

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – PPGCS**

**JOSÉ MARCELO BOTACIN CAMPOS**

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO GESTACIONAL AO VALPROATO DE  
SÓDIO COMBINADO A PRIVAÇÃO MATERNA EM UM MODELO  
ANIMAL DE AUTISMO**

**CRICIÚMA, 2020**

JOSÉ MARCELO BOTACIN CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO GESTACIONAL AO VALPROATO DE  
SÓDIO COMBINADO A PRIVAÇÃO MATERNA EM UM MODELO  
ANIMAL DE AUTISMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cinara Ludvig  
Gonçalves

**CRICIÚMA, 2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C198a Campos, José Marcelo Botacin.

Avaliação da exposição gestacional ao valproato de sódio combinado a privação materna em um modelo animal de autismo / José Marcelo Botacin Campos. - 2020.

74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.

Orientação: Cinara Ludvig Gonçalves.

1. Transtorno do Espectro Autista (TEA). 2. Autismo. 3. Privação dos pais. 4. Ácido valpóico. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 23. ed. 616.8982



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 357

Com início às 16h (dezesseis horas) do dia vinte e oito de julho de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, via ferramenta digital Google Meet, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **JOSÉ MARCELO BOTACIN CAMPOS**, sob a orientação da **Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves** intitulada “**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO GESTACIONAL AO VALPROATO DE SÓDIO COMBINADO A PRIVAÇÃO MATERNA EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Profa. Dra. Gislaine Tezza Rezin (Universidade do Sul da Santa Catarina - UNISUL) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 17h (dezessete horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 28 (vinte e oito) de julho de 2020 (dois mil e vinte).

**Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol**  
Coordenador do PPGCS

**Fernanda Nunes Peruchi**  
Assistente Administrativo

## **FOLHA INFORMATIVA**

Esta dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Autismo e pesquisa em Neurodesenvolvimento – LAND, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da UNESC.

*Dedico este trabalho à minha família: esposa Gilnara e filhos Bhrenda, Marcelo Antônio e Olívia que sempre me apoiaram e deram força para meu sucesso e a minha Mãe Cecília que, nos tempos difíceis, me acolheu em seus braços.*

## **AGRADECIMENTOS**

Não poderia iniciar de modo diferente, que não fosse agradecer a Deus pela saúde e por me ter permitido fazer novos amigos e me tornar um profissional melhor. À minha esposa Gilnara, que nos tempos difíceis sempre me apoiou, acreditou em mim e em minhas ideias, e hoje faz parte do meu sucesso. A minha mãe, pois, no momento que precisei ela me acolheu, me aconselhou e apoiou.

Agradeço as minhas amigas de estudo, que desde o começo, fizeram parte da dura rotina de estudos, das apresentações dos trabalhos e viagens à Criciúma - SC. Nos momentos em que estava difícil, sempre tínhamos uns aos outros para nos socorrer. Obrigado Daine, Rovená, Lia e Rusilania pelo apoio, carinho e parceria nesta jornada.

Agradeço também ao UNESC Colatina-ES, por ter me proporcionado a oportunidade de aperfeiçoamento profissional através do programa MINTER, certamente, estou mais capacitado e com olhares ampliados frente a tríade ensino-pesquisa-extensão.

Agradeço a minha orientadora prof. Dr<sup>a</sup> Cinara que me acolheu em seu grupo de estudos, me orientou e conduziu meus estudos sobre sua sabedoria. Agradeço também aos membros do grupo de estudos/laboratório pelo aprendizado e por ter me ajudado com os experimentos.

Muitas pessoas fazem parte desta caminhada e não seria possível citar o nome de todas, então, agradeço as falas, orientações dos amigos, coordenadores de curso e família que diretamente contribuíram para a conclusão deste curso.

*“Do lado de fora, olhando para dentro, você nunca poderá entendê-lo. Do lado de dentro, olhando para fora, você jamais conseguirá explicá-lo. Isso é autismo.”*

Autism Topics

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$  – Oxigênio singlet

5-HT – Serotonina /Receptor 5-hidroxitriptamina (sigla do inglês)

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (sigla do inglês)

CDC – Centros de Controle e Prevenção de Doenças (sigla do inglês)

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CNVs - Variantes do Número de Cópias (sigla do inglês)

DCF – 2',7'-diclorofluoresceína

DCFH – Dicloroidrofluoresceína (sigla do inglês)

DCFH-DA – diacetato 2',7'-diclorofluoresceína

DNA – Ácido desoxirribonucleico (sigla do inglês)

DNPH – 2,4-dinitrofenil-hidrazina

DPN – Dia pós-natal

DSM – Manual de Diagnóstico e Estatístico da Associação Americana de Psiquiatria

DTNB – Ácido 5,5'-ditio-bis- [2-nitrobenzóico] (sigla do inglês)

eNOS – Isoenzima óxido nítrico sintase endotelial (sigla do inglês)

ERN – Espécies reativas nitrogênio

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

FMR1 – Gene Retardo Mental frágil X 1 (sigla do inglês)

GABA – Ácido gama-amino-butírico (sigla do inglês)

GABA<sub>A</sub> – Receptores do ácido  $\gamma$ -aminobutírico tipo A (sigla do inglês)

GABRB3 – Receptor beta3 do ácido gama-aminobutírico 3 (sigla do inglês)

GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub> – Descarboxilase de ácido glutâmico (sigla do inglês)

GD – Dia gestacional

GPx – Glutathione peroxidase (sigla do inglês)

GR – Glutathione reductase (sigla do inglês)

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada (sigla do inglês)

GST – Glutathione transferase (sigla do inglês)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

HNO<sub>2</sub> – Ácido nitroso

HO<sup>•</sup> – Hidroxila

HPA – Hipotálamo-pituitária-adrenal

IFN- $\gamma$  – Interferon-gama (sigla do inglês)

IL-12 – Interleucina 12

IL-1 $\beta$  – Interleucinas 1beta

IL-6 – Interleucina 6

iNOS – Isoenzima óxido nítrico sintase indutível (sigla do inglês)

IP – Intraperitoneal

MDA – Malondialdeído

MECP2 – Proteína 2 de ligação ao metil-CpG (sigla do inglês)

mtDNA – DNA mitocondrial

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> – Óxido nitroso

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzida (sigla do inglês)

NG<sub>2</sub>-glia – Células precursoras de oligodendrócitos (sigla do inglês)

nNOS – Isoenzima óxido nítrico sintase neuronal (sigla do inglês)

NO – Óxido nítrico (sigla do inglês)

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrito

NO<sub>2</sub><sup>·</sup> – Nitrito

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – Nitrato

NOS – Óxido nítrico sintase (sigla do inglês)

O<sub>2</sub> – Oxigênio molecular

O<sub>2</sub><sup>·-</sup> – Superóxido

ONOO<sup>-</sup> – Peroxinitrito

OPCs – Células progenitoras de oligodendrócitos (sigla do inglês)

PM – Privação Materna

RO<sup>·</sup> – Alcoxila

ROO<sup>·</sup> – Peroxila

SAL – Salina

SC – Subcutânea

SH – Grupo Sulfidril

SHANK3 – Gene SH3 e múltiplos domínios de repetição de anquirina 3 (sigla do inglês)

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TEA – Transtorno do Espectro Autista

TNF- $\alpha$  – Fatores de Necrose Tumoral Alfa (sigla do inglês)

VO – Via oral

VPA – Ácido Valproico

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Correlação entre fatores contribuintes para o desenvolvimento do TEA...	21
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática do processo inflamatório durante a gravidez com ativação do sistema imune fetal. ....	22
<b>Figura 3:</b> Quadro apresentando estágios de desenvolvimentos e fatores ambientais associados ao Transtorno do Espectro Autista. ....	26
<b>Figura 4:</b> Estresse por privação materna e alterações fisiológicas.....	31
<b>Figura 5:</b> Hipótese de citocinas de neuroinflamação: implicações na comorbidade de doenças sistêmicas com transtornos psiquiátricos.....	32
<b>Figura 6:</b> Produção de ERO e efeitos patológicos provocado pelo desequilíbrio redox nas células. ....	36
<b>Figura 7:</b> Representação esquemática do desenho experimental - matrizes VPA / SAL. ....	41
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática do desenho experimental modelo animal murino de TEA: VPA + PM.....	41
<b>Figura 9:</b> Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, no comportamento de interação social dos animais testados. ....	47
<b>Figura 10:</b> Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, no comportamento locomotor dos animais testados. ....	48
<b>Figura 11:</b> Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de DCF, no cérebro em região Pré-frontal <b>(A)</b> , Córtex <b>(B)</b> e Cerebelo <b>(C)</b> de animais expostos ao VPA (pré-natal) e a PM (pós-natal) (n= 5-6 animais/grupo). ....	49
<b>Figura 12:</b> Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de Carbonil no cérebro em região Pré-frontal <b>(A)</b> , Córtex <b>(B)</b> e Cerebelo <b>(C)</b> dos animais testados (n=5-6 animais/grupo).....	50
<b>Figura 13:</b> Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de Sulfidrila (SH) no cérebro em região Pré-frontal <b>(A)</b> , Córtex <b>(B)</b> e Cerebelo <b>(C)</b> dos animais testados (n=5-6 animias/grupo). ....	51
<b>Figura 14:</b> Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de nitrito (NO <sub>2</sub> -) no cérebro em região Pré-frontal <b>(A)</b> , Córtex <b>(B)</b> e Cerebelo <b>(C)</b> dos animais testados (n=5-6 animais/grupo). ....	51

<b>Figura 15:</b> Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de glutathiona reduzida (GSH) no cérebro em região Pré-frontal <b>(A)</b> , Córtex <b>(B)</b> e Cerebelo <b>(C)</b> dos animais testados ( n=5-6 animais /grupo).....	52
<b>Figura 16:</b> Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de Superóxido Dismutase (SOD), no cérebro em região Pré-frontal <b>(A)</b> , Córtex <b>(B)</b> e Cerebelo <b>(C)</b> dos animais testados ( n=5-6 animais /grupo). .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Síndromes monogênicas* associadas ao transtorno do espectro autista e a genes correspondentes.....	25
<b>Tabela 2:</b> Avaliação do estado redox do homogeneizado cerebral – visão geral .....	63

## RESUMO

**Introdução:** O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um distúrbio complexo e geneticamente heterogêneo caracterizado por comprometimento das habilidades sociais e de comunicação, além de comportamentos estereotipados e um repertório restrito de interesses e atividades. Estudos mostram que o TEA afeta 1 em cada 100 crianças em todo o mundo com prevalência em homens na proporção de quatro vezes mais (4:1) que as mulheres. Apresenta etiopatogenia multifatorial provinda da interação complexa entre fatores genéticos e ambientais. Essa multiplicidade de fatores dificultam a concretização de sua fisiopatologia. Estudos demonstram que fatores gestacionais como complicações durante a gravidez, exposição a produtos químicos, processo inflamatório materno durante a gestação, epigenética, e disfunção mitocondrial podem afetar o neurodesenvolvimento e estão associados ao TEA.

**Objetivo:** caracterizar os efeitos da exposição gestacional ao valproato de sódio combinado à privação materna sob parâmetros comportamentais, inflamatórios e de estresse oxidativo. **Metodologia:** Foi utilizado o modelo animal de autismo através de indução química por administração de ácido valpróico (VPA) pré-natal, associado à privação materna (PM) pós-natal. No décimo segundo dia de gestação (DG12), as ratas Wistar grávidas receberam 600mg/kg de VPA (grupo VPA-expostos) ou salina (grupo SAL-expostos), via intraperitoneal. Ao nascimento, as proles VPA-expostos e SAL-expostos foram subdivididos em grupos: **I)** “privação materna” e **II)** “sem-privação materna”, para realização do experimento. A privação materna ocorreu do 1º ao 10º dia pós-natal, durante 3 h/dia. Os parâmetros comportamentais de interação social e avaliação locomotora, foram avaliados nos dias 25 e 28 pós-natal. No 30º dia pós-natal, os animais foram eutanasiados e o cérebro removido para isolamento do córtex, pré-frontal e cerebelo para análise de parâmetros estresse oxidativo. **Resultados:** O modelo VPA demonstrou alterações significativas no teste de interação social, conforme observado em humanos com TEA. Na análise molecular, para identificar comprometimento estrutural e funcional, os dados estatísticos demonstraram que o grupo VPA+PM apresentou alteração significativa dos níveis de todos os marcadores de estresse oxidativo utilizados diclorodifluoresceína (DCF), proteína carbonil, sulfidril, óxido nítrico e diminuição da defesa antioxidante de glutatona reduzida (GSH) e superóxido dismutase (SOD). **Conclusão:** O protocolo de VPA+PM proposto neste estudo se mostrou funcional com alcance dos objetivos traçados pela pesquisa. Se mostrou como um modelo complexo e com alterações que perduraram na juventude. Estudos futuros são sugeridos para uma melhor investigação dos mecanismos fisiológicos promovidos pela associação do modelo VPA+PM, deste modo, processos ainda não compreendidos podem ser avaliados direcionando tratamento mais eficientes e menos custosos aos indivíduos com TEA e para suas famílias.

**Palavras-chave:** Autismo; privação materna; ácido valpróico; estresse oxidativo.

## ABSTRACT

**Introduction:** Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex and genetically heterogeneous disorder characterized by impairment of social and communication skills, as well as stereotyped behaviors and a restricted repertoire of interests and activities. Studies show that ASD affects 1 in every 100 children worldwide with prevalence in men at a rate of four times higher (4:1) than women. It presents multifactorial etiopathogenesis resulting from the complex interaction between genetic and environmental factors. This multiplicity of factors hinders the realization of its pathophysiology. Studies have shown that gestational factors such as complications during pregnancy, exposure to chemicals, maternal inflammatory process during pregnancy, epigenetics, and mitochondrial dysfunction can affect neurodevelopment and are associated with ASD. **Objective:** to characterize the effects of gestational exposure to sodium valproate combined with maternal deprivation under behavioral, inflammatory and oxidative stress parameters. **Methodology:** We used the animal model of autism through chemical induction by administration of prenatal valproic acid (APV) associated with maternal deprivation (MB) postnatal. On the twelfth day of pregnancy (GD12), pregnant Wistar rats received 600mg/kg of VPA (VPA-exposed group) or saline (SAL-exposed group) intraperitoneally. At birth, the VPA-exposed and SAL-exposed offspring were subdivided into groups: I) "maternal deprivation" and II) "maternal deprivation", to perform the experiment. Maternal deprivation occurred from the 1st to the 10th postnatal day, during 3 h/day. The behavioral parameters of social interaction and locomotor evaluation were evaluated on days 25 and 28 postnatal. On the 30th postnatal day, the animals were euthanized and the brain removed for isolation of cortex, prefrontal and cerebellum structures for analysis of oxidative stress parameters. **Results:** The VPA model demonstrated significant changes in the social interaction test, as observed in humans with ASD. In the molecular analysis, to identify structural and functional impairment, the statistical data demonstrated that the VPA+PM group presented significant changes in the levels of all oxidative stress markers used dichlorodifluorescein (DCF)carbonyl protein, sulfhydryl, nitric oxide and decreased antioxidant defense of reduced glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD). **Conclusion:** the VPA+PM protocol proposed in this study proved to be functional with the objectives outlined by the research. It presented itself as a complex model and with amendments that persisted in youth. Future studies are suggested for a better investigation of the physiological mechanisms promoted by the association of the VPA+PM model. Thus, processes not yet understood can be evaluated by directing more efficient and less costly treatment to individuals with ASD and to their families.

**Key-words:** Autism; maternal deprivation; valproic acid; oxidative stress.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 Transtorno do Espectro Autista - TEA .....	19
1.2 Neurodesenvolvimento e genética no TEA.....	23
1.3 Modelo animal de TEA por administração de Ácido Valproico (VPA).....	26
1.4 Privação Materna e alterações imunológicas .....	29
1.5 Neuroglia, estresse oxidativo e neuropatologia .....	33
1.6 Justificativa e relevância .....	36
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos .....	38
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 Aspectos Éticos .....	39
3.2 Protocolo de exposição ao VPA .....	39
3.3 Protocolo de Privação Materna.....	40
3.4 Desenho Experimental.....	40
3.5 Avaliação comportamental.....	41
3.5.1 Teste de interação social .....	41
3.5.2 Teste de locomoção .....	42
3.6 Análises Bioquímicas.....	42
3.7 Avaliação de Estresse Oxidativo .....	43
3.7.1 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS:.....	43
3.7.2 Determinação da concentração da 2',7'-diclorofluoresceína - DCF .....	43
3.7.3 Determinação da concentração de Oxido Nítrico .....	43
3.7.4 Oxidação de proteínas: concentração de Carbonil .....	44
3.7.5 Determinação da concentração de Sulfidril (SH) .....	44
3.8 Defesas antioxidantes.....	45
3.8.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) .....	45
3.8.2 Determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH) .....	45

3.8.3 Nível de proteínas totais.....	45
3.9. Análises Estatísticas .....	46
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1 Avaliação Comportamental.....	47
4.1.1 Teste da Interação Social.....	47
4.1.2 Avaliação da atividade locomotora.....	48
4.2 Análise Bioquímica .....	48
4.2.1 Dano oxidativo .....	48
4.2.1.1 Concentração de DCF.....	48
4.2.1.2 Concentração de Carbonil.....	49
4.2.1.3 Concentração de Sulfidrilas .....	50
4.2.1.4 Concentração de Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	51
4.3 Defesa Antioxidante.....	52
4.3.1 Concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	52
4.3.2 Concentração Superóxido Dismutase (SOD).....	53
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>74</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Transtorno do Espectro Autista - TEA

O termo “autismo” foi utilizado pela primeira vez por Bleuler em 1911, para denominar pacientes com perda do contato com a realidade o que dificultava ou mesmo impossibilitava sua comunicação, adiante, a primeira descrição da síndrome foi feita por Leo Kanner, em 1943 (Bernardi et al., 2012; Masi et al., 2017).

Em seu estudo, Kanner, estabeleceu uma distinção entre essa síndrome (Autismo), e a da "esquizofrenia infantil" observando nas crianças avaliadas extrema incapacidade de se relacionar com outras, mais tarde, Hans Asperger (1944) publicou um trabalho intitulado de "psicopatia autista" apontando dificuldades com a comunicação não verbal e habilidades sociais relacionadas ampliando os conceitos sobre o transtorno (Masi et al., 2017). Atualmente, o termo transtorno do espectro do autismo (TEA) é usado para explicar a diversidade de sintomas que caracterizam essa neuropatologia (Bossu, Roux, 2019).

