



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3ºAndar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica submetido
para avaliação no Edital: 04/2022
Modalidade: voluntário

Título do projeto: Avaliação do efeito da progesterona em vias neuroinflamatórias em animais submetidos a anoxia neonatal combinada à inflamação perinatal

Palavras-chave do projeto: Transtorno do Espectro Autista; Ativação Imune Materna; Anoxia neonatal; Progesterona;

Área do conhecimento do projeto: neurobiologia de sistemas

Sumário

1 Resumo.....	2
2 Introdução e Justificativa	2
3 Objetivos	6
4 Metodologia	6
5 Viabilidade.....	8
6 Cronograma de atividades	9
Referências.....	10

1 Resumo

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento que apresenta diversos graus de gravidade. A incidência é estimada entre 0,3% e 1,8% de nascidos vivos, sendo cinco vezes mais comum entre meninos. O ambiente materno, particularmente a inflamação têm um papel importante na incidência de TEA. A privação de oxigênio ao nascimento, conhecida como anoxia neonatal é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em crianças. Tanto a anoxia como a ativação imune materna (AIM) levam ao aumento da inflamação no sistema nervoso central se assemelhando ao que foi identificado em indivíduos com TEA. Devido a isso, a eficácia de possíveis agentes neuroprotetores tem sido testada. A progesterona (PROG) tem um forte potencial para o tratamento já que a sua utilização tem se mostrado benéfica em pesquisas relacionadas a privação de oxigênio na fase neonatal. Portanto, esse projeto tem como objetivo avaliar a ação neuroprotetores da PROG no modelo de inflamação perinatal por AIM combinada à anoxia neonatal. Será verificado se o tratamento por progesterona será eficaz na redução das vias neuroinflamatórias.

2 Introdução e Justificativa

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento heterogêneo e generalizado por déficits persistentes na interação social e de comunicação, déficits no desenvolvimento, compreensão e manutenção de relacionamentos, bem como comportamento repetitivo, com vários graus de gravidade (ERGÁZ; WEINSTEIN-FUDIM; ORNOY, 2016; KOGAN et al., 2009). A incidência é estimada entre 0,3% e 1,8% de nascidos vivos, um aumento de 7 a 9 vezes em relação a 20 anos atrás (ELSABBAGH et al., 2012; HINKKA-YLI-SALOMÄKI et al., 2014). Como resultado, houve um grande aumento de literatura sobre a pesquisa associada com TEA.

Embora parte desse aumento possa ser explicado por mudanças nos critérios de diagnósticos, tal fato não pode ser explicado apenas por isso e, portanto, devem ser identificados outros fatores que contribuem para o autismo e que também expliquem a elevação da incidência. No entanto, a etiologia é amplamente desconhecida e parece ser o resultado da interação genética e ambiental (TCHACONAS; ADESMAN, 2013). Nos últimos anos, as exposições ambientais, especialmente durante a gravidez, vêm sendo cada vez mais

reconhecidas como potenciais fatores de risco para TEA, e a possibilidade de que o ambiente pré-natal afete a programação fetal é uma direção promissora para pesquisas.

1.2 Ativação imune materna (AIM)

Estudos sugerem que o ambiente materno, particularmente a ligação entre a gestação e o estado de ativação do sistema imunológico materno durante períodos críticos do desenvolvimento fetal, têm um papel significativo na incidência de TEA (GLASSON et al., 2015). Um estudo epidemiológico sugeriu uma forte associação entre os períodos de AIM, particularmente durante o início da gravidez, com aumento do risco de induzir distúrbios de neurodesenvolvimento ao neonato, como TEA (MARAMARA; HE; MING, 2014).

O sistema imunológico é a interface com o meio ambiente, e um papel para o envolvimento imunológico em pelo menos um subtipo de TEA foi hipotetizado por algum tempo (MONEY; BORROW; CLARKE, 1971). Atualmente estudos observaram uma relação significativa entre doenças autoimunes familiares e TEA (COMI et al., 1999; MOLLOY et al., 2006a, 2006b; SWEETEN et al., 2003a, 2003b). Além disso, resultados de estudos post-mortem e utilizando as técnicas de ressonância magnética identificaram inflamação estável e persistente nos encéfalos de indivíduos com TEA em comparação aos indivíduos controle (PARDO; VARGAS; ZIMMERMAN, 2005; SUZUKI; et al., 2013).

