

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

LUCIANA MERTEN COSTA

**EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO
REDUZIDAS COM CURCUMINA SOB PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO**

CRICIÚMA

2022

LUCIANA MERTEN COSTA

**EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO
REDUZIDAS COM CURCUMINA SOB PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.**

Orientadora: Dr^a. Cinara Ludvig Gonçalves

CRICIÚMA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C837e Costa, Luciana Merten.

Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro reduzidas com curcumina sob parâmetros comportamentais em um modelo animal de autismo / Luciana Merten Costa. - 2022.

63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2022.

Orientação: Cinara Ludvig Gonçalves.

1. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico.
2. Curcumina - Uso terapêutico. 3. Transtornos do espectro autista - Tratamento. 4. Comportamento - Modificação.

CDD 23. ed. 615.321

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



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 390

Com início às 13h30 (treze horas e trinta minutos) do dia vinte e nove de março de 2022 (dois mil e vinte e dois), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **LUCIANA MERTEN DE COSTA**, sob a orientação da **Profa. Dra. CINARA LUDVIG**, intitulada “**EFEITO DO TRATAMENTO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO REDUZIDAS COM CURCUMINA SOB PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO**”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Jaqueline da Silva Generoso (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Tatiana de Souza Nascimento (Albert Einstein College of Medicine) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: APROVADA, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 14h30 (quatorze horas e trinta minutos), 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. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 25 (vinte e cinco) de março de 2022 (dois mil e vinte e dois).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck

Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi

Assistente Administrativo

A dissertação foi elaborada seguindo as normas do PPGCS estilo Vancouver modificado e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde.

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, que me deu a oportunidade de ampliar mais uma vez meus conhecimentos para fazer a diferença ao próximo; à minha família que, desde cedo, encaminhou-me em um caminho digno e justo para deixar um grande legado ao mundo; e ao meu eterno namorado Mateus, que tanto me incentiva e apoia, motivando-me a continuar em busca de aprimorar nossas capacidades incessantemente.

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de forma significativa na elaboração da minha dissertação, seja à minha orientadora Dra. Cinara, que tanto me ensinou e demonstrou o dom e o carinho que tem pelo ensino e pela procura incansável do saber.

Aos meus colegas da nossa agradável Linha de Pesquisa Sobre Neurodesenvolvimento e Autismo, como nossas queridas e sempre presente alunas de Iniciação Científica Maiara e Rose, que tanto me ensinaram pelas suas dedicações integrais e de forte apoio em todos os experimentos presentes no laboratório.

Aos colegas de outras Linhas de Pesquisa aqui da Universidade, seja os que dividiram disciplinas, corpo discente, ou que nos contemplaram com a sua sabedoria, corpo docente, como o professor Dr. Paulo, ao longo do Mestrado, partilhando sua fonte de conhecimento, resultando em mais hipóteses para desvendarmos e auxiliarmos na construção da divulgação científica, como no caso da afinidade com imunologia e inflamação, que tanto me ajudou a compreender o processo REDOX e reação com os antioxidantes, como a curcumina.

Também ao professor Dr. Sílvio, que me oportunizou a dividir os seus alunos para passarmos o conteúdo de imunologia, excelente oportunidade para fazer meu Estágio, sob autorização também da Coordenadora de Farmácia e que permitiu que nosso encontro acontecesse, professora Sílvia.

Seja meus colegas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) que tanto me apoiaram, como nesta fase final principalmente, Carina e Lidiane, que com um gesto tão singelo depositaram confiança na minha capacidade de querer fazer a diferença.

À CAPES pelo financiamento deste trabalho de pesquisa, que me oportunizou enfrentar novos desafios e estreitar contatos com a comunidade científica local, nacional e internacional, inclusive com a participação em eventos acadêmicos e o compartilhamento de resultados desta monografia.

“Autismo: uma forma diferente de ver o mundo”

Luciana Costa

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é caracterizado por comprometimento na interação social aliada à presença de padrão restrito, repetitivo e estereotipado de comportamentos, interesses ou atividades. A utilização das nanopartículas de ouro (GNPs) no tratamento de diversas patologias surge devido às evidências de agir como um efeito antagonista do sistema REDOX (reação de óxido-redução) nas células e como um antiinflamatório. A curcumina (CUR) também vem ganhando representatividade por seus potenciais benefícios sobre o estresse oxidativo e doenças inflamatórias, neurodegenerativas e cardiometabólicas. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito do uso das GNPs reduzidas com CUR na reversão das alterações comportamentais em um modelo experimental de TEA induzido por ácido valproico (VPA). Neste sentido, as ratas no 12º dia gestacional, receberam uma única administração intraperitoneal (i.p.) de 500 mg/kg de VPA ou salina (grupo-controle). No 6º dia pós-natal (PN), os filhotes foram divididos em 8 grupos: apenas salina (SAL), SAL+GNP, SAL+CUR, VPA+SAL, VPA+GNP, VPA+CUR, SAL+GNP+CUR e VPA+GNP+CUR. As GNPs (2,5 mg/kg) e a CUR (1 mg/kg) foram administradas uma vez ao dia, durante três dias consecutivos (6, 7 e 8º PN), via i.p. O peso corporal foi verificado ao longo dos 30 dias de experimentação. Os parâmetros comportamentais relacionados ao neurodesenvolvimento, locomoção, ansiedade e sociabilidade foram avaliados nos dias 17, 28, 29, 30 e 31º PN, respectivamente. Neste estudo, observou-se uma melhora dos parâmetros sociais dos animais expostos ao VPA e tratados com CUR ou GNP+CUR. Conclui-se então que a CUR *per se* não precisa de carreador para exercer seus efeitos terapêuticos no déficit social observado no modelo animal de TEA.

Palavras-chave: Curcumina; Nanopartícula de Ouro; Comportamento; Tratamento.

ABSTRACT

The autism spectrum disorder (ASD) is characterized by impairment in social interaction combined with the presence of a restricted, repetitive and stereotyped pattern of behaviors, interests or activities. The use of gold nanoparticles (GNPs) in the treatment of various pathologies arises due to evidence of acting as an antagonist effect of the REDOX system (oxide-reduction reaction) in cells and as an anti-inflammatory. Curcumin (CUR) has also been gaining representation due to its potential benefits on oxidative stress and inflammatory, neurodegenerative and cardiometabolic diseases. Thus, the aim of the study was to evaluate the promising effect of the use of GNPs reduced with CUR in reversing behavioral changes in an experimental model of ASD induced by valproic acid (VPA). In this sense, the rats on the 12th gestation's day received a single intraperitoneal (i.p.) administration of 500 mg/kg of VPA or saline (control group). On the 6th postnatal day (PN), the pups were divided into 8 groups: saline only (SAL), SAL+GNP, SAL+CUR, VPA+SAL, VPA+GNP, VPA+CUR, SAL+GNP+CUR or VPA+GNP+CUR. GNPs (2.5 mg/kg) and CUR (1 mg/kg) were administered once a day for three consecutive days (6th, 7th and 8th PN) via i.p. Body weight was verified throughout the 30 days of experimentation. Behavioral parameters related to neurodevelopment, locomotion, anxiety and sociability were evaluated on days 17, 28, 29, 30 and 31 PN, respectively. In this study, an improvement in the social parameters of VPA-exposed animals and treated with CUR or GNP+CUR was observed. It is therefore concluded that CUR per se does not need a carrier to exert its therapeutic effects on the social deficit observed in the animal model of ASD.

Keywords: Curcumin; Gold Nanoparticle; Behavior; Treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fatores internos e externos induzindo o desenvolvimento do TEA.....	19
Figura 2 – Os neurotransmissores e os potenciais mecanismos de ação à nível molecular no desenvolvimento do TEA.....	22
Figura 3 – Equilíbrio dos radicais livres e antioxidantes agindo em nível metabólico	24
Figura 4 – Teste de Geotaxia Negativa	31
Figura 5 – Teste das Três Câmaras.....	33
Figura 6 – Teste do Labirinto de Cruz Elevada	34
Figura 7 – Teste de Campo Aberto	35
Figura 8 – Gráfico em formato de Linhas e Barras dos Pesos dos animais	36
Figura 9 – Gráfico da Geotaxia Negativa	37
Figura 10 – Gráfico do Teste de Campo Aberto	38
Figura 11 – Gráfico do Teste de Labirinto em Cruz Elevada	40
Figura 12 – Gráfico do Teste das Três Câmaras.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CAT –Catalase
CCL2 – Ligante de Quimiocina 2
CUR – Curcumina
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ERN – Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO – Espécies Reativa de Oxigênio
FDA – Órgão de Administração de Alimentos e Medicamentos nos Estados Unidos
GN – Geotaxia Negativa
GNP – Nanopartícula de Ouro
GSH-Px – Glutathione Peroxidase
GABA – Ácido Gama-Aminobutírico
IFN- γ – Interferon Gama
IL – Interleucina
IP – Intraperitoneal
NGF – Proteína Fator de Crescimento Nervoso
PN – Pós-Natal
QI – Quociente de Inteligência
REDOX – Reações de Oxidação-Redução
SAL – Salina
SOD –Superóxido Dismutase
SNC – Sistema Nervoso Central
TEA – Transtorno do Espectro Autista
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
VPA – Ácido Valproico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Definição de Autismo	13
1.2 Epidemiologia.....	14
1.3 Etiologia	14
1.4 Diagnóstico e Tratamento	19
1.5 Fisiopatologia	20
1.6 Nanopartículas de Ouro	25
1.7 Curcumina	26
2 OBJETIVOS DO TRABALHO	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Princípios Éticos.....	29
3.2 Desenho Experimental.....	29
3.2.1 Fase Experimental I	29
3.2.2 Fase Experimental II	30
3.3 Testes Comportamentais.....	31
3.3.1 Teste Geotaxia Negativa.....	31
3.3.2 Teste das Três Câmaras.....	32
3.3.3 Teste do Labirinto em Cruz Elevado	33
3.3.4 Teste do Campo Aberto	34
3.4 Análise Estatística	35
4 RESULTADOS	36
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO A - Certificado do Projeto	65

1 INTRODUÇÃO

O termo autismo foi utilizado primariamente pelo psiquiatra suíço Paul Eugen Bleuler em 1911. Ele usou este termo para descrever um grupo de sintomas relacionados à esquizofrenia, assim como ainda constavam nas primeiras versões das DSMs, Manual Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais. Já Hans Asperger e Leo Kanner, cientistas contemporâneos em 1943, durante a II Guerra Mundial, desenvolveram o estudo atual criando novos conceitos e tendências de avaliações e entendimento mais específicos na etiologia do autismo (Sivamaruthi et al., 2020).

1.1 Definição de Autismo

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma condição do neurodesenvolvimento com fenótipos bem complexos e com muitas etiologias subjacentes (Jepson et al, 2007; Newschaffer, et al., 2007). Segundo Sivamaruthi et al. (2020), a incidência de TEA aumentou abruptamente nas últimas décadas, principalmente entre irmãos nascidos em famílias com o distúrbio, tendo um risco aumentado de 50% maior de prevalência.

O TEA é um transtorno caracterizado por comprometimento persistente na interação e reciprocidade social aliado à presença de padrão restrito, repetitivo e estereotipado de comportamentos, interesses ou atividades (DSM-5, 2013; Lord et al., 2018). Além desses sintomas principais, existem geralmente outros distúrbios associados, tais como a ansiedade, a depressão, os distúrbios do sono e da alimentação, os problemas de déficit de atenção, os acessos de raiva e agressividade, além da própria automutilação (DSM-5, 2013) e desregulação do sistema imunológico (Warren et al., 1996).

Sabe-se que no TEA, há comprometimento do desenvolvimento neuronal, proliferação e migração das células da glia e células nervosas (Fontes Dutra et al., 2018), formação aumentada das fendas sinápticas, mielinização de neurônios e disfunções no sistema glutamatérgico e serotoninérgico (Tanaka et al.,

2018). Perturbações na função motora, quando presentes, são geralmente visíveis (Kemper, 1998).

O diagnóstico precoce e as intervenções terapêuticas em conjunto com uma equipe interdisciplinar melhoram o prognóstico do TEA (Masini et al., 2020).

1.2 Epidemiologia

A prevalência de TEA é quatro vezes mais frequente em indivíduos do sexo masculino (Baio et al., 2018). Cerca de 20 a 37% dos casos apresentam epilepsia como comorbidade associada (Yasuhara, 2010). Sua origem data na literatura médica dos Estados Unidos e Europa em meados de 1940 (Wing et al., 2002), e sua prevalência hipotética em meados de 1980 seria algo em torno de 5% apenas de habitantes em todo o mundo (Gillberg et al., 1991).

Levando-se em consideração a elevada prevalência do TEA na atualidade em oposição ao que se tinha na literatura desde então, temos cerca de 3% das crianças só em algumas comunidades dos Estados Unidos (Baio et al., 2018) e aproximadamente de 2 a 3% na população em geral do oriente, como a Coreia do Sul (Kim et al., 2011).

Nos países europeus, a Islândia possui um destaque de aproximadamente 3,1% (Chiarotti e Venerosi, 2020). E na América Latina, como o Brasil, encontra-se dois estudos na literatura atual, um em pequeno número amostral situado na região de Atibaia/SP, com prevalência de aproximadamente 0,3% (Paula et al., 2011), enquanto que o Estado de Santa Catarina em torno de 1,31% a cada 10.000 habitantes (Ferreira, 2008).

Crianças com TEA têm tendência a portar deficiência intelectual segundo alguns estudos na literatura, com Coeficiente de Inteligência (QI) menor ou igual a 70 (Chiarotti e Venerosi, 2020). Porém, Maenner et al. (2020) enfatiza que apenas 30% aproximadamente possuem esta deficiência, sendo 24% em uma faixa próxima à *boderline* QI entre 71-85 e 42% com um QI na faixa média ou superior (QI>85).

Segundo a última atualização do DSM-5 (2013), a taxa de aumento na incidência do TEA pode estar sendo associada à inclusão de casos ainda subjetivos, maior conscientização da população local e no mundo, diferenças nas metodologias do estudo e avaliações e comparações ou aumento real na frequência de casos.

Com esta nova compreensão da prevalência, as consequências sociais e específicas do TEA começam a ser amplamente direcionadas com o enfoque de verdadeiras políticas públicas, como citado por Newschaffer et al. (2007), e importante começar a atrair o foco de pesquisadores no globo direcionando tempo e investimento reais como uma patologia bastante emergente (Chiarotti e Venerosi, 2020).

1.3 Etiologia

Apesar de ser um transtorno prevalente, pouco se sabe a respeito das causas e da fisiopatologia do TEA (Nestler et al., 2010). A partir de 2005, tecnologias como sequenciamento de exoma inteiro e microarranjos têm permitido estudos de todo o genoma, levando a diferentes variações nos números de cópias, segmentos de DNAs e variações de nucleotídeos únicos em pacientes com TEA (Masini et al., 2020). Mais de 100 genes candidatos já foram estudados nos últimos anos para associação com o TEA (Bacchelli et al., 2006), fato provavelmente justificado por mais de um terço de todos os genes humanos serem expressos no tecido cerebral (Boguski et al., 2004).