O TEA é um distúrbio complexo e geneticamente heterogêneo (Griesi-Oliveira, Sertie, 2017), caracterizado por comprometimento das habilidades sociais e de comunicação, além de comportamentos estereotipados e um repertório restrito de interesses e atividades. (APA, 2013; Lai et al., 2014; Baxter et al., 2015; Gomes et al., 2015, Bossu, Roux, 2019). A detecção do transtorno ocorre na primeira infância, antes dos três anos de idade com alguns sintomas perceptíveis entre os 6 e os 18 meses de idade (Bernardi et al., 2012; Lyall et al., 2017).

Atualmente, o TEA ocupa o terceiro lugar entre os transtornos de desenvolvimento infantil mais comuns (Schlickmann, Fortunato, 2013), apresentando-se em três graus de gravidade: leve, moderado e severo (Hadjkacem et al., 2016). Segundo Ferreira e De Oliveira (2016), trata-se de um transtorno com grande implicação na funcionalidade diária do indivíduo, necessitando de um direcionamento no tratamento para a intervenção educativa e comportamental, de forma individualizada, e intensiva.

Desde a descrição da síndrome, muitos debates ocorreram e, como diagnóstico médico para autismo infantil, são utilizados os critérios descritos no Manual de Diagnóstico e Estatístico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM) (Bernardi et al., 2012; Masi et al., 2017). As orientações diagnósticas do autismo foram descritas

na DSM-3 – como subgrupo de transtorno invasivo do desenvolvimento, mais tarde, na DSM-4 (1994) houve atualização do protocolo de avaliação, no qual, ocorreu a separação da Síndrome de Asperger do grupo autista. E, no atual protocolo, a DSM-5 (2013), o paciente com TEA pode ser classificado, segundo o grau de comprometimento, em Nível 1- que requer suporte; Nível 2 – que requer suporte substancial e Nível 3 - exigindo suporte muito substancial (Hadjkacem et al., 2016; Masi et al., 2017). Conforme descrito anteriormente, os critérios para diagnóstico do TEA estão orientados no DSM-5 de 2013, sendo o diagnóstico de TEA “essencialmente clínico”, feito a partir do cruzamento de informações colhidas através da observação da criança, por entrevista com os pais e aplicação de instrumentos específicos (APA, 2013; Gomes et al., 2015), e requer a presença do distúrbio em três domínios: 1) interação social; 2) comunicação; 3) interesses restritos e padrões estereotipados do comportamento (Schlickmann, Fortunato, 2013).

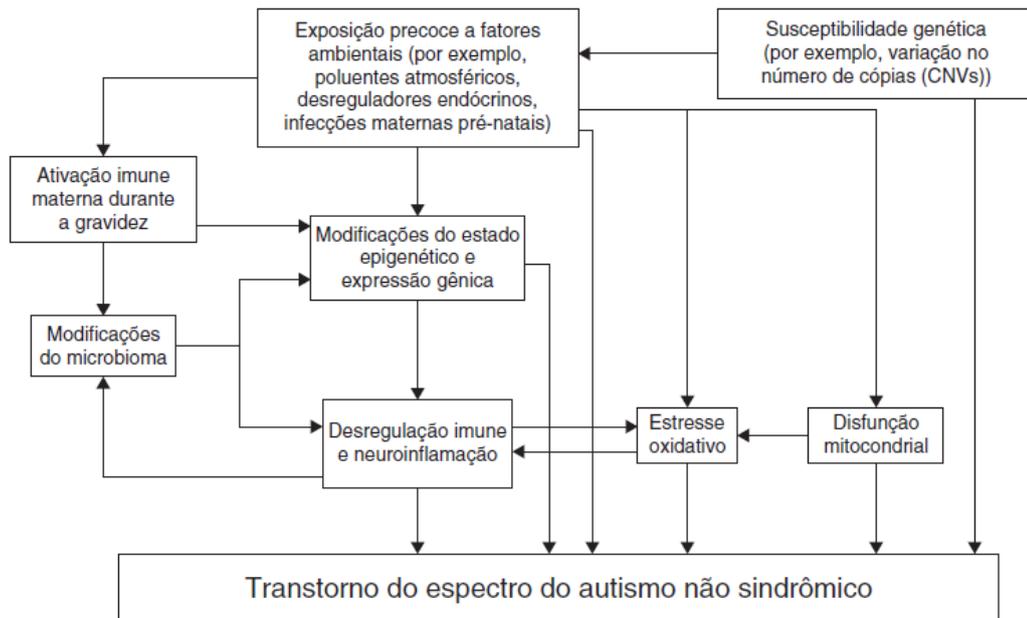
A partir dos avanços das ciências e a obtenção de maior conhecimento sobre a doença, estudos epidemiológicos vêm demonstrando, um aumento drástico nas últimas décadas (Posar, Visconti, 2017). Dados epidemiológicos mundiais sugerem que um (1) para cada oitenta e oito (88) nascidos vivos apresentem TEA (Gomes et al., 2015). Outros estudos mostram que o TEA afeta 1 em cada 100 crianças em todo o mundo (Bossu, Roux, 2019), com prevalência quatro vezes maior em homens do que em mulheres (4:1) (Chaste, Leboyer, 2012; Lai et al., 2014; Griesi-Oliveira, Sertie, 2017).

O Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) – EUA, publicou um relatório apresentando os dados de 11 locais acompanhados pela Rede de Monitoramento de Autismo e Deficiências do Desenvolvimento em 2012 (Yenkoyan et al., 2017), no qual, identificou-se a prevalência do TEA de 1 em 69 crianças, para o referido ano e de acordo com os achados pelo CDC, a expectativa do número de casos pode ser maior (Christensen et al. 2018).

Os distúrbios do desenvolvimento exercem um impacto muito negativo na integração de crianças na sociedade e sobre as vidas de toda a família dos indivíduos afetados (Schlickmann, Fortunato, 2013). Ainda que hajam, grandes esforços em pesquisas médicas, atualmente muitos aspectos da etiopatogenia do TEA ainda são desconhecidos (Posar, Visconti, 2017).

TEA têm sua etiopatogenia multifatorial provinda da interação complexa entre fatores genéticos e ambientais (Figura 1). Dos quais 35-40% se relacionam à genética

e, 60-65% se devem a fatores ambientais desencadeadores em períodos pré-natais, perinatais e pós-natais (Hadjkacem et al., 2016; Posar, Visconti, 2017). Mesmo o autismo tendo forte componente genético, os fatores ambientais como toxinas, pesticidas, infecções e drogas, conferem suscetibilidade ao autismo pela indução de alterações epigenéticas (Nicolini, Fahnestock, 2018).

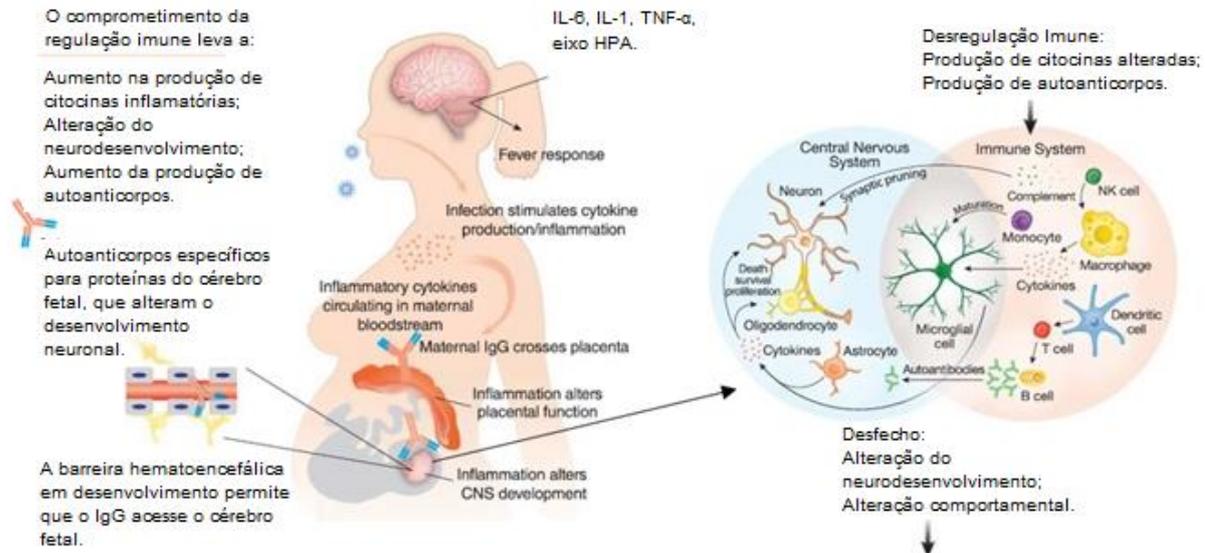


**Figura 1:** Correlação entre fatores contribuintes para o desenvolvimento do TEA. O esquema apresenta os múltiplos fatores/eventos, pré-natais, genéticos e ambientais, e suas correlações enquanto desencadeadores do TEA (adaptado). **Fonte:** Posar, Visconti (2017).

Segundo apontamentos de Lai et al. (2014), a multiplicidade de fatores que levam ao desenvolvimento do TEA dificulta a concretização dos motivos reais de sua fisiopatologia estando os esforços voltados para a compreensão dos mecanismos iniciais de desenvolvimento da síndrome e quais intervenções devem ser feitas.

Outros estudos têm demonstrado que fatores gestacionais podem afetar o neurodesenvolvimento, como complicações durante a gravidez e exposição a produtos químicos (Lai et al., 2014). A exposição à agentes teratogênicos, como a talidomida e o ácido valproico (VPA), durante a gestação, no período em que ocorre o fechamento do tubo neural e a produção dos primeiros neurônios que formam os núcleos motores dos nervos cranianos, podem alterar o desenvolvimento do cérebro e resultar em anormalidades comportamentais e déficits cognitivos, como observados no autismo (Rice, Barone, 2000, Schlickmann, Fortunato, 2013). O processo inflamatório materno durante a gestação (Figura 2), também tem sido descrito pela

literatura, assim, a ativação do sistema imune materno parece desempenhar um papel importante em transtornos do neurodesenvolvimento (Hadjkacem et al., 2016).



**Figura 2:** Representação esquemática do processo inflamatório durante a gravidez com ativação do sistema imune fetal. Quando, os muitos componentes do sistema imunológico estão desregulados, essas redes podem levar a mudanças no neurodesenvolvimento e no comportamento (adaptado). Na imagem da esquerda, há ativação imune materna com produção de citocinas e mediadores da inflamação ultrapassam a barreira hematoencefálica e no cérebro em desenvolvimento que podem levar ao comprometimento do neurodesenvolvimento pela produção elevada de citocinas no SNC (à esquerda). **Fonte:** Meltzer, Water (2017).

Respostas imunes alteradas estão presentes em crianças com TEA. Ashwood et al. (2011), em seu estudo, descreveu a presença de anticorpos auto-reativos para proteínas do sistema nervoso central (SNC) incluindo perfis de citocinas de células T auxiliares anormais, baixa de linfócitos e desequilíbrio dos níveis séricos de imunoglobulina em amostras cerebrais. Essas respostas imunes alteradas em indivíduos com TEA foram acompanhadas por quase 40 anos (Ashwood et al. 2011).

Wong e Giulivi (2016), estudaram o comprometimento mitocondrial de linfócitos de crianças com autismo. Segundo os autores, a disfunção mitocondrial é um dos distúrbios metabólicos mais prevalentes associados ao TEA, apresentando alterações nos processos ocorridos na cadeia respiratória. O estresse oxidativo decorrente do desequilíbrio entre o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e respostas antioxidantes podem causar danos ao mtDNA (Wong, Giulivi, 2016).

Substâncias químicas ambientais e drogas podem atravessar a placenta durante a gravidez e interagir com alvos celulares fetais que provocam problemas tardios no

desenvolvimento (Wong, Giulivi, 2016). Poluentes atmosféricos, principalmente metais pesados e material particulado, desreguladores endócrinos, principalmente pesticidas, estão descritos na literatura como contribuinte para o autismo (Posar, Visconti, 2017). Segundo Posar, Visconti (2017), tais condições de poluição levam a danos ao DNA, estresse oxidativo, aumento do cálcio intracelular, disfunção do sistema imunológico e rompimento da barreira hematoencefálica.

Processos neuroinflamatórios induzidos durante o período pré-natal permanecem alterados ao longo da patologia do autismo, e estudos tem observado resposta inflamatória anormal à infecção de diferentes células sanguíneas de crianças autistas (El-Ansary, Al Dera, 2016).

## 1.2 Neurodesenvolvimento e genética no TEA

Estudos indicam que, de fato, as regiões cerebrais envolvidas na gênese do TEA tais como o sistema límbico, áreas pré-frontais e cerebelo, se desenvolvem mais lentamente, estando mais vulneráveis à distúrbios do neurodesenvolvimento (Schlickmann, Fortunato, 2013). Além disso, alterações fisiopatológicas do SNC de pacientes com TEA também podem decorrer da influência ambiental causando estresse oxidativo, neuroinflamação, disfunção mitocondrial e distúrbios bioquímicos (Schlickmann, Fortunato, 2013).

Estudo clínicos e experimentais também demonstraram que infecções virais e bacterianas ocorridas em período pré-natal podem interferir no ambiente intrauterino promovendo alterações na resposta imune com ativação de citocinas pró-inflamatórias (Schlickmann, Fortunato, 2013). As citocinas, por sua vez, atravessam a barreira hematoencefálica, interagem com células neurogliais, induzindo neuroinflamação. De fato, citocinas como Interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), apresentaram-se aumentados em pacientes autistas (De Theije et.al, 2011; Yenkovyan et al. 2017).

Evidências têm demonstrado que fatores ambientais, como infecções ou o uso de determinados medicamentos durante a gestação, contribuem para o desenvolvimento do transtorno, porém, o fator hereditário apresenta-se em cerca de 50-90% dos casos demonstrando a importância dos fatores genéticos na patogênese da doença (Griesi-Oliveira, Sertie, 2017).

Estudos genéticos também têm demonstrado que alteração de genes contribuem para o desenvolvimento do TEA (Schlickmann, Fortunato, 2013; Hadjkacem et al., 2016). Existem evidências crescentes de que o TEA pode surgir de mutações persistentes e desequilíbrios genômicos (Betancur, 2011).

Segundo Gupta e Stade (2006), muitos dos avanços na pesquisa genética envolvendo o autismo, como a identificação de alelos de risco ou mutações representam um importante passo para desvendar a fisiopatologia do TEA; há um esforço de contribuições combinadas de uma variedade de áreas, incluindo genética, clínica, neurobiologia do desenvolvimento e neuroimagem. Descrevem ainda, dados dos resultados de estudos de ligação genética, citogenéticos e de genes candidatos com um foco no progresso de desenvolvimento de TEA (Gupta, State, 2006).

As anormalidades genéticas associadas com o TEA podem ser agrupadas em três classes: i) mutações de um único gene (*SHANK3*, *FMR1* ou *MECP2*.), (ii) variantes do número de cópias (CNVs), por duplicações, grandes deleções, inversões e translocações de cromossomos, e (iii) fatores de risco poligênicos, e desta forma, cada uma contribui para uma parte do risco (Varghese et al., 2017).

De acordo com o estudo de Griesi-Oliveira, Sertie (2017), eventos de deleção e duplicação representam risco de moderado a alto para desenvolvimento da doença e estes, ocorrem em mais de 400 genes por diversas CNVs. O TEA pode fazer parte da sintomatologia de alguns transtornos monogênicos (Griesi-Oliveira, Sertie, 2017, p.235) (Tabela 1). Sanders e colaboradores, listaram as CNVs mais frequentes encontradas em pacientes com TEA estando confirmadas em seis locos de risco: 1q21.1, 3q29, 7q11.23, 16p11.2, 15q11.2-13 e 22q11.2 (Sanders et al., 2015). Destas CNVs as 15q11-13, 16p11 e 22q11-13, juntas, têm incidência de 3-5% (Betancur, 2011; Griesi-Oliveira, Sertie, 2017). Essas variações genéticas conferem vulnerabilidade a estressores ambientais (Bernardi et al., 2012).

A região do cromossomo 15q11-q13 contém um número de genes que codificam para as subunidades particulares do ácido gama-aminobutírico-A (GABA<sub>A</sub>) e CNVs de microdeleção / microduplicação foram observados no autismo (Coghlan et al., 2012). As alterações estão presentes no *locus GABRB3* que codifica o receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) (Gupta, State, 2006).

**Tabela 1:** Síndromes monogênicas\* associadas ao transtorno do espectro autista e a genes correspondentes.

Síndrome	Gene mutado
**Síndrome do X frágil	<i>FMR1</i>
**Síndrome de Rett	<i>MECP2</i>
**Síndrome de Cowden	<i>PTEN</i>
Neurofibromatose	<i>NF1</i>
Esclerose tuberosa	<i>TSC1/2</i>
Síndrome de Angelman	<i>UBE3A (15q11-q13)</i>

\*\*A identificação das três síndromes listadas refere-se a alta prevalência entre indivíduos com TEA.  
**Fonte:** Adaptado de Griesi-Oliveira, Sertie (2017).

No estudo de Betancur (2011), pode-se encontrar a lista ampla com 100 genes descritos correlacionados ao TEA. No estudo de Varghese et al. (2017), pode-se encontrar uma revisão ampla apresentando as variáveis que corroboram para o desenvolvimento do TEA, os intervenientes neuropatológicos e o uso de modelos animais correspondentes às diferentes frentes de pesquisas de cunho epigenético e ambiental.

Ao acompanhar o esquema do quadro (Figura 3), identifica-se da 1ª a 20ª semana de gestação, como “períodos mais críticos” por envolver três estágios importantes do SNC: a neurogênese, a migração neuronal e a maturação neuronal. Fica evidenciado que, se neste período, qualquer agente pode causar injúria ao SNC, o indivíduo terá seu neurodesenvolvimento comprometido. Períodos de maior risco na gravidez têm resultados variáveis, mas tendem a se reunir na primeira metade da gravidez (Lyll et al., 2014).

