanto, as células glias entéricas formam vastas redes de comunicação através de um complexo repertório de sinais de Ca^{2+} que permitem a estas células integrar informações transmitidas por células neuronais, glias, do sistema imune e outras células no microambiente entérico (Ochoa-Cortes et al., 2016).

Novos papéis estão sendo recentemente atribuídos às células glias entéricas. Estas células são responsáveis por sentir, responder e regular a função neuronal através

da liberação de gliotransmissores. Além disso, promovem a manutenção e a sobrevivência neuronais, sendo capazes, ainda, de formar uma ponte celular e molecular entre os nervos entéricos, células endócrinas, células do sistema imune e células epiteliais (Gulbransen & Sharkey, 2012; Rühl, 2005; Sharkey, 2015).

O aumento na densidade de células gliais no plexo mioentérico do modelo, o qual poderia inclusive contribuir na explicação da manutenção da área ganglionar além da diminuição da densidade neuronal, pode ter sido causada por uma reação defensiva das células gliais. Assim como os astrócitos do SNC, as células gliais entéricas concebivelmente lidam com o estresse agudo, limitam o dano tecidual e restauram a homeostase, ainda inibindo mecanismos adaptativos de plasticidade neuronal por trás da recuperação funcional (Pekny & Pekna, 2014; von Boyen & Steinkamp, 2010).

Consistentemente, a remoção e inibição funcional das células gliais entéricas desencadeiam severa inflamação no trato gastrointestinal (Bush et al., 1998) e diminuição na motilidade intestinal (Nasser et al., 2006), nos quais há o importante envolvimento da conexina 43 (Cx43), provavelmente pela liberação de fatores via canais de Cx43 e/ou acoplamento célula-célula via junções gap Cx43. Mudanças na expressão, localização celular e função da Cx43 têm o potencial de diretamente afetar o trato gastrointestinal quanto à motilidade, permeabilidade epitelial e processos inflamatórios (Grubišić & Parpura, 2015).

As alterações colinérgicas e gliais encontradas neste estudo, apesar de poderem ter sido geradas por mecanismos fisiológicos distintos, contribuem em conjunto para os quadros patológicos gastrointestinais presentes no TEA. Corroborando esta ideia, Cheadle e colegas (2013) mostraram íntima relação entre as células gliais entéricas e a sinalização neuronal colinérgica. Com a utilização de um agonista de receptores colinérgicos nicotínicos, mostrou-se maior ativação de células gliais entéricas e melhora na função da barreira epitelial intestinal em um modelo *in vitro* de dano intestinal. Ainda, a ativação nicotínica de células gliais entéricas parece modular a função da barreira epitelial através da menor ativação da via do fator nuclear kappa B (NF-kB) (Cheadle et al., 2014). Outro estudo *in vitro* mostra que, além de responder à sinalização colinérgica, as células gliais entéricas também respondem a outros mecanismos de neurotransmissão excitatória rápida, como a serotoninérgica e a purinérgica,

provavelmente através de mudanças intracelulares nas concentrações de Ca²⁺ (Boesmans et al., 2013).

Um fator fundamental por trás da relação entre o TEA e o trato gastrointestinal é a aumentada permeabilidade intestinal nestes indivíduos (Quigley, 2016). Estudos mostram que animais modelo de TEA apresentam defeitos na barreira epitelial gastrointestinal, resultando na entrada de toxinas e produtos metabólicos bacterianos na corrente sanguínea, influenciando a função encefálica (Hsiao et al., 2013; Onore, Careaga, & Ashwood, 2012). Por exemplo, o lipopolissacarídeo (LPS), componente da parede celular de bactérias gram-negativas, mostra-se aumentado no soro de pacientes com TEA em comparação com indivíduos com comportamento típico, estando associado com prejuízos no comportamento social (Emanuele et al., 2010). A integridade da barreira epitelial gastrointestinal e da barreira hemato-encefálica mostram-se prejudicadas em indivíduos com TEA, como evidenciado por níveis encefálicos aumentados de claudinas (CLDN-5, CDLN-12, CDLN-3) e diminuição nos componentes das junções oclusivas entéricas (CLDN-1, OCLN E TRIC) (Fiorentino et al., 2016). Ainda, camundongos livres de germes (germ-free) mostram aumento na permeabilidade intestinal (Braniste et al., 2014).