Em modelos animais foi possível induzir comportamentos semelhantes aos do TEA através da AIM, alterando persistentemente a função imunológica da prole e o desenvolvimento neural do feto, como também alterações imunológicas que se correlacionam com anormalidades no comportamento (BAUMA et al., 2013; BAUMAN et al., 2013; BORRELL et al., 2000). Além disso, diversos fatores ambientais são associados ao TEA em humanos, como infecção, exposições a toxinas, estresse e obesidade materna, todos os quais impactam as vias inflamatórias (KRAKOWIAK et al., 2012; OUSSSEN et al., 2013; VOLK et al., 2013). Para mimetizar os efeitos da AIM em modelo animal pode-se utilizar um tratamento com lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina que simula infecção por bactérias gram-negativas em ratas em gestação acarretando a socialização e comportamento repetitivo / restrito induzido aos neonatos. Esses resultados sugerem que a exposição pré-natal ao LPS induziu efeitos semelhantes ao autismo na prole (KIRSTEN et al., 2012, 2013).

Mecanismos moleculares de vias da AIM, como a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, também podem induzir ao parto prematuro espontâneo, chegando a atingir 25% dos partos prematuros e 79 dos partos de prematuros extremos (CAPPELLETTI et al., 2016). Estudos mostram que o nascimento prematuro aumenta o risco de TEA em pacientes sem mutações genéticas relacionadas ao autismo conhecidas (LECHPAMMER et al., 2016).

1.3 Anoxia Neonatal

Recentemente, a privação de oxigênio ao nascimento, conhecida como anoxia neonatal, foi relacionada como o único fator de risco significativamente mais prevalente em mães mais velhas de crianças com TEA em comparação com mães mais jovens (MARAMARA; HE; MING, 2014). As consequências cognitivas de longa duração da anoxia neonatal incluem déficits na aprendizagem espacial e na memória (ROGALSKA; DANIELISOVA; CAPUTA, 2006; TAKADA et al., 2015), que podem estar relacionados ao dano hipocampal (LEUNER; GOULD; SHORS, 2006).

Além disso, a anoxia neonatal é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em crianças (KNOX et al., 2013), ocorrendo em cerca de 2% dos recém-nascidos, sendo que 60% destes são prematuros. De 20% a 50% dos recém-nascidos com anoxia severa morrem no período perinatal (MCQUILLEN; FERRIERO, 2006). Quando sobrevivem, 25% apresentam deficiências neuropsicológicas, como dificuldade de aprendizado, epilepsia e paralisia cerebral. As causas da privação de oxigênio, em sua maioria, ocorrem antes do nascimento, porém podem ocorrer também durante e após o nascimento (DOUGLAS-ESCOBAR; WEISS, 2013).

Embora possa haver morte neuronal durante um período suficientemente prolongado de asfixia, muitos neurônios podem se recuperar do insulto, ao menos parcialmente, em um período conhecido como "fase latente", que normalmente se estende ao longo das primeiras 6 horas após a lesão (CHO et al., 2020a). Atualmente, a hipotermia terapêutica (HT) está bem estabelecida como o tratamento padrão usado para neonatos com lesão moderada a grave causada por HI neonatal (ABATE et al., 2021). No entanto, a HT deve ser iniciado dentro de um período de 6 horas após o evento hipóxico (janela terapêutica) para atingir os efeitos neuroprotetores desejados (CHO et al., 2020b; GUNN et al., 1997). Portanto, a busca de agentes neuroprotetores que possam agir após a fase latente é de extrema importância.

1.4 Progesterona (PROG)

Em estudo prévio publicado por nosso grupo (FABRES et al., 2020a) foi possível observar que a PROG apresenta efeitos benéficos em animais neonatos submetidos a hipóxia-isquemia após 6h da lesão, sendo um candidato a agente neuroprotetor também no modelo de anoxia neonatal. A PROG, um esteroide neuroativo, é capaz de modular a atividade neural (DUBROVSKY, 2006) além de ativar vias de sinalização envolvidas com estímulos pró-sobrevivência em diferentes áreas encefálicas, promovendo a fosforilação da Akt e a fosforilação da Erk (componente da via das proteínas cinases ativadas por mitógenos - MAPK)(GUERRA-ARAIZA et al., 2009; KAUR et al., 2007).