Trimestre	Primeiro									Segundo			Terceiro			
Semana gestacional	1	2	3	4	5	6	7	8	9	16	20	22	28	38		
<b>Patologia cerebral</b>																
Neurogênese	Semana 1-20															
Migração neuronal	Semana 1-6															
Maturação neuronal	Semana 1-24															
<b>Exposição</b>																
Proximidade à rodovias													3º trimestre			
Polluição do ar	1º, 2º e 3º trimestres															
Pesticidas										Dias 26-81						
Vitaminas Pré-natais	1º mês e antes do 3º mês															
Ácido Fólico	1º mês															
Infecção por Rubéola	Semanas 1-8															
Febre	1º e 2º trimestre															
Talidomida				Dias 20-24												
Ácido Valproico				Dias 22-28												
ISRS	1º trimestre															
Estressores pré-natais													Semanas 25-28			

**Figura 3:** Quadro apresentando estágios de desenvolvimentos e fatores ambientais associados ao Transtorno do Espectro Autista. Os fatores ambientais descritos foram identificados por Lyall et al. (2014). Os autores realizaram um levantamento dos diversos fatores que de forma direta ou indireta conduzem ao Transtorno do espectro autista. De acordo com o estudo, em indivíduos com transtornos do espectro autista encontraram-se evidências de neurogênese desregulada, migração neuronal e maturação neuronal. Se a exposição a substâncias tóxicas ambientais coincidirem com a ontogênese dos processos de desenvolvimento do SNC, há maior probabilidade de causar efeitos adversos pois, irão interferir na cascata desses processos tornando o indivíduo vulnerável a perturbações na infância e na vida adulta (adaptado). **Fonte:** Lyall et al. (2014).

Diferentes domínios comportamentais como as funções cognitivas, sensoriais e motoras são promovidos por diferentes áreas cerebrais estando os distúrbios clínicos, por exemplo, esquizofrenia, dislexia, epilepsia e autismo, como resultado da interferência na ontogênese normal dos processos de desenvolvimento no sistema nervoso (Rice, Barone, 2000).

### 1.3 Modelo animal de TEA por administração de Ácido Valproico (VPA)

Com o avanço das ciências e dos protocolos de pesquisas, diversos estudos têm utilizado modelos animais para melhor compreender as causas e consequências do autismo, e para isto, os modelos animais devem ser qualificados em critérios como: I) constructo - verifica o grau de similaridade entre os mecanismos subjacentes aos modelos animais e a doença humana; II) face – verifica se o aspecto fenomenológico observado em animais é semelhante ao observado em pacientes; III) validade preditiva – avalia se o modelo animal demonstra resposta similar à que os humanos

têm na redução de sintomas após a administração de medicação específica (Yenkoyan et al. 2017).

O TEA ainda tem sua etiologia desconhecida, tais modelos são importantes ferramentas de estudo científico, pois permitem a análise minuciosa dos mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam as alterações comportamentais, neurais, imunes e genéticas encontradas em pacientes autistas (Bernardi et al., 2012). O modelo animal para TEA é construído a partir da intervenção a que ele será submetido, ficando subdividido em grupos: agentes biológicos; agentes químicos; modelos induzidos por lesão/dano cerebral; modelos induzidos por modificações genéticas (Yenkoyan et al. 2017).

Fazendo parte do grupo de agentes químicos, o modelo animal de TEA por administração gestacional de VPA é um dos mais utilizados no campo científico (Mabunga et al., 2015). O VPA é um agente teratogênico que promove anormalidades comportamentais tornando-se um dos agentes ambientais ligados ao TEA, que vem sendo largamente estudado (Schlickmann, Fortunato, 2013). As anormalidades são decorrentes de malformações congênitas, síndromes perinatais e transtornos no neurodesenvolvimento (Christensen et al., 2013; Schlickmann, Fortunato, 2013); e defeitos do tubo neural (Roullet et al., 2013).

As vias afetadas pelo VPA e seu suposto mecanismo incluem o estresse oxidativo, a inibição da histona desacetilase, o desequilíbrio excitatório / inibitório e a hiperserotonemia (Mabunga et al., 2015). Vários estudos em modelo animal com administração de valproato, em vários estágios da gravidez, descrevem manifestações do autismo como: aumento da atividade repetitiva ou estereotipada, maior ansiedade e diminuição do nível de interação social (Christensen et al., 2013). Segundo estudos, ratos expostos ao VPA no dia 12,5 da gestação exibem várias anormalidades anatômicas no tronco encefálico e no cerebelo (Schneider et al., 2006).

O VPA é um anticonvulsivante utilizado em casos de epilepsia e também como estabilizador do humor, sua principal ação é aumentar no nível do (GABA) no cérebro (Schlickmann, Fortunato, 2013). O GABA regula a migração, diferenciação, morte celular, e ainda, a formação das sinapses (Coghlan et al., 2012). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro humano, ele é sintetizado a partir do glutamato, um neurotransmissor excitatório através da ação de enzimas glutamato descarboxilase (GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub>), portanto, alterações na produção e ou na reciclagem

do GABA podem levar a quadros de defeito de circuito comum do equilíbrio excitatório-inibitório e, de acordo com a literatura, estudos evidenciaram padrões anormais de expressão dos genes do receptor GABA-A, das enzimas de síntese GABA - GAD<sub>65</sub> e GAD<sub>67</sub> (Coghlan et al., 2012).

Alterações no metabolismo da serotonina sugerem relação com o desenvolvimento do autismo (Lai et al., 2014). Estudos demonstraram que a hiperserotonemia relacionada ao TEA seja proveniente de doenças genéticas, gastrointestinais ou imunológicas (De Theije et.al, 2011). A serotonina é um neurotransmissor e mediador da inflamação que tem sido relacionada aos estudos na patogênese do TEA, uma vez, que os níveis aumentados de serotonina no sangue (5-hidroxitriptamina; 5-HT) foram descritos em crianças com autismo (De Theije et.al, 2011).

Segundo estudos, mulheres que fizeram uso do VPA durante os dias 20-24 de gestação apresentaram prole susceptível a distúrbios de desenvolvimento neurológico, afetando as funções cognitiva e comportamental, semelhante às apresentadas no TEA (Rice, Barone, 2000). A exposição durante a gestação ao VPA, mas não a outros tratamentos antiepilépticos, quase triplica o risco de ter um filho com TEA (Varghese et al., 2017). De acordo com Rice e Barone (2000), a vulnerabilidade do cérebro em desenvolvimento depende de dois problemas de exposição de significância: 1) se um agente ou metabólito ativo atingir o sistema nervoso em desenvolvimento; 2) em qual período ocorreu a exposição.

Ao utilizar um modelo animal de estudos, é de fundamental importância que se tenha uma boa compreensão das linhas temporais de desenvolvimento neural normal em humanos e das outras espécies usadas como modelo (Rice, Barone, 2000). Schlickmann e Fortunato (2013), realizaram um estudo revisional para modelo animal e o uso de VPA, descrevendo três formas de administração e dosagem da substância. Para administração, os procedimentos foram realizados na via subcutânea (SC); intraperitoneal (IP) e via oral (VO), utilizando diferentes dosagens de VPA, incluindo 400 mg/kg (SC), 500 mg/kg (IP), 600 mg/kg (IP) e 800 mg/kg (IP). Para cada dosagem e via de administração foram observados efeitos diferentes para o modelo proposto (Schlickmann, Fortunato, 2013). Regiões cerebrais específicas podem ser mais suscetíveis a danos durante o neurodesenvolvimento após a exposição ao VPA (Roullet et al., 2013).

Em resumo, o protocolo para modelo animal de TEA consiste na formação de dois grupos, no qual se administra em ratas prenhas, VPA em um grupo e salina (SAL) no grupo (controle), no dia gestacional (GD) 12,5. As doses podem variar de 400 a 600 mg/kg. Os animais validados para modelo de TEA serão as proles, que passarão por testes visando avaliar o comprometimento e ou à melhora a partir do tratamento proposto (Olexová et al., 2013; Cezar et al., 2018).

#### 1.4 Privação Materna e alterações imunológicas

O cuidado parental é um comportamento fortemente estabelecido em roedores, sendo essencial para o desenvolvimento saudável da prole (Varela, 2018). O ambiente ao qual um indivíduo é exposto no início da vida influencia fortemente o desenvolvimento de respostas comportamentais na idade adulta (Weiss et.al, 2011).

De acordo com Lehmann e Feldon (2000), filhotes de mamíferos apresentam alta dependência de cuidados maternos durante os primeiros dias e ou semanas de vida, desta forma, este período se torna crítico e as mudanças nas interações mãe-filhote produzem efeitos negativos no desenvolvimento normal que podem perdurar ao longo da vida do animal.

Estudos clínicos fornecem evidências de que fatores prejudiciais, como abuso ou trauma precoce podem ter um impacto severo nos comportamentos e, continuam afetando os indivíduos durante e ao longo da vida adulta (Weiss et.al, 2011). A plasticidade cerebral é altamente sensível ao estresse, tais estressores com exposição aguda ou crônica, podem diminuir a plasticidade do cérebro (Herpfer et al., 2012).

O cérebro se desenvolve durante a gestação e continua nos períodos pós-natal, adolescência e idade adulta, quando a maturidade cerebral é atingida (estes são chamados períodos críticos), nos quais, o desenvolvimento em cada fase, ocorre de forma diferente no cérebro ou sistemas de neurotransmissores tornando estes períodos os de maior vulnerabilidade a insultos específicos para cada região cerebral (Marco et al., 2015).

Desde o início da vida os seres vivos estão constantemente expostos ao estresse, seja por condições agradáveis ou desagradáveis e os tipos de estresse ocorrem nas formas físicas ou psicológicas, agudas ou crônicas e apresentam efeitos diferentes em cada situação (Webster et al., 2008). Em cada experiência vivida há um

limiar de estresse, que quando excedido, ocasiona o aumento temporário desse limiar e leva o corpo/cérebro a responder fisiologicamente diferente à cada situação, neste sentido, parafraseando Seyle (1976), o estresse pode ser definido como “resposta inespecífica do corpo a qualquer exigência feita a ele, ou seja, a taxa na qual se vive a qualquer momento”.

Para identificar e compreender os efeitos de eventos estressores ocorridos nos primeiros dias e nas primeiras semanas de vida de roedores, as pesquisas têm feito uso do modelo de Privação Materna (PM). De acordo com Silva (2017), a PM é um modelo de estudos utilizado para induzir comportamentos depressivos em roedores e também para estudar os efeitos de estresse precoce e seu impacto no desenvolvimento.

A PM ou separação materna foi introduzida em 1956, por Levine et al., e desde então, os estudos têm demonstrado que este tipo de privação produz efeitos neuroendócrinos e comportamentais relativamente consistentes e identificáveis no animal adulto (Lehmann, Feldon, 2000). A compreensão dos efeitos fisiológicos e das mudanças comportamentais a partir de estudos com roedores submetidos à PM podem contribuir para o maior entendimento dos distúrbios psiquiátricos e auxiliar na indicação de tratamentos mais efetivos (Ignácio et al., 2017).

A PM neonatal é um evento estressante, de caráter ambiental, capaz de desencadear alterações estruturais e neurobiológicas no desenvolvimento do SNC durante a diferenciação celular migratória e proliferativa (Czarnabay et al., 2019). Para induzir tais alterações, o protocolo de PM consiste em separar a mãe da ninhada durante 3h por dia, do dia pós-natal 1 (DPN 1) ao 10 (DPN 10), e desta forma, não requer a manipulação dos filhotes (Réus et al., 2017; Giridharan et al. 2019).

Boku et al. (2015), identificaram que a PM, altera fenótipos comportamentais relacionados a distúrbios neuropsiquiátricos. Ménard et al. (2017), descreveu em seu trabalho que o acometimento a eventos adversos nas fases iniciais do desenvolvimento de roedores, promovem alterações em diversos circuitos neurais que persistem na idade adulta e que o estresse precipita eventos inflamatórios no SNC. No estudo de Réus et al. (2017), os resultados mostraram que eventos estressantes “críticos”, no início da vida induzem alterações no comportamento que persistem na idade adulta; estimulam a inflamação e o dano oxidativo no SNC e Sistema Nervoso Periférico (SNP).

No trabalho de Lehmann e Feldon (2000), os autores relataram a existência de inúmeras evidências sobre as consequências neuroendócrinas a curto e longo prazo advindas da PM, especificamente ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). No estudo de Weiss et.al (2011), foram identificadas alterações do sistema imunológico e aumento da morte celular neuronal.

O SNC é complexo e sua perfeita homeostase se dá pela conexão e integração entre suas diferentes áreas, neste sentido, Ignácio et al. (2017) propuseram um esquema descrevendo a correlação do eixo HPA e as respostas fisiológicas do estresse decorrentes da PM nos primeiros dias de vida (figura 4).



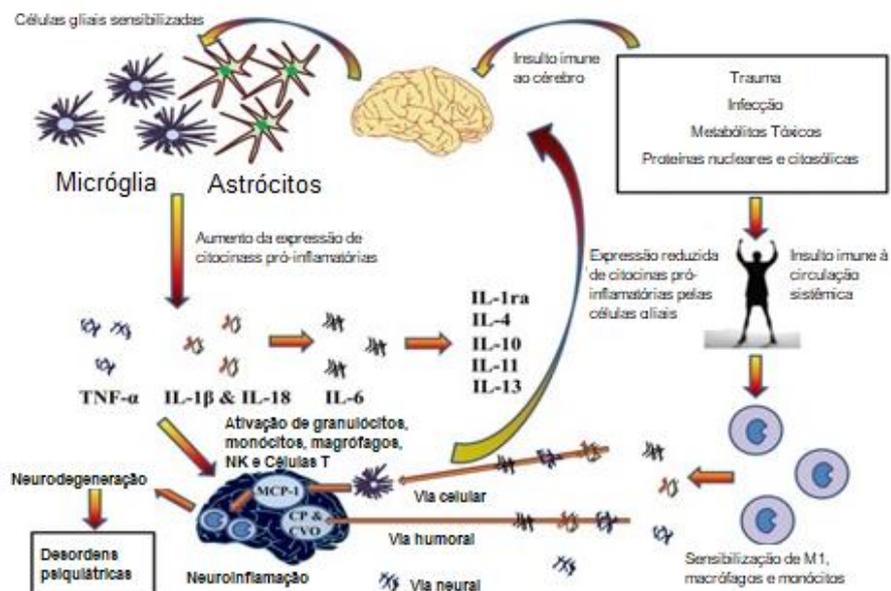
**Figura 4:** Estresse por privação materna e alterações fisiológicas. O eixo HPA interage com outros processos fisiológicos, como ativação epigenética levando a alterações na expressão de moléculas envolvidas em funções específicas. Outra correlação se dá aos fatores de transcrição promovido pelo aumento da produção de glicocorticóides, isso potencializa a ativação imunológica e eleva a expressão de interleucinas inflamatórias no plasma e em regiões cerebrais responsável pelas emoções e comportamento (sistema límbico). Ademais, os efeitos inflamatórios crônicos e alterações metabólicas advindos de falhas em processos mitocondriais elevam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) aumentando os efeitos negativos e danos ao cérebro (adaptado). **Fonte:** Ignácio et al. (2017).

Ao ser acometido por um estressor o eixo HPA e o sistema nervoso simpático são ativados provocando uma cascata de eventos conforme descrito por Glaser; Kiecolt-Glaser (2005), a modulação da resposta hormonal associada ao estresse pelo SNC tem início com a excitação da glândula pituitária, liberação do hormônio adrenocorticotrópico que estimula a glândula adrenal a produzir hormônios glicocorticoides e catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) que irão modular mecanismos do sistema imunológico.

De forma direta, o sistema nervoso simpático também pode estimular a glândula adrenal e/ou órgãos linfoides provocando interações bidirecionais. Essa modulação ativa as células imunológicas fazendo com que elas produzam citocinas em nível

periférico e que também podem ultrapassar a barreira hematoencefálica e modular a atividade do hipotálamo potencializando o efeito estressante (Glaser; Kiecolt-Glaser, 2005).

Conforme já discutido anteriormente, injúria, estressor, alterações metabólicas e inflamação acometidos ao cérebro (figura 5), promovem excitação das células gliais que, por sua vez, irão expressar citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, estas citocinas irão ativar granulócitos, monócitos/macrófagos, Natural Killer e células T, todo este conjunto de eventos, juntos, contribuem para a fisiopatologia da neuroinflamação (Glaser e Kiecolt-Glaser, 2005; Singhal et al., 2014; Ignácio et al., 2017).



**Figura 5:** Hipótese de citocinas de neuroinflamação: implicações na comorbidade de doenças sistêmicas com transtornos psiquiátricos. Condições que acometem injúrias ao SNC levam a produção de citocinas. Estas citocinas irão estimular a ativação dos mecanismos de defesa, que por sua vez, também irão produzir mediadores da inflamação. Esse processo conduz ao estado cada vez mais citotóxico no cérebro, de neurodegeneração e de desordens psiquiátricas. **Fonte:** Singhal et al. (2014).

Yenkoyan et al. (2017), fizeram uma revisão discutindo as teorias modernas sobre a fisiopatologia do TEA apontando como contribuintes os defeitos na conectividade neural e migração neural prejudicada o que pode levar à maturação ruim do cérebro. Estes mesmos achados também são identificados e estão associados ao protocolo de PM, que induz processo inflamatório e distúrbios neuropsiquiátricos.

## 1.5 Neuroglia, estresse oxidativo e neuropatologia

O SNC é complexo, formado por um emaranhado de células que desempenham papéis cruciais à manutenção e correto funcionamento deste sistema. As células da glia são as mais abundantes e estão amplamente distribuídas no SNC interagindo com neurônios, células imunológicas e vasos sanguíneos (Yang, Zhou, 2019). Os tipos celulares da glia encontrados são astrócitos, oligodendrócitos e seus precursores (NG<sub>2</sub>-glia ou OPCs), e micróglia, estas células não geram impulsos nervosos, não formam sinapses, porém, mantêm funções cerebrais vitais (Morrens et al., 2012; Bronzuoli et al., 2018). Os tipos celulares estão comentados abaixo.