Assim, a microbiota intestinal pode vista como outro fator possivelmente envolvido nas alterações celulares entéricas encontradas no modelo, incluindo o prejuízo na comunicação SNE-SNC. A exposição pré-natal ao VPA, em camundongos, afetou as unidades taxonômicas operacionais (UTOs; menor entidade taxonômica utilizada no estudo) bacterianas, incluindo em gêneros como *Bacteroidetes* e *Firmicutes*, além da ordem *Desulfovibrionales*. Adicionalmente, desequilíbrios em UTOs designadas aos gêneros *Alistipes*, *Enterorhabdus*, *Mollicutes* e *Erysipelotrichalis* mostraram-se presentes especialmente nos machos prole de camundongos VPA. As diferenças microbianas nos machos expostos intra-útero ao VPA mostraram-se diretamente proporcionais ao aumento nos níveis fecais de butirato, assim como maior infiltração neutrofílica ileal; e inversamente associadas com níveis intestinais de serotonina e escores nos testes de comportamento social (de Theije et al., 2014). Em ratos, a administração intracerebroventricular de ácido propiônico (PPA) - um ácido graxo de cadeia curta, produto do metabolismo de bactérias entéricas – foi capaz de gerar déficits comportamentais similares aos encontrados em ratos do grupo VPA:

interesses restritos e prejuízos no comportamento social (MacFabe et al., 2011).

Corroborando os dados provenientes da pesquisa animal, a pesquisa clínica mostra que as alterações na interação entre a microbiota intestinal e o SNC podem contribuir significativamente para o aparecimento dos sintomas do TEA em crianças afetadas (Collins et al., 2009; Mayer, Padua, & Tillisch, 2014). Comparada à microbiota de crianças sem TEA, a microbiota em crianças com TEA é menos diversa e exhibe menores níveis de *Bifidobacterium* e *Firmicutes*, e maiores níveis de *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroidetes*, *Desulfovibrio*, *Caloramator* e *Sarcina* (Adams, Johansen, Powell, Quig, & Rubin, 2011; De Angelis, Francavilla, Piccolo, De Giacomo, & Gobetti, 2015; Sandler et al., 2000). Crianças com autismo que apresentam sintomas gastrointestinais possuem menor abundância dos gêneros *Prevotella*, *Coprococcus* e *Veillonellaceae* que aquelas sem sintomas gastrointestinais e neurotípicas (Kang et al., 2013). Amostras fecais de crianças com autismo também apresentam altos níveis do grupo *Clostridium histolyicum* (clusters I e II) comparadas com amostras de crianças neurotípicas (Parracho, Bingham, Gibson, & McCartney, 2005). Bactérias do gênero *Clostridium* podem produzir neurotoxinas, as quais podem exercer efeito sistêmico (Parracho et al., 2005), sendo que a redução de cepas de *Clostridium* causa significativa melhora em crianças com autismo (Sandler et al., 2000). Adicionalmente, crianças com autismo apresentam alterações nos níveis de *Bifidobacterium*, *Prevotella* e *Sutterella* (Wang et al., 2013); e crianças que nasceram por cesariana tem maior risco (1,23x) de desenvolvimento de TEA que aquelas nascidas por parto vaginal (Curran et al., 2015).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou um trabalho mostrando que um tratamento pré-natal com resveratrol (RSV) foi capaz de prevenir alterações na sociabilidade da prole no modelo VPA (Bambini-Junior et al., 2014). O RSV (3,4',5-triidroxi-trans-estilbeno) é um polifenol encontrado naturalmente em algumas frutas e vegetais, isolado pela primeira vez em 1940 das raízes de *Veratrum grandiflorum*. Sua presença em uvas, pinhas e amendoins é relacionada à proteção da planta contra infecções fúngicas e radiações UV (Vang et al., 2011). Adicionalmente, resultados preliminares de trabalhos em andamento do nosso grupo apontam que o RSV pode prevenir outras características que se refletem em diferenças em microRNA específicos. Assim, o RSV pode complementar o estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no

desenvolvimento de características do tipo autista neste modelo, incluindo aqueles relacionados ao SNE. 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, incluindo avaliação em idades embrionárias. Dessa forma, uma das perspectivas do estudo é a avaliação de possíveis prevenções em níveis moleculares, celulares e teciduais causadas pelo RSV no SNE.

