

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

ANITA SILVA BRUNEL ALVES

**ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA
INTRANASAL EM UM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA**

**CRICIÚMA
FEVEREIRO, 2024**

ANITA SILVA BRUNEL ALVES

**ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA
INTRANASAL EM UM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinara Ludvig
Gonçalves

**CRICIÚMA
FEVEREIRO, 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A474a Alves, Anita Silva Brunel.

Análise do efeito do tratamento com n-acetilcisteína intranasal em um modelo animal de transtorno do espectro autista / Anita Silva Brunel Alves. - 2024.

58 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Cinara Ludvig Gonçalves.

1. N-acetilcisteína - Efeito fisiológico. 2. Administração intranasal. 3. Autismo - Tratamento. 4. Transtornos do espectro autista - Tratamento. 5. Ácido valproico. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

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

FOLHA INFORMATIVA

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

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

Dedico este trabalho a todas pessoas dentro do espectro do autismo e seus familiares, que com muita generosidade me contam suas histórias, dividem suas vidas e confiam em meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Tenho muitas pessoas a agradecer, muito mais do que cabem nestas páginas.

Agradeço aos meus pais, Sinesio Brunel Alves e Maria Gorete Silva Brunel Alves, que em mim plantaram os valores, regaram as virtudes e podaram os vícios, permitindo-me crescer até aqui. Muito obrigado, ainda, por me ensinarem, todos os dias, a definição de amor sacrificial.

Ao meu irmão, Arthur Brunel, que caminha ao meu lado há tantos anos.

À minha orientadora, Prof. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves, que é um exemplo de liderança, dedicação, respeito e caráter. Não tenho palavras para agradecer o carinho com que fui acolhida e orientada em seu laboratório. Que nossa amizade e parceria profissional se perdurem para além deste trabalho.

Meu agradecimento e carinho aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Autismo e Neurodesenvolvimento da Universidade do Extremo Sul Catarinense (LAND), que se dedicam, diariamente, ao estudo deste tema tão desafiador, em especial: Maiara de Aguiar da Costa e Maria Fernanda Ebs, que não mediram esforços para me ajudar.

Ao Dr Jaime Lin, meu grande incentivador de pesquisas desde a UNISUL. Foi um grande prazer poder ter novamente sua companhia no LAND. Sua contribuição para esse estudo foi imensurável.

Agradeço também à UNIFEBE por ter me proporcionado a oportunidade de aperfeiçoamento profissional através do programa MINTER. Certamente estou mais capacitada e com olhares ampliados frente a tríade ensino-pesquisa-extensão.

Gratidão especial a Deus, que sempre me colocou sobre ombros de gigantes e que escreve todas as linhas.

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

Autism Topics

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por interação social e comunicação prejudicadas. Atualmente, não existem estratégias terapêuticas eficazes para os principais déficits associados ao autismo. A N-acetilcisteína (NAC) apresenta propriedades neuroprotetoras e antioxidantes. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da NAC intranasal (IN) em um modelo experimental de TEA induzido por ácido valproico (VPA). Ratos machos nascidos de matrizes expostas ao VPA ou salina (SAL) no 12,5º dia gestacional foram divididos em quatro grupos: grupo 1: salina pré-natal + salina pós-natal, via IN; grupo 2: salina pré-natal + NAC pós-natal, via IN; grupo 3: VPA pré-natal + salina pós-natal, via IN; grupo 4: VPA pré-natal + NAC pós-natal, via IN. Todos os animais receberam seus respectivos tratamentos com salina ou NAC por 15 dias, a partir do dia pós-natal (DPN) 21. Os parâmetros comportamentais foram avaliados no DPN 36, em seguida os animais foram eutanasiados e foram realizadas análises bioquímicas nos tecidos cerebrais (córtex posterior e pré-frontal, hipocampo, estriado e cerebelo). Observou-se que os animais VPA-expostos apresentaram atraso para encontrar seu ninho de origem e para rotacionar sobre o próprio eixo no teste de geotaxia. Não houveram diferenças significativas no peso dos animais. No córtex posterior verificou-se que os animais VPA+NAC apresentaram aumento na atividade de catalase e glutatona redutase quando comparados aos VPA+SAL. No hipocampo, os animais VPA+NAC apresentaram aumento na atividade de superóxido dismutase, conteúdo total de sulfidrilas, além de apresentarem diferença significativa nos níveis de catalase quando comparados ao grupo VPA+SAL. Em relação a oxidação de DCFH, observou-se que no hipocampo o tratamento com NAC diminuiu significativamente o dano causado pelo estresse oxidativo nestes animais. No cerebelo, houve uma diminuição na atividade antioxidante da catalase no grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo SAL+SAL. **Conclusão:** O modelo animal de autismo induzido por VPA induziu atraso no neurodesenvolvimento típico do modelo e a NAC foi capaz de atenuar o dano oxidativo causado pelo VPA, além de mostrar efeito positivo na defesa antioxidante nas regiões analisadas.