Essas cinases participam das ações da PROG envolvendo o controle da diferenciação e da função neuronal e do comportamento reprodutivo, além das ações de neuroproteção (KAUR et al., 2007). A PROG pode, ainda, reduzir a expressão e a atividade da enzima caspase-3, que é

considerada a caspase efetora central e final, sendo responsável pela maior parte da apoptose celular (FABRES et al., 2020b).

A PROG também tem característica modulatória na astrogliose após lesões do SNC (Djebaili et al., 2004; Fabres et al., 2020; Labombarda et al., 2011). A astrogliose é um fenômeno comum em casos de lesão do SNC, dano excitotóxico, envelhecimento, neurodegeneração, neuroinflamação, isquemia e doenças metabólicas (Benarroch, 2005; Sofroniew, 2009). Astrócitos podem ter efeitos prejudiciais após lesões do SNC, levando à exacerbação da cascata inflamatória, liberação de níveis neurotóxicos de espécies reativas de oxigênio e glutamato e ao comprometimento da função da BHE, aumentando a formação de edema citotóxico (Sofroniew, 2009). Em muitas dessas condições, os hormônios esteróides desempenham um papel anti-gliótico, diminuindo a astrogliose. O efeito anti-gliótico já foi demonstrado para muitos esteróides, incluindo estradiol, moduladores seletivos do receptor de estrogênio, PROG, andrógenos e glicocorticóides (Djebaili et al., 2004; Garcia-Segura et al., 1999). Uma vez que os astrócitos expressam receptores intracelulares e de membrana para a PROG (Labombarda et al., 2011; Schumacher et al., 2004; Waters et al., 2008), especula-se que os efeitos dos esteróides sobre os astrócitos podem ser diretos. Exemplos de efeitos da PROG administrada *in vivo* sobre a função dos astrócitos incluem a inibição da óxido nítrico sintase, da GFAP e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-18 (Coughlan et al., 2005; Labombarda et al., 2011; Meyer et al., 2010). Também é conhecido que uma inativação seletiva do fator NF-kB astrogliar, um regulador chave da inflamação e da cascata de lesão secundária, leva a uma melhora da recuperação funcional em modelos de esclerose múltipla (Brambilla et al., 2009).

A este respeito, a inibição de NF-kB pela PROG sugere que a PROG possa agir como um regulador da astrogliose e dos danos secundários provocados pela HI. Portanto, há razões para se pensar que a PROG tem um forte potencial para o tratamento de doenças do neurodesenvolvimento, já que o mesmo apresenta efeitos benéficos em pesquisas relacionadas com lesão cerebral traumática, lesão cerebral isquêmica, hipóxia-isquemia neonatal e outros

modelos de lesão do SNC de adultos (FABRES et al., 2020b; KAORE et al., 2012; LUOMA; STERN; MERMELSTEIN, 2012; STEIN, 2011).

3 Objetivos

Avaliar a ação neuroprotetora da PROG no modelo de inflamação perinatal por AIM combinada à anoxia neonatal.

De modo específico, o projeto tem como objetivos:

I) Verificar se a PROG promove redução da morte neuronal, neuroinflamação e astrogliose reativa no hipocampo e córtex pré-frontal medial. Para isso, será avaliado o número de células coradas com marcação por NeuN, Iba-1 em P7.

II) Determinar os efeitos da PROG sobre as vias pro-inflamatórias. Para isso será realizada análise de Imunoensaio por multiplexagem de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α).

III) O desenvolvimento do projeto pelo aluno de IC irá proporcionar a inserção do aluno no mundo da pesquisa, como aprendizado de diversas técnicas experimentais que auxiliarão o aluno na titulação de mestre e doutor futuramente.