Ainda, como perspectivas do estudo, encontra-se a avaliação celular e tecidual dos plexos submucoso e mioentérico do SNE em diferentes regiões do trato gastrointestinal, assim como a avaliação na expressão gênica e proteica de neurotransmissores importantes na regulação das funções do SNE e a descoberta dos mecanismos que levam a estas alterações, os quais podem ser estudados embriologicamente.

Em resumo, este trabalho é o primeiro a investigar alterações entéricas em níveis neuronais e gliais no autismo. Em conjunto nossos resultados apontam para alterações neuronais e gliais que podem explicar déficits na motilidade intestinal no transtorno e abrem possibilidades quanto ao entendimento e tratamento de doenças gastrointestinais associadas com o TEA através do SNE.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir a partir deste trabalho que a exposição pré-natal ao VPA medeia importantes alterações neuroglicais entéricas, que podem estar relacionadas de diferentes formas com o desenvolvimento e a gravidade dos sintomas gastrointestinais e comportamentais presentes no TEA. Considerando as alterações significativas, observou-se: 1. Redução do número de neurônios totais por gânglio e por área do gânglio. 2. Redução no número de neurônios colinérgicos por área seguido de aumento de área do corpo celular. 3. Aumento do número de células gliais por área. Dessa forma, nossos resultados apontam pela primeira vez alterações no SNE em modelo de autismo, abrindo perspectivas para o entendimento mais sistêmico da fisiopatologia do TEA, no qual dever-se-á considerar não só alterações no SNC, mas também alterações

neurogliais periféricas. Assim, a presença de desbalanços gastrointestinais no transtorno – consideravelmente maior que na população neurotípica – poderá ser vista com maior detalhe e cuidado, podendo possibilitar inclusive tratamentos mais eficientes a esses sintomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. B., Johansen, L. J., Powell, L. D., Quig, D., & Rubin, R. A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism – comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterology*, *11*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-22>
- Aldinger, K. A., Kogan, J., Kimonis, V., Fernandez, B., Horn, D., Klopocki, E., ... & Barkovich, A. J. (2013). Cerebellar and posterior fossa malformations in patients with autism-associated chromosome 22q13 terminal deletion. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *161*(1), 131-136. doi/10.1002/ajmg.a.35700/full
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition (DSM-5)*. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edition TR*. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>
- Anderson, G. M., Horne, W. C., Chatterjee, D., & Cohen, D. J. (1990). The Hyperserotonemia of Autisma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *600*(1), 331-340. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb16893.x/full>
- Arndt, T. L., Stodgell, C. J., & Rodier, P. M. (2005). The teratology of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *23*(2), 189-199. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.11.001>
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., & Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.003>
- Asperger, H. (1938). Das psychisch abnorme Kind. *Wien Klin Wochenschr*.

- Baio, J. (2012). Prevalence of Autism Spectrum Disorders: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 Sites, United States, 2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Surveillance Summaries. Volume 61, Number 3. Centers for Disease Control and Prevention.
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G. A., Moreira, J. C. F., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2011). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. *Brain Research*, *1408*, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.015>
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., ... Gottfried, C. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neuroscience Letters*, *583*, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>
- Banerjee, A., García-Oscos, F., Roychowdhury, S., Galindo, L. C., Hall, S., Kilgard, M. P., & Atzori, M. (2013). Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(6), 1309–1318. <https://doi.org/10.1017/S1461145712001216>
- Bassotti, G., Villanacci, V., Antonelli, E., Morelli, A., & Salerni, B. (2007). Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *87*(7), 628–32. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700564>
- Bauman, M. D., Iosif, A.-M., Smith, S. E. P., Bregere, C., Amaral, D. G., & Patterson, P. H. (2014). Activation of the Maternal Immune System During Pregnancy Alters Behavioral Development of Rhesus Monkey Offspring. *Biological Psychiatry*, *75*(4), 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.06.025>
- Bleuler, E. (1911). Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. *Handbuch Der Psychiatrie*. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10014515664/>
- Boesmans, W., Cirillo, C., Van den Abbeel, V., Van den Haute, C., Depoortere, I.,