Palavras-chave: autismo; valproato; n-acetilcisteína; intranasal.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by impaired social interaction and communication. Currently, there are no effective therapeutic strategies for the core deficits associated with autism. N-acetylcysteine (NAC) possesses neuroprotective and antioxidant properties. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of intranasal (IN) NAC in an experimental model of ASD induced by valproic acid (VPA). Male rats born to dams exposed to VPA or saline (SAL) on gestational day 12.5 were divided into four groups: group 1 - prenatal saline + postnatal saline, IN; group 2 - prenatal saline + postnatal NAC, IN; group 3 - prenatal VPA + postnatal saline, IN; group 4 - prenatal VPA + postnatal NAC, IN. All animals received their respective treatments with saline or NAC for 15 days, starting from postnatal day (PDN) 21. Behavioral parameters were assessed on PDN 36, followed by euthanasia, and biochemical analyses were performed on brain tissues (posterior and prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum). VPA-exposed animals showed delays in finding their home cage and rotating on their axis in the geotaxis test. No significant differences were observed in body weight. In the posterior cortex, VPA+NAC animals exhibited an increase in catalase and glutathione reductase activity compared to VPA+SAL. In the hippocampus, VPA+NAC animals showed increased superoxide dismutase activity, total sulfhydryl content, and significant differences in catalase levels compared to the VPA+SAL group. Regarding DCFH oxidation, NAC treatment significantly reduced oxidative stress damage in the hippocampus. In the cerebellum, there was a decrease in catalase antioxidant activity in the VPA+SAL group compared to the SAL+SAL group. **Conclusion:** The VPA-induced animal model of autism exhibited delays in typical neurodevelopment, and NAC was able to attenuate the oxidative damage caused by VPA, showing a positive effect on antioxidant defense in the analyzed brain regions.

Keywords: autism; valproate; N-acetylcysteine; intranasal.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
1.1	TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	10
1.1.1	Neuropatologia.....	11
1.1.2	Tratamento.....	13
1.1.3	A via intranasal e seu potencial na terapia de TEA.....	15
1.2	MODELO ANIMAL DE AUTISMO.....	16
2.	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	19
3.2	ANIMAIS.....	19
3.3	DESENHO EXPERIMENTAL.....	19
3.3.1	Fase experimental 1 (geração das proles)	19
3.3.2	Fase experimental 2 (tratamento das proles)	20
3.3.2.1	Protocolo de tratamento NAC intranasal	20
3.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	22
3.4.1	Teste de busca pelo ninho.....	22
3.4.2	Teste geotaxia negativa.....	23
3.4.3	Teste do <i>open field</i>	23
3.4.4	Teste das três câmaras.....	23
3.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	24
3.5.1	Diclorofluoresceína (DCFH).....	24
3.5.2	Glutathiona redutase (GR)	24
3.5.3	Medida de sulfidrilas totais.....	25
3.5.4	Atividade de superóxido dismutase (SOD)	25
3.5.5	Atividade da catalase (CAT)	25
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4.	RESULTADOS.....	27
5.	DISCUSSÃO	38
6.	CONCLUSÃO.....	46
7.	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXOS.....	56
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	57
	ANEXO B – ATA DE MESTRADO.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O termo “autismo” surgiu em 1908 por Eugen Bleuler e foi derivado da palavra grega *Autos*, que significa “eu”, para demonstrar o isolamento destes pacientes, e a primeira descrição da síndrome foi feita por Leo Kanner, em 1943 (Bernardi, Kirsten, Trindade, 2012; Masi et al., 2017).