4 Metodologia

Para o desenvolvimento dos objetivos acima descritos, ratos Wistar machos com 1 dias de vida (P1) serão divididos em três grupos experimentais:

-1-grupo Controle;

-2-grupo LPS+Anoxia;

-3-grupo LPS + Anoxia + PROG

Os animais do **grupo controle** serão expostos às mesmas condições experimentais mas não serão submetidos a anoxia e, receberão apenas o veículo (ciclodextrina), ao invés da administração de progesterona.

Os animais do **grupo LPS + Anoxia** serão submetidos ao modelo AIM e anoxia neonatal e receberão a administração de veículo (ciclodextrina): 6h e 24h após a anoxia

Os animais do **LPS + Anoxia + PROG** serão submetidos ao modelo AIM e anoxia neonatal e receberão a administração de progesterona: 6h e 24h após a anoxia.

4.1 Animais

Serão utilizados ratos Wistar com 1 dia de idade (P1), machos e fêmeas de casais obtidos no Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP) e mantidos no biotério da Universidade Federal do ABC - campus São Bernardo do Campo. Os

filhotes serão mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310 mm, juntamente com suas respectivas mães (8 filhotes por caixa, juntamente com as respectivas mães). Todos os animais serão mantidos em ciclos claro/escuro de 12h/12h em salas climatizadas ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) com ração e água *ad libitum* durante todas as etapas do projeto.

4.1.2 Considerações Éticas

Todos os procedimentos serão realizados de acordo com a resolução normativa n°13, de 20 de setembro de 2013 e a resolução normativa n°30, de 02 de fevereiro de 2016 do CONCEA e de acordo com a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, além dos princípios internacionais para a prática envolvendo animais, constantes do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, 2011)* do *National Research Council of the National Academies*. Nenhum experimento será iniciado antes da aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFABC.

4.2 Modelo LPS

Para indução da inflamação perinatal, será realizada a injeção de LPS materno conforme o protocolo descrito por Babri, Doosti e Salari (BABRI; DOOSTI; SALARI, 2014). A aplicação será feita em fêmeas adultas grávidas no décimo sétimo dia gestacional, via subcutânea, de solução composta por 500 $\mu\text{g/kg}$ de LPS (*Escherichia coli* 055:B5, Sigma Co, USA) ou 50 $\mu\text{g/kg}$ salina. O grupo controle receberá apenas a salina no mesmo momento que os outros grupos.

4.3 Modelo Anoxia

Para a anoxia, será empregado o sistema descrito por Takada e colaboradores (TAKADA et al., 2011), composto por uma câmara com vazão para entrada e saída de gás, ligada a um regulador e ao cilindro de gás nitrogênio 100%. Ratos Wistar P1 pesando entre 6-8g, serão colocados em uma câmara de policarbonato, a qual será saturada completamente com nitrogênio 100% a um fluxo de 11,5 L/minuto, durante 25 minutos e aquecidos a 37°C por placa aquecedora e sob pressão de 101.7 kPa constante. O grupo controle será exposto às mesmas condições experimentais sem, contudo, haver troca do ar dentro da câmara, ou seja, permanecerá ao ar ambiente.

4.4 Progesterona

A administração de PROG será realizada de acordo com o modelo proposto por Tsuji et al. (TSUJI et al., 2012) e reproduzido por trabalhos anteriores realizados pelo candidato (FABRES et al., 2018, 2020b). A PROG será dissolvida em ciclodextrina 22,5% (2-hidroxipropil- β -ciclodextrina) e será administrada na dose de 10 mg/kg de peso corporal (na concentração de 5 mg/mL). Os animais receberão a administração de PROG 6h e 24h após o início do insulto. Essas duas injeções serão realizadas por via subcutânea, para permitir uma absorção mais gradual do

hormônio. A administração da PROG segue o modelo publicado por Fabres e colaboradores para tratamento de um modelo de hipóxia-isquemia neonatal (FABRES et al., 2020a).

4.5 Imunoensaio por multiplexagem

Os animais serão eutanasiados quando atingirem a idade de 7 dias e o hipocampo e o córtex pré-frontal medial serão dissecados e homogeneizados em tampão de lise celular. A dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-18 e TNF- α será realizada por meio de kits Multiplex no soro, córtex pré-frontal medial e hipocampo. Todos os procedimentos serão realizados de acordo com as especificações do fabricante.