Sabe-se que 50% dos casos de TEA são atribuídos a defeitos no gene e anormalidades cromossômicas que levam ao comprometimento das conexões neuronais e amadurecimento do cérebro (An et al., 2018; Gandal et al., 2018). Evidências revelam que mutações nos genes *de novo*, variantes raras e comuns, são os principais fatores genéticos que levam ao desenvolvimento do TEA (Sivamaruthi et al., 2020). Estudos genômicos revelam que os cromossomos 2q, 7q, 15q e 16p representam genes suscetíveis ao TEA (Wiśniowiecka-Kowalnik et al., 2019; Sivamaruthi et al., 2020) e os genes EN2 (engrailed homeobox 2), envolvido no padrão de desenvolvimento do cerebelo, genes do sistema ácido α -aminobutírico (GABA) e genes do transportador de serotonina também estão associados ao TEA (Campistol et al., 2016).

Sugere-se que os genes mais afetados no TEA codificam para proteínas envolvidas na remodelação da cromatina e regulação da transcrição, proliferação celular, arquitetura e funcionalidade sináptica (Hertz-Picciotto et al., 2018), e nestas incluindo moléculas de adesão celular, receptores e proteínas do citoesqueleto (Masini, 2020).

Evidências mostraram que fatores ambientais, externos, estão associados à ocorrência de TEA (Barônio et al., 2015), como infecções virais e microbianas (Wu et al., 2015); além de fatores internos como anticorpos maternos (Bhagavathi et al., 2020), disparidades metabólicas, diabetes (Wan et al., 2018), e/ou histórico familiar de doenças autoimunes – como os níveis séricos mais baixos de zinco (Sanna et al., 2018), que desempenham um papel importante na regulação do sistema imunológico e um papel importante na formação do tubo neural (Masini et al., 2020).

A hipóxia placentária pode causar danos cerebrais relacionados à disfunção da mielina (Monz et al., 2019), resultado do comprometimento dos oligodendrócitos ou inflamação envolvendo a micróglia (van Tilborg et al., 2018).

Ainda há a deficiência de micronutrientes, como a falta de vitaminas – C, D e E (Srinivasan et al., 2009) e oligoelementos (cromo, magnésio e zinco) que geralmente estão presentes em desequilíbrio em amostras como de cabelo e/ou sangue, apresentando risco aumentado de redução em pacientes com o transtorno (Masini et al., 2020), além de consequentemente possuir o microbioma intestinal

comprometido - influenciando principalmente a memória e a aprendizagem (Sivamaruthi et al., 2020). Por exemplo, a deficiência de magnésio pode ser um dos agentes responsáveis pelo estresse oxidativo (Zheltova et al., 2016).

Segundo Lyall et al (2017), há forte tendência de exposição gestacional a toxinas ambientais, como as idades paternas na formação de gametas induzindo a metilação de seu DNA e formação do tubo neural do feto, além da mãe geralmente imunossuprimida ser ainda mais suscetível à poluição, contaminantes e germes no ar.

Também há a exposição de pesticidas - como os organofosforados e piretróides ao longo da vida tanto infanto-juvenil quanto adulta, como na lavoura, comprometendo principalmente às doenças ocupacionais gerados por estes agentes (Lyall et al., 2017).

O etilmercúrio, muito usado como conservante (timerosal) em produtos médicos como vacina, tem sido objeto de discussão já faz algum tempo (Newschaffer et al., 2007), contribuindo para os níveis totais de mercúrio no sangue (Parker et al., 2004). No entanto, até o momento, não há estudos que indiquem a relação deste composto na etiologia do TEA (Carter-Pokras et al., 2020).

Alguns xenobióticos prescritos desde a década de 50 surgiram como contribuintes para a interrupção do fechamento do tubo neural no período gestacional (Stromland et al., 1994), tais quais a talidomida - usada por muitos anos para dormir e tratar a ansiedade e enjôos matinais em mulheres grávidas (Newschaffer et al., 2007); o ácido valproico (VPA), antiepilético usado como estabilizador de humor no transtorno bipolar e na esquizofrenia (Rasalam et al., 2005); e o misoprostol, análogo da prostaglandina utilizado geralmente para induziro aborto médico, resultando em dano aos núcleos dos nervos cranianos (Ornoy et al., 2016).

Além de fatores ambientais e genéticos, outras condições patológicas como o estresse oxidativo e disfunção mitocondrial provavelmente estão envolvidos na patologia do TEA (Kumar et al., 2012). A ativação da micróglia (imunidade inata) e a liberação de citocinas (adaptativa) oriundas da cascata inflamatória (Shabab et al., 2017), bem como aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e vias do estresse oxidativo podem gerar danos mitocondriais (Bhat et al., 2015), levando à morte celular no SNC (Fahkri et al., 2018).

Neste sentido, na Figura 1, está descrito o ciclo da exposição pré-natal como toxinas ambientais, desordem autoimune, drogas e infecções gerando uma disfunção imunológica. Enquanto a exposição pós-natal está relacionada ao estilo de vida, deficiências/disfunção no metabolismo e drogas, gerando uma disbiose intestinal, influenciada principalmente pela dieta, onde a suscetibilidade genética somada a fatores ambientais induz à severidade no desenvolvimento do TEA (Masini et al., 2020).

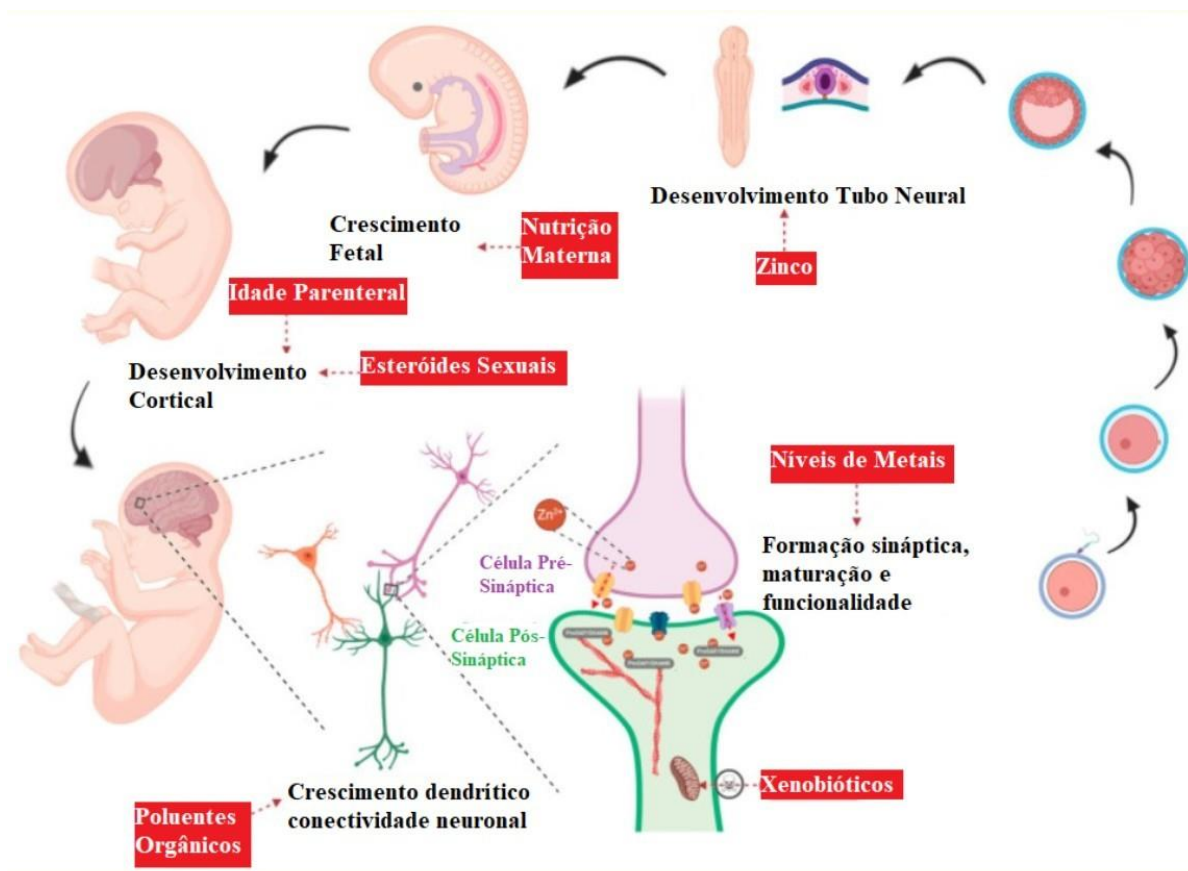


Figura 1: Fatores genéticos e ambientais influenciando na severidade da patologia do TEA. Desde a formação do óvulo fecundado, mórula, blástula, gástrula, formação do tubo neural, crescimento fetal e desenvolvimento do sistema nervoso, com a formação sináptica entre os neurônios, maturação e funcionalidade (Fonte: Masini et al., 2020).

Nesse ínterim, a administração de substâncias antioxidantes pode ter um efeito neuroprotetor, ou mesmo terapêutico, para indivíduos susceptíveis ao TEA.

1.4 Diagnóstico e Tratamento

Os critérios diagnósticos são observacionais baseados na história-clínica do paciente, pelo prontuário e anamnese (de acordo com o DSM-5, 2013), pois ainda não há um biomarcador para este transtorno (Kumar et al., 2012).

Segundo o próprio DSM-5 (2013), a autoridade médica propõe diferenciações no diagnóstico com base na comorbidade como a deficiência intelectual, de linguagem, outro distúrbio do neurodesenvolvimento, mental ou comportamental, condição patológica ou genética e fatores ambientais. Ainda, na

atualidade, há dificuldades para a padronização de exames de imagens para que possam indicar alterações no diagnóstico do TEA (Ospina et al., 2008).

Até o momento então, não existe tratamento eficaz para os sintomas centrais do autismo (Eissa et al., 2018), apenas há medicações para diminuir seus efeitos colaterais. A intervenção baseia-se no suporte multidisciplinar, cujos objetivos são maximizar a independência funcional do indivíduo afetado e amenizar as deficiências e o impacto promovido pelas diversas comorbidades existentes no TEA (Volkman et al., 1998; Lord et al., 2018).

Atualmente, os antipsicóticos atípicos risperidona e aripiprazol são os únicos aprovados pela FDA (Órgão Administrativo de alimentos e medicações nos Estados Unidos da América) para melhorar os sintomas comportamentais associados ao TEA (Matson et al., 2011).

Existem ainda várias outras intervenções farmacológicas, tais como inibidores seletivos de recaptção de serotonina (sertralina, citalopram, fluoxetina) para ansiedade e comportamentos repetitivos, psicoestimulante (metilfenidato), antagonista opioide (naltrexona) para hiperatividade, e antipsicóticos atípicos (risperidona, olanzapina, clozapina) para distúrbios de raiva, agressividade ou comportamento autoprejudicável (Aman, 2004; Moore et al., 2004; Kumar et al., 2012). No entanto, ainda não há um medicamento que seja eficaz na reversão do comprometimento neurológico (Paval, 2017).

Uma equipe interdisciplinar como neuropediatra, psiquiatra, terapeuta ocupacional, nutricionista, fonoaudiólogo, psicólogo, um professor especialista e um assistente social são necessários para um acompanhamento contínuo (Karande, 2006). É interessante identificar e encaminhar crianças com TEA o mais cedo possível para Programas de Intervenção Precoce para melhorar a sua qualidade de vida ao longo dos anos (Kumar et al., 2012).

1.5 Fisiopatologia

A heterogeneidade das características clínicas e comportamentais individualizadas dos pacientes com diagnóstico de TEA reflete a dificuldade de compreensão da fisiopatologia desse transtorno (Eissa et al., 2018).

A fisiopatologia do TEA é igualmente complexa e diferentes vias moleculares parecem estar afetadas. Uma recente hipótese indica que o TEA surge como uma patologia onde há um excesso de conexões sinápticas e de circuitos neuronais (Courchesne et al., 2007).

Além disso, evidências apontam níveis alterados de BDNF (fator neurotrófico do cérebro) no sangue periférico (Connolly et al., 2006) de pacientes autistas. Observou-se que estas proteínas estão alteradas em diferentes modelos comportamentais no TEA, e que tal fator estaria diretamente envolvido com a plasticidade neural, onde atuariam como elementos-chave para as alterações sociais e motoras observadas (Alo et al., 2021).

Hormônios como a serotonina, ocitocina e melatonina também parecem estar envolvidos na fisiopatologia do TEA. A serotonina tem se mostrado consistentemente em concentrações mais altas no sangue periférico de indivíduos com o TEA (Newschaffer et al., 2007). A melatonina mostra-se diminuída em indivíduos com TEA (Tordjman et al., 2005), enquanto a sua administração possibilitou melhora no comportamento diurno em pacientes tratados com melatonina (Rossignol et al., 2011). A ocitocina também se encontra significativamente reduzida no cérebro de indivíduos com pacientes autistas (Yoon et al., 2020), podendo ser interpretada como uma experiência diminuída de recompensa social em seus receptores (Freeman et al., 2018).

Na Figura 2 estão representados os envolvimento de fatores neuroquímicos como o ácido gama-aminobutírico, a serotonina, a dopamina, o glutamato, a histamina e a acetilcolina com moléculas-alvos em novas terapêuticas na área de genética em pacientes com TEA, para pesquisa clínica e descoberta de novos fármacos atenuantes na sua sintomatologia.