A microglia é uma população de células independente e auto renovadora (Butovsky, Weiner, 2018), tem importante função no desenvolvimento cerebral incluindo crescimento axonal, sobrevivência e apoptose neuronal, migração de neurônios, maturação e poda sináptica (Giridharan et al. 2019), fagocitando conexões e axônios sinápticos inadequados (Butovsky, Weiner, 2018).

As microglias exibem plasticidade fenotípica e funcional em cérebros saudáveis e doentes (Butovsky, Weiner, 2018), neste sentido, algumas células da glia funcionam como células imunes inatas do SNC contribuindo para o monitoramento do meio fisiológico e agem como primeira linha de defesa quando o SNC é acometido a insultos (Yang, Zhou, 2019).

Os oligodendrócitos são células mielinizantes do SNC e parte integrante da substância branca do cérebro, cuja as funções da mielina, são fornecimento de isolamento crítico axonal, para permitir velocidades de condução saltatória mais rápidas (Haroon et al., 2017), de potenciais de ação através dos fluxos de íons de sódio nos nós de Ranvier; contribuir para a sinalização neuronal; fornece suporte trófico aos neurônios, aos axônios e apresenta papel crítico quando ocorre desregulação imunológica em nível do tecido da substância branca (Goldman, Kuypers, 2015).

O antígeno nervoso glial 2 (NG<sub>2</sub>-glia) ou células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) estão presentes em todas as regiões do cérebro na substância cinzenta e branca, durante o desenvolvimento pós-natal e na idade adulta. As células que expressam NG<sub>2</sub> podem gerar não apenas oligodendrócitos, mas também astrócitos, demonstrando que a expressão de NG<sub>2</sub> é característica comum a

todas as células (Dimou e Gallo, 2015). Ainda no mesmo estudo, os autores Dimou e Gallo (2015), descrevem a relação sináptica entre neurônio-glia como indefinida, porém, essa sinalização mediada por neurotransmissores entre neurônios e NG2-glia parecem modular o desenvolvimento dessas células da glia.

Os processos microgliais são altamente ativos, examinando continuamente o microambiente do parênquima, ainda que, no estado de repouso (Morrens et al., 2012; Yang, Zhou, 2019). A Micróglia é a célula imune inata residente e a mais móvel no SNC, semelhante aos macrófagos do sangue periférico e, quando ativadas, aumentam a expressão gênica inflamatória secretando citocinas IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$ ; mudam de forma; assumem perfil fagocítico e se movem em direção a regiões de lesão (Haroon et al., 2017).

Os astrócitos são células multiramificadas em formato de estrela, cuja morfologia e funções mudam variando a especialização e diferenciação em resposta a demandas fisiológicas e patológicas (Haroon et al., 2017). São células que se encontram em íntimo contato com as células do SNC, como os neurônios, oligodendrócitos e com outros astrócitos. Além disso, controlam o metabolismo dos neurônios, participam da captação e liberação de diversos neurotransmissores, atuam na manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, participam da formação da barreira hematoencefálica, entre outras funções essenciais para a homeostase do SNC (Silva, 2017; Yang, Zhou, 2019).

Tal discussão é importante, pois alterações na funcionalidade destas células levam ao comprometimento do funcionamento cerebral, instalação e ou agravo de patologias. Contudo, as respostas imunológicas no SNC são reguladas pela micróglia e astrócitos, os quais desempenham papéis inflamatórios e anti-inflamatórios (Silva, 2017). Porém, a neuroinflamação não é uma resposta simples, diferentes sinais inflamatórios por infecção, dano mecânico, metabólitos tóxicos ou autoimunidade promovem uma variabilidade ampla de respostas e adaptações (Yang, Zhou, 2019).

Haroon et al. (2017), verificaram que a ativação das células imunes no cérebro produz um efeito excitotóxico, podendo conduzir à disfunção sináptica, à morte, a deficiências comportamentais e cognitivas. Evidências atuais sobre a fisiologia glial no SNC, tanto em desenvolvimento quanto maduro, sugerem que alterações nas funções das células gliais contribuem para o desenvolvimento de neuropatologias (Bronzuoli et al., 2018).

A formação de sinapse desarranjada, por falha astrocítica, também foi implicada em vários distúrbios do desenvolvimento neurológico, incluindo esquizofrenia, autismo e síndrome do X frágil (Haroon et al., 2017). O papel da micróglia na escultura e na regulação das sinapses neuronais sugere que a disfunção microglial contribui para o TEA (Butovsky, Weiner, 2018).

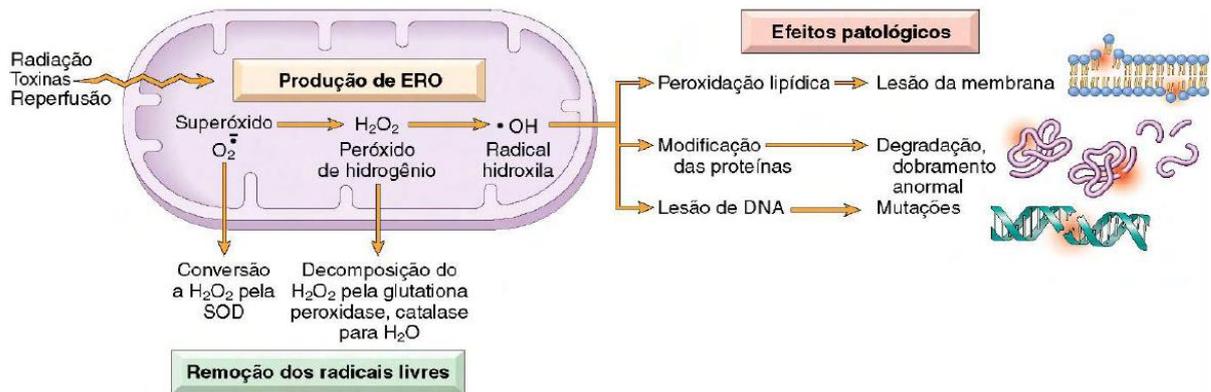
Estudos com modelo animal de PM têm demonstrado ativação microglial com aumento do estresse oxidativo podendo culminar em alterações comportamentais prejudiciais que persistem na idade adulta (Ignácio et al., 2017; Réus et al., 2017). Estudos recentes têm destacado a contribuição da neuroglia para a fisiopatologia do TEA (Bronzuoli et al., 2018).

O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre processos bioquímicos que levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os responsáveis por sua remoção, a chamada cascata antioxidante (Sayre et al., 2008). O desequilíbrio entre formação e remoção originou o termo “estresse oxidativo” (Hawkins, Davies, 2019).

A ativação crônica de micróglia e astrócitos geram espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas nitrogênio (ERN), e quando a produção supera as defesas antioxidantes elas culminam em estresse oxidativo no SNC (Ignácio et al., 2017). O SNC é particularmente vulnerável ao insulto oxidativo devido à alta taxa de utilização de O<sub>2</sub> para a produção de energia (Sayre et al., 2008), e conseqüentemente há produção de radicais livres.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo o radical superóxido, podem resultar em inflamação (Perry et al., 2010), e o radical hidroxila é considerado o principal instigador dos danos causados pelo estresse oxidativo (Sayre et al., 2008). Porém, não apenas as ERO e ERN de origem microglial criam um estresse sobre os neurônios do ambiente, mas, em oposto, os oxidantes podem estimular a transcrição de genes pró-inflamatórios na glia, criando um ciclo vicioso (Sayre et al., 2008).

O mecanismo de proteção é constituído por dois tipos de componentes, um enzimático e o outro não enzimático; no primeiro, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GSH-Px), agem na captura de radicais superóxido e hidroxila (SOD e CAT) ou na destruição de peróxidos orgânicos produzidos pelos ácidos graxos; e no segundo, a glutathiona (GSH) e a vitamina E agem como “eliminador” de radicais livres (Ortiz et al., 2017).



**Figura 6:** Produção de ERO e efeitos patológicos provocado pelo desequilíbrio redox nas células. A produção de ERO é inerente ao processo de produção de energia. A manutenção da homeostase redox é feita por sistemas enzimáticos especializados que promovem a remoção destas substâncias. Porém, quando há produção excessiva ou remoção inadequada o resultado é acúmulo de radicais livres na célula. Esse acúmulo conduz a lesão de lipídios (por peroxidação), proteínas e DNA, resultando em lesão celular (Adaptado). **Fonte:** Kumar et al., Robins-Patologia Básica, ed. 9. 2013. Pág. 15.

Em homeostase, as ERO são produzidas em pequenas quantidades, em todas as células, durante as reações de oxidação; as células imunológicas são responsáveis por sua produção, especialmente neutrófilos e macrófagos através dos fagossomas e fagolisossomas leucocitários, deste modo, quando a produção de ERO aumenta ou quando os sistemas de remoção são ineficientes, o resultado é o excesso desses radicais livres levando a condição chamada de estresse oxidativo (Kumar et al., 2013), o processo está demonstrado na fig. 6.

## 1.6 Justificativa e relevância

Considerando a enorme prevalência do TEA na atualidade, sendo um dos transtornos de neurodesenvolvimento mais comuns, ainda, pouco se sabe a respeito das suas causas e da sua fisiopatologia. Estudos em humanos, apresentam diversas limitações como os métodos de investigação neurofisiológica, que oferecem apenas dados indiretos e inespecíficos acerca do equilíbrio excitatório/inibitório do SNC.

Neste sentido, a utilização de modelos animais torna factível o estudo das alterações comportamentais encontradas no TEA, sua relação com a exposição pré-natal a intoxicantes e agentes ambientais permitindo ainda o estudo direto dos mecanismos bioquímicos relacionados. Como qualquer outro modelo animal de desordens neurológicas, os modelos animais de TEA foram desenvolvidos para obter uma visão e fazer previsões da condição de TEA humana.

O modelo animal de exposição ao VPA pré-natal mostra-se relevante por abordar um agente químico associado epidemiologicamente a etiologia do transtorno, que consegue promover o surgimento de alguns fenômenos bioquímicos e comportamentais do TEA. No entanto, tal modelo não contempla as questões inflamatórias e o desbalanço de neurotransmissores glutamatérgicos e serotoninérgicos associados ao transtorno. Paralelamente, animais submetidos ao modelo animal de PM – utilizado para estudar o efeito de eventos estressores precoces no desenvolvimento da depressão – apresentam potencialmente a ativação dos receptores de glutamato, bem como, há um aumento nos marcadores inflamatórios.

Devido às limitações de reprodutibilidade do modelo animal com VPA (pré-natal), acredita-se que a união de tal protocolo ao de PM (que mimetiza muitos dos aspectos fisiopatológicos do TEA) resultará em um modelo animal de TEA mais complexo, com maior reprodutibilidade e potencialmente com uma gama maior de fenótipos e mecanismos fisiopatológicos contemplados.

Assim, percebe-se a necessidade deste estudo, onde a avaliação comportamental e de marcadores de estresse oxidativo permite caracterizar e compreender um modelo animal de TEA adequado e, conseqüentemente, avançar na compreensão da complexa fisiopatologia do TEA abrindo possibilidades terapêuticas futuras.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar os efeitos da exposição gestacional ao valproato de sódio combinado à privação materna sob parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em um modelo animal murino de transtorno do espectro autista.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento do tipo autista nos dias 25 e 28 pós-natal (DPN 25 e DPN 28), através de testes de avaliação da locomoção, comportamentos repetitivos, e de interação social, em ratos machos expostos ao valproato de sódio (pré-natal) e submetidos a privação materna (pós-natal).
- Avaliar parâmetros de dano oxidativo (níveis de TBARS e carbonil, oxido nítrico, sulfidril) em córtex pré-frontal, córtex posterior e cerebelo de ratos machos expostos ao valproato de sódio (pré-natal) e submetidos a privação materna (pós-natal).
- Avaliar parâmetros de defesa antioxidantes (atividade das enzimas glutatona e superóxido dismutase) em córtex pré-frontal, córtex posterior e cerebelo de ratos machos expostos ao valproato de sódio (pré-natal) e submetidos a privação materna (pós-natal).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento para cuidados com animais. Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e aprovado sob protocolo número 035/2019-1 (ANEXO A).

#### 3.2 Protocolo de exposição ao VPA

Foram utilizadas 12 ratas Wistar fêmeas adultas (60 dias/400g) e 6 machos para acasalamento, provenientes do Biotério Central da UNESC. As fêmeas foram colocadas ao final de um período de vigília em caixas contendo machos (3 animais/gaiola – 2 fêmeas/macho), com condição controlada de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, fase clara das 7h às 19h), e com acesso *ad libitum* a alimento e água. As fêmeas com conteúdo seminal positivo (matrizes) foram divididas em dois grupos ficando alocadas em caixas individuais durante o restante do período gestacional.

No décimo segundo dia de gestação, as matrizes foram divididas em dois grupos (6 cada), onde receberam 600mg/kg de VPA (grupo VPA-expostos) ou salina (grupo SAL-expostos), via intraperitoneal.

Após o nascimento, as proles das matrizes VPA-expostos (6 matrizes) e SAL-expostos (6 matrizes) foram subdivididos em dois grupos cada - **I**) “privação materna” e **II**) “sem-privação materna” - compondo 4 subgrupos para a realização do experimento:

- Grupo 1: SAL-expostos + não privados (n=12);
- Grupo 2: SAL- expostos + privação materna (n=12);
- Grupo 3: VPA-expostos + não privados (n=12);
- Grupo 4: VPA-expostos + privação materna (n=12).

### 3.3 Protocolo de Privação Materna

O protocolo de PM constitui em retirar a mãe da caixa original e levá-la para outra sala. Os filhotes são mantidos em suas gaiolas (agrupados no ninho na presença de odor materno). Do 1º ao 10º dia pós-natal os filhotes foram privados da mãe durante 3 horas por dia, sendo este procedimento realizado durante as manhãs das 08h às 12h. No final de cada sessão diária de privação, as mães foram devolvidas às caixas. Os animais (ratos) controle permaneceram em suas caixas junto com suas mães durante todo o experimento. Os ratos foram desmamados no 21º dia após o período pré-natal. Em consideração aos dados epidemiológicos de prevalência de TEA em homens (diferença 4:1 homens/mulher), somente os ratos machos foram utilizados neste estudo.

### 3.4 Desenho Experimental

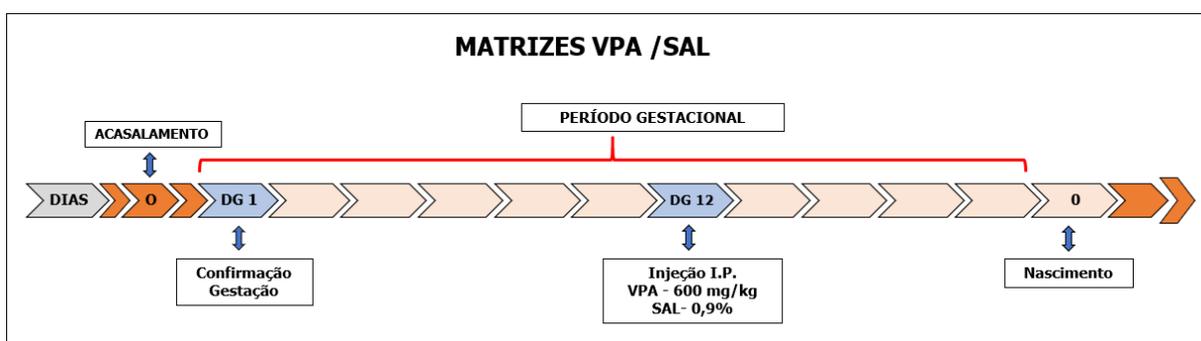
No décimo segundo dia de gestação (DG12), as matrizes receberam 600mg/kg de VPA (grupo VPA-expostos) ou salina (grupo SAL-expostos), via intraperitoneal para indução do modelo animal murino de transtorno do espectro autista. Após o nascimento, as proles VPA-expostos e SAL-expostos foram subdivididos em dois grupos cada - I) “privação materna” e II) “sem-privação materna” - compondo 4 subgrupos para a realização do experimento com n= 48 animais:

- Grupo 1: animais que receberam salina na gestação e não foram privados da presença materna (n=12, machos);
- Grupo 2: animais que receberam salina na gestação e foram privados da presença materna (n=12, machos);
- Grupo 3: animais que receberam VPA na gestação e não foram privados da presença materna (n=12, machos);
- Grupo 4: animais que receberam VPA na gestação e foram privados da presença materna (n=12, machos).

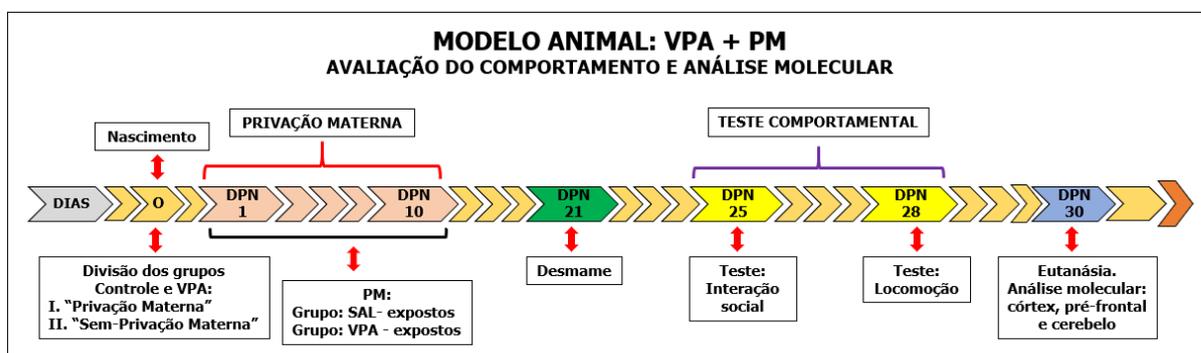
Após o protocolo de PM (do 1º ao 10º dia pós-natal), os grupos de animais privados e não privados (controles) foram submetidos a testes comportamentais e posteriormente, às análises bioquímicas. No DPN 25 e DPN 28, os filhotes machos foram submetidos aos testes comportamentais (n=12 por grupo, 4 grupos x 2

(machos) = 48 animais) para avaliar a presença de comportamentos repetitivos, locomoção e interação social.

Após a conclusão dos testes comportamentais, DPN 30, os ratos foram eutanasiados e seus cérebros removidos para a dissecação das estruturas: córtex posterior, córtex pré-frontal e cerebelo, sendo processados e utilizados para as análises bioquímicas. Conforme já citado, somente os machos foram utilizados neste estudo.