4.6 Análise histológica

Para as técnicas histológicas, os animais serão anestesiados quando atingirem a idade de 7 dias com uma dose letal e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina (0,9%), seguida de uma solução de paraformaldeído (4%). Os encéfalos serão removidos e mantidos na mesma solução de paraformaldeído por 4 horas. Após, serão crioprotetidos com soluções crescentes de sacarose 15% e 30%, congelados e cortados no criostato (30 μ m).

4.6.1 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência será utilizada para avaliação da distribuição e morfologia das células astrocitárias e microgliais. Os cortes serão processados para a incubação com anticorpos primários anti-GFAP (1:500, Sigma-Aldrich), anti-Iba1 (1:1000, Wako), anti-NeuN (1:200, Cell Signaling). Será utilizado os anticorpos secundários fluorescentes compatíveis Alexa-Fluor 488 e 568 (Molecular Probes). Os cortes serão contracolorados com DAPI e avaliados em microscópio de fluorescência (5500 DM, Leica Microsystems, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (DFC 365 FX, Leica Microsystems, Alemanha) para a visualização e contagem das células do hipocampo e do córtex pré-frontal medial ⁵⁰.

4.7 Análise Estatística

A normalidade dos dados será verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos serão submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do post hoc de Duncan para comparações múltiplas. Os dados não-paramétricos serão avaliados por Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney. A significância aceita será de $p < 0,05$ e os testes serão realizados utilizando o programa SPSS versão 19.0.

5 Viabilidade

O laboratório é equipado com os equipamentos necessários para a realização do projeto, como também ser constituído de uma equipe experiente no modelo proposto e nas análises que serão realizadas. O modelo de LPS-anoxia é um modelo já utilizado em nosso laboratório, enquanto a utilização do tratamento de PROG já foi utilizado pelo nosso grupo e

gerou 2 artigos científicos do grupo já publicados em periódicos científicos. O projeto antes do início será submetido ao comitê de ética da instituição para aprovação. Portanto, o projeto apenas será iniciado após aprovação no comitê de ética.

6 Cronograma de atividades

1. Etapa 1

a. Etapa 1.a.

Revisão Bibliográfica - O aluno estará em contato com a literatura atual durante todo o período de desenvolvimento do projeto.

b. Etapa 1.b.

Comitê de ética - O projeto será submetido ao comitê de ética da instituição para aprovação e então solicitação dos animais para início dos experimentos.

c. Etapa 1.c.

Modelo LPS-Anoxia – Após aprovação no comitê de ética, e chegada dos animais, o modelo de LPS+Anóxia será realizado pelo aluno e supervisionado por um pós-graduando e pelo orientador.

2. Etapa 2

a. Etapa 2.a.

Imunoensaio por multiplexagem – Após a submissão dos animais ao modelo e após atingirem a idade de 7 dias os materiais biológicos serão devidamente processados para análise de vias inflamatórias.

b. Etapa 2.b.

Análise histológica – Após os animais atingirem 7 dias de idade, os animais serão eutanasiados e os materiais biológicos serão devidamente processados.

3. Etapa 3

a. Etapa 3.a.

Redação de artigo – Após as análises dos experimentos o aluno deverá escrever o primeiro artigo científico para submissão do mesmo em um periódico científico.

b. Etapa 3.b.

Submissão do artigo 1 à revista científica – Após a escrita, o aluno irá submeter o artigo a um periódico científico de impacto internacional.

c. Etapa 3.c.

Entrega do Relatório Final – Escrita e envio do relatório final ao CNPq.

Tabela 1 – Exemplo de cronograma de atividades previstas

Etapa	Mês											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
1.a.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1.b.	X	X										
1.c.			X	X								
2.a.				X	X	X						
2.b.				X	X	X	X	X				
3.a.									X	X	X	X
3.b.												X
3.c.												X

Referências

ABATE, B. B. et al. Effects of therapeutic hypothermia on death among asphyxiated neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: A systematic review and meta-analysis of randomized control trials. **PLoS ONE**, v. 16, n. 2 February 2021, p. 1–20, 2021.