- Tack, J., & Vanden Berghe, P. (2013). Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. *Neurogastroenterology & Motility*, 25(2), e151–e160.
<https://doi.org/10.1111/nmo.12065>
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Toth, M., ... Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine*, 6(263).
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009759>
- Bristol Silvestrin, R., Bambini-Junior, V., Galland, F., Daniele Bobermim, L., Quincozes- Santos, A., Torres Abib, R., ... Gottfried, C. (2013). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Research*, 1495, 52–60.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.11.048>
- Bryson, S. E., Rogers, S. J., & Fombonne, E. (2003). Autism spectrum disorders: early detection, intervention, education, and psychopharmacological management. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne de Psychiatrie*, 48(8), 506–16.
<https://doi.org/10.1177/070674370304800802>
- Buie, T., Campbell, D. B., Fuchs, G. J., Furuta, G. T., Levy, J., VandeWater, J., ... Winter, H. (2010). Evaluation, Diagnosis, and Treatment of Gastrointestinal Disorders in Individuals With ASDs: A Consensus Report. *Pediatrics*, 125(Supplement 1).
- Bush, T. G., Savidge, T. C., Freeman, T. C., Cox, H. J., Campbell, E. A., Mucke, L., ... Sofroniew, M. V. (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell*, 93(2), 189–201. <http://doi.org/10.1542/peds.2013-3995>
- Cheadle, G. A., Costantini, T. W., Bansal, V., Eliceiri, B. P., & Coimbra, R. (2014). Cholinergic Signaling in the Gut: A Novel Mechanism of Barrier Protection through Activation of Enteric Glia Cells. *Surgical Infections*, 15(4), 387–393.
<https://doi.org/10.1089/sur.2013.103>
- Chen, B., Girgis, S., & El-Matary, W. (2010). Childhood autism and eosinophilic

colitis. *Digestion*, 81(2), 127–9. <https://doi.org/10.1159/000252765>

Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*, 309(16), 1696–703.

<https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>

Coelho-Aguiar, J. D. M., Bon-Frauches, A. C., Gomes, A. L. T., Veríssimo, C. P., Aguiar, D. P., Matias, D., ... & Moura-Neto, V. (2015). The enteric glia: identity and functions. *Glia*, 63(6), 921-935. <https://doi.org/10.1002/glia.22795>

Collins, S. M., Bercik, P., Kelly, P., al., et, Masclee, A. A., & Saarela, M. (2009). The Relationship Between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease. *Gastroenterology*, 136(6), 2003–2014. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.075>

Cook, E. H. (2009). Gastrointestinal symptoms in ASD, brain structure of identical twins with ASD. *Autism Research*, 2(5), 285–286. <https://doi.org/10.1002/aur.95>

Courchesne, E., Karns, C., Davis, H., & Ziccardi, R. (2001). Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder an MRI study. *Neurology*. 57(2), 245-254. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.57.2.245>

Courchesne, E., & Pierce, K. (2005). Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. *Current Opinion in Neurobiology*. 15(2) 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.03.001>

Curran, E. A., O'Neill, S. M., Cryan, J. F., Kenny, L. C., Dinan, T. G., Khashan, A. S., & Kearney, P. M. (2015). Research Review: Birth by caesarean section and development of autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 56(5), 500–508. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12351>

De Angelis, M., Francavilla, R., Piccolo, M., De Giacomo, A., & Gobbetti, M. (2015). Autism spectrum disorders and intestinal microbiota. *Gut Microbes*, 6(3), 207–213. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1035855>

- de Magistris, L., Familiari, V., Pascotto, A., Sapone, A., Frolli, A., Iardino, P., ... Bravaccio, C. (2010). Alterations of the Intestinal Barrier in Patients With Autism Spectrum Disorders and in Their First-degree Relatives. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 51(4), 418–424. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181dcc4a5>
- de Theije, C. G. M., Wopereis, H., Ramadan, M., van Eijndthoven, T., Lambert, J., Knol, J., ... Oozeer, R. (2014). Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.005>
- Dufour-Rainfray, D., Vourc'h, P., & Guisquet, A. Le. (2010). Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: a model for autism. *Neuroscience*.470(1):55-9.<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.054>
- Emanuele, E., Orsi, P., Boso, M., Broglia, D., Brondino, N., Barale, F., ... Politi, P. (2010). Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. *Neuroscience Letters*, 471(3), 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.033>
- Fiorentino, M., Sapone, A., Senger, S., Camhi, S. S., Kadzielski, S. M., Buie, T. M., ... Fasano, A. (2016). Blood–brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Molecular Autism*, 7(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13229-016-0110-z>
- Fombonne, E. (2009). Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatric Research*, 65(6), 591-598. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819e7203>
- Furness, J. . (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 81(1), 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00127-2)
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(5), 286–294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Furness, J. B., Jones, C., Nurgali, K., & Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Progress in Neurobiology*, 72(2),