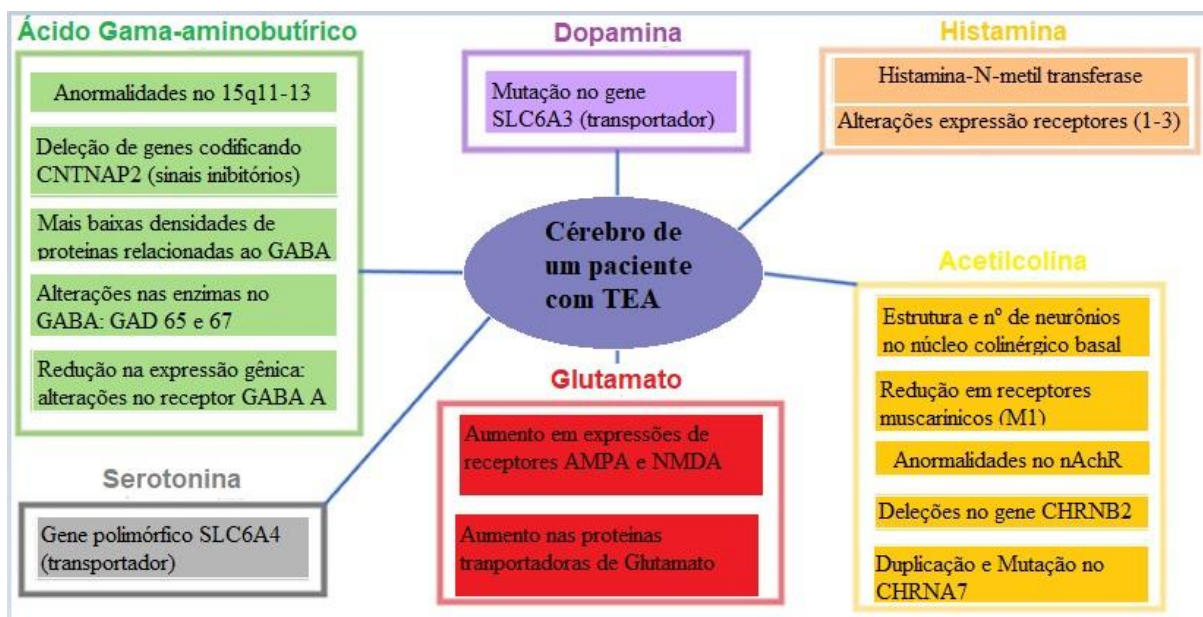


Figura 2: Neurotransmissores glutamato, serotonina, dopamina, ácido gama-aminobutírico, acetilcolina e histamina, atuando com moléculas-alvos geralmente alteradas no TEA. Seus potenciais mecanismos de ação para minimizar a sintomatologia e possível reversão do transtorno do espectro autista sob perspectiva genética, molecular e celular. Fonte: (Eissa et al., 2018).

O cérebro é um órgão que representa um dos principais metabolizadores de oxigênio, concentrando grande quantidade de EROs em várias regiões (Pangrazzi et al., 2020).

Os radicais livres geralmente são gerados na mitocôndria, principalmente na cadeia respiratória dentro da matriz mitocondrial (Chauhan et al., 2006). Após a respiração celular e geração de ATP, trifosfato de adenosina, gerando energia nas demais funções do metabolismo celular (Serajee et al., 2006), devido à camada de valência do oxigênio tornar-se mais reativa por fatores internos e/ou externos, sejam eles genéticos e/ou ambientais (Chauhan et al., 2006).

Nesse contexto, evidências acerca do fenômeno conhecido como estresse oxidativo e seu envolvimento na fisiopatologia do TEA têm ganhado força.

O estresse oxidativo é uma importante via que conduz ao dano celular, através do comprometimento da estrutura e a função de proteínas, lipídeos e o próprio DNA (Lobo, 2010). ERO como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio são altamente seletivos em suas reações com moléculas biológicas (Ortiz et al., 2017).

O estresse oxidativo celular leva a um ciclo vicioso que tende a disfunção celular e desestabilização de sua estrutura (Fahkri et al., 2018), culminando na indução de apoptose (morte programada) precoce, danificando ainda mais o tecido nervoso cerebral (Karande et al., 2004).

Quanto aos antioxidantes, segundo Fontes-Dutra et al. (2018), sua administração provoca efeitos interessantes na reversão da etiologia e fisiopatologia do TEA, com o intuito de explorar seus efeitos reversos de propriedades antiinflamatórias e antioxidantes, como o caso do resveratrol administrado durante o desenvolvimento embrionário em modelo animal de autismo.

Este estudo mostrou que animais do tipo autistas (indução por VPA) apresentam prejuízo na sinalização dos neurônios sensoriais e alteração na expressão de proteínas de sinapses excitatórias e inibitórias, onde tais alterações foram revertidas quanto ao quadro de óxido-redução, se administrado resveratrol durante a gestação (Fontes-Dutra et al., 2018).

Em outro estudo, avaliado o efeito neuroprotetor de extrato de semente de uva em modelo animal de autismo induzido por VPA, verificou-se uma melhora significativa na atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) no hemisfério cerebelar. Os autores também observaram uma notável preservação das células de Purkinje presentes no cerebelo (Arafat et al., 2019), região que tem como função controlar os movimentos voluntários do corpo, a postura, a aprendizagem motora, o equilíbrio e o tônus muscular, provavelmente indicando uma forte participação das vias REDOX na fisiopatologia do TEA.

Além disso, a geração de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) em excesso também influenciam e ativam outras vias importantes que podem levar à morte e dano celular, como a neuroinflamação.

Entretanto, além de células microgлияis ativadas, há a presença elevada de citocinas pró-inflamatórias e anticorpos específicos do cérebro no líquido cefalorraquidiano no soro, contribuindo para a desregulação imunológica e dano ao tecido (Bjorklund et al., 2016). Podemos citar o interferon-gama (IFN- γ), interleucina-1beta (IL-1 β), IL-6, IL-12p40, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e ligante de

quimiocina CCL-2 (Kim et al., 2011) como moléculas presentes em larga escala como marcadores biológicos da inflamação no sistema nervoso central.

Na Figura 3 estão representados alguns mecanismos de formação de EROs, estabilizando a sua formação e tentando manter um equilíbrio à nível celular. Neste sentido, o uso destes antiinflamatórios parece ser mais do que benéficos em indivíduos com TEA. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona-peroxidase (GSH-Px) atuando com mecanismos enzimáticos para conter o estresse oxidativo, gerado pelos radicais livres presentes principalmente em lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas; e enzimas ou outros nutrientes atuando em mecanismos não-enzimáticos, como a glutaciona (GSH) e a vitamina E, que conseguem reverter o dano e o quadro de inflamação generalizada (Hafizi et al., 2019).

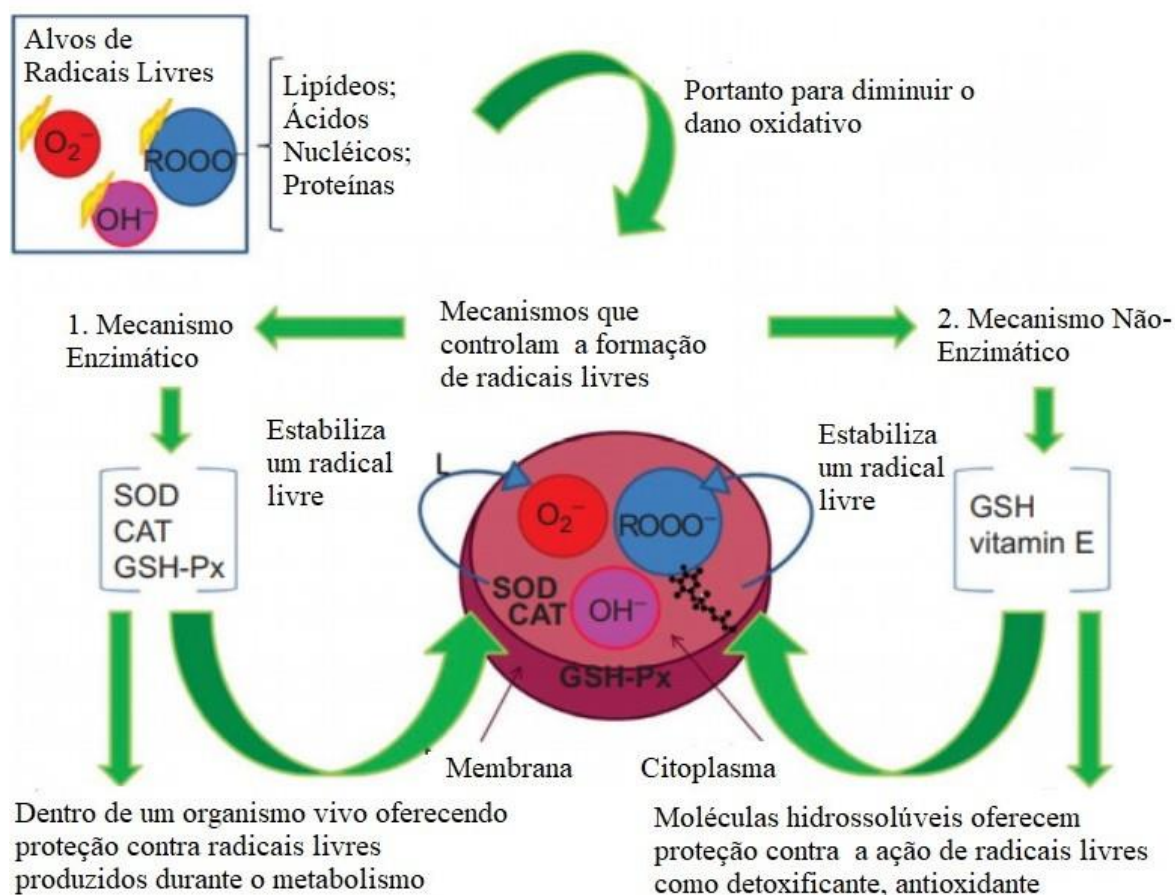


Figura 3: Homeostase REDOX, onde as quantidades de EROs são determinadas para equilibrar a sua produção e remoção, gerando respostas adaptativas em sistemas antioxidantes. Alvos EROs: lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, provavelmente aumentando o dano oxidativo, sendo estabilizados por moléculas de proteção como antioxidantes por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos à nível celular e molecular (Fonte: ORTIZ et al., 2017).

Estudos em seres humanos apresentam diversas limitações. Métodos de investigação neurofisiológicos utilizando eletroencefalografia ou magnetoencefalografia oferecem apenas dados indiretos e inespecíficos acerca do equilíbrio excitatório e inibitório do SNC (Yasuhara et al., 2010).

A escolha do modelo experimental pode influenciar no acompanhamento do ciclo de vida mais sensato, onde se acompanha todo o ciclo evolutivo de uma forma mais rápida e detalhada, por ser bastante semelhante ao sistema fisiológico humano. A utilização de um modelo animal então torna acessível o estudo das alterações comportamentais encontradas no TEA, sua relação com a exposição pré-natal a intoxicantes e agentes ambientais permitindo o estudo direto dos mecanismos bioquímicos relacionados ao início, desenvolvimento e manutenção do TEA, refletindo aspectos-chave dos sintomas humanos e respondendo a farmacoterapias operacionais em doenças humanas (Chadman et al., 2009).

A exposição prematura ao VPA então resulta em uma maturação retardada do SNC na ninhada (Roullet et al., 2013), mesmo que não só à nível de estresse oxidativo. A exposição pré-natal de animais ao VPA (principalmente roedores) é amplamente usada em modelos experimentais no desenvolvimento neuronal e mecanismos moleculares subjacentes ao TEA (Eissa et al., 2018).

Muitos estudos mostraram que a exposição ao VPA está associada a um risco aumentado de defeitos do tubo neural e déficits de neurodesenvolvimento, tal como o bloqueio nas bombas de sódio/potássio e canais dependentes de voltagem no tecido cerebral (Johannessen et al., 2003).

1.6 Nanopartículas de Ouro (GNPs)

Como mencionado, ainda não existem intervenções terapêuticas farmacológicas eficientes que visem reverter os principais sintomas do TEA (Xu et al., 2018). Como alternativa, surgiu a possibilidade de utilização da nanomedicina com nanoagregados biocompatíveis e biodegradáveis com o intuito de direcionar a farmacocinética, as vias de administração e a biodisponibilidade de seus fármacos para facilitar estudos e funcionar como carreadores sozinhos ou acompanhados

para atravessar a barreira hematoencefálica e poder tanto servir como diagnóstico ou tratamento em si (Wu et al., 2018).

Acredita-se que as GNPs sejam totalmente inertes, ou seja, sem efeitos adversos no organismo (Sadaukas et al., 2007). O potencial promissor da nanotecnologia aumentou o interesse em investigar a atividade no TEA com valor antioxidativo das nanopartículas de ouro, prata ou cobre nas doenças neurodegenerativas (Selim et al., 2015), além de provável resposta antiinflamatória (Muller et al., 2017).

As GNPs têm sido utilizadas como tratamento preventivo em alguns eventos patológicos no cérebro, preservando a função cognitiva, tais como no Parkinson e Alzheimer (Muller et al., 2017), agindo principalmente sobre as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e a IL-1 β) no sistema nervoso (Jeon et al., 2003).

As GNPs diminuem a inflamação a nível neuronal, e conseqüentemente reduz o estresse oxidativo e dano celular a nível molecular e celular (Tramontin et al., 2020). Conseqüentemente as GNPs diminuem efeitos comportamentais segundo Muller et al. (2017), como os avaliados no estudo, em modelo animal de ratos Wistar, induzidos por VPA para simular os sintomas do TEA.

1.7 Curcumina

A curcumina, chamada popularmente como açafrão-da-terra, bastante comum em na culinária atual, vem sendo estudada por muitos anos e vem ganhando representatividade por seus potenciais efeitos sobre o estresse oxidativo, câncer, diabetes e doenças inflamatórias, neurodegenerativas e cardiometabólicas (Al-Askar et al., 2017). A curcumina pode atravessar a barreira hematoencefálica e não é tóxica em altas doses (Aggarwal et al., 2009).

A curcumina também vem demonstrando grande capacidade antioxidante e antiinflamatória, onde modelos apresentam redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e reversão no quadro de estresse oxidativo quando tratados com esta substância (Jacob et al., 2013).

O conhecimento sobre a etiologia e o tratamento para o TEA ainda são incipientes e limitados, muito pouco se sabe sobre a fisiopatologia e as possíveis

terapias para o TEA. Neste sentido, este estudo avaliou os efeitos neuroprotetores oriundos do tratamento com as GNPs e curcumina, notando efeitos e resultados favoráveis à diminuição neuroinflamatória do autismo, apresentando provavelmente um efeito promissor, menos invasivo e podendo ser utilizado, inclusive, sozinho ou concomitante com outras medicações potencializando ou inibindo o seu mecanismo de ação (Carneiro et al., 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das GNPs reduzidas com curcumina no modelo experimental de TEA induzido por ácido valproico (VPA) em ratos *Wistar* nos parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo, avaliando seu efeito neuroprotetor na redução da inflamação no TEA, diminuindo o danocelular e mitocondrial, com efeito antioxidante. Considerando-se as limitações das tecnologias não invasivas para estudar o cérebro humano, os modelos animais são ferramentas fundamentais para aprofundar o entendimento dos fenômenos neurobiológicos.

Além disso, permite que outros estudos sejam realizados e reproduzidos em outros laboratórios, do ponto de vista científico, para melhor compreender a complexa fisiopatologia do TEA e disponibilize alternativas e novas possibilidades terapêuticas futuras.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliando os efeitos do tratamento com GNP's reduzidas com CUR em um modelo experimental de TEA induzido por VPA em ratos *Wistar*.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar o peso da prole nos dias 9, 17 e 25 pós-natal (PN), bem como o registro do abrir dos olhos nos dias 12 a 16 PN como indicadores de desenvolvimento e crescimento;

Avaliar o neurodesenvolvimento no 15º dia PN, pela técnica de Geotaxia Negativa, verificando se houve atraso no amadurecimento do SNC através do controle do centro gravitacional;

Avaliar o comportamento do tipo autista nos dias 28, 29, 30 e 31 PN, através do teste das três câmaras, teste de campo aberto e o labirinto em cruz elevado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Princípios Éticos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais de ética e pesquisa 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 teve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob número de protocolo 12/2021 (Anexo).