BABRI, S.; DOOSTI, M.; SALARI, A. Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring. **Brain, Behavior, and Immunity journal**, v. 37, p. 164–176, 2014.

BAUMA, M. et al. Maternal antibodies from mothers of children with autism alter brain growth and social behavior development in the rhesus monkey. **Translational Psychiatry**, v. 3, n. 7, p. e278-12, 2013.

BAUMAN, M. D. et al. Activation of the Maternal Immune System During. **Biological Psychiatry**, v. 75, n. 4, p. 332–341, 2013.

BORRELL, J. et al. Prenatal Immune Challenge Disrupts Sensorimotor Gating in Adult Rats : Implications for the Etiopathogenesis of Schizophrenia. **NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY**, v. 26, n. 2, p. 204–215, 2000.

CAPPELLETTI, M. et al. Inflammation and preterm birth. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 1, p. 67–78, 2016.

CHO, K. H. T. et al. Cooling and immunomodulation for treating hypoxic-ischemic brain injury. **Pediatrics International**, v. 62, n. 7, p. 770–778, 2020a.

CHO, K. H. T. et al. Cooling and immunomodulation for treating hypoxic-ischemic brain injury. **Pediatrics International**, v. 62, n. 7, p. 770–778, 2020b.

COMI, A. M. et al. Familial Clustering of Autoimmune Disorders and Evaluation of Medical Risk Factors in Autism. **Journal of Child Neurology**, v. 14, p. 388–394, 1999.

- DOUGLAS-ESCOBAR, M.; WEISS, M. D. Biomarkers of brain injury in the premature infant. **Frontiers in Neurology**, v. 3 JAN, n. January, p. 1–7, 2013.
- DUBROVSKY, B. Neurosteroids , neuroactive steroids , and symptoms of affective disorders. **armacology, Biochemistry and Behavior**, v. 84, p. 644–655, 2006.
- ELSABBAGH, M. et al. Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. **Autism Research**, v. 5, n. 3, p. 160–179, 2012.
- ERGAZ, Z.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; ORNOY, A. Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). **Reproductive Toxicology**, v. 64, p. 116–140, 2016.
- FABRES, R. B. et al. Effects of progesterone on the neonatal brain following hypoxia-ischemia Effects of progesterone on the neonatal brain following. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, p. 813–821, 2018.
- FABRES, R. B. et al. Long-Lasting Actions of Progesterone Protect the Neonatal Brain Following Hypoxia-Ischemia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, n. 0123456789, 2020a.
- FABRES, R. B. et al. Long-Lasting Actions of Progesterone Protect the Neonatal Brain Following Hypoxia-Ischemia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 40, p. 1417–1428, 2020b.
- GLASSON, E. J. et al. Perinatal Factors and the Development of Autism. **Arch Gen Psychiatry**, v. 61, n. June 2004, p. 618–627, 2015.
- GUERRA-ARAIZA, C. et al. Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. **Journal of neuroscience research**, v. 87, n. 2, p. 470–81, fev. 2009.
- GUNN, A. J. et al. Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 2, p. 248–256, 1997.
- HINKKA-YLI-SALOMÄKI, S. et al. The incidence of diagnosed autism spectrum disorders in Finland. **Nordic Journal of Psychiatry**, v. 68, n. 7, p. 472–480, 2014.
- KAORE, S. N. et al. Novel actions of progesterone: what we know today and what will be the scenario in the future? **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 8, p. 1040–1062, ago. 2012.
- KAUR, P. et al. Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants. **Journal of neuroscience research**, v. 85, n. 11, p. 2441–9, 15 ago. 2007.
- KIRSTEN, T. B. et al. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, n. 10, p. 1903–1912, 2012.
- KIRSTEN, T. B. et al. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: Relevance to autism. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–10, 2013.
- KNOX, R. et al. Enhanced NMDA receptor tyrosine phosphorylation and increased brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in mice with neuronal Fyn overexpression. **Neurobiology of Disease**, v. 51, n. 1, p. 113–119, mar. 2013.