Em seu estudo, Kanner estabeleceu uma distinção entre essa síndrome (Autismo) e a da "esquizofrenia infantil" observando nas crianças avaliadas extrema incapacidade de se relacionar com outras. Mais tarde, Hans Asperger (1944) publicou um trabalho intitulado de "psicopatia autista", apontando dificuldades com a comunicação não verbal e habilidades sociais relacionadas, e ampliando os conceitos sobre o transtorno (Masi et al., 2017). Apenas em 1960 houve uma separação da esquizofrenia e do autismo e, desde então, seus critérios diagnósticos foram refinados e os tratamentos reconhecidos (Zaky, 2017).

O transtorno do espectro autista (TEA) ficou mais conhecido na década de 1970 e, então, a Fundação Erica na Suécia iniciou a educação e terapia para crianças psicóticas. Muitos pais ainda confundiam autismo com retardo mental e psicose. Os primeiros tratamentos iniciaram com terapia eletroconvulsiva e técnicas de modificação comportamental, como punição. Desde 1980, até o presente, as terapias comportamentais com reforço positivo, reestruturação ambiental para aprendizagem e treinamento de habilidades de comunicação tornaram-se as principais modalidades terapêuticas para o TEA (Zaky, 2017).

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por interação social e comunicação prejudicadas, além de padrões de comportamento restritos, repetitivos e estereotipados (APA, 2013). Recentemente, em 2013, a 5ª edição do Manual de Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) foi publicada, e todos os termos previamente descritos, que incluíam transtorno autista, transtorno de Asperger e transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação, foram unificados dentro do termo TEA (DSM-IV).

O TEA representa uma ampla variedade de manifestações clínicas com diferentes graus de suporte (nível 1 a 3). Os critérios propostos pelo DSM-5 incluem nível 1, que representa que o paciente requer pouco suporte para atividades diárias,

nível 2, que requer suporte substancial e, nível 3, que requer suporte muito substancial. Já as manifestações clínicas incluem déficits na comunicação e interação social, persistentes em diversas situações, acompanhadas por padrões de comportamento, interesses e atividades que são restritos, ritualísticos e repetitivos, formando, então, um conjunto de critérios a serem preenchidos, a fim de se chegar ao diagnóstico (APA, 2013).

Dados dos Estados Unidos apresentados pelo *Central of Disease Control* (CDC) demonstram que a prevalência dos últimos anos está aumentando de forma acelerada. A prevalência do TEA aumentou de 1 em cada 150 crianças (2000-2002), para 1 em 68 crianças (2010-2012), 1 em 59 crianças (2014), 1 em 54 (2020) e estima-se 1 em 36 em 2023 (Maenner et al., 2023).

Apesar da melhor caracterização clínica e maior incidência, o TEA ainda é considerado uma condição médica complexa e atualmente não há estratégias terapêuticas eficazes disponíveis para tratar os principais déficits associados a esse transtorno (Zhang et al., 2017). A intervenção atual baseia-se no suporte inter e multidisciplinar, cujos objetivos são maximizar a independência funcional do indivíduo afetado e minimizar as deficiências e o impacto promovido pelas diversas comorbidades existentes (Lord et al., 2018).

1.1.1 Neuropatologia

Devido à grande heterogeneidade clínica do TEA, não é surpresa que tentativas de identificar uma teoria explicativa única para o autismo tenham sido fracassadas (Levy et al., 2009). Embora a causa do TEA permaneça indefinida, ele é considerado um distúrbio multifatorial que é influenciado por fatores genéticos, ambientais e imunológicos, bem como pelo aumento da vulnerabilidade ao estresse oxidativo (Chauhan e Chauhan, 2006 e 2015).

O estresse oxidativo ocorre quando o nível de espécies reativas de oxigênio (ERO) excede a capacidade dos mecanismos de defesa antioxidante, o que representa uma ameaça às células, causando peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, danos aos ácidos nucleicos e morte celular (Smaga et al, 2015).