3.2 Desenho Experimental

3.2.1 Fase Experimental I

Quarenta e duas ratas *Wistar* foram acasaladas com 21 ratos machos no total. Essas fêmeas foram colocadas em caixas contendo os respectivos machos em uma proporção de 2 fêmeas para cada 1 macho (2:1) ao final de um período de vigília.

Essas fêmeas, agora denominadas matrizes, foram divididas em dois grupos (16 animais em cada) e alocadas em caixas individuais durante todo o período gestacional.

No 12º dia de gestação, as matrizes receberam:

- I) administração intraperitoneal (i.p.) em dose única de 500 mg/kg de VPA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dissolvido em solução salina a 0,9%, pH 7,4; e
- II) injeção de salina a 0,9%, pH 7,4, i.p. (SAL).

3.2.2 Fase Experimental II

Após o nascimento, as proles de 6 dias de vida, advindas dos grupos de matrizes expostas ao VPA e advindos dos grupos de matrizes expostas à solução salina foram subdivididos em 06 grupos: 1) animais que receberam salina 0,9% na gestação e receberam novamente salina 0,9% via i.p. no período pós-natal; 2) animais que receberam salina 0,9% na gestação e receberam curcumina (1 mg/kg) via i.p. no período pós-natal; 3) animais que receberam salina 0,9% na gestação e receberam curcumina (1 mg/kg) e GNPs (2,5 mg/kg) via i.p. no período pós-natal; 4) animais que receberam VPA (500 mg/kg) na gestação e receberam salina 0,9% via i.p. no período pós-natal; 5) animais que receberam VPA (500 mg/kg) na gestação e receberam curcumina (1 mg/kg) via i.p. no período pós-natal; e 6) animais que receberam VPA (500 mg/kg) na gestação e receberam curcumina (1 mg/kg) e GNPs (2,5 mg/kg) via i.p. no período pós-natal.

Sendo assim, ao final, considerando o tratamento pré-natal com VPA, e pós-natal com GNPs e curcumina, a distribuição dos animais ficou em 6 grupos:

Os testes comportamentais para avaliar o comportamento do tipo autista foram realizados nos dias 28, 29, 30 e 31 PN, através da avaliação de peso e testes de geotaxia negativa, avaliando o neurodesenvolvimento e crescimento, testes de interação social, como o de três câmaras, o de labirinto em cruz elevada, avaliando a ansiedade e comportamento de risco, e o de campo aberto, avaliando a atividade exploratória e neurodesenvolvimento.

Os testes foram divididos conformes os grupos de salina, nanopartícula de ouro e/ou curcumina, sozinhos ou concomitantes, com sentido de fármacos adjuvantes. Todos os testes foram realizados com os mesmos ratos. Foram distribuídos desde a idade gestacional, induzidos por VAP, com o intuito de desenvolver o transtorno do espectro autista, comparados com um grupo controle até a idade pré-adolescente, com o intuito de melhor classificar a hipótese de reversão dos sintomas e desenvolvimento adequado do SNC, idade mais propícia a inverter os danos predispostos a pacientes com este quadro clínico.

3.3 Testes Comportamentais

3.3.1 Teste de Geotaxia Negativa

Um teste que consiste em colocar o modelo experimental de cabeça para baixo, em uma rampa geralmente de 45°, e verificar o tempo de retorno postural à no mínimo 180° (Staubli e Houston, 1979).

Geralmente é um teste muito utilizado para verificar a maturação do neurodesenvolvimento após o nascimento comparado com um grupo controle, normotípico. Concomitantemente, verificado também o “abrir dos olhos” da ninhada presente e peso, complementando a avaliação do SNC e Autônomo, além do crescimento e desenvolvimento funcional (Staubli e Houston, 1979).

No 15º PN, os animais dos 8 grupos foram colocados em uma rampa com 45º de inclinação, com a cabeça direcionada para baixo. Registrado o tempo que cada animal levou para virar-se para a posição oposta, ou seja, com a cabeça voltada para cima, como na Figura 4.

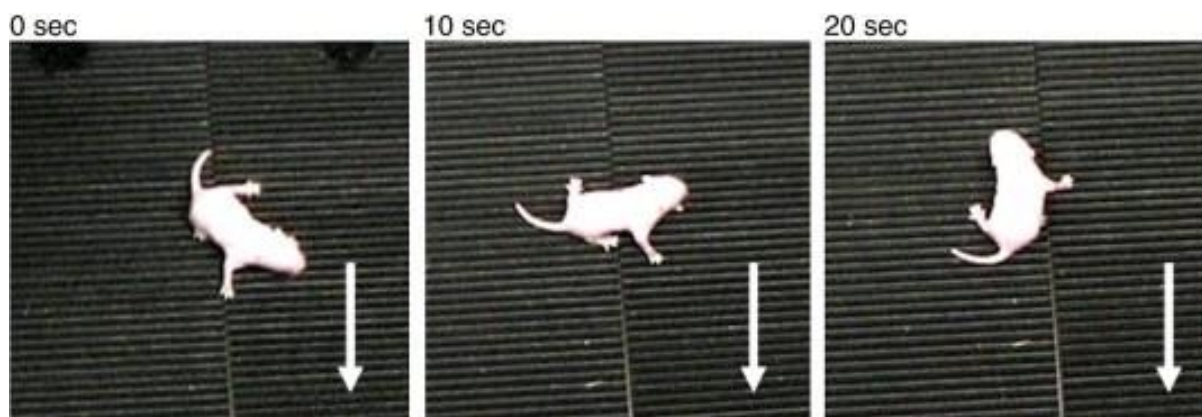


Figura 4: Teste de Geotaxia Negativa. Animais são colocados de cabeça para baixo, em uma rampa inclinada sob o ângulo de 45° e registrado o tempo que leva para girar em torno de 180°, avaliando o atraso no neurodesenvolvimento dos filhotes, no 15º dia pós-natal (Fonte:El-Khodor et al., 2008).

Os animais que não apresentaram reflexo na primeira tentativa foram testados mais duas vezes.

A ocorrência de reflexo na primeira, segunda ou terceira tentativa também foram registrados em uma planilha (Staubli e Houston, 1979).

3.3.2 Teste das Três Câmaras

No 28^o dia PN, os ratos foram submetidos ao teste de interação social.

O teste consta na tendência natural que os modelos experimentais têm de investigar semelhantes considerados desconhecidos, seja na primeira fase do teste, onde tem-se um teste de adaptação com as câmaras vazias; inserção de uma cobaia similar para testar a experiência do novo, sociabilidade; e, por último, inserção de uma nova cobaia, na câmara diametralmente oposta, para avaliar sua conduta no quesito de interação e preferência social (Nadler et al., 2004).

Neste experimento, os animais foram levados individualmente a interagir com outro animal desconhecido do mesmo sexo em uma caixa de acrílico (60x60x30cm). A análise consistiu na quantificação do tempo de interação do modelo experimental abrangendo os episódios de “grooming” (autolimpeza), cheirar, seguir, chutar, socar, montar ou permitir a monta.

Os ratos foram pareados e inseridos na área de testes por 10 minutos, vide Figura 5 (Nadler et al., 2004).



Figura 5: Teste das Três Câmaras consiste em uma habituação do rato em que se quer testar a interação social com as câmaras vazias. Colocando-se um novo rato como objeto novo, verifica-se a sociabilidade; colocando-se dois ratinhos, um novo e o já conhecido, na 3ª fase do teste, verifica-se a preferência pelo novo (Fonte: Ugo Basile, 2022).

3.3.3 Teste do Labirinto de Cruz Elevada

Nos 30 e 31º dia PN, os ratos foram submetidos ao teste para medir o comportamento do tipo ansioso e predisposição ao risco eminente em roedores.

Conforme o próprio nome sugere, o teste consiste em colocar o animal em um labirinto elevado do solo. Este aparato é formado por dois braços fechados por paredes e dois abertos, sendo analisada a frequência de entradas do animal em cada braço e o tempo gasto em cada tipo de braço. Outros comportamentos, incluindo deslocamentos, levantar-se e esticar-se, também foram analisados.

O animal explora os dois tipos de braço, mas geralmente entra mais e permanece mais tempo nos braços fechados. Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos ou pelos fechados como uma estimativa do comportamento do tipo ansioso: quanto mais evidente for este

comportamento, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nos mesmos (Handley e Mithani, 1984; Pellow e File, 1986; Morato, 2006).



Figura 6: Teste do Labirinto de Cruz Elevada. O teste consiste em colocar o modelo experimental no centro do labirinto e avaliar a sua frequência e número de cruzamentos entre os braços abertos e fechados (Fonte: Tayman et al. 2016).

3.3.4 Teste de Campo Aberto

No teste de Campo Aberto o modelo experimental é colocado em uma câmara e avaliado a locomoção e exploração, além da ansiedade, avaliados durante 5 minutos (Figura 7).

Neste teste, realizado no 29º dia PN, os padrões comportamentais observados são: frequência de cruzamentos de linhas (com as quatro patas), entradas do quadrado central, duração da praça central, frequência em que se

posiciona nas patas traseiras, alongamento para frente da cabeça e ombros e defecção e micção (Hall e Ballachey, 1932).

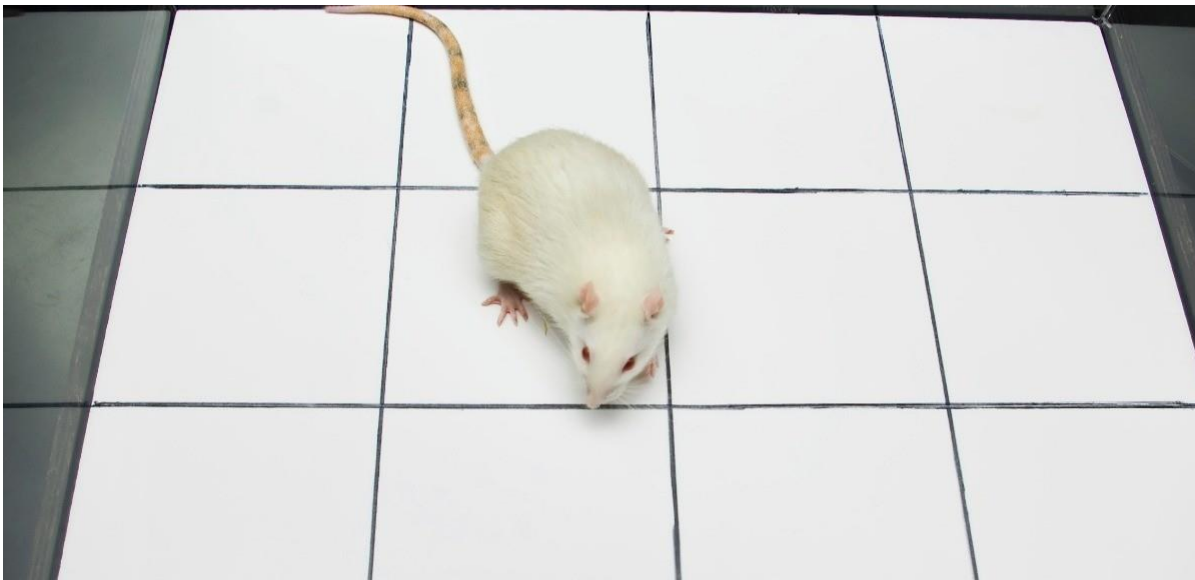


Figura 7: Teste de Campo Aberto. O animal é colocado em um canto da câmara e passa a observar-se, dentro de um tempo padronizado, a locomoção (número de cruzamentos) e atividade exploratória (levantadas das patas dianteiras) deste (Fonte: Noldus, 2022).

3.4 Análise Estatística

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas no programa Graphpad versão 7.0. Para as comparações entre os grupos foram primariamente realizados os testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Neste sentido foi realizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey, quando apropriado. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os animais foram monitorados quanto ao ganho de peso ao longo dos 30 dias de experimento. A figura 8A, apresenta o ganho de peso nos dias experimentais PN 6, 8, 10, 12, 19 e 26. Todos os grupos tiveram o ganho de peso normal, sem diferenças significativas entre os grupos. Como se pode observar na figura 8B que representa a média geral de peso de cada grupo, observa-se que o grupo de VPA+SAL e VPA+CUR tiveram uma média um pouco mais baixo quando comparado ao grupo controle, porém não de modo significativo.

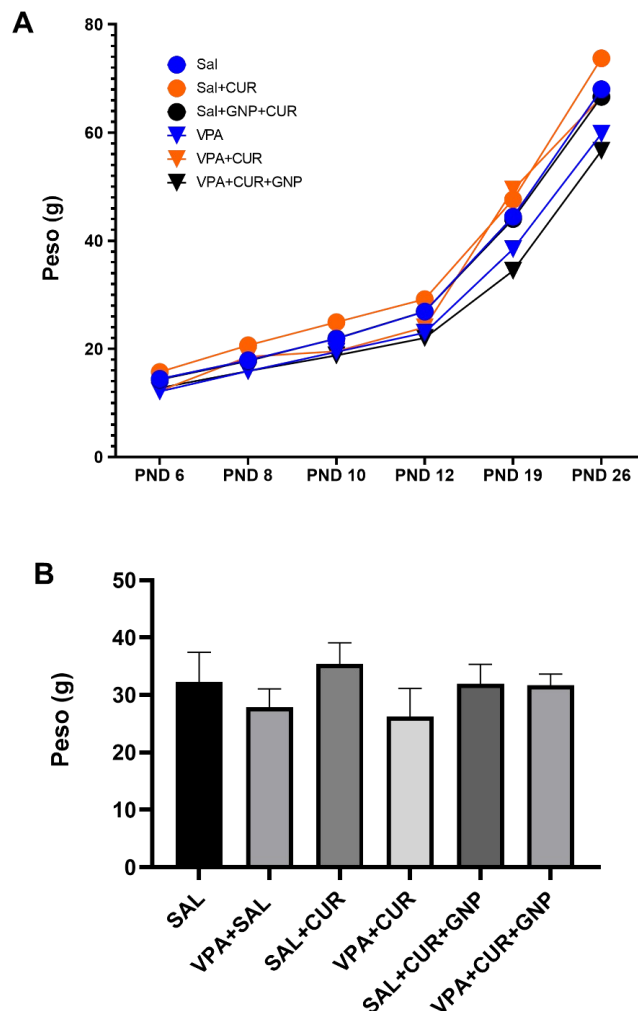


Figura 8: Peso dos animais ao longo do período de tratamento. (A) Média dos dados coletados nos dias pós-natal 6, 8, 10, 12, 19 e 26. (B) Média absoluta de todas as amostragens. Dados expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados foram avaliados com a ANOVA de uma via ($n=9-13$).