**Figura 7:** Representação esquemática do desenho experimental - matrizes VPA / SAL. Confirmação da gestação, administração de VPA no DG 12 e constituição da prole como modelo animal murino de TEA.



**Figura 8:** Representação esquemática do desenho experimental modelo animal murino de TEA: VPA + PM. Divisão dos grupos de estudo; protocolo de privação materna (PM), testes comportamentais e análise molecular.

### 3.5 Avaliação comportamental

#### 3.5.1 Teste de interação social

No DPN 25, os ratos ( $n=12$ ), foram submetidos ao teste de interação social. O teste se baseia na tendência natural que os roedores tem de investigar animais considerados desconhecidos, intrusos. Os animais foram levados individualmente a

interagir com outro rato desconhecido do mesmo sexo em uma caixa de acrílico (60 x 60 x 30cm). A análise consistiu na quantificação do tempo de interação do modelo experimental abrangendo os episódios de grooming, cheirar, seguir, chutar, socar, montar ou permitir a monta. Os ratos foram pareados e inseridos na área de testes por 10 minutos.

### 3.5.2 Teste de locomoção

No DPN 28, os ratos (n=12), foram submetidos ao teste locomotor. A atividade motora foi medida, colocando os animais individualmente, em gaiola de atividade animal - câmara (41x41x33 cm) (Multiple Activity Cage; Ugo Basile®), que consiste em uma Gaiola Animal de Perspex claro, completa com dois conjuntos de matrizes emissor/sensor, equipadas com monitores infravermelhos para atividade horizontal e vertical. O experimento ocorreu em uma sala experimental iluminada e silenciosa. A avaliação da atividade motora foi definida como a contagem horizontal do número total de feixes cruzados. Os dados de velocidade, distância e movimento ambulatório foram coletados durante 20 minutos por meio do software do equipamento.

### 3.6 Análises Bioquímicas

Após a conclusão dos testes comportamentais, no 30º dia, os ratos foram eutanasiados por decapitação e o cérebro dissecado em: córtex, pré-frontal e cerebelo, de acordo com o método descrito por Glowinski e Iversen (1966).

A partir do homogenato das regiões córtex pré-frontal, córtex posterior e cerebelo, os seguintes testes bioquímicos foram conduzidos: avaliação da produção de radicais livres pela oxidação da diclorodifluoresceína (DCFH), concentração de Oxido Nítrico, oxidação de proteínas por concentração de Carbonil, concentração de Sulfidrila (SH); atividade da glutatona redutase (GSH), e da superóxido dismutase (SOD), além da dosagem de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e tióis totais.

### 3.7 Avaliação de Estresse Oxidativo

#### 3.7.1 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS:

A peroxidação lipídica foi analisada através da formação de TBARS (Cheeseman, 1990). As amostras de tecido cerebral foram lavadas com PBS, colhidas e lisadas. As espécies reativas foram obtidas por hidrólise ácida de 1,1,3,3-tetra-etoxi-propano (TEP) e foram utilizadas como padrão para a quantificação de TBARS. A cada tubo foi adicionado TBA a 0,67% e em seguida agitados. A mistura da reação foi incubada a 90° C durante 20 min e posteriormente as amostras colocadas em gelo. A densidade óptica de cada solução foi medida em um espectrofotômetro a 535 nm. Os dados foram expressos como nmol de equivalentes malondialdeído (MDA) por mg de proteína.

#### 3.7.2 Determinação da concentração da 2',7'-diclorofluoresceína - DCF

O homogeneizado de tecido cerebral (pré-frontal, Córtex e Cerebelo) foram utilizadas analisar a concentração da 2',7'-diclorofluoresceína – DCF. A produção de hidroperóxidos foi determinada pela oxidação intracelular de diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) por espécies reativas de oxigênio (ERO). A formação do derivado fluorescente oxidado foi monitorada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525nm, respectivamente, usando um espectrofotômetro de fluorescência como descrito anteriormente por LeBel et al. (1990).

#### 3.7.3 Determinação da concentração de Oxido Nítrico

Citocinas estimulam os níveis de expressão de óxido nítrico sintase das células imunes promovendo estresse oxidativo induzido pelo óxido nítrico (NO) levando a danos citotóxicos. Seguindo os procedimentos conforme descrito por Chae et al. (2004), o óxido nítrico (NO) foi estimado espectrofotometricamente de acordo com a produção de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). As amostras do homogeneizado de tecido cerebral (pré-frontal, Córtex e Cerebelo), foram incubadas com reagente de Griess à temperatura ambiente (18-22 °C), e a absorbância foi medida a 540 nm usando um leitor de microplacas da Molecular Devices.

### 3.7.4 Oxidação de proteínas: concentração de Carbonil

O homogeneizado de tecido cerebral (pré-frontal, Córtex e Cerebelo) foi utilizado para análise da concentração de Carbonil. Seguindo a técnica descrita por Levine et al. (1990), a oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina, essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O teor de carbonil de proteína foi medido usando derivados de proteína-hidrazona marcados com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), que reage com as proteínas carboniladas, formando dinitrofenil-hidrazonas. Estes derivados foram extraídos com ácido tricloroacético seguido de tratamento com etanol / acetato de etilo e dissolvidos em cloridrato de ureia. As concentrações de dinitrofenil-hidrazonas incorporada foram medidas pela absorvância a 370 nm e são mostradas em miligramas de proteína.

### 3.7.5 Determinação da concentração de Sulfidril (SH)

Resíduos de aminoácidos – as cisteínas – que contêm sulfidril (-SH) nas proteínas são alvos suscetíveis a uma variedade de pró-oxidantes. Em diferentes tecidos, as células, incluindo o cérebro, possuem um sistema que regula o status redox dos tióis celulares e protegem as proteínas que contêm -SH contra oxidação excessiva. Os radicais sulfidrilas (-SH) representam todos os grupos tióis, portanto, conforme descrito por Aksenov, Markesbery (2001), para a análise do teor de tiol total e ligado às proteínas, as amostras (pré-frontal, Córtex e Cerebelo) foram processadas e suspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH, 7,5) contendo inibidores de protease: leupeptina (0,5mg / ml), pepstatina (0,7 mg / ml), inibidor de tripsina de soja do tipo IIS (0,5 mg / ml) e fluoreto de fenilmetanossulfonil (40 mg / ml). O conteúdo total de tiol foi determinado usando 5,50-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) e quantificado de acordo com a absorvância a 412 nm usando um espectrofotômetro.

### 3.8 Defesas antioxidantes

#### 3.8.1 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Amostras cerebrais (Pré-frontal, Córtex e Cerebelo) foram homogeneizadas em tampão de glicina. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da autooxidação da adrenalina segundo Bannister e Calabrese (1987). Foi utilizado 10, 30 e 50µL da amostra (homogeneizado em tampão glicina) e adicionado 10µL de catalase (0,0024g/ml de água destilada), 970µL de tampão glicina (0,75g em 200mL de água destilada – 32°C), 17µL de adrenalina (60 mM em água destilada + 15µL/ml de HCl fumegante). A leitura foi realizada em 180 segundos com intervalo de 10 segundos medida espectrofotometricamente a 480nm e os valores foram expressos em Unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg proteína).

#### 3.8.2 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados com base na reação da GSH com o ácido 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico), reagente de Ellman (DTNB). A reação gera um produto oxidado de GSH-TNB que, posteriormente é reduzido a glutathiona redutase (GR). Na presença de nicotinamida-adenina 2'-fosfato dinucleotídeo reduzido – o hidrato de sal tetrassódico (NADPH), reage com a GR – reduzindo-a, com conseqüente síntese de GSH. As concentrações de GSH foram determinadas usando uma curva de regressão plotada usando vários padrões de GSH conforme o estudo de Hissin e Hilf (1976).

#### 3.8.3 Nível de proteínas totais

O conteúdo de proteínas no tecido muscular homogeneizado foi determinado usando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o estudo de Lowry et al. (1951). O reagente fosfomolibdico-fosfotungstico (Folin fenol) foi adicionado para ligar a proteína. O reagente foi reduzido lentamente, como indicado por uma mudança da coloração amarela para azul. A absorbância foi medida a 750 nm.

### 3.9. Análises Estatísticas

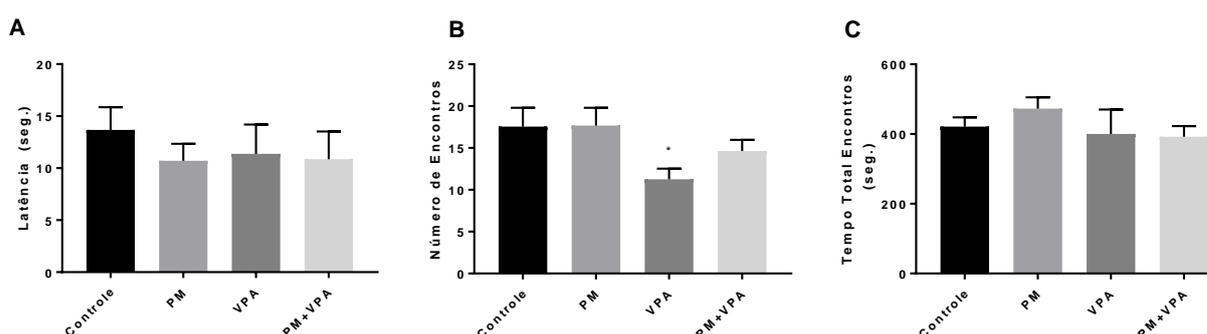
As análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS e os gráficos construídos utilizando o programa Graphpad versão 7.0. Para as comparações entre os grupos utilizou-se a análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey (post hoc). O critério de significância utilizado foi de  $p < 0,05$ . Os asteriscos (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ) caracterizam o grau de significância.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação Comportamental

#### 4.1.1 Teste da Interação Social

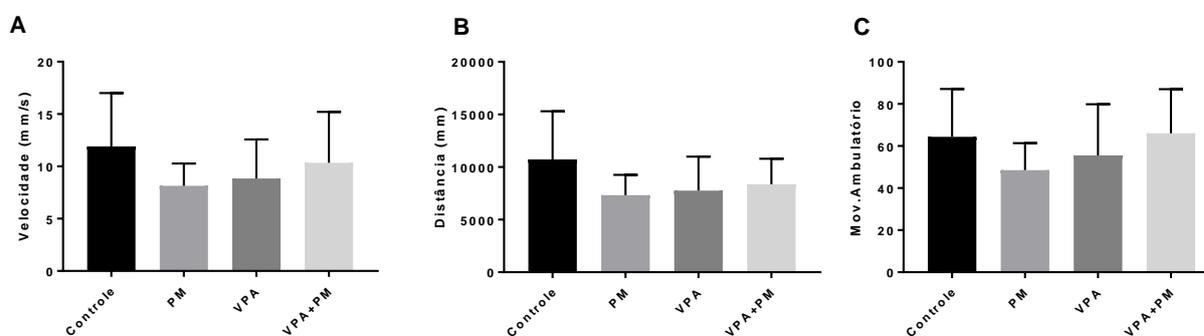
No DPN 25, ratos machos jovens, foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico para interagir com outro animal (do mesmo sexo e grupo experimental), com objetivo de verificar o comportamento de interação social. Os animais permaneceram na área de testes por 10 minutos e os dados de latência para o primeiro encontro (A), número de encontros (B) e tempo total juntos em todos os encontros (C) estão apresentados na figura 9. Na avaliação da latência e tempo total de encontros não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos testados relacionados ao controle. Mas, no número de encontros, o grupo VPA demonstrou uma diminuição estatística (\* $p < 0,05$ ), em relação ao grupo controle. Os animais deste grupo se encontraram menos vezes com seu par, isso demonstra que a administração de VPA no DG12 foi capaz de induzir alterações no comportamento interesse/relação social dos ratos. Os grupos PM e VPA+PM não diferiram em relação ao grupo controle.



**Figura 9:** Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, no comportamento de interação social dos animais testados. Os animais foram levados individualmente a interagir com outro animal desconhecido do mesmo sexo em uma caixa de acrílico. Os ratos foram pareados e inseridos na área de testes por 10 minutos ( $n=12$  animais/grupo). Os dados coletados estão representados nas figuras: **(A)** Latência (segundos) – representa tempo de repouso do animal antes da primeira movimentação; **(B)** Número de encontros – representa o total de encontros entre os animais pareados e, **(C)** Tempo total Encontros (segundos) – representa o tempo total gastos nos encontros. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de Tukey, \* $P < 0,05$ .

#### 4.1.2 Avaliação da atividade locomotora - caixa de atividade

No DPN 28, foi avaliada a atividade locomotora espontânea dos ratos machos jovens e os dados estão apresentados na figura 10. Foram registrados os dados referentes a velocidade de locomoção (A), distância percorrida na caixa (B) e o registro de movimento ambulatorio (C), com propósito de verificar a hiperatividade e movimentos estereotipados. Os dados coletados e analisados não demonstraram diferenças estatísticas significativas entre os grupos PM, VPA e VPA+PM em relação ao grupo controle.



**Figura 10:** Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, no comportamento locomotor dos animais testados. Para avaliar a locomoção foi utilizada a gaiola de atividade, onde os animais foram testados individualmente durante 10 minutos (n=12 animais/grupo). Os dados coletados estão representados nas figuras: **(A)** velocidade (mm/s) – representa a velocidade de deslocamento do animal, **(B)** distância (mm/s) – representa a distância total percorrida pelo animal e **(C)** movimento ambulatorio – representa o deslocamento. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de Tukey.

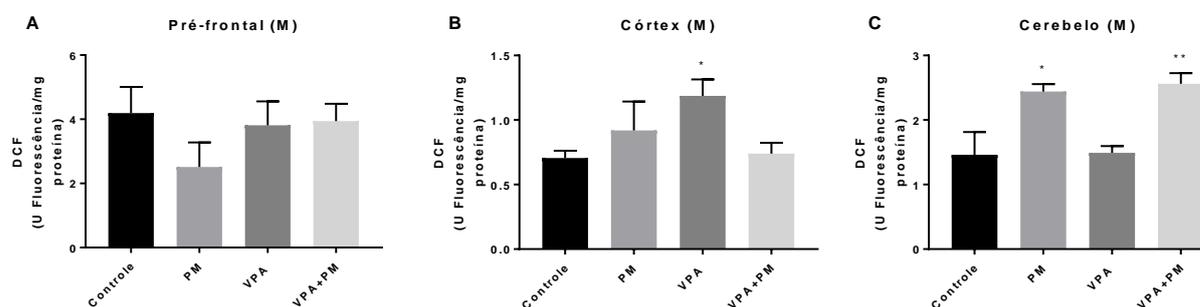
## 4.2 Análise Bioquímica

### 4.2.1 Dano oxidativo

#### 4.2.1.1 Concentração de DCF

No DPN 30, os animais foram eutanasiados e o encéfalo foi removido para avaliação molecular de ERO, os resultados estão apresentados das figuras 11 a 14. Os níveis de oxidação de DCFH são indicadores da produção de espécies reativas, especialmente peróxido de hidrogênio. A produção de ERO foi mensurado com base

na oxidação da sonda DCFH-DA em composto fluorescente da DCF em amostra cerebral. Os dados estão apresentados na figura 11. Foram analisadas as seguintes regiões encefálicas: córtex pré-frontal (A), córtex posterior (B) e cerebelo (C). Na região do córtex pré-frontal, o grupo VPA apresentou aumento significativo na produção de DCF ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo controle, enquanto que os grupos PM e VPA+PM, não diferiram estatisticamente do controle. No cerebelo, o grupo PM apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ), assim como o grupo VPA+PM ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo controle. O grupo VPA não apresentou diferença comparado ao controle. Na região de córtex pré-frontal não houveram diferenças estatísticas entre os grupos quando comparados ao grupo controle. Os dados demonstram que o VPA administrado no GD12 e a PM do DPN1 a 10, de modo isolados e em associação, produziram aumento da DCF em regiões distintas, estando o córtex posterior e o cerebelo mais vulneráveis aos radicais livres gerados frente aos insultos pré (VPA) e pós natal (PM).

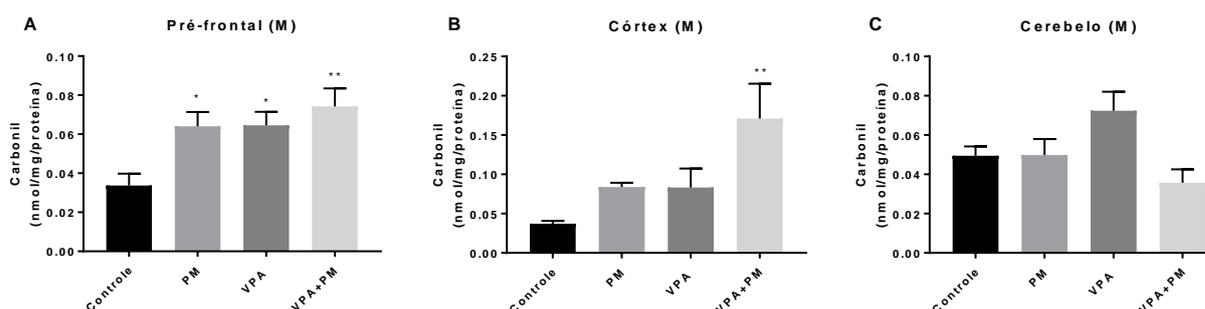


**Figura 11:** Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de DCF, no cérebro em região Pré-frontal (A), Córtex (B) e Cerebelo (C) de animais expostos ao VPA (pré-natal) e a PM (pós-natal) (n=5-6 animais/grupo). Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de Tukey, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.