O mecanismo de proteção antioxidante é constituído por dois tipos de componentes, um enzimático e o outro não enzimático; no primeiro, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), agem na captura

de radicais superóxido e no peróxido de hidrogênio ou na destruição de peróxidos orgânicos produzidos pelos ácidos graxos; e no segundo, a glutatona (GSH), os grupos sulfidrilas e a vitamina E agem como “neutralizador” de radicais livres (Ortiz et al., 2017).

Em condições fisiológicas normais, as ERO são produzidas em pequenas quantidades, em todas as células, durante as reações de oxidação; as células imunológicas são responsáveis por sua produção, especialmente neutrófilos e macrófagos através dos fagossomas e fagolisossomas leucocitários. No entanto, quando a produção de ERO aumenta ou quando os sistemas de remoção são ineficientes, o resultado é o excesso desses radicais livres levando à condição chamada de estresse oxidativo (Kumar et al., 2013). Este processo está ilustrado na figura 1.

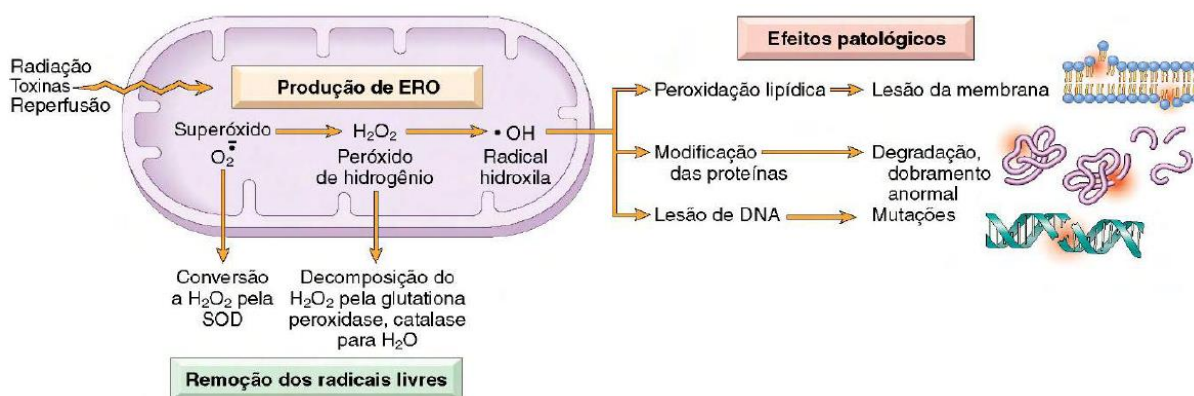


Figura 1: Produção de ERO e efeitos patológicos provocado pelo desequilíbrio redox nas células. A produção de ERO é inerente ao processo de produção de energia. A manutenção da homeostase redox é feita por sistemas enzimáticos especializados que promovem a remoção destas substâncias. Porém, quando há produção excessiva ou remoção inadequada o resultado é acúmulo de radicais livres na célula. Esse acúmulo conduz a lesão de lipídios (por peroxidação), proteínas e DNA, resultando em lesão celular (Adaptado). **Fonte:** Kumar et al., 2013.

De fato, o estresse oxidativo tem sido associado a patogênese de diversas doenças neuropsiquiátricas, incluindo transtorno depressivo maior, transtornos de ansiedade e transtorno obsessivo compulsivo (Wang et al., 2016). Evidências crescentes sugerem um papel do estresse oxidativo no desenvolvimento e manifestação clínica do autismo (Wang et al., 2016).

No estudo de Wang et al. (2016), foi investigado o papel da enzima antioxidante SOD em crianças chinesas com TEA, medindo os níveis séricos circulantes de SOD e comparando-os com crianças com desenvolvimento típico da mesma idade e sexo. O nível sérico da SOD foi significativamente menor em crianças com TEA em

comparação com crianças com desenvolvimento típico. Foi também visto que a SOD sérica foi negativamente correlacionada com sintomas positivos de autismo, sugerindo que os pacientes com TEA, especialmente os com níveis mais graves do transtorno, estavam com altos níveis de estresse oxidativo.

Bjørklund et al. (2020) reafirmaram que a neurobiologia do TEA está associada ao estresse oxidativo, já que afirmam que crianças com diagnóstico de TEA são consideradas mais vulneráveis ao estresse oxidativo devido ao desequilíbrio nos níveis de GSH intra e extracelular e à diminuição da capacidade de