O teste de geotaxia negativa avalia o neurodesenvolvimento dos animais, a capacidade de perceber a inclinação do ambiente e se virar para a inclinação positiva. Como mostrado na figura 9, não houve diferença significativa entre os grupos, no entanto observou-se uma sutil piora na performance do grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo controle.

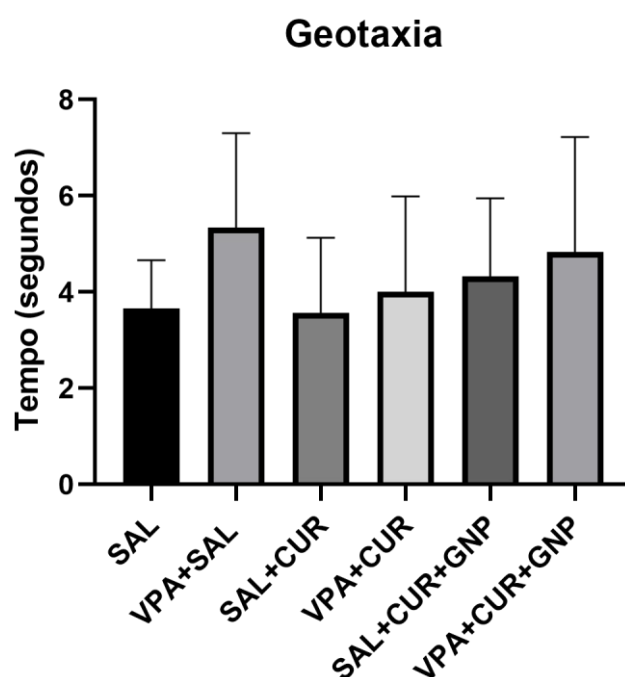


Figura 9: Geotaxia. Tempo em segundo para se virar de um aparato com inclinação de 45°. Dados expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados foram avaliados com a ANOVA de uma via ($n=10-13$).

Com relação atividade locomotora, Figura 10, avaliada pelo teste de campo aberto, não houve diferença significativa no número de cruzamentos (Figura 10A) e no número de levantadas (Figura 10B), quando comparado com o grupo controle e com os outros grupos.

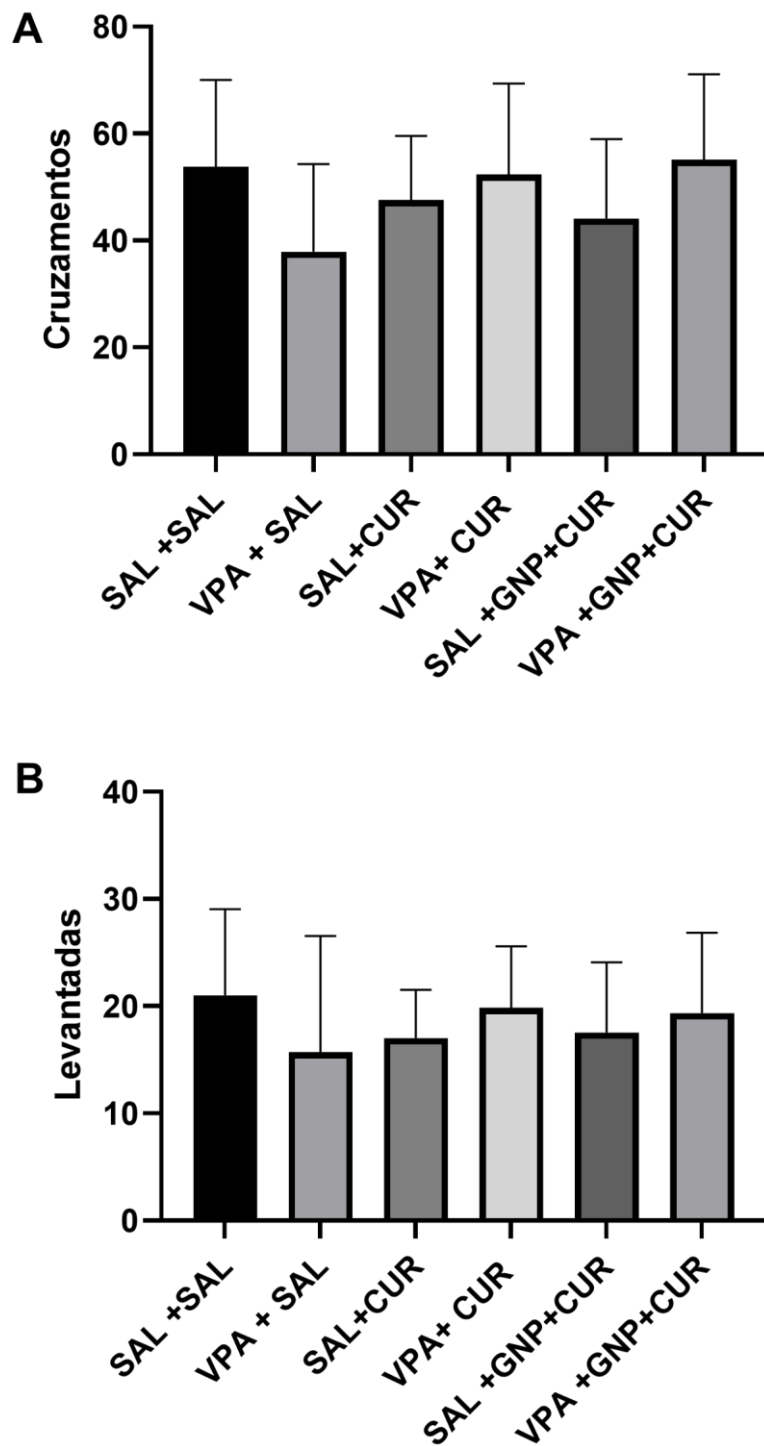


Figura 10: Teste do Campo aberto. (A) número de cruzamentos e (B) número de levantadas. Dados expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados foram avaliados com a ANOVA de uma via ($n=9-12$).

Na figura 11, estão apresentados os dados do teste de labirinto em cruz elevada que avalia parâmetros relacionados a ansiedade. Houve um aumento significativo no grupo VPA+CUR quando comparado ao grupo VPA+ SAL ($p < 0,05$), no parâmetro de frequência no braço aberto (11A), que corresponde ao número de vezes de entrada no braço aberto. No entanto, quando se observa o tempo total de permanência no braço aberto, não houve diferenças significativas (12B). Indicando que os animais do grupo VPA+CUR tende a ir com frequência para o braço aberto, mas não permanecem neste por muito tempo. Com relação a frequência (12C) e tempo total no braço fechado (12D), não houveram diferenças significativas. Por fim, no parâmetro de tempo total no centro (12F) houve um aumento significativo do grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$), mas não no número de entradas no centro (12E).

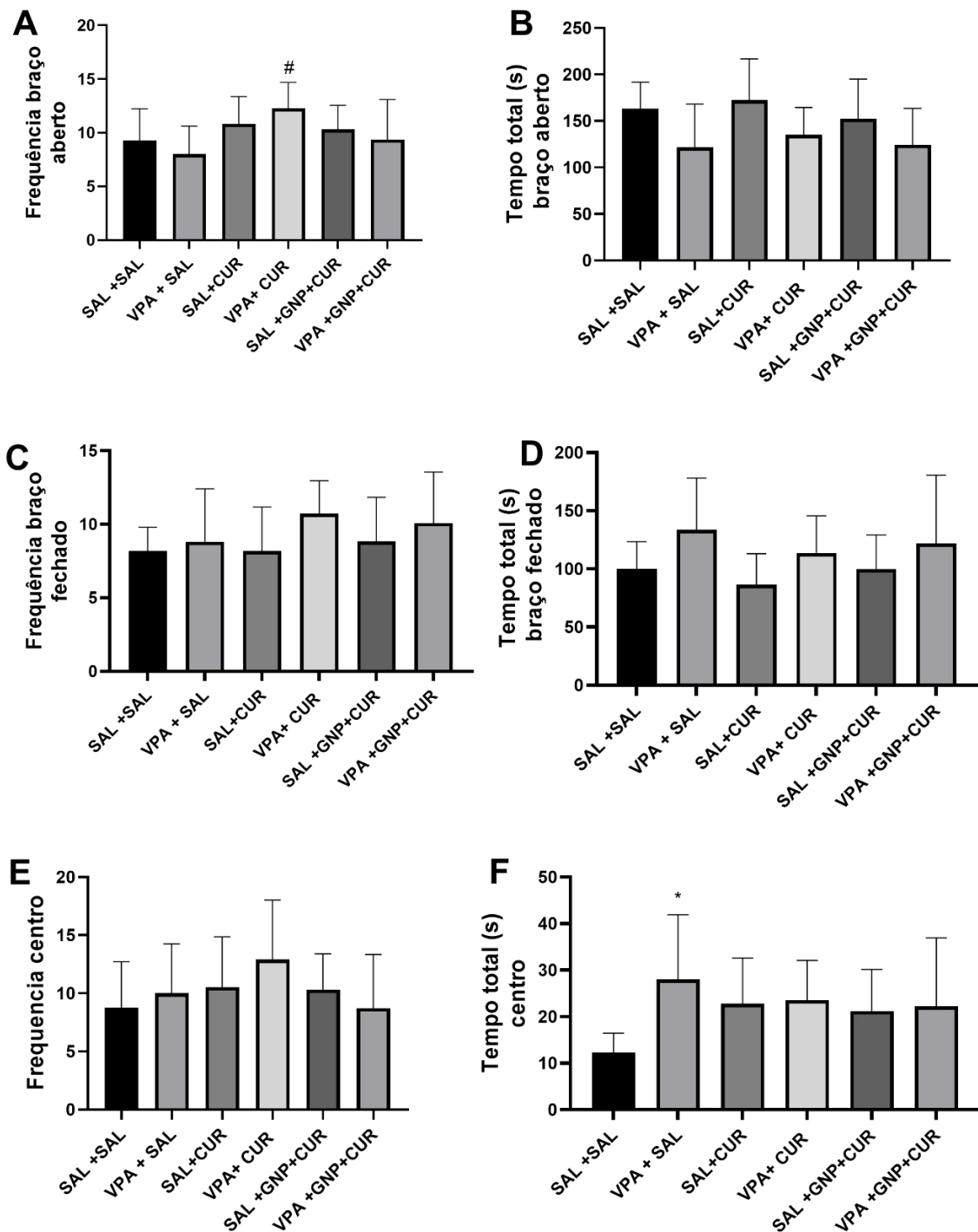


Figura 11: Teste Labirinto em Cruz Elevada. (A) Frequência no braço aberto, (B) Tempo total no braço aberto, (C) Frequência no braço fechado, (D) Tempo total no braço fechado, (E) Frequência Centro, (F) Tempo total no centro, (n=10-13). Os resultados foram avaliados com a ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc de Tukey. * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL+SAL, # $p < 0,05$ comparado com o grupo VPA+SAL.

A figura 12, apresenta os dados do teste das três câmaras, que avalia a sociabilidade e interesse em novidade social em modelos de roedores de distúrbios do SNC. Neste teste, os roedores normalmente preferem passar mais tempo com outro roedor (sociabilidade) e interação com um novo rato no ambiente mais do que um já explorado, “familiar” (novidade social). Com base nessas premissas, este teste pode ajudar a identificar roedores com déficits de sociabilidade e/ou novidade social.

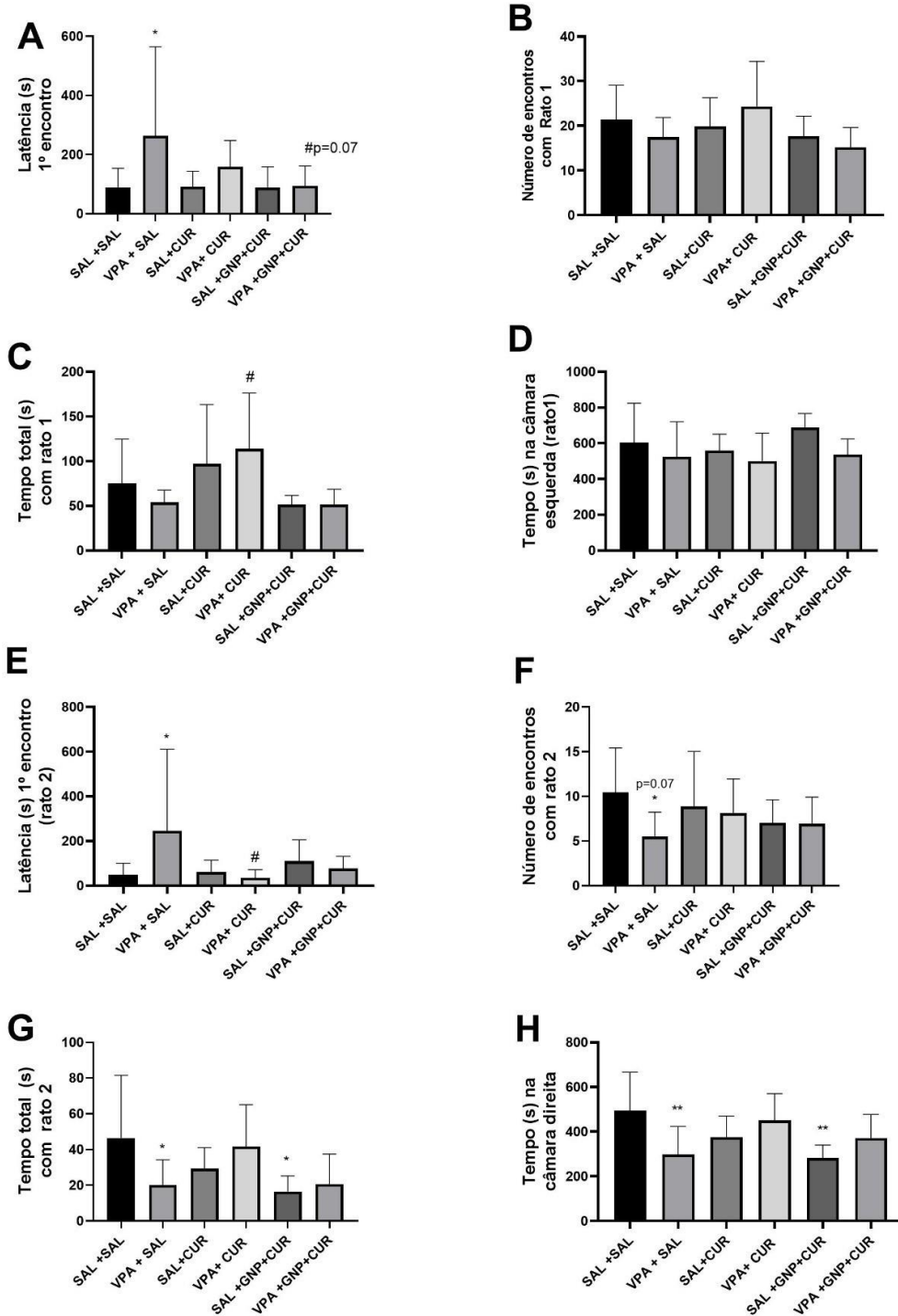


Figura 12: Teste das três câmaras (n=9-13). (A) Latência primeiro encontro rato 1. (B) Número de encontros com rato 1. (C) Tempo total com rato 1. (D) Tempo total na câmara esquerda (rato 1). (E) Latência primeiro encontro rato 2. (F) Número de encontros com rato 2. (G) Tempo total com rato 2. (H) Tempo total na câmara esquerda (rato 2). Os resultados foram avaliados com a ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Dados expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$

comparado com o grupo SAL+SAL, ** $p < 0,01$ comparado com o grupo SAL+SAL, # $p < 0,05$ comparado com o grupo VPA+SAL.