143–164. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2003.12.004>

Furuya, S., & Furuya, K. (2013). Roles of Substance P and ATP in the Subepithelial Fibroblasts of Rat Intestinal Villi. In *International review of cell and molecular biology* (Vol. 304, pp. 133–189). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407696-9.00003-8>

Gabella, G. (1972). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *Journal of Anatomy*, *111*(Pt 1), 69–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4335909>

Gadia, C. A., Tuchman, R., & Rotta, N. T. (2004). Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. *Jornal de Pediatria*, *80*(2), 83–94. <https://doi.org/10.1590/S0021-75572004000300011>

Galligan, J. J., LePard, K. J., Schneider, D. A., & Zhou, X. (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *Journal of the Autonomic Nervous System*, *81*(1), 97–103. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00130-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00130-2)

Genuis, S. J., & Bouchard, T. P. (2010). Celiac Disease Presenting as Autism. *Journal of Child Neurology*, *25*(1), 114–119. <https://doi.org/10.1177/0883073809336127>

Gershon, M. D., & Rothman, T. P. (1991). Enteric glia. *Glia*, *4*(2), 195–204. <https://doi.org/10.1002/glia.440040211>

Geschwind, D. H. (2009). Advances in Autism. *Annual Review of Medicine*, *60*(1), 367–380. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.053107.121225>

Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Baronio, D., Zanatta, G., Silvestrin, R. B., Vaccaro, T., & Riesgo, R. (2013). Valproic acid in autism spectrum disorder: from an environmental risk factor to a reliable animal model. In *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders-Volume I*. InTech. <https://doi.org/10.5772/54824>

Goyal, R. K., & He, X. D. (1998). Evidence for NO · redox form of nitric oxide as nitrergic inhibitory neurotransmitter in gut. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *275*(5). Retrieved from <http://ajpgi.physiology.org/content/275/5/G1185.short>

- Grabauskas, G., & Owyang, C. (2017). Plasticity of vagal afferent signaling in the gut. *Medicina*. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2017.03.002>
- Green, B. T., Lyte, M., Kulkarni-Narla, A., & Brown, D. R. (2003). Neuromodulation of enteropathogen internalization in Peyer's patches from porcine jejunum. *Journal of Neuroimmunology*, *141*(1), 74–82. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(03\)00225-X](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(03)00225-X)
- Groen, W., Teluij, M., Buitelaar, J., & Tendolkar, I. (2010). Amygdala and hippocampus enlargement during adolescence in autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, *49*(6), 552-560. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2009.12.023>
- Grubišić, V., & Parpura, V. (2015). The second brain in autism spectrum disorder: could connexin 43 expressed in enteric glial cells play a role? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 242. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00242>
- Gulbransen, B. D., & Sharkey, K. A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *9*(11), 625–632. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.138>
- Horvath, K., Papadimitriou, J. C., Rabsztyn, A., Drachenberg, C., & Tildon, J. T. (1999). Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *The Journal of Pediatrics*, *135*(5), 559–63. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(99\)70052-1](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(99)70052-1)
- Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., ... Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell*, *155*(7), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>
- Imai, K., Iida, T., Yamamoto, M., & Komatsu, K. (2014). Psychological and mental health problems in patients with thalidomide embryopathy in Japan. *Psychiatry and Clinical Neurophysiology*. [doi/10.1111/pcn.12152](https://doi.org/10.1111/pcn.12152)
- John Doe; Jane Smith. (2013). *Centers for Disease Control and Prevention*. (CDC, Ed.). Atlanta. Retrieved from <http://mdanderson.libanswers.com/faq/26256>
- Just, M., Cherkassky, V., Keller, T., & Minshew, N. (2004). Cortical activation and

synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: evidence of underconnectivity. *Brain*. Retrieved from <http://brain.oxfordjournals.org/content/127/8/1811.short>