#### 4.2.1.2 Concentração de Carbonil

A carbonilação proteica é resultado da ação direta de ERO produzindo modificações oxidativas nas proteínas, deste modo, para verificar alterações proteicas foi medido a concentração da proteína carbonil conforme apresentado na figura 12. Os resultados demonstram que no córtex pré-frontal, a PM e VPA, isoladamente ou em associação provocaram aumento dos níveis da proteína carbonil ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente), quando comparados ao grupo controle. Na região do córtex

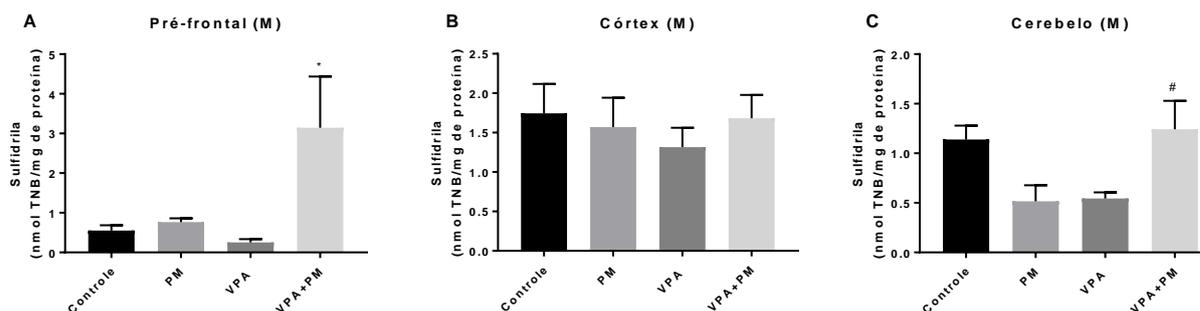
posterior, os dados também confirmaram aumento significativo dos níveis de proteínas carboniladas ( $p < 0,01$ ), para grupo VPA+PM, quando comparado ao grupo controle. Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos quando comparados ao grupo controle, no cerebelo. Os resultados mostram que a associação de VPA+PM, conforme protocolo adotado por esta pesquisa, promoveu dano oxidativo consistente no pré-frontal e córtex de ratos jovens.



**Figura 12:** Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de Carbonil no cérebro em região Pré-frontal (A), Córtex (B) e Cerebelo (C) dos animais testados ( $n=5-6$  animais/grupo). A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de Tukey, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.2.1.3 Concentração de Sulfidrila

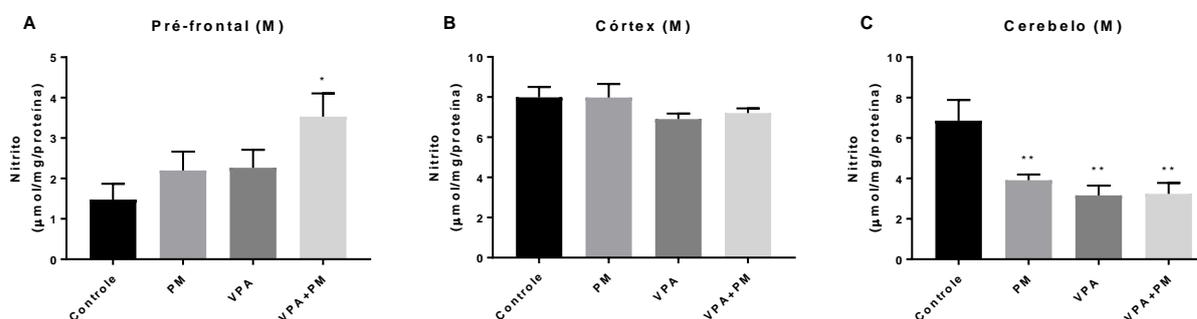
Os dados da figura 13, representam os níveis de oxidação de proteína tiol (sulfidrila -SH) para as regiões do córtex pré-frontal (A), córtex posterior (B) e cerebelo (C). No pré-frontal, somente o grupo VPA+PM ( $p < 0,05$ ), apresentou um aumento significativo nos níveis de sulfidrila, quando comparado ao controle. No cerebelo, o grupo VPA + PM apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ), na oxidação de -SH, quando comparados aos grupos PM e VPA, mas não quando comparado ao grupo controle. Na região do córtex posterior, não houveram alterações significativas entre os grupos PM, VPA e VPA+PM, quando comprados ao grupo controle. Os resultados apresentados demonstram que o grupo submetido ao protocolo conjugado VPA+PM, contém maior dano oxidativo nas regiões encefálicas avaliadas (córtex pré-frontal e cerebelo), sugerindo um desequilíbrio redox nas células e conseqüentemente maior vulnerabilidade do tecido.



**Figura 13:** Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de Sulfidrilas (SH) no cérebro em região Pré-frontal (A), Córtex (B) e Cerebelo (C) dos animais testados (n=5-6 animais/grupo). A oxidação de grupamentos Sulfidrilas (dano proteico) foi determinada mediante a quantificação do teor de tiol total ligado às proteínas. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de Tukey, \*P < 0,05, quando comparados com ao grupo controle; # P < 0,05 quando comparados aos grupos PM e VPA.

#### 4.2.1.4 Concentração de Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ )

A figura 14 apresenta a relação dos níveis de nitrito, nas regiões do pré-frontal (A), córtex posterior (B) e cerebelo (C). Na região pré-frontal, observou-se um aumento estatístico na produção de nitrito somente no grupo VPA+PM ( $p < 0,05$ ), comparado ao controle, evidenciando maior toxicidade por associação dos protocolos PM e VPA. Surpreendentemente, no cerebelo, houve uma diminuição dos níveis de nitrito nos grupos PM ( $p < 0,01$ ), VPA ( $p < 0,01$ ) e VPA+PM ( $p < 0,01$ ), em comparação ao grupo controle. Nas amostras do córtex, os grupos não diferiram estatisticamente. Os dados demonstram alterações na produção de nitrito.

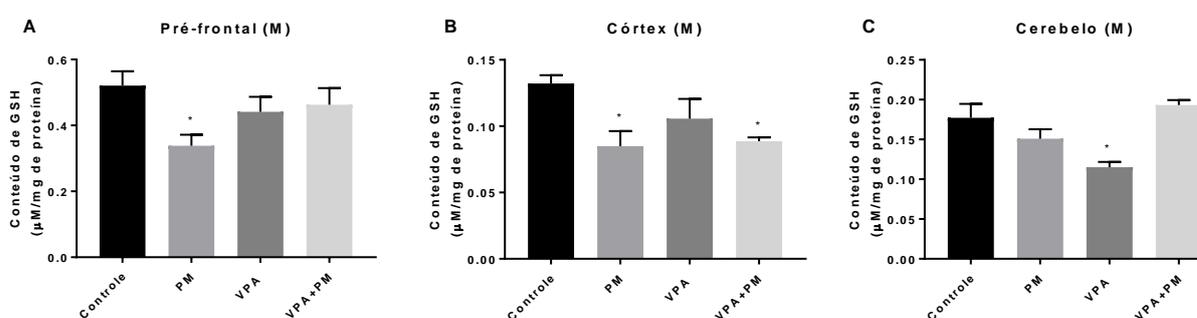


**Figura 14:** Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no cérebro em região Pré-frontal (A), Córtex (B) e Cerebelo (C) dos animais testados (n=5-6 animais/grupo). O estresse oxidativo induzido pelo óxido nítrico (NO), foi estimado espectrofotometricamente mediante a quantificação da produção de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de Tukey, \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.

## 4.3 Defesa Antioxidante

### 4.3.1 Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

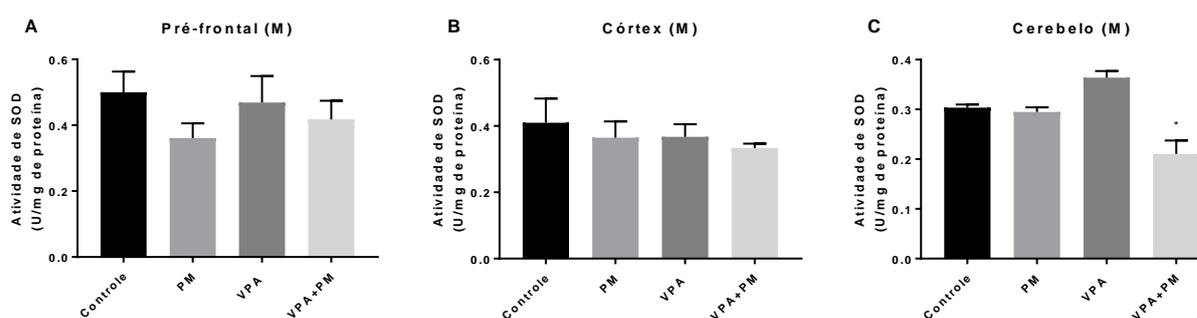
Parâmetros para verificar a defesa antioxidante das células também foram utilizados, a partir, da avaliação dos níveis de GSH e SOD, do homogenato das estruturas cerebrais já mencionadas. A figura 15 apresenta a relação dos níveis de glutathiona, nas regiões do pré-frontal (A), córtex posterior (B) e cerebelo (C). Na região do córtex pré-frontal, somente o grupo PM, demonstrou diminuição na concentração de GSH ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo controle. Nas amostras do córtex posterior, houve uma diminuição estatística na concentração de GSH nos grupos PM ( $p < 0,05$ ) e VPA+PM ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle. No cerebelo, a concentração de GSH apresentou-se diminuída no grupo VPA ( $p < 0,05$ ). Os achados comprovam diminuição na capacidade de reciclagem da ERO peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), concomitante com estresse oxidativo, pela menor atividade da GSH. Os dados mostram que tanto o VPA quanto a PM isoladamente, ou em associação foram capazes de promover a diminuição de glutathiona, onde as diferentes áreas cerebrais divergem quanto a sua susceptibilidade e resposta ao dano oxidativo.



**Figura 15:** Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de glutathiona reduzida (GSH) no cérebro em região Pré-frontal (A), Córtex (B) e Cerebelo (C) dos animais testados (n=5-6 animais/grupo). As concentrações de GSH foram avaliadas usando uma curva padrão de GSH. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de Tukey, \* $P < 0,05$ .

### 4.3.2 Concentração Superóxido Dismutase (SOD)

Neste estudo, avaliou-se a atividade da SOD, no homogeneizado cerebral das regiões do córtex pré-frontal (A), córtex posterior (B) e cerebelo (C), e os resultados estão apresentados na figura 16. Os dados obtidos nas regiões córtex pré-frontal e córtex posterior não apresentaram alterações estatísticas da atividade da SOD para os grupos PM, VPA, VPA+PM, comparados ao controle. Ademais, no cerebelo, a concentração da SOD apresentou-se diminuída para o grupo VPA+PM ( $p < 0,05$ ), comparado ao controle. Com a diminuição da atividade de SOD, o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) presente no meio celular poderá reagir com o radical  $HO\cdot$  produzindo oxigênio singlete  $^1O_2$  e com o óxido nítrico (NO) produzindo peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), aumentando o estado de toxicidade do meio.



**Figura 16:** Efeito da exposição pré-natal ao VPA e PM pós-natal, na concentração de Superóxido Dismutase (SOD), no cérebro em região Pré-frontal (A), Córtex (B) e Cerebelo (C) dos animais testados ( $n=5-6$  animais/grupo). A atividade da SOD foi avaliada medindo a inibição da autooxidação da adrenalina com absorbância a 480 nm. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de Tukey,  $*P < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento de origem multifatorial, no qual, os agentes ambientais podem atuar como um gatilho em indivíduos geneticamente suscetíveis. Neste sentido, o estresse oxidativo parece atuar como uma conexão entre genes e fatores ambientais, ativando e potencializando os efeitos do TEA, afetando gravemente o funcionamento social e a autossuficiência (Hegazy et al., 2015; Posar, Visconti, 2017).

A proposta deste estudo foi verificar os efeitos da exposição gestacional ao VPA combinado à PM, em parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo no cérebro de ratos jovens, pois estas alterações estão presentes no TEA. Os modelos animais são fundamentais para a pesquisa por mimetizarem algumas características elementares de determinado estado patológico específico e reduzir o número de variáveis, assim, pode-se ter maior grau de controle experimental (Arruda et al., 2011).

O modelo animal de TEA por administração gestacional de VPA é um dos modelos animais mais amplamente utilizados e, como qualquer outro modelo experimental, ele não consegue modelar a totalidade dos sinais vistos no TEA (Schlickmann, Fortunato, 2013; Mabunga et al., 2015). Devido às limitações de reprodutibilidade do modelo animal de TEA com administração de VPA (pré-natal) e toda sua complexidade, o presente estudo associou a PM, que também mimetiza aspectos fisiopatológicos do transtorno, buscando um modelo animal de TEA mais complexo; e atender também as condições de validação de constructo, face e preditiva, conforme descrito por Bossu e Roux (2019).

As condições ambientais neonatais, têm profundo impacto no desenvolvimento do SNC, evidências clínicas e epidemiológicas apoiam o entendimento de que a exposição a um ambiente adverso inicial pode estar implícita à vulnerabilidade e à expressão posterior de doenças neuropsicológicas (Ignácio et al., 2017). Segundo Herpfer et al. (2012), experiências adversas na infância associadas a altos níveis de estresse prolongado se apresentam como importantes fatores de risco para uma variedade de distúrbios psiquiátricos e médicos como diminuição da emocionalidade em novos ambientes, tendência para aumento da ansiedade, características semelhantes à anedonia e motivação social reduzida. Outros autores, ainda reforçam que a exposição a ambientes estressantes durante a vida pré-natal ou neonatal

podem alterar o desenvolvimento e predispor o indivíduo a problemas de saúde que perduram ao longo da vida (Marco et al., 2015).

Em humanos, o autismo é diagnosticado quando o paciente apresenta pelo menos dois itens em uma lista de comportamentos em três domínios: interação social; comunicação; interesses restritos e padrões estereotipados do comportamento (Schlickmann, Fortunato, 2013). Sabe-se que os ratos são uma espécie altamente social (Moy et al., 2004), exibem um conjunto notável de comportamentos sociais, servindo como modelos de diagnóstico de TEA, para muitas das categorias observadas em seres humanos e que são acessíveis através de testes padronizados (Schroeder et al., 2017).

Neste sentido, no presente trabalho foi realizado o teste de interação social, onde o modelo animal de VPA apresentou déficit social. Houve uma redução significativa no número de encontros quando comparado ao grupo controle, ou seja, o grupo VPA apresentou prejuízo em interagir com seus pares e menor interesse pelo novo. Tais achados reproduzem características fenotípicas encontradas em humanos com TEA. Estes mesmos achados se comparam aos descritos na literatura, nos quais indivíduos com TEA apresentam dificuldades de interação social e restrição de interesses em diferentes idades (Sanchack, Thomas, 2016), e que o organismo exposto a agentes químicos teratogênicos durante o período pré-natal leva ao desenvolvimento neurológico comprometido (Posar, Visconti, 2017). Os mesmos achados de sociabilidade prejudicada e a preferência pela novidade social em modelo de rato macho de autismo induzido por VPA foram confirmados por Win-Shwe et al. (2018).

Conforme descrito por Iwata (2019), aspectos clínicos do autismo e comportamentos relevantes em modelos animais podem ser avaliados através das três principais deficiências comportamentais observadas no autismo e suas medidas comportamentais em camundongos e ratos: 1) Prejuízo na interação social (contato direto; comportamento lúdico; exploração social; atividade sexual e agressão); 2) Deficiências cognitivas e de comunicação (chamadas de emergência (filhotes); acasalamento e submissão) e 3) Atividades motoras repetidas.

Além disso, no presente projeto foi avaliada a condição motora dos animais através da caixa de atividade. Não foram observadas alterações locomotoras significativas, evidenciando que a motricidade dos animais (ratos machos jovens) não se aprestou afetada pelo tratamento com VPA (pré-natal) e/ou PM (pós-natal). Os

dados demonstram também que os animais não apresentaram hipoatividade e nem hiperatividade locomotora.

O cerebelo é essencial para a coordenação, adaptação/ajuste, aprendizado motor, estando esta região do SNC responsável pela execução das habilidades motoras especializadas, além de regular o tônus postural e o equilíbrio (Fenner, 2009). Dada a importância da informação, pois ao analisar os dados de dano oxidativo no cerebelo não se identificam alterações significativas estatisticamente que possam conduzir ao mal funcionamento desta área, e portanto, que possam comprometer a locomoção dos animais avaliados.

Estes resultados nos levam a novas reflexões e a futuros projetos, conforme já discutido, por Rice e Barone (2000), a vulnerabilidade do cérebro em desenvolvimento depende da exposição ao metabólito ativo e, em qual período ocorreu a exposição; segundo Schlickmann e Fortunato (2013), diferentes dosagens apresentam diferentes efeitos; e regiões cerebrais específicas podem ser mais suscetíveis a danos durante o neurodesenvolvimento (Roullet et al., 2013), e ainda, desde a gestação, o cérebro se desenvolve e continua nos períodos pós-natal, adolescência e idade adulta. Cada área amadurece e desenvolve atendendo as especializações fisiológicas de cada região.

Neste sentido, na idade temporal utilizada – animais jovens – o cérebro, devido sua plasticidade, pode ter sido capaz de se adaptar às necessidades fisiológicas e se recuperado, em parte, das injúrias sofridas no período gestacional e pós-natal, por isso, tais efeitos esperados não foram evidenciados, mas, isso não descarta a possibilidade de, na infância ou idade adulta, as alterações comportamentais de interesses restritos e repetitivos possam se fazer presentes.

Outro ponto a ser observado é o tipo de teste utilizado no estudo, o qual, não possibilitou a identificação de alterações comportamentais em nível estatístico. Assim como proposto no estudo de Bronzuoli et al. (2018), para melhor entender estes efeitos, fica sugestivo o estudo longitudinal desde o período gestacional à idade adulta (conferentes à infância, adolescência e idade adulta humana), para compreender os efeitos do VPA pré-natal associado a PM pós-natal sobre a locomoção do modelo animal proposto, com aplicação de diferentes testes, segundo a especificidade, nas diferentes fases do desenvolvimento.

Além da questão comportamental, a fisiopatologia do TEA também é amplamente investigada. A oxidação é um processo fundamental da vida aeróbica e

do nosso metabolismo, deste modo, há produção, natural ou por alguma disfunção biológica, dos radicais livres que por sua vez, são denominados de acordo com o elétron desemparelhado, encontrando-se centrado nos átomos de oxigênio, formando a espécie reativa de oxigênio – ERO, ou centrado nos átomos de nitrogênio formando a espécie reativa de nitrogênio – ERN (Barreiros et al., 2006; Kumar et al. 2013).