Com relação aos dados de sociabilidade, onde a referência para interações é o rato 1, foi verificado o tempo que o animal levou para ter o seu primeiro encontro com o rato 1 (Figura 12A), neste parâmetro houve um aumento significativo no tempo do grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo SAL+SAL. Este dado evidencia que o modelo funcionou, pois os animais VPA expostos levaram mais tempo para interagir com um rato novo. Além disso, foi observado uma tendência a uma redução neste tempo ($p = 0,07$) no grupo VPA+GNP+CUR, quando comparado ao grupo VPA+SAL, sugerindo que o tratamento com GNP+CUR protege os animais deste efeito do VPA. Quanto ao número de encontros do rato teste com o rato 1 (Figura 12B) não houve diferença significativa. No entanto, quando analisamos o tempo total do animal teste com o rato 1 (Figura 12C), notou-se um aumento significativo do grupo CUR +VPA ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo VPA+SAL, evidenciando que o tratamento com curcumina melhora esse parâmetro nos ratos VPA-expostos. Na análise do tempo total que o animal teste permanece na câmara esquerda (Figura 12D), a câmara que abrigava o rato 1, não houve alterações significativas entre os grupos.

Com relação aos dados de preferência social, avaliado pelas interações com o rato 2, pode-se observar que no parâmetro que avalia a latência para primeiro encontro com o rato 2 (Figura 12E) houve redução significativa no grupo VPA+CUR quando comparado ao grupo VPA+SAL ($p < 0,05$), e o tratamento com CUR reverteu significativamente este parâmetro ($p < 0,05$). Importante notar que em diversos parâmetros comportamentais, inclusive neste, os grupos tratados com GNP sozinho ou em associação apresentaram uma um tempo médio de latência semelhante ao grupo controle SAL+SAL, apesar de não haver diferença significativa, parece haver uma reversão parcial do efeito do VPA nestes grupos também.

Quando se analisou o número de encontros com o rato 2 (Figura 12F), houve uma tendência a redução no número de encontros ($p = 0,07$) no grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo SAL+SAL, evidenciando mais uma vez a validade no modelo de autismo induzido por VPA. Fato semelhante foi observado no tempo total

com o rato 2 (Figura 12G) com uma redução significativa no grupo VPA+SAL ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo SAL+SAL. Além disso, interessante, houve redução significativa no grupo SAL+GNP+CUR ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo SAL+SAL. Finalmente, no parâmetro sobre o tempo na câmara direita (Figura 12H42), como esperado houve uma redução significativa no grupo VPA+SAL ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo SAL+SAL, evidenciando o comprometimento na preferência social nos animais VPA-expostos. Também houve redução significativa no grupo SAL+GNP+CUR ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo SAL+SAL, evidenciando que em ratos saudáveis a combinação GNP+CUR pode comprometer a performance na preferência social.

5 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito terapêutico da CUR e da GNP+CUR na reversão do comportamento tipo autista de ratos expostos ao VPA. O modelo animal de TEA utilizado é baseado na exposição de ratas prenhes no 12º dia de gestação a uma elevada dose única de 500 mg/kg de VPA. Desta maneira, a prole gerada apresenta sinais e sintomas tipo autismo (Schneider e Przewłocki, 2005). As GNPs + CUR e a CUR (2,5 mg/kg) foram administradas 1x ao dia, durante 3 dias (dia PN 6, 7 e 8), via i.p. (Khlebtsov e Dykman, 2010). Os parâmetros comportamentais dos animais que receberam a administração de GNPs, curcumina e salina foram avaliados nos dias 28, 29, 30 e 31 PN. À partir do presente estudo, observou-se que o tratamento com CUR e GNP + CUR melhorou a sociabilidade e a preferência social em ratos, parâmetros estes afetados no modelo animal de autismo.

Outros estudos que avaliaram os efeitos terapêuticos e toxicológicos da CUR, não encontraram efeitos deletérios em modelos experimentais em relação a testes comportamentais (Zhong et al. 2020), e segundo Chhavi et al. (2014), a CUR chega a reverter os efeitos neurodegenerativos, com o aumento significativo nas células neuronais viáveis, promovendo neuroproteção no organismo.

A CUR, um polifenol não tóxico de ocorrência natural, foi recentemente proposta para o tratamento de doenças neurodegenerativas e neurológicas (Meo et al., 2019). À nível molecular, a CUR atua no controle da agregação de proteínas mal dobradas, também mantém a homeostase do sistema inflamatório, aumenta a depuração de agregados tóxicos do cérebro, elimina os radicais livres, quelata o ferro e induz a produção de antioxidantes (Jacob et al., 2013; Mansuri et al., 2014; Hu et al., 2015).

A CUR como tratamento neuropsiquiátrico apresenta potencial para melhorar os distúrbios fisiológicos comumente associados a diversos transtornos neuropsiquiátricos (Lopresti, 2017). Em particular, desequilíbrios monoaminérgicos (associados à serotonina, dopamina, noradrenalina e glutamato), distúrbios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), estresse oxidativo e nitrosativo, inflamação desregulada, distúrbios mitocondriais e neuroprogressão têm sido comumente

implicados no transtorno depressivo maior (Leonard e Maes, 2012), transtorno bipolar (Anderson e Maes, 2015), vários transtornos de ansiedade (Furtado e Katzman, 2015), esquizofrenia (Davis et al., 2014) e autismo (Rossignol e Frye, 2014).

O estudo de Bhandari e Kuhad (2015) avaliou os efeitos da CUR oral administradas por 4 semanas em um modelo animal de TEA induzido com ácido propanóico. Eles observaram que altas doses de CUR (50, 100 e 200mg/kg) recuperou de forma significativa e dose-dependente várias alterações induzidas pelo modelo animal, incluindo interações sociais, comportamentos repetitivos, ansiedade e comportamentos do tipo-depressivo. A CUR também reduziu o estresse oxidativo e nitrosativo induzido pelo ácido propanóico, disfunção mitocondrial, níveis de TNF- α e níveis de metaloproteinase da matriz.

No entanto, existem estudos divergentes entre as atividades farmacológicas documentadas na literatura à respeito da CUR, que parece possuir *in vivo* e *in vitro* baixa solubilidade aquosa, biodisponibilidade e perfis farmacocinéticos, resultando em limitações sob qualquer efeito terapêutico (Lopresti, 2017). Neste sentido, neste projeto, idealizou-se potencializar os efeitos da CUR utilizando o nanoencapsulamento destas em GNPs. Devido ao seu pequeno tamanho, as nanopartículas podem interagir com sistemas biológicos em nível molecular, com alto grau de especificidade espacial e temporal. Elas podem penetrar na barreira hematoencefálica e fornecer agentes terapêuticos específicos, sondas ou materiais biológicos para células e tecidos alvo (Shilo et al., 2013). O uso de GNP projetadas em neurociência aumentou consideravelmente na última década. GNPs podem ser facilmente bioconjugados para direcionamento específico de células (Wang e Guo, 2016).

A integração de GNPs na pesquisa neurológica tem o potencial de encontrar novas estratégias para doenças que atualmente não são tratáveis. Essa perspectiva surge de suas propriedades únicas, incluindo resposta óptica, estabilidade química e física, toxicidade relativamente baixa e ampla gama de possíveis ferramentas de superfície funcionando como um carreador para outros fármacos em atingir suas moléculas-alvo (Cheng et al., 2016).

Interessantemente, neste protocolo, a presença de GNP não otimizou a performance dos animais nos testes comportamentais, sugerindo que o nanoencapsulamento da CUR com GNPs não potencializou os efeitos terapêuticos desta nos testes comportamentais em um modelo animal de autismo.

Vários estudos indicaram que pequenas nanopartículas podem passar pelo BHE. No entanto, nanopartículas muito pequenas são vulneráveis à excreção renal e à depuração dos tecidos-alvo. Ao contrário, nanopartículas de tamanhos maiores (≥ 20 nm) podem passar pela barreira hematoencefálica (BHE), mas nanopartículas maiores (> 200 nm) podem ser suscetíveis à absorção por outros órgãos (Jo et al., 2015).

O atraso no desenvolvimento em neonatos submetidos ao VPA, indutor de autismo no modelo experimental de ratos *Wistar*, é relatado em muitos estudos clínicos, como atraso no peso corporal e abertura dos olhos (Ruehla et al, 2019). Neste sentido, o peso dos animais ao longo do estudo foi monitorado. Apesar de não ter sido observada diferença significativa, observou-se que o grupo exposto ao VPA, tanto no VPA+SAL quanto no VPA+CUR, apresentam uma média de peso inferior, quando comparado ao grupo controle. O mesmo aconteceu no parâmetro da geotaxia, onde apesar de não haver diferença significativa, houve um atraso considerável no grupo VPA+SAL, o que corrobora com o estudo de Ruehla et al. (2019), caracterizado principalmente como atraso no neurodesenvolvimento e reflexo tardio nas respostas locomotoras.

A literatura aponta que o modelo animal de TEA induzido por VPA apresenta algumas alterações comportamentais típicas como hiperatividade locomotora e repetitiva/semelhante à estereotipia combinada com menor atividade exploratória, e diminuição do número de comportamentos sociais e aumento da latência para comportamentos sociais. Tais aberrações comportamentais costumam aparecer antes puberdade (Schneider e Przewłocki, 2005).

Em relação ao teste de campo aberto, não houve diferença significativa entre os parâmetros avaliados no quesito cruzamento de linhas (caráter locomotor e levantamentos das patas dianteiras (caráter exploratório) do modelo estudado. O estudo de Leão et al. (2021) utilizando somente camundongas fêmeas, expostas ao

VPA *in utero*, encontrou maior locomoção e comportamento exploratório que o grupo controle, bem como alterações nos parâmetros observados no labirinto em cruz elevado. No entanto, a não alteração em parâmetros locomotores é importante pois representa certa confortabilidade pelo menos em relação a interpretação dos demais experimentos, onde é certo que não foi obtido problemas com sua locomoção, algo que poderia prejudicar as análises posteriores de outros testes comportamentais.

O labirinto em cruz elevado avalia o nível de ansiedade de um rato examinando sua escolha de explorar os braços abertos expostos, contra os braços fechados e mais seguros. Com exceção, do tempo total no centro, onde houve um aumento neste parâmetro no grupo VPA+SAL, a exposição a CUR ou GNP+CUR não alteraram de modo significativo os parâmetros de tempo nos braços abertos e fechados, em animais normais e VPA-expostos. Todos os parâmetros do teste, juntos, revelam os níveis de ansiedade dos animais.

De modo diferente, Kinjo et al. (2019), observou que os animais submetidos ao modelo de autismo tendem a permanecer mais tempo nos braços abertos, detectando, também segundo Mohammadi et al. (2020), um aumento na locomoção e atividade exploratória relatado como comportamento ansioso em animais expostos ao VPA durante a gestação.

O TEA está associado a déficits na reciprocidade socioemocional, comunicação social e interação social em vários contextos. Notavelmente, várias regiões cerebrais afetadas no TEA também demonstraram estar envolvidas na tomada de decisões. As teorias neurobiológicas do TEA enfatizam anormalidades funcionais na amígdala, córtex pré-frontal, sulco temporal superior e giro fusiforme. Juntas, essas regiões são consideradas como o “cérebro social” (Baron-Cohen et al., 2000; Brothers, 1996; Schultz et al., 2000).

Em comparação com o grupo controle, os ratos VPA demonstraram diminuição do número de comportamentos sociais e aumento da latência aos comportamentos sociais, evidenciando que o modelo animal de autismo utilizado reproduziu o principal comportamento tipo-autista em modelos animais, o comprometimento na sociabilidade (Rein et al., 2020; Bronzuoli et al., 2018). Em comparação com o grupo controle, os ratos VPA demonstraram diminuição do número

de comportamentos sociais e aumento da latência aos comportamentos sociais, evidenciando que o modelo animal de autismo utilizado reproduziu o principal comportamento tipo-autista em modelos animais, o comprometimento na sociabilidade (Rein et al., 2020; Bronzuoli et al., 2018). Observou-se também, tendência a uma diminuição significativa no grupo VPA+GNP+CUR quando comparado ao grupo VPA+SAL, evidenciando que o tratamento com GNP e CUR, dois antioxidantes em conjunto, GNP+CUR, protegem os animais deste efeito, funcionando como neuroprotetores, provavelmente por suas atividades antioxidantes e antiinflamatórias, agindo à nível celular e molecular.

De modo geral, apesar de a análise estatística não evidenciar diferenças significativas, em todos os tratamentos, a presença de CUR sozinha ou associada à GNP parece reverter o comprometimento social dos ratos expostos ao VPA. O que também foi comprovado nos estudos de Zhong et al. (2020), com modelos experimentais tratados com CUR testando a melhora no convívio e preferência social. Futuras análises bioquímicas nos tecidos cerebrais dos ratos poderão revelar os mecanismos de tais efeitos observados no comportamento.

6 CONCLUSÃO

Os achados são compatíveis aos resultados relatados por outros estudos, com curcumina e GNP. Demonstraram que a exposição ao VPA, indutor de comportamento tipo-autismo em um modelo experimental de ratos Wistars, durante o desenvolvimento, alterou o resultado nos testes comportamentais.

A curcumina e nanopartícula de ouro aparecem com o intuito de amenizar os sintomas do TEA, atuando como um conhecido e enaltecido agente oxidante, com efeito antagonista progressivo contra efeitos deletérios no sistema óxido-redução e cascata de estresse oxidativo no organismo. Assim, a suplementação de curcumina e nanopartículas de ouro aparecem com efeitos benéficos nas melhoras do déficit social induzidos por VPA.

A partir do aqui exposto, sugere-se avaliar outros parâmetros encontrados a nível bioquímico e molecular dos efeitos dos radicais livres e antioxidantes à nível do SNC, com o intuito de compreender os efeitos e possibilitar melhores resultados à nível cerebral.