Kang, D.-W., Park, J. G., Ilhan, Z. E., Wallstrom, G., LaBaer, J., Adams, J. B., & Krajmalnik-Brown, R. (2013). Reduced Incidence of Prevotella and Other Fermenters in Intestinal Microflora of Autistic Children. *PLoS ONE*, 8(7), e68322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068322>

Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. Retrieved from http://neurodiversity.com/library_kanner_1943.pdf

Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>

Kim, J.-W., Choi, C. S., Kim, K. C., Park, J. H., Seung, H., Joo, S. H., ... Park, S. H. (2013). Gastrointestinal tract abnormalities induced by prenatal valproic Acid exposure in rat offspring. *Toxicological Research*, 29(3), 173–9. <https://doi.org/10.5487/TR.2013.29.3.173>

Knowles, R. G., & Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *The Biochemical Journal*, (Pt 2), 249–58. <http://doi.org/10.1042/bj2980249>

Kolozsi, E., Mackenzie, R. N., Rouillet, F. I., Decatanzaro, D., & Foster, J. A. (2009). Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic adhesion molecule neuroligin 3 in mice. *Neuroscience*, 163(4), 1201–1210. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.021>

Koshino, H., Carpenter, P., Minshew, N., & Cherkassky, V. (2005). Functional connectivity in an fMRI working memory task in high-functioning autism. *Neuroimage*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.09.028>

Krammer, H.-J., & Khnel, W. (1993). Topography of the enteric nervous system in Peyer's patches of the porcine small intestine. *Cell and Tissue Research*, 272(2), 267–272. <https://doi.org/10.1007/BF00302732>

- MacFabe, D. F., Cain, N. E., Boon, F., Ossenkopp, K.-P., & Cain, D. P. (2011). Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behavioural Brain Research*, *217*(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.005>
- Martínez-Bermejo, A., & Polanco, I. (2002). Neuropsychological changes in coeliac disease. *Revista de Neurologia*, *34 Suppl 1*, S24-33. <http://doi.org/10.1007/s11126-011-9186-y>
- Mayer, E. A., Padua, D., & Tillisch, K. (2014). Altered brain-gut axis in autism: Comorbidity or causative mechanisms? *BioEssays*, *36*(10), 933–939. <https://doi.org/10.1002/bies.201400075>
- Mayes, S. D., Calhoun, S. L., Murray, M. J., Pearl, A., Black, A., & Tierney, C. D. (2014). Final DSM-5 under-identifies mild Autism Spectrum Disorder: Agreement between the DSM-5, CARS, CASD, and clinical diagnoses. *Research in Autism Spectrum Disorders*, *8*(2), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.rasd.2013.11.002>
- McElhanon, B. O., McCracken, C., Karpen, S., & Sharp, W. G. (2014). Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Pediatrics*, *111*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1471>
- Miles, J. H. (2011). Autism spectrum disorders—A genetics review. *Genetics in Medicine*, *13*(4), 278–294. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba>
- Miller, M., & Strömland, K. (1999). Teratogen update: thalidomide: a review, with a focus on ocular findings and new potential uses. *60*(5), 306-321. *Teratology*. [doi/10.1002/1096-9926](https://doi.org/10.1002/1096-9926)
- Miyazaki, K., Narita, N., & Narita, M. (2005). Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *23*(2–3), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.004>
- Narita, N., Kato, M., Tazoe, M., Miyazaki, K., & Narita, M. (2002). Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide-and valproic

- acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatric*. 52, 576–579.
<http://doi.org/10.1203/00006450-200210000-00018>
- Nasser, Y., Fernandez, E., Keenan, C. M., Ho, W., Oland, L. D., Tibbles, L. A., ... Sharkey, K. A. (2006). Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(5), G912–G927. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00067.2006>
- Nelson, K., Grether, J., & Croen, L. (2001). Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Annals of Neurology* 49(5):597-606. <http://doi.org/10.1002/ana.1024/full>
- Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A., Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., ... Christofi, F. L. (2016). Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(2), 433–49.
<https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000667>
- Olsson, C., & Holmgren, S. (2001). The control of gut motility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 128(3), 479–501. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00330-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00330-5)
- Onore, C., Careaga, M., & Ashwood, P. (2012). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(3), 383–92.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.007>
- Parker-Athill, E. C., & Tan, J. (2010). Maternal Immune Activation and Autism Spectrum Disorder: Interleukin-6 Signaling as a Key Mechanistic Pathway. *Neurosignals*, 18(2), 113–128. <https://doi.org/10.1159/000319828>
- Parracho, H. M., Bingham, M. O., Gibson, G. R., & McCartney, A. L. (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology*, 54(10), 987–991.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.46101-0>
- Paula, C. S., Ribeiro, S. H., Fombonne, E., & Mercadante, M. T. (2011). Brief Report: Prevalence of Pervasive Developmental Disorder in Brazil: A Pilot Study. *Journal*