As ERO são produzidas em pequenas quantidades, em todas as células, durante as reações de oxidação e redução, por meio da cadeia transportadora de elétrons, decorrentes da respiração e geração de energia mitocondrial (Kumar et al., 2013), se tornam um subproduto “não intencional”, como quando há o escape de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial - originando o superóxido; as ERO também podem ser produzidas pelo sistema imunológico, principalmente neutrófilos e macrófagos, para eliminar agentes invasores e outras substâncias durante a inflamação e defesa do organismo (Kumar et al. 2013; Hawkins, Davies, 2019). As principais ERO estão distribuídas em dois grupos, os radicalares: hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ); e os não-radicalares: peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ) e o ácido hipocloroso; as ERN incluem o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ )<sup>10</sup> (Barreiros et al., 2006; Chen et al., 2010).

Erros no metabolismo energético e a produção de radicais livres podem levar ao surgimento de doenças e/ou agravá-las, pois, o excesso desta produção apresenta efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos, às enzimas, carboidratos e ao DNA (Barreiros et al., 2006). Wong e Giulivi (2016), relatam que a disfunção mitocondrial é o distúrbio metabólico mais prevalente associado ao TEA, onde a diminuição na atividade da cadeia de transporte de elétrons estaria relacionada ao aumento da produção de ERO e respostas antioxidantes. Isto também favoreceria o aumento na replicação e deleções de mtDNA agravando ainda mais a patologia (Hollis et al., 2017).

Dada a relevância fisiopatológica das ERO, este estudo se propôs a verificar a homeostase redox nas estruturas cerebrais do córtex pré-frontal, córtex posterior e cerebelo de animais expostos a VPA (pré-natal) e /ou PM (pós-natal). Para avaliar a produção geral de ERO intracelular, utilizou-se a sonda 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). A DCFH-DA é um biomarcador (corante não polar), convertido em DCFH (polar), por esterases celulares que não são fluorescentes, mas, que são alteradas para DCF altamente fluorescentes quando oxidadas por ERO intracelular, este

processo de conversão ocorre em nível mitocondrial (Chen et al., 2010; Rastogi et al., 2010). Observou-se que a concentração de DCF para o grupo VPA apresentou aumento estatístico em relação ao grupo controle, no córtex posterior. Já no cerebelo houve um aumento significativo no grupo PM e VPA+PM quando comparados ao controle. No pré-frontal, não foram registradas alterações significativas para este parâmetro. Os dados demonstram presença de ERO aumentada nas regiões avaliadas, em resposta às injúrias acometidas ao cérebro.

A presença de ERO sugere prejuízo na atividade neurofisiológica da região acometida. Os achados de aumento de radicais livres, como neste estudo, foram descritos no estudo de Bu et al. (2017), no qual foi detectado aumento significativo de espécies reativas intracelulares de oxigênio; ERO mitocondrial e apoptose induzida pelo estresse oxidativo mitocondrial, em células linfoblásticas de pacientes com TEA.

As proteínas são abundantes e reagem rapidamente com muitos oxidantes, elas são altamente suscetíveis e são os principais alvos de danos oxidativos (Hawkins, Davies, 2019). Com aumento do estresse oxidativo, a ERO no interior da célula pode provocar a carbonilação de proteínas, através de modificações de cadeias laterais de aminoácidos formando grupamentos carbonil como aldeídos e cetonas, por sua vez, as proteínas podem ser danificadas e suas estruturas sofrerem fragmentação, degradação, e conseqüentemente, perder e/ou alterar suas funções fisiológicas (Fernandes, 2017). Os biomarcadores utilizados para avaliação de oxidação incluem alterações no conteúdo de proteínas carbonilas, nitrotirosinas, produtos finais de glicação e alterações no teor de proteínas e tiol (Aksenov, Markesbery, 2001). No presente projeto, para verificar alterações e dano oxidativo a proteínas, realizou-se a quantificação dos compostos carbonílicos e sulfidrílicos no córtex pré-frontal, córtex posterior e cerebelo de animais expostos a VPA (pré-natal) e/ou PM (pós-natal).

De acordo com as análises bioquímicas, na região do córtex pré-frontal, os níveis de proteínas carboniladas apresentaram-se elevadas em todos os grupos PM; VPA e VPA+PM, comparados ao grupo controle. Já no córtex posterior, apenas os animais expostos ao protocolo VPA+PM confirmaram elevação da proteína carbonil quando comparados ao grupo controle. No cerebelo, não foram registradas alterações significativas. Os grupos demonstraram carbonilação de proteínas por ação de ERO, ademais, o grupo que sugere maior dano/prejuízo é o grupo VPA+PM, que estatisticamente, em diferentes regiões cerebrais, apresentou elevada concentração da proteína carbonil.

Os grupos tióis, representados pelo radical sulfidril (-SH), podem estar ligados a proteínas ou a compostos de baixo peso molecular e quando o estresse redox está elevado, podem ser oxidados. Utilizando o corante de Ellman (DTNB), os grupos tióis absorvem a luz e podem ser quantificados (Aksenov, Markesbery, 2001). Analisando os dados do presente projeto, mais uma vez, a exposição de animais ao protocolo VPA+PM mostrou-se mais prejudicial ao SNC, onde houve um aumento significativo nos níveis de sulfidril para este grupo no córtex pré-frontal quando comparados ao grupo controle. No cerebelo, este grupo também foi significativamente mais afetado que o grupo exposto a PM e a VPA, isoladamente. No córtex posterior não foram registradas alterações.

O óxido nítrico (NO) é um importante neuromodulador com capacidade potencializadora, atuando na memória e no aprendizado, regulando a atividade do BDNF (Tripathi et al., 2020). O NO possui três isoformas descritas pela ciência, a endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), sendo expressos constitutivamente, e a (iNOS) uma enzima induzível pode ser encontrada em células imunes ativadas, como macrófagos (Flora Filho, Zilberstein, 2000; Sweeten et al., 2004; Tripathi et al., 2020). As isoformas (nNOS e eNOS) estão envolvidas em processos homeostáticos como neurotransmissão podendo também ter ações endócrinas, autócrinas e parácrinas; ademais a eNOS e a iNOS estão envolvidas em várias patologias do SNC (Flora Filho, Zilberstein, 2000; Sweeten et al., 2004).

Nas amostras da região do córtex pré-frontal, o grupo exposto ao VPA+PM demonstrou aumento significativo nos níveis de nitrito, comparado ao controle. Por outro lado, as amostras do cerebelo, apresentam menor concentração de NO para os grupos PM; VPA e VPA+PM, em comparação ao grupo controle. Os dados demonstram alterações no metabolismo do NO dependente da área cerebral.

A expressão da NOS é estimulada devido resposta inflamatória levando a superprodução de NO, e nesta condição, pode ser convertido em espécies reativas como peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), conduzindo à oxidação de diversas classes de lipídeos (O'Donnell, Freeman, 2001). Sweeten et al. (2004), concluíram em seu estudo que a produção de NO é alta em crianças com autismo e este fato pode estar associado à regulação positiva do iNOS mediada por IFN- $\gamma$ , em consequência, a produção de NO anormalmente aumentada no cérebro pode interromper as conexões sinápticas, o neurodesenvolvimento normal do cérebro e, possivelmente contribuir para a fisiopatologia subjacente do autismo.

Outra condição a ser observada é possibilidade de reações do NO com outros radicais como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) resultando na formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), ou então, a reação do  $ONOO^-$  com o íon hidrogênio ( $H^+$ ) originando o radical hidroxil ( $HO\cdot$ ), desta forma, ao considerar esta condição, sugere-se que a baixa de NO na região do cerebelo se deve ao consumo deste radical através de sua reação com outras espécies reativas dando origem a outros compostos radicalares. De acordo com o estudo de Keynes et al. (2005), a concentração de NO no homogenato de tecido do cerebelo depende da taxa de geração e degradação e pouco se sabe como o NO é inativado.

Esses dados nos faz reforçar, conforme os achados no estudo de Bronzuoli et al. (2018), que a mesma proteína tem medidas e efeitos diferentes em diferentes áreas cerebrais nas distintas fases de desenvolvimento, e também pode ter relação com sua função naquele local. Amal et al. (2018), em estudo com modelo animal genético de SHANK3, relataram a nitrosilação de proteína S, NO e a modificação pós-tradução mediada (PTM) de cisteína-tióis (NOS), que modulam a atividade de proteínas que regulam as principais vias de sinalização, desta forma compreender as alterações moleculares relacionadas com NO e sinalização de NOS no cérebro de um modelo de autismo, permite caracterizar e identificar proteínas-chave, vias celulares e mecanismos neurobiológicos que podem ser afetados no TEA. Além disso, Tripathi et al., (2020), relacionam o NO como fator importante no TEA, pois, através da mutação *SHANK3* há um aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  excitando a atividade da nNOS; registraram a elevação da atividade da óxido nítrico sintase das proteínas envolvidas no ciclo da vesícula sináptica (Syntaxin1a (Stx1a), sinaptotagmina 1, proteína de fusão sensível à N-etilmaleimida (Nsf) e comprometimento na neurotransmissão, portanto, dado os achados, pode-se implicar o NO como um fator patológico importante no TEA.

Como forma protetora, o organismo possui mecanismo para controle da produção de substâncias tóxicas advindos do processo metabólico mitocondrial - a defesa antioxidante – desempenhando a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais e/ou espécies reativas não radicalares, neste sentido, a defesa antioxidante celular e organizacional incluem enzimas que removem oxidantes ou precursores de oxidantes (superóxido dismutases, peroxixinas, tioredoxina / tioredoxina redutase, isoformas de GSH peroxidase e catalases); eliminadores de oxidantes lipossolúveis, incluindo tíois (GSH e tioredoxina); e não-enzimática através de compostos antioxidantes de origem

dietética, dos quais se destacam as vitaminas (A, C, E), minerais e polifenóis (Barbosa et al., 2010; Hawkins e Davies, 2019).

A L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina (GSH - glutathiona reduzida), é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular presente na maioria das células, desta forma, torna-se um dos agentes importantes do sistema de defesa antioxidante (El-Ansary, Al Dera, 2016). As enzimas envolvidas neste sistema são a glutathiona redutase (GR) catalisando a troca  $SH / S \pm S$  que contribui para a proteção das proteínas tiol; glutathiona peroxidase (GPx); glutathiona transferases (GST), que usa GSH para desintoxicar peróxidos e produtos contendo peróxido de carbonila; gama-glutamilcisteína sintetase; e glicose-6-fosfato desidrogenase, que controla as principais etapas do metabolismo do GSH (Aksenov e Markesbery, 2001; Santos, 2009; Barbosa et al., 2010; Hawkins, Davies, 2019).

Com relação a quantificação dos níveis de glutathiona, presente no homogeneizado cerebral dos animais testados neste estudo, na região do córtex pré-frontal do grupo PM, houve diminuição dos níveis de GSH, em relação ao grupo controle. No córtex posterior, a diminuição dos níveis de GSH, foram apresentados pelos grupos expostos à PM e VPA+PM. Já no cerebelo, a ocorrência da diminuição de GSH foi apresentado pelo grupo VPA. Os três protocolos (PM, VPA ou VPA+PM) foram capazes de desencadear, em diferentes áreas cerebrais, a diminuição dos níveis de GSH. Corroborando com nossos achados, outros estudos com modelo de exposição VPA também relataram diminuição dos níveis de GSH (Hegazy et al. 2015, Kuamr et al., 2016)

Conforme Barreiros et al. (2006), o controle redox pela glutathiona ocorre através da GSH reduzindo o  $H_2O_2$  à  $H_2O$  em presença de GPx, e posteriormente é regenerada a GSH. Deste modo, os dados apresentados nos gráficos, na avaliação da glutathiona, indicam que há redução de sua atividade levando o meio intracelular ao estresse oxidativo. Corroborando a esta observação, segundo Waligóra et al. (2019), o cérebro tem capacidade limitada para desintoxicar a ERO por falta de potencial para a produção de glutathiona pelos neurônios, deste modo, os neurônios ficam vulneráveis ao estresse oxidativo e, se as alterações neurológicas provocadas pelo estresse oxidativo, ocorrerem nos estágios iniciais do desenvolvimento do tecido cerebral, poderão levar a distúrbios do espectro do autismo.

De fato, crianças com autismo apresentam menor razão redox de GSH para glutathiona oxidada, consistente com o estresse oxidativo (Mabunga et al., 2015).

Waligóra et al. (2019), discutem ainda que a menor concentração da forma reduzida de glutathione também pode explicar a possibilidade de infecções recorrentes, inflamação do tecido nervoso e capacidade reduzida de remover substâncias tóxicas do corpo em pacientes com TEA.

Outra proteína antioxidante é a superóxido dismutase (SOD), uma enzima importante para a proteção das células contra os danos oxidativos, catalisando a conversão do radical aniônico superóxido em peróxido de hidrogênio (que é altamente tóxico para as células), em oxigênio molecular e água através da catalase (Barreiros et al., 2006; Perry et al., 2010; Stryer et al., 2014). Devido a isto, é uma importante defesa antioxidante para a maioria das células expostas ao oxigênio.

Até momento, três isoformas de SOD estão descritas em mamíferos: a citoplasmática (SOD-1) Cu/Zn-SOD (Cobre-zinco-SOD); a mitocondrial (SOD2) de Mn-SOD (Manganês-SOD), e a extracelular (SOD3) Cu/Zn-SOD (Cobre-zinco-SOD), todas, as quais, requerem metal catalítico (Cu ou Mn) para sua ativação (Perry et al., 2010; Fukai, Ushio-Fukai, 2011). A enzima SOD catalisa a dismutação dos radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Perry et al., 2010). Neste estudo, na avaliação da atividade da SOD no homogeneizado cerebral, o grupo exposto ao VPA+PM apresentou diminuição significativa no cerebelo, comparado do controle. Em conjunto com os achados anteriores pode-se observar que a maior produção de ERO é acompanhado de uma menor capacidade de reciclagem, configurando desbalanço redox. Com a atividade da SOD e da GSH diminuídas a homeostase do estado redox fica comprometido e o cérebro exposto a danos por radicais livres.

Em pesquisa recente, foram verificadas diferenças nas concentrações das enzimas SOD, GPx e CAT em amostras de sangue em crianças com TEA, indicando capacidade reduzida de neutralizar  $H_2O_2$ , radical aniônico superóxido e hidróxidos orgânicos (Waligóra et al., 2019).

Os achados neste estudo indicam que a aplicação do protocolo de VPA administrado no DG12 e associado a PM do DPN 1-10, provocaram alterações mais significativas em diversos parâmetros em ratos machos jovens. Sugere-se que as alterações provocadas pelo VPA durante a gestação, com a PM aplicada no período crítico de neurodesenvolvimento produziu-se efeitos que se prolongam na vida e sugerem poder perdurar pela vida toda. Numa visão geral, propõe-se a tabela 2.

Tabela 2: Avaliação do estado redox do homogeneizado cerebral – visão geral

GRUPOS	CÓRTEX PRÉ-FRONTAL						CÓRTEX POSTERIOR						CEREBELO						
	DCF	PC	SH	NO	GSH	SOD	DCF	PC	SH	NO	GSH	SOD	DCF	PC	SH	NO	GSH	SOD	
G2: PM		↑			↓							↓		↑			↓↓		
G3: VPA		↑					↑									↓↓	↓		
G4: VPA+PM		↑↑	↑	↑				↑↑			↓		↑↑		#	↓↓			↓

DCF- 2',7'-diclorofluoresceína; PC- Proteína Carbonil; SH- Sulfidril; NO- Óxido nítrico; GSH- Glutathiona reduzida; SOD- superóxido dismutase. Resultados dos grupos em comparação ao G1: Controle.  
 ↓- Representa diminuição do parâmetro avaliado ( $p < 0,05$ ); ↑- Representa aumento do parâmetro avaliado ( $p < 0,05$ ); ↑↑- Representa aumento do parâmetro avaliado ( $p < 0,01$ ); ↓↓- Representa diminuição do parâmetro avaliado ( $p < 0,01$ ); # - não diferiu do controle, mas apresenta-se alterado em relação ao grupo PM e grupo VPA.

Como observado, os dados demonstram que o desequilíbrio redox parece ser mais pronunciado no cerebelo, seguido do córtex pré-frontal e por último o córtex posterior, evidenciando singularidade na susceptibilidade do tecido cerebral dependente de estrutura. Como já descrito, esta pesquisa promoveu a associação de VPA+PM, desta forma buscou-se um modelo animal de TEA mais complexo. Portanto, ao analisar o resultado de forma geral sobre os achados do estado redox, apresentados na tabela 2, identifica-se que o grupo VPA+PM demonstra alterações em diversos indicadores avaliados. No entanto, mais análises bioquímicas e comportamentais são necessárias para concluir a eficiência e versatilidade do modelo proposto.

## 6 CONCLUSÃO

Autismo é um espectro de transtornos que podem variar em intensidade e em características, a depender de cada indivíduo. Dados epidemiológicos demonstram um crescente número de pessoas com TEA, isso pode ter relação com a atualização da DSM-5 e dos critérios diagnósticos, com isso, o número de casos discutido é de 1 a cada 68 nascidos vivos, mas com o avanço da ciência e tecnologias, estima-se que este número possa ser maior.

Existem diferentes linhas de estudos, mas pouco se sabe a respeito dos possíveis mecanismos fisiopatológicos relacionados a etiologia do transtorno do espectro autista. De fato, muito dos avanços alcançados na compreensão da fisiopatologia do TEA e no desenvolvimento de terapêuticas é atribuído ao papel fundamental desempenhado pelos modelos animais, porém, a identificação de um modelo de TEA ainda é um grande desafio para a ciência devido à complexidade multifatorial para seu desenvolvimento. Diversos modelos de TEA já foram propostos, mas que avaliam fenótipos específicos ou mimetizam um número pequeno de sinais e sintomas.

Na literatura, o modelo mais consolidado é o modelo VPA. O modelo proposto neste estudo, associa o modelo de VPA à PM precoce, no período crítico de desenvolvimento do cérebro e, conforme discutido na literatura, esta privação tem efeito negativo quando crônico, trazendo prejuízos neuropsicológicos ao indivíduo que perduram na idade adulta e, o VPA produz alterações no cérebro e no neurodesenvolvimento.

Avaliando os efeitos do protocolo adotado, na interação social, comunicação e interesse restrito-repetitivo o modelo VPA, segundo os dados estatísticos, demonstrou alterações na interação e comunicação social conforme observado em humanos com TEA.