- KOGAN, M. D. et al. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. **Pediatrics**, v. 124, n. 5, p. 1395–1403, 2009.
- KRAKOWIAK, P. et al. Maternal Metabolic Conditions and Risk for Autism and Other Neurodevelopmental Disorders. **Pediatrics**, v. 129, n. 5, p. e1121–e1128, 2012.
- LECHPAMMER, M. et al. Dysregulation of FMRP/mTOR Signaling Cascade in Hypoxic-Ischemic Injury of Premature Human Brain. **Journal of Child Neurology**, v. 31, n. 4, p. 426–432, 2016.
- LEUNER, B.; GOULD, E.; SHORS, T. J. Is There A Link Between Adult Neurogenesis and Learning ? **hippocampus**, v. 224, n. January, p. 216–224, 2006.
- LUOMA, J. I.; STERN, C. M.; MERMELSTEIN, P. G. Progesterone inhibition of neuronal calcium signaling underlies aspects of progesterone-mediated neuroprotection. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 131, n. 1–2, p. 30–36, 2012.
- MARAMARA, L. A.; HE, W.; MING, X. Pre- and Perinatal Risk Factors for Autism Spectrum Disorder in a New Jersey Cohort. **Journal of Child Neurology**, v. 29, n. 12, p. 1645–1651, 2014.
- MCQUILLEN, P. S.; FERRIERO, D. M. Perinatal Subplate Neuron Injury: Implications for Cortical Development and Plasticity. **Brain Pathology**, v. 15, n. 3, p. 250–260, 5 abr. 2006.
- MOLLOY, C. A. et al. Familial Autoimmune Thyroid Disease as a Risk Factor for Regression in Children with Autism Spectrum Disorder : A CPEA Study. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 36, n. 3, p. 317–324, 2006a.
- MOLLOY, C. A. et al. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. **Journal of Neuroimmunology**, v. 172, p. 198–205, 2006b.
- MONEY, J.; BORROW, N. A.; CLARKE, F. C. Autism and Autoimmune Disease: A Family Study. **journal of Autism and Childhood Schizophrenia**, v. 1, n. 2, p. 146–160, 1971.
- OUSSENY, Z. et al. Maternal Infection During Pregnancy and Autism Spectrum Disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 45, p. 4015–4025, 2013.
- PARDO, C. A.; VARGAS, D. L.; ZIMMERMAN, A. W. Immunity , neuroglia and neuroinflammation in autism. **International Review of Psychiatry**, v. 17, n. 6, p. 485–495, 2005.
- ROGALSKA, J.; DANIELISOVA, V.; CAPUTA, M. Effect of neonatal body temperature on postanoxic, potentially neurotoxic iron accumulation in the rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 393, n. 2–3, p. 249–254, 2006.
- STEIN, D. G. Is progesterone a worthy candidate as a novel therapy for traumatic brain injury? **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 352–359, 2011.
- SUZUKI, K. et al. Microglial Activation in Young Adults With Autism Spectrum Disorder. **JAMA Psychiatry**, v. 70, n. 1, p. 49–58, 2013.
- SWEETEN, T. L. et al. Pervasive Developmental Disorders. **Pediatrics**, v. 112, n. 5, p. 420–424, 2003a.
- SWEETEN, T. L. et al. High Blood Monocyte Counts and Neopterin Levels in Children With Autistic Disorder. **Am J Psychiatry**, v. 160, n. 9, p. 1691–1693, 2003b.

TAKADA, S. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 1, p. 62–69, 2011.

TAKADA, S. H. et al. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience**, v. 284, n. October, p. 247–259, 2015.

TCHACONAS, A.; ADESMAN, A. Autism spectrum disorders: A pediatric overview and update. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 25, n. 1, p. 130–144, 2013.

TSUJI, M. et al. Progesterone and allopregnanolone exacerbate hypoxic-ischemic brain injury in immature rats. **Experimental neurology**, v. 233, n. 1, p. 214–20, jan. 2012.

VOLK, H. E. et al. Brief Report: Autism Spectrum Disorder: Interaction of Air Pollution with the MET Receptor Tyrosine Kinase Gene. **Epidemiology**, v. 25, n. 1, p. 44–47, 2013.