REFERÊNCIAS

- Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases *Int. J Biochem Cell Biol.* 2009; 41 (1):40-59.
- Aksenov MY, Markesbery WR. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302:141-145.
- Al-Askar M, Bhat RS, Selim M, Al-Ayadhi L, El-Ansary A. Postnatal treatment using curcumin supplements to amend the damage in VPA-induced rodent models of autism. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):259.
- Alò Rafaella, Olivito I, Fazzari G, Zizza M, Di Vito A, Avolio E, Mandalà M, Bruno R, Barni T, Canonaco M, Facciolo RM. Correlation of distinct behaviors to the modified expression of cerebral Shank1,3 and BDNF in two autistic animal models. *Behav Brain Res.* 2021; 404:113165.
- Aman, MG. Management of hyperactivity and other acting-out problems in patients with autism spectrum disorder. *Semin Pediatr Neurol* 2004; 11:225-228.
- American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtorno Mentais (DSM). 5a ed. American Psychiatric Publishing, Arlington, VA, 2013; 50-59.
- An JY, Lin K, Zhu L, Werling DM, Dong S, Brand H, Wang HZ, Zhao X, Schwartz GB, Collins RL. Genome-wide risk score implicates promoter variation in autism spectrum disorder. *Science.* 2018; 362:eeat6576.
- Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM (2013). Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-Like Behaviors in Mice. *Journal of Visualized Experiments* (82):50978. doi: 10.3791/50978.
- Anseloni VZ, Brandão ML. Ethopharmacological analysis of behavior of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behav Pharmacol.* 1997; 8(6-7):533-540.
- Arafat EA, Shabaan DA. The possible neuroprotective role of grape seed extract on the histopathological changes of the cerebellar cortex of rats prenatally exposed to Valproic Acid: animal model of autism. *Acta Histochem.* 2019; 121(7):841-851.

- Bacchelli E, Maestrini E. Autism spectrum disorders: molecular genetic advances. *Am J Med Genetic C Semin Med Genetic*. 2006; 142 C(1):13-23.
- Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, Bolton P, Simonoff E, Yuzda E, Rutter M. Autism as a strongly genetic disorder: Evidence from a British twin study. *Psychol. Med*. 1995; 25:63–77.
- Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos P. A clinicopathological study of autism. *Brain* 1998; 121:889-905.
- Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, Kurzius-Spencer M, Zahorodny W, Rosenberg CR, White T, Durkin MS, Imm P, Nikolaou L, Yeargin-Allsopp M, Lee LC, Harrington R, Lopez M, Fitzgerald RT, Hewitt A, Pettygrove S, Constantino JN, Vehorn A, Shenouda J, Hall-Lande J, Braun KVN, Dowling NF. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years -Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ*. 2018; 67(6):1-23.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987; 32:279-312.
- Baron-Cohen S, Ring HA, Bullmore ET, Wheelwright S, Ashwin C, Williams SCR. The amygdala theory of autism. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000;24:355-364.
- Barônio, D; Castro, K; Gonchoroski, T; de Melo, GM; Nunes, GD; Bambini-Junior, V. Effects of an H3R antagonist on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *PLoS One* 2015; 10(1)e0116363.
- Basile U. Three-Chamber Sociability Task. University of IOWA Health Care . <<https://ncbc.medicine.uiowa.edu/equipment-fees/equipment/behavior/social-behavior>>. Acessada em 10/03/2022.
- Bhandari R, Kuhad A. Neuropsychopharmacotherapeutic efficacy of curcumin in experimental paradigm of autism spectrum disorders. *Life Sci*. 2015 Nov 15;141:156-69.
- Bhat A, Mahalakshmi AM, Ray B, Tuladhar S, Hediya TA, Manthiannem E, Padamati J, Chandra R, Chidanbaram SB, Sakharkar MK. Benefits of curcumin in brain disorders. *Biofactors*. 2019 Sep;45(5):666-689.

- Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganie SA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother.* 2015; 74: 101-110.
- Bjorklund G, Saad K, Chirumbolo S, Kern JK, Geier DA, Geier MR, Urbina MA. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Acta Neurobiol Exp* 2016; 76:257–268.
- Boguski MS, Jones AR. Neurogenomics: at the intersection of neurobiology and genome sciences. *Nat Neurosci.* 2004; 7:429-433.
- Bronzuoli MR, Facchinetti R, Ingrassia D, Sarvadio M, Schiavi S, Steardo L, Verkhratsky A, Trezza V, Scuderi C. Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Mol Autism.* 2018 Dec 27;9:66.
- Brothers L. Brain mechanisms of social cognition. *J Psychopharmacol.* 1996;10:2-8.
- Brown AS, Surcel H-M, Hinkka-Yli-Salomäki S, Cheslack-Postava K, Bao Y, Sourander A. Maternal thyroid autoantibody and elevated risk of autism in a national birth cohort. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015; 57:86–92.
- Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol.* 1998; 108:347-52.
- Carneiro MFH, Barbosa FJ. Gold nanoparticles: A critical review of therapeutic applications and toxicological aspects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2016; 19(3-4):129-48.
- Carter-Pokras O, Hutchins S, Gaudino JA, Veeranki SP, Lurie P, Weiser T, DeMarco M, Khan NF, Cordero JF. The Role of Epidemiology in Informing United States Childhood Immunization Policy and Practice. *Ann Epidemiol.* 2020; S1047-2797(20)30388-4.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Mental health in the United States: parental report of diagnosed autism in children aged 4-17 years - United States, 2003-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55(17):481-486.
- Chadman, KK; Yang, M; Crawley, JN. Criteria for validating mouse models of psychiatric diseases. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2009; 150:1-11.
- Chae SY, Lee M, Kim SM, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials.* 2004. 25:843-850.

- Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*. 2006;13:171-181.
- Chhavi S, Pooja S, Piyu S, Neha J, Maheep B. Curcumin attenuates neurotoxicity induced by fluoride: An in vivo evidence. *Pharmacoghosy Magazine*. 2014; 10(37), 61–5.
- Chiarotti F, Venerosi A. Epidemiology of Autism Spectrum Disorders: A Review of Worldwide Prevalence Estimates Since 2014. 2020; 10(5):274.
- Connolly AM, Chez M, Streif EM, Keeling RM, Golumbeck PT. Brain-derived neurotrophic factor and autoantibodies to neural antigens in sera of children with autistic spectrum disorders, Landau-Kleffner syndrome, and epilepsy. *Biol Psychiatry*. 2006; 59:354-363.
- Cruz APM, Frei F, Graeff FG. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; 49:171-176.
- Courchesne E, Pierce K, Schumann CM, Redcay E, Buckwalter JA, Kennedy DP, Morgan J. Mapping early brain development in autism. *Neuron* 2007; 56: 399-413.
- Devasagayam TP, Tilak JC, Bolor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India*. 2004; 52:794–804.
- Leão ERLP, De Souza DNC, De Moura LVB, Da Silveira Júnior AM, Dos Santos ALG, Diniz DG, Diniz CWP, Sosthenes MCK. Lateral septum microglial changes and behavioral abnormalities of mice exposed to valproic acid during the prenatal period. *J Chem Neuroanat*. 2021 Jan;111:101875.
- Dong J, Sulik KK, Chen SY. The role of NOX enzymes in ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryos. *Toxicol Lett*. 2010; 193:94-100.
- Esterbauer H, Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol*. 1990; 186, 406-413.
- Eissa N, Al-houqani M, Sadeq A, Ojha Sk, Sasse A, Sadek B. Current Enlightenment About Etiology And Pharmacological Treatment Of Autism Spectrum Disorder. *Front Neurosci*. 2018; 12:204.
- El-Khodor BF, Edgar N, Chen A, Winberg ML, Joyce C, Brunner D, Suárez-Fariñas M, Heyes MP. Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the

SMNDelta7 neonate model of spinal muscular atrophy. *Exp Neurol.* 2008 Jul;212(1):29-43.

Elsabbagh M, Divan G, Koh KJ, Kauchali S, Marcín C, Montiel-Nava C, Patel V, Paula CS, Wang C, Yasamy MT, Fombonne E. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res.* 2012; 5(3):160-179.

Fahkri S, Aneva IY, Farzaei MH, Sobarzo-sanchez E. The Neuroprotective Effects Of Astaxanthin: Therapeutic Targets And Clinical Perspective. *Molecules.* 2019; 24(14):2640.

Fahkri S, Aneva IY, Farzaei MH, Sobarzo-sanchez E. Astaxanthin attenuates neuroinflammation contributed to the neuropathic pain and motor dysfunction following compression spinal cord injury. *Brain Res Bull* 2018; 143:217-224.

Ferreira E. [dissertação]. Programa de Pós-Graduação de Saúde Pública da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2008.

Flannery BM, Silverman JL, Bruun DA, Puhger KR, McCoy MR, Hammock BD, Crawley JN, Lein PJ. Behavioral assessment of NIH Swiss mice acutely intoxicated with tetramethylenedisulfotetramine. *Neurotoxicol Teratol.* 2015 Jan-Feb;47:36-45.

Fontes-Dutra M, Santos-Terra J, Deckmann I, Schwingel GB, Nunes GDF, Hirsch MM, Bauer-Negrini G, Riesgo RS, Bambini-Júnior V, Hedin-Pereira C, Gottfried C. Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. *Front Synaptic Neurosci.* 2018; 10:9.

Freeman SM, Palumbo MC, Lawrence RH, Smith AL, Goodman MM, Bales KL. Effect of age and autism spectrum disorder on oxytocin receptor density in the human basal forebrain and midbrain. *Transl Psychiatry.* 2018; 8:257.

Friedman AJ, Han G, Navati MS, Chacko M, Gunther L, Alfieri A, Friedman JM. Sustained release nitric oxide releasing nanoparticles: characterization of a novel delivery platform based on nitrite containing hydrogel/glass composites. *Nitric Oxide.* 2008 Aug;19(1):12-20.

Frisch C, Husch K, Angestein F, Kudin A, Kunz W, Elger CE. Dose-dependent memory effects and cerebral volume changes after in utero exposure to valproate in the rat. *Epilepsia.* 2009; 50:1432-1441.

- Gandal MJ, Zhang P, Handjmicheel E, Walker RL, Chen C, Liu S, Won H, van Bakel H, Varghese M, Wang Y. Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder. *Science*. 2018;362:eaat8127.
- Gevezova M, Sarafian V, Anderson G, Maes M. Inflammation and Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. *CNS NeurolDisord Drug Targets*. 2020;19(5):320-333.
- Gillberg C, Steffenburg S, Schaumann H. Is autism more common now than ten years ago? *Br J Psychiatry*. 1991; 158:403-409.
- Grossen, N. E., & Kelly, M. J. (1972). Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81, 307-310.
- Guilhotra N, Dhingra D. GABAergic and nitriergic modulation by curcumin for its antianxiety-like activity in mice. *Brain Res*. 2010 Sep 17;1352:167-75.
- Hafizi S, Tabatabaei D, Lai M-C. Review of Clinical Studies Targeting Inflammatory Pathways for Individuals With Autism. *Front Psychol*. 2019; 10:849.
- Hall CS, Ballachey EL (1932). A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*. **6**: 1–12.
- Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1984; 327,1:5.
- Hertz-Picciotto I, Schmidt RJ, Krakowiak P. Understanding environmental contributions to autism: causal concepts and the state of science. *Autism Res*. 2018; 11(4):554-586.
- Hissin PJ, Hilf R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem*. 1976; 74, 214-226.
- Hu S, Maiti P, Ma Q, et al. Clinical development of curcumin in neurodegenerative disease. *Expert Rev Neurother*. 2015;15: 629–637
- Jacob JN, Badyal DK, Bala S, Toloue M. Evaluation of the in vivo anti-inflammatory and analgesic and in vitro anti-cancer activities of curcumin and its derivatives. *Nat Prod Commun*. 2013 Mar;8(3):359-62. PMID: 23678811.

- Jeon KI, Byun MS, Jue DM. Gold compound auranofin inhibits I κ B kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKK β subunit. *Exp Mol Med*. 2003; 152:208-231.
- Jepson B, Johnson J. Autism in the Brain. In: Jepson B, Johnson J. *Changing the Course of Autism: A Scientific Approach for Parents and Physicians*. First Edition. CO: Sentient Publications; 2007. 164-174.
- Johannessen CU, Johannessen SI. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev*. 2003; 9:199-216.
- Shilo M, Motiei M, Hana P, Popovtzer R. Transport of nanoparticles through the blood-brain barrier for imaging and therapeutic applications. *Nanoscale*. 2014 Feb 21;6(4):2146-52. doi: 10.1039/c3nr04878k. Epub 2013 Dec 23. PMID: 24362586.
- Wang Y, Guo L. Nanomaterial-Enabled Neural Stimulation. *Front Neurosci*. 2016 Mar 7;10:69. doi: 10.3389/fnins.2016.00069. PMID: 27013938; PMCID: PMC4779906.
- Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem Rev*. 2016 Mar 9;116(5):2826-85. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00148. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26799741.
- Jo DH, Kim JH, Lee TG, Kim JH. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine*. 2015 Oct;11(7):1603-11. doi: 10.1016/j.nano.2015.04.015. Epub 2015 May 16. PMID: 25989200.
- Karande S. Autism: A Review for family physicians. *Indian J Med Sci*. 2006; 60:205-215.
- Kemper TL, Bauman M. Neuropathology of infantile autism. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998, 57:645-652.
- Khanh LL, Truc NT, Dat NT, Nghi NTP, Toi VV, Hoai NTT, Quyen TN, Loan TTT, Hiep NT. Gelatin-stabilized composites of silver nanoparticles and curcumin: characterization, antibacterial and antioxidant study. *Sci Technol Adv Mater*. 2019 Mar 29;20(1):276-290.
- Kim YS, Leventhal BL, Koh YJ, Fombonne E, Laska E, Lim EU, Cheon KA, Kim SJ, Kim YK, Lee H, Song DH, Grinker RR. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am J Psychiatry*. 2011; 168(9):904-912.

- Kinjo T, Ito M, Seki T, Fukuhara T, Bolati K, Arai H, Suzuki T. Prenatal exposure to valproic acid is associated with altered neurocognitive function and neurogenesis in the dentate gyrus of male offspring rats. *Brain Res.* 2019 Nov 15;1723:146403
- Kumar, B; Prakash, A; Sewal, RK; Medhi, B; Modi, M. Drug therapy in autism: a present and future perspective. *Pharmacol Rep* 2012; 64, 1291-1304.
- Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992; 5(2):227-231.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464-478.
- Lobo V, Patil A, Pathak A, Chandra N. Free Radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews.* 2010; 4(8):118-126.
- Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet.* 2018; 392(10146):508-20.
- Lyall K, Croen LA, Sjödin A, Yoshida CK, Zerbo O, Kharrazi M, Windham GC. Polychlorinated Biphenyl and Organochlorine Pesticide Concentrations in Maternal Mid-Pregnancy Serum Samples: Association with Autism Spectrum Disorder and Intellectual Disability. *Environ Health Perspect.* 2017; 125(3):474-480.
- Maenner MJ, Shaw KA, Baio J, Washington A, Patrick M, DiRienzo M, Christensen DL, Wiggins LD, Pettygrove S, Andrews JG, Lopez M, Hudson A, Baroud T, Schwenck Y, White T, Rosenberg CR, Lee LC, Harrington RA, Huston M, Hewitt A, Esler A, Hall-Lande J, Poynter JN, Hallas-Muchow L, Constantino JN, Fitzgerald RT, Zahorodny W, Shenouda J, Daniels JL, Warren Z, Vehorn A, Salinas A, Durkin MS, Dietz PM. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016.
- Mansuri ML, Parihar P, Solanki I, Parihar MS. Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. *Genes Nutr.* 2014.
- Masini E, Loi E, Vega-Benedetti AF, Carta M, Doneddu G, Fadda R, Zavattari P. An Overview of the Main Genetic, Epigenetic and Environmental Factors Involved in

Autism Spectrum Disorder Focusing on Synaptic Activity. *Int J Mol Sci.* 2020 21(21):8290.