Na análise molecular, para identificação do comprometimento estrutural e funcional, identificou-se, através dos dados estatísticos que o grupo VPA+PM apresentou alteração dos níveis de marcadores de estresse oxidativo DCF, proteína carbonil, sulfidril, óxido nítrico e diminuição da defesa antioxidante GSH, SOD.

Estas alterações ocorreram nas diferentes regiões testadas, o que sugere, que diferentes substâncias estão mais ativas e presentes em certas regiões cerebrais do que em outras, desta forma podem apresentar efeitos fisiológicos singulares. Os

marcadores de estresse oxidativo fortalecem a proposta de associação da PM ao modelo de VPA como um modelo mais complexo pois, identifica-se a produção de espécies reativas conforme avaliado por este estudo e também descrito na literatura, portanto, se o indivíduo tiver uma pré-disposição e viver em condições estressoras na infância, durante o período crítico de desenvolvimento cerebral, posteriormente, na fase jovem e/ou adulta poderá apresentar prejuízo de ordem neuropsicológica.

Estudos futuros são necessários para uma melhor investigação dos mecanismos fisiológicos promovidos pela associação do modelo VPA+PM e poderão responder às questões ainda em aberto como - por que o grupo VPA+PM não apresentou alterações em todos os parâmetros e regiões avaliadas? Será que na avaliação longitudinal (infância/juventude/adulto) os resultados seriam diferentes? Deste modo processos ainda não compreendidos podem ser avaliados direcionando para tratamento mais eficientes e menos custosos aos indivíduos com TEA e para suas famílias.

## REFERÊNCIAS

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001;302(2-3):141-145.

Amal H, Barak B, Bhat V, et al. Shank3 mutation in a mouse model of autism leads to changes in the S-nitroso-proteome and affects key proteins involved in vesicle release and synaptic function [published online ahead of print, 2018 Jul 9]. *Mol Psychiatry.* 2018.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5). 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.

Arruda Eder João De; Kitamura, Jefferson Hisamo; Chaves, Taila Penteado; Silva, Carlos Alberto Da; Mascarim, André Lico. Comportamento exploratório e ansiolítico de ratos e ratas submetidos à estimulação somatossensorial. *Rev Bras Terap e Saúde,* 2(1):7-12, 2011.

Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun.* 2011 Jan;25(1):40-5.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32: 279-312.

Barbosa, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr., Campinas,* v. 23, n. 4, p. 629-643, Aug. 2010.

Barreiros, André L. B. S.; David, Jorge M.; David, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova, São Paulo,* v. 29, n. 1, p. 113-123, Feb. 2006.

Bautista, Edwin e Dueñas, Zulma. A separação materna durante a amamentação induz alterações no número de células imunomarcadas para GFAP. *Psychology & Neuroscience.* 2012 Dez;5 (2), 207-213.

Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JG. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med.* 2015 Feb;45(3):601-13.

Bernardi, Maria Martha; Kirsten, Thiago Berti; Trindade, Mácio Oliveira. Autism, Neuroinflammation and Animal Models for the Study of Autism: A Review. *Rev Neurocienc.* 20(1):117-127. 2012.

Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res.* 2011 Mar 22; 1380:42-77.

Boku S, Toda H, Nakagawa S, Kato A, Inoue T, Koyama T, Hiroi N, Kusumi I. Neonatal maternal separation alters the capacity of adult neural precursor cells to differentiate into neurons via methylation of retinoic acid receptor gene promoter. *Biol Psychiatry.* 2015;77(4):335-44.

Bossu JL, Roux S. Les modèles animaux d'étude de l'autisme - Le modèle «valproate» [The valproate model of autism]. *Med Sci (Paris).* 2019;35(3):236-243.

Bronzuoli MR, Facchinetti R, Ingrassia D, et al. Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Mol Autism.* 2018; 9: 66.

Bu X, Wu D, Lu X, et al. Role of SIRT1/PGC-1 $\alpha$  in mitochondrial oxidative stress in autistic spectrum disorder. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017; 13: 1633-1645. Published 2017 Jun 23.

Butovsky O, Weiner HL. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(10):622-635.

Cezar LC, Kirsten TB, da Fonseca CCN, de Lima APN, Bernardi MM, Felício LF. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018 Jun 8;84(Pt A):173-180.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials.* 2004;25(5):843-850.

Chaste P, Leboyer M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues Clin Neurosci.* 2012;14(3):281-292.

Cheeseman, K. Determinação de produtos de peroxidação lipídica aldeídicos: malonaldeído e 4-hidroxinonenal. *Métodos enzimol.* 1990. 186, 406-413.

Cheh MA, Millonig JH, Roselli LM, Ming X, Jacobsen E, Kamdar S, Wagner GC. En2 knockout mice display neurobehavioral and neurochemical alterations relevant to autism spectrum disorder. *Brain Res.* 2006 Oct 20;1116(1):166-76. Epub 2006 Aug 28.

Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res.* 2010;44(6):587-604.

Christensen DL, Braun KVN, Baio J, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ.* 2018;65(13):1-23. Published 2018 Nov 16.

Christensen J, Gronborg TK, Sorensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, Vestergaard M. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*. 2013 Apr 24;309(16):1696-703.

Coghlan S, Horder J, Inkster B, Mendez MA, Murphy DG, Nutt DJ. GABA system dysfunction in autism and related disorders: from synapse to symptoms. *Neurosci Biobehav Rev*. 2012 Oct;36(9):2044-55.

Czarnabay D, Dalmago J, Martins AS, et al. Repeated three-hour maternal deprivation as a model of early-life stress alters maternal behavior, olfactory learning and neural development. *Neurobiol Learn Mem*. 2019; 163: 107040.

De Theije CG, Wu J, da Silva SL, Kamphuis PJ, Garssen J, Korte SM, Kraneveld AD. Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur J Pharmacol*. 2011 Sep;668 Suppl 1: S70-80.

Dimou L, Gallo V. NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia*. 2015;63(8):1429-1451.

El-Ansary Afaf, Al Dera Hussain. Biomarkers-Directed Strategies to Treat Autism. 2016. Ago; cap. 10: 202-28.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990;186: 407-421.

Fenner, F. L. S. Perfil da produção de óxido nítrico (NO) pelo cerebelo na progressão do estado caquético induzido por tumor de Walker-256. Dissertação (mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2009.

Fernandes, Gabrielly Cruvinel. Estresse neonatal resulta em alterações comportamentais e neuroquímicas duradouras. Dissertação (Mestrado). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2017.

Ferreira X, Oliveira G. Autism and Early Neurodevelopmental Milestones. *Acta Med Port*. 2016 Mar;29(3):168-75.

Flora Filho, R.; Zilberstein, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo uma complexidade. *Metabolismo, amostras e funções*. *Rev. Assoc. Med. Bras*. São Paulo, v. 46, n. 3, p. 265-271, setembro de 2000.

Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(6):1583-1606.

Giridharan VV, Réus GZ, Selvaraj S, Scaini G, Barichello T, Quevedo J. Maternal deprivation increases microglial activation and neuroinflammatory markers in the prefrontal cortex and hippocampus of infant rats. *J Psychiatr Res*. 2019; 115: 13-20.

Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(3):243-251.

Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H] norepinephrine, [3H] dopamine and [3H] dopa in various regions of the brain. *J Neurochem*. 1966; 13(8):655-669.

Goldman SA, Kuypers NJ. How to make an oligodendrocyte. *Development*. 2015; 142(23): 3983-3995.

Gomes PT, Lima LH, Bueno MK, Araújo LA, Souza NM. Autism in Brazil: a systematic review of family challenges and coping strategies. *J Pediatr (Rio J)*. 2015 Mar-Apr;91(2):111-21.

Griesi-Oliveira, Karina; Sertie, Andréa Laurato. Transtornos do espectro do autismo: um guia atualizado para aconselhamento genético. Einstein (São Paulo), São Paulo, v. 15, n. 2, p. 233-238, junho de 2017.

Gupta, Abha R e State, Matthew W. (2006). Autismo: genética. *Rev. Bras. de Psiquiatr*, 28 (Supl. 1), s29-s38.

Hadjkacem I, Ayadi H, Turki M, Yaich S, Khemekhem K, Walha A, Cherif L, Moalla Y, Ghribi F. Prenatal, perinatal and postnatal factors associated with autismo spectrum disorder. *J Pediatr (Rio J)*. 2016 Nov - Dec;92(6):595-601.

Hannan AJ Enriquecimento ambiental e reparação cerebral: aproveitando os efeitos terapêuticos da estimulação cognitiva e da atividade física para melhorar plasticidade dependente de experiência. *Neuropatol Appl Neurobiol*. 2014 Feb; 40 (1): 13-25.

Haroon E, Miller AH, Sanacora G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):193-215.

Hauptenthal DPDS, Possato JC, Zaccaron RP, et al. Effects of chronic treatment with gold nanoparticles on inflammatory responses and oxidative stress in Mdx mice. *J Drug Target*. 2020;28(1):46-54.

Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem*. 2019;294(51):19683-19708.

Hegazy HG, Ali EH, Elgoly AH. Interplay between pro-inflammatory cytokines and brain oxidative stress biomarkers: evidence of parallels between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain physiopathology in autism rat model. *Cytokine*. 2015;71(2):173-180.

Herpfer I, Hezel H, Reichardt W, et al. Early life stress differentially modulates distinct forms of brain plasticity in young and adult mice. *PLoS One*. 2012; 7(10): e 46004.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976;74(1):214-226.

Hollis F, Kanellopoulos AK, Bagni C. Mitochondrial dysfunction in Autism Spectrum Disorder: clinical features and perspectives. *Curr Opin Neurobiol.* 2017; 45: 178-187.

Ignácio, Z.M.; Réus, G.Z.; Quevedo, J.; Kalinichev, M.; Francis, D. Maternal Deprivation. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. 2ed.: Elsevier, 2017, v. 1, p. 1-12.

Iwata K. Characterization of an Animal Model of Autism and Social Interaction. *Methods Mol Biol.* 2019; 1916: 149-155.

Keynes RG, Griffiths CH, Hall C, Garthwaite J. Nitric oxide consumption through lipid peroxidation in brain cell suspensions and homogenates. *Biochem J.* 2005;387(Pt 3):685-694.

Kim B. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol.* 2017; 1606: 133-139.

Kumar, V et al. Robbins, patologia básica. ed.9, RJ: Elsevier, 2013.

Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism. *Lancet.* 2014 Mar 8; 383 (9920): 896-910.

LeBel CP, Ali SF, McKee M, Bondy SC. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990;104(1):17-24.

Lehmann J, Feldon J. Efeitos bio-comportamentais a longo prazo da separação materna no rato: consistente ou confusa? *Rev Neurosci.* 2000; 11: 383-408.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-478.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.

Lyall K, Croen L, Daniels J, et al. The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu Rev Public Health.* 2017; 38:81-102.

Lyall K, Schmidt RJ, Hertz-Picciotto I. Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. *Int J Epidemiol.* 2014. Apr; 43 (2):443-64.

Mabunga DF, Gonzales EL, Kim JW, Kim KC, Shin CY. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp Neurobiol.* 2015 Dec; 24 (4):285-300.

Marco EM, Llorente R, López-Gallardo M, et al. The maternal deprivation animal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015; 51: 151-163.

Masi A, DeMayo MM, Glozier N, Guastella AJ. An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. *Neurosci Bull.* 2017;33(2):183-193.

Meltzer A, Van de Water J. The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2017 Jan; 42 (1):284-298.

Morrens J, Van Den Broeck W, Kempermann G. Glial cells in adult neurogenesis. *Glia*. 2012;60(2):159-174.

Moy SS, Nadler JJ, Perez A, et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav*. 2004;3(5):287-302.

Nicolini C, Fahnstock M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol*. 2018 Jan; 299 (Pt A):217-227.

O'Donnell VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ Res*. 2001;88(1):12-21.

Ortiz GG, Pacheco Moisés FP, Mireles-Ramírez M, et al. Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2017; 108: 1-31.

Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(2):245-262.

Posar A, Visconti P. Autism in 2016: the need for answers. *J Pediatr (Rio J)*. 2017 Mar - Apr;93(2):111-119.

Rastogi RP, Singh SP, Häder DP, Sinha RP. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;397(3):603-607.

Réus GZ, Fernandes GC, de Moura AB, et al. Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. *J Psychiatr Res*. 2017; 95: 196-207.

Rice D, Barone S Jr. Períodos críticos de vulnerabilidade para os países em desenvolvimento sistema nervoso: evidências de humanos e modelos animais. *Perspectiva de saúde do ambiente*. 2000 Jun; 108 Suppl 3: 511-33.

Roulet FI, Lai JK, Foster JA. Exposição in utero ao ácido valpróico e autismo - uma revisão atual de estudos clínicos e animais. *Neurotoxicol Teratol*. 2013 mar-abr; 36: 47-56.

Sanchack KE, Thomas CA. Autism Spectrum Disorder: Primary Care Principles. *Am Fam Physician*. 2016;94(12):972-979.

Sanders SJ, He X, Willsey AJ, et al. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*. 2015;87(6):1215-1233.

Santos, Alessandra Antunes dos. Efeito reativador de oximas frente à inibição da enzima acetilcolinesterase cerebral induzida por malation e malaaxon. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2009.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2008; 21(1): 172-188.

Schlickmann, E; Fortunato, JJ. O uso de ácido valproico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*. 2013 Jun; 62(2), 151-159

Schneider T, Turczak J, Przewłocki R. O enriquecimento ambiental reverte alterações comportamentais em ratos expostos ao ácido valproico pré-natal: problemas para uma abordagem terapêutica no autismo. *Neuropsicofarmacologia*. 2006 Jan; 31 (1): 36-46.

Schroeder JC, Reim D, Boeckers TM, Schmeisser MJ. Genetic Animal Models for Autism Spectrum Disorder. *Curr Top Behav Neurosci*. 2017; 30: 311-324.

Selye H. (1976) Stress without Distress. In: Serban G. (eds) *Psychopathology of Human Adaptation*. Springer, Boston, MA.1976.

Silva, Ritele Hernandez da. Estudo de marcadores gliais e da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase em ratos submetidos à privação materna. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci*. 2014; 8: 315.

Stryer, Lubert; Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L. *Bioquímica - 7. ed.*, RJ: Guanabara Koogan, 2014.

Sweeten TL, Posey DJ, Shankar S, McDougale CJ. High nitric oxide production in autistic disorder: a possible role for interferon-gamma. *Biol Psychiatry*. 2004;55(4):434-437.

Todorov, JC. Sobre uma definição de comportamento. *Perspectivas*, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 32-37, 2012.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76(9):4350-4354.

Tripathi MK, Kartawy M, Amal H. The role of nitric oxide in brain disorders: Autism spectrum disorder and other psychiatric, neurological, and neurodegenerative disorders [published online ahead of print, 2020 May 15]. *Redox Biol*. 2020;34:101567.

Varela, Roger Bitencourt. Efeitos dos inibidores de histonas desacetilase sobre enzimas epigenéticas no cérebro de animais submetidos a modelos de mania e de depressão / Roger Bitencourt Varela. 2018.

Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, Harony-Nicolas H, De Rubeis S, Drapeau E, Buxbaum JD, Hof PR. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol.* 2017 Oct;134(4):537-566.

Waligóra A, Waligóra S, Kozarska M, Damasiewicz-Bodzek A, Gorczyca P, Tyrpień-Golder K. Autism spectrum disorder (ASD) - biomarkers of oxidative stress and methylation and transsulfuration cycle. *Zaburzenia ze spektrum autyzmu (ASD) – biomarkery stresu oksydacyjnego oraz cyklu metylacji i transsulfuracji. Psychiatr Pol.* 2019;53(4):771-788.

Webster Marketon JI, Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cell Immunol.* 2008; 252(1-2):16-26.

Weiss IC, Franklin TB, Vizi S, Mansuy IM. Inheritable effect of unpredictable maternal separation on behavioral responses in mice. *Front Behav Neurosci.* 2011; 5: 3. Published 2011.

Win-Shwe TT, Nway NC, Imai M, Lwin TT, Mar O, Watanabe H. Social behavior, neuroimmune markers and glutamic acid decarboxylase levels in a rat model of valproic acid-induced autism. *J Toxicol Sci.* 2018;43(11):631-643.

Wong S, Giulivi C. Autism, Mitochondria and Polybrominated Diphenyl Ether Exposure. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2016;15(5):614-23.

Woo CC, Donnelly JH, Steinberg-Epstein R, Leon M. Enriquecimento ambiental como uma terapia para o autismo: uma replicação e extensão de ensaios clínicos. *Behaviour Neurosci.* 2015 Ago; 129 (4): 412-22.

Wultz B, Sagvolden t, Moser EI, Moser MB A ratazana espontaneamente hipertensiva como um modelo animal da desordem de hiperatividade de déficit de atenção: efeitos de metilfenidato no comportamento exploratório. *Behav Neural Biol.* 1990. 53: 88-102.

Yamaguchi H, Hara Y, Ago Y, Takano E, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. *Behav Brain Res.* 2017. Aug,30; 333:67-73.

Yang QQ, Zhou JW. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia.* 2019;67(6):1017-1035.

Yenkoyan K, Grigoryan A, Fereshetyan K, Yepremyan D. Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res.* 2017. Jul, 28; 331:92-101.

## ANEXO A



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 07/05/2019.

<b>Título do projeto</b>	Avaliação do efeito da exposição ao valproato de sódio e à privação materna como modelo animal murino de transtorno do espectro autista
<b>Project title</b>	<i>Evaluation of the effect of sodium valproate and maternal deprivation on behavioral and biochemical parameters related to autism spectrum disorder</i>
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	035/2019-1
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Cinara Ludvig Gonçalves
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Beatriz da Costa Chede, Jaime Lin, João Paulo Behenck, Maria Eduarda Botelho, Mariana Setubal Milverstet, Laura de Araujo Borba, Raíssa Walter de Freitas.

<b>Finalidade</b>	( ) Ensino      ( X ) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	10/05/2019 a 09/05/2020
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico/Wistar
<b>Idade/Peso</b>	60 dias/400
<b>Gênero</b>	12 femininos
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico/Wistar
<b>Idade/Peso</b>	1 dia/30g
<b>Gênero</b>	96 masculino
<b>Número de animais</b>	108
<b>Origem</b>	Biotério Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

  
Samira da Silva Valvassori  
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 07 de maio de 2019