- of Autism and Developmental Disorders*, 41(12), 1738–1742.
<https://doi.org/10.1007/s10803-011-1200-6>
- Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiology Review*, 94, 1077–1098. doi:10.1152/physrev.00041.2013
- Quigley, E. M. M. (2016). Leaky gut – concept or clinical entity? *Current Opinion in Gastroenterology*, 32(2), 74–79. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000243>
- Rapin, I., & Tuchman, R. F. (2008). Autism: Definition, Neurobiology, Screening, Diagnosis. *Pediatric Clinics of North America*.
<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2008.07.005>
- Riesgo, R. D. S., Becker, M. M., Ranzan, J., Bragatti Winckler, M. I., & Ohlweiler, L. (2013). Evolución de los niños con retraso del desarrollo y conductas del espectro autista. *Medicina (Buenos Aires)*, 73, 16-19.
- Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., & Croog, V. J. (1997). Linking etiologies in humans and animal models: Studies of autism. In *Reproductive Toxicology* (Vol. 11, pp. 417–422). [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(97\)80001-U](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(97)80001-U)
- Roulet, F. I., Lai, J. K. Y., & Foster, J. a. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.004>
- Roulet, F. I., Wollaston, L., deCatanzaro, D., & Foster, J. A. (2010). Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience*, 170(2), 514–522.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.069>
- Rühl, A. (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterology and Motility : The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 17(6), 777–90.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00687.x>
- Salzman, A. L. (1995). Nitric oxide in the gut. *New Horizons (Baltimore, Md.)*, 3(2), 352–64. <http://doi.org/10.1288/7583176>.
- Sandler, R. H., Finegold, S. M., Bolte, E. R., Buchanan, C. P., Maxwell, A. P.,

- Vaisanen, M.-L., ... Wexler, H. M. (2000). Short-Term Benefit From Oral Vancomycin Treatment of Regressive-Onset Autism. *Journal of Child Neurology*, *15*(7), 429–435. <https://doi.org/10.1177/088307380001500701>
- Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *30*, 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Sharkey, K. A. (2015). Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(3), 918–925. <https://doi.org/10.1172/JCI76303>
- Tan, G., Doke, T., Ashburner, J., & Wood, N. (2010). Normal variation in fronto-occipital circuitry and cerebellar structure with an autism-associated polymorphism of CNTNAP2. *Neuroimage*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.02.018>
- Tsujino, N., Nakatani, Y., Seki, Y., & Nakasato, A. (2007). Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.10.018>
- Uesaka, T., Young, H. M., Pachnis, V., & Enomoto, H. (2016). Development of the intrinsic and extrinsic innervation of the gut. *Developmental Biology*, *417*(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.016>
- Vang, O., Ahmad, N., Baile, C. A., Baur, J. A., Brown, K., Csiszar, A., ... Wu, J. M. (2011). What Is New for an Old Molecule? Systematic Review and Recommendations on the Use of Resveratrol. *PLoS ONE*, *6*(6), e19881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019881>
- Villalobos, M., Mizuno, A., Dahl, B., & Kemmotsu, N. (2005). Reduced functional connectivity between V1 and inferior frontal cortex associated with visuomotor performance in autism. *Neuroimage*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.12.022>
- von Boyen, G., & Steinkamp, M. (2010). The role of enteric glia in gut inflammation. *Neuron Glia Biology*, *6*(4), 231–236. <https://doi.org/10.1017/S1740925X11000068>

Wang, L., Christophersen, C. T., Sorich, M. J., Gerber, J. P., Angley, M. T., & Conlon, M. A. (2013). Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder. *Molecular Autism*, 4(1), 42. <https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-42>

Wing, L., & Potter, D. (2002). The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(3), 151–161. <https://doi.org/10.1002/mrdd.10029>