Mohammadi S, Asadi-Shekaari M, Basiri M, Parvan M, Shabani M, Nozari M. Improvement of autistic-like behaviors in adult rats prenatally exposed to valproic acid through early suppression of NMDA receptor function. *Psychopharmacology (Berl).* 2020 Jan;237(1):199-208.

Monz, Bu; Houghton, R; Law K; Loss, G. Treatment Patterns In Children With Autism In The United States. *Autism Res.* 2019; 12(3):517-526

Moore, ML; Eichner, SF; Jones, JR. Treating functional impairment of autism with selective serotonin-reuptake inhibitors. *Ann Pharmacother* 2004; 38, 1515-1519.

Muller, AP; Ferreira, GK; Pires, AJ; Silveira, GB; Souza, DL; Brandolfi, JA; Souza, CT; Paula, MMS; Silveira, PCL. Gold Nanoparticles Prevent Cognitive Déficits, Oxidative Stress And Inflammation In A Rat Model Of Sporadic Dementia Of Alzheimer 's Type. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 77:476-483.

Morato, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevada. *Psicol USP.* 2006; 17(4):159-174.

Muller, AP; Ferreira, GK; Silva, S; Nesi, RT; Silveira, GB; Mendes, C; Pinho, RA; Paula, MMS; Silveira, PCL. Safety Protocol For The Gold Nanoparticles Administration In Rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 77:1145-1150.

Nadler JJ, Moy SS, Dold G, Trang D, Simmons N, Perez A, Young NB, Barbaro RP, Piven J, Magnuson TR, Crawley JN. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes Brain Behav.* 2004;3:303–314.

Nestler, EJ; Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 2010; 13:1161-1169.

Newschaffer CJ, Croen LA, Daniels J, Giarelli E, Grether JK. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu Rev Public Health.* 2007; 28:235-258.

Njung'e K, Handley SL. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1991;38:63–67.

Noldus. Tools for tests with an Open Field. <<https://www.noldus.com/applications/open-field>> Acessado em 10/03/2022.

- Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. Síndromes genéticas , doenças maternas e fatores pré-natais associados a distúrbios do espectro do autismo (TEA). *Front Neurosci.* 2016; 10:316.
- Ortiz GG; Moisés FPP; Mireles-ramirez M; Flores-alvarado LJ; Gonzalez-usigli H; Sanchez-gonzales VJ; Sanchez-lopez A; Sanchez-romero L; Díaz-barba E; Santoscoy-gutiérrez JF; Rivero-moragrega P. Oxidative Stress: Love and Hate History in Central Nervous System. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2017; 108:1-31.
- Ospina MB, Krebs SJ, Clark B, Karkhaneh M, Hartling L, Tjosvold L, Vandermeer B, Smith V. Behavioural and developmental interventions for autism spectrum disorder: a clinical systematic review. *PLoS One.* 2008; 3(11): 3755.
- Ozonoff S, Young GS, Goldring S, Greiss-Hess L, Herrera AM, Steele J, Macari S, Hepburn S, Rogers SJ. Gross motor development, movement abnormalities, and early identification of autism. *J Autism Dev Disord.* 2008;38:644–56.
- Pangrazzi L, Balasco L, Bozzi Y. Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(9):3293.
- Parker SK, Schwartz B, Todd J, Pickering LK. Thimerosal-containing vaccines and autistic spectrum disorder: a critical review of published original data. *Pediatrics.* 2004; 114:793-804.
- Paula CS, Fombonne E, Gadia C, Tuchman R, Rosanoff M. Autism in Brazil - perspectives from science and society. *Rev Assoc Méd Bras.* 2011; 57:2-5.
- Paval, D. A Dopamine Hypothesis Of Autism Spectrum Disorder. *Dev Neurosci* 2017; 39(5):355-360.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 1985; 14(3):149-167.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, oxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4(2):89-96.
- Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol.* 2005; 47:551-555.

- Rein B, Ma K, Yan Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. *Nat Protoc.* 2020 Oct;15(10):3464-3477.
- Rodgers RJ, Cole JC. Anxiolytic-like effect of (S)-WAY 100135, a 5-HT_{1A} receptor antagonist, in the murine elevated plus-maze test. *Eur J Pharm*; 261: 321-325.
- Rossignol D, Frye RE. Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Dev. Med. Child Neurol.* 2011; 53:783–792.
- Rossignol DA, Bradstreet JJ. Evidence of mitochondrial dysfunction in autism and implications for treatment. *Am J Biochem Biotech.* 2008; 4:208-217.
- Roullet FI, Lai JK, Foster JA. In utero exposure to valproic acid and autism - a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol Teratol.* 2013; 36:47-56.
- Ruhella R, Soni S, Sarma P, Prakash A, Medhi B. Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Ann Neurosci.* 2019 Jan; 26(1): 25– 31.
- Sadaukas E, Wallin H, Stoltenberg M, Vogel U, Doering P, Larsen A, Danscher G. Kupffer Cells are Central in the Removal of Nanoparticles from Organism. *Part Fibre Toxicol.* 2007; 4:10.
- Sadek A, Berk LS, Mainess K, Daher NS. Antioxidants and Autism: Teachers' Perceptions of Behavioral Changes. *Adv Mind Body Med.* 2018; 32:12–17.
- Saeidienik F, Shahraki MR, Fanaei H, Badini F. The Effects of Iron Oxide Nanoparticles Administration on Depression Symptoms Induced by LPS in Male Wistar Rats. *Basic Clin Neurosci.* May-Jun 2018;9(3):209-216.
- Sanna A, Firinu D, Zavattari P, Valera P. Zinc Status and Autoimmunity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients.* 2018; 10:68.
- Santos M, Silva-Fernandes A, Oliveira P, Sousa N, Maciel P. Evidence for abnormal early development in a mouse model of Rett syndrome. *Genes Brain Behav.* 2007;6(3):277–86.
- Shamsher S., Sumit J., Puneet K. (2015). Piperine enhances the protective effect of curcumin against 3-np induced neurotoxicity: Possible neurotransmitters modulation mechanism. *Neurochemical Research*, 40(8), 1758–66.
- Scherer SW, Dawson G. Risk factors for autism: translating genomic discoveries into diagnostics. *Hum Genet.* 2011; 130:123-148.

- Schumann CM, Amaral DG. Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. *J Neurosci*. 2006; 26:7674-7679.
- Schultz RT, Romanski LM, Tsatsanis KD. Neurofunctional models of autistic disorder and Asperger syndrome: clues from neuroimaging. *Asperger Syndr*. 2000;1:172-209.
- Selim ME, Abd-Elhakim YM, Al-Ayadhi LY. Pancreatic Response to Gold Nanoparticles Includes Decrease of Oxidative Stress and Inflammation in Autistic Diabetic Model. *Cell Physiol and Biochem*. 2015; 35(2):586-600
- Serajee FJ, Zhang H, Huq AHMM. Prevalence of common mitochondrial point mutations in autism. *Neuropediatrics*. 2006; 37(S1):S127.
- Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: A general review. *Int J Neurosci*. 2017; 127:624-633.
- Sharifi S, Fathi N, Memar MY, Khatibi SMH, Khalilov R, Negahdari R, Vahed SZ, Dizaj SM. Anti-microbial activity of curcumin nanoformulations: New trends and future perspectives. *Phytoter Res*. 2020 Aug;34(8):1926-1946.
- Shrinivas KK, Mohit KB, Mahendra B. Antidepressant activity of curcumin: Involvement of serotonin and dopamine system. *Psychopharmacology*. 2008. 201(3), 435–42.
- Silverman JL, Pride MC, Hayes JE, Puhger KR, Butler-Struben HM, Baker S, Crawley JN. GABAB Receptor Agonist R-Baclofen Reverses Social Deficits and Reduces Repetitive Behavior in Two Mouse Models of Autism. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Aug;40(9):2228-39.
- Sivamaruthi BS, Suganthy N, Kesika P, Chaiyasut C. The Role of Microbiome, Dietary Supplements, and Probiotics in Autism Spectrum Disorder. *Int J Environ Res Public Health*. 2020, 17(8):2647.
- Sousa JABM. Caracterização comportamental e distribuição de neurônios inibitórios em um modelo animal de autismo induzido por ácido valproico [dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação do Rio Grande do Norte. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2013.
- Srinivasan P. A review of dietary interventions in autism. *Ann Clin Psychiatry*. 2009; 21:237-247.
- Staubli U e Huston JP. Up-hill Avoidance: A New Passive Avoidance Task. *Physiol Behav*. 1979 Apr;22(4):775-6

- Stromland H, Nordin V, Miller M, Akerstrom B, Gillberg C. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev Med Child Neurol.* 1994; 36:351-356.
- Tayman C, Aydemir S, Tayman C, Tonbul A, Tatli MM. Effects of the magnetic field constituted by the incubators. *J Ponte.* 2016; 72:4.
- Tanaka M, Sato A, Hagino Y, Kotajima-murakami H, Kashii H, Takamatsu Y, Nishito Y, Inagaki M, Mizuguchi M, Hall Fs, Uhl Gr, Murphy D, Sora I, Ikeda K. Brain Hyperserotonemia Causes Autism-relevant Social Deficits In Mice. *Mol Autism.* 2018; 9:60.
- Tordjman S, Anderson GM, Pichard N, Charbuy H, Touitou Y. Nocturnal excretion of 6-sulphatoxymelatonin in children and adolescents with autistic disorder. *Biol Psychiatry.* 2005; 57:134-138.
- Tramontin NS, Da Silva S, Arruda R, Ugioni Ks, Canteiro PB, Silveira Gb, Mendes C, Silveira PCL, Muller Ap. Gold Nanoparticles Treatment Reverses Brain Damage In Alzheimer 's Disease Model. *Mol Neurobiol.* 2020; 57(2): 926-936.
- Van Tilborg E, Achterberg EJM, van Kammen CM, van der Toorn A, Groenendaal F, Dijkhuizen RM. Combined fetal inflammation and postnatal hypoxia causes myelin deficits and autism-like behavior in a rat model of diffuse white matter injury. *Glia.* 2018; 66:78–93.
- Volkman J, Schnitzler A, Witte OW, Freund H: Handedness and asymmetry of hand representation in human motor cortex. *J Neurophysiol.* 1998; 79:2149–2154.
- Xu Y, Ku BS, Yao HY, Lin YH, Ma X, Zhang YH, Li XJ (2005). The effects of curcumin on depressive-like behaviors in mice. *European Journal of Pharmacology*, 518(1), 40–6.
- Xu XL; Strathearn L; Liu B; Bao W. Prevalence of Autism spectrum disorder among US children and adolescents. *JAMA.* 2014-2016. 319:81-82.
- Yasuhara A. Correlation between EEG abnormalities and symptoms of autism spectrum disorder (ASD). *Brain Dev.* 2010; 32:791–798.
- Yoon SH, Choi J, Lee WJ, Do JT. Genetic and Epigenetic Underlying Autism Spectrum Disorder. *J Clin Med.* 2020; 9(4):966.
- Warren RP, Singh VK, Averett RE, Odel JD, Maciulis A. Immunogenetic studies in autism and related disorders. *Mol Chem Neuropathol* 1996; 28:77-81.

- Wan H, Zhang C, Li H, Luan S, Liu C. Association of maternal diabetes with autism spectrum disorder in offspring. *Medicamento*. 2018; 97:e9438.
- Wang L, Cai Y, Fan X. Metformin Administration During Early Postnatal Life Rescues Autistic-Like Behaviors in the BTBR T+ Itpr3tf/J Mouse Model of Autism. *Front Behav Neurosci*. 2018 Nov 29;12:290.
- Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1981; 77:325-333.
- Wing L, Potter D. The epidemiology of autistic spectrum disorders: Is the prevalence rising? *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002; 8:151-161.
- Wiśniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska BA. Genetics and epigenetics of autism spectrum disorder-current evidence in the field. *J Appl Gene*. 2019; 60:37–47.
- Wong CT, Bestard-Lorigados I, Crawford DA. Autism-related behaviors in the cyclooxygenase-2-deficient mouse model. *Genes Brain Behav*. 2019 Jan;18(1):e12506.
- Wu S, Ding Y, Wu F, Li R, Xie G, Hou J, Mao P. Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015; 55:322–332.
- Wu Y, Wu Y, Chen I-F, Wu Y-L, Chuang C, Huang H, Kuo S. Reparative effects of astaxanthin-hyaluronan nanoaggregates against retrorsine-CCl4-induced liver fibrosis and necrosis. *Molecules* 2018;23:726.
- Zheltova AA, Kharitonova MV, Iezhitsa I, Spasov AA. Magnesium deficiency and oxidative stress: An update. *BioMedicine*. 2016; 6:20.
- Zhong H, Xiao R, Ruan R, Liu H, Li X, Cai Y, Zhao J, Fan X. Neonatal curcumin treatment restores hippocampal neurogenesis and improves autism-related behaviours in a mouse model of autism. *Psychopharmacology (Berl)*. 2020 Dec;237(12):3539-3552.

ANEXO A



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais




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** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **20/04/2021**.

Título do projeto	Efeitos do tratamento com nanopartículas de ouro reduzidas com curcumina em um modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico
Project title	Effects of treatment with gold nanoparticles reduced with curcumin in a model of autism induced by valproic acid.
Número do protocolo Protocol number	12/2021
Pesquisador principal Principal Investigator	Cinara Ludvig Gonçalves
Pesquisadores Researchers	Maiara de Aguiar da Costa, Jaime Lin, Bruna de Moraes, Tamires da Silva Nascimento, Rosiane Ronchi Nascimento Costa, Bruna Bittencourt Netto, Simone Lespinasse Araujo, Mariana Setubal Milverstet, José Marcelo Botacin Campos, Bruna de Andrade Flauzino, Caroline Pacheco Rodrigues, João Victor Folle, Maria Goreti Aléssio Crispim, Victória Linden de Rezende.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	21/04/2021 a 21/04/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo/ Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250-300g
Número de animais	Masculino: 9 e feminino: 45
Idade/Peso	1 dia / 30g
Número de animais	Masculino: 80 e feminino: 80
Total	214
Procedência	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.


Josiane Budni
Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 20 de abril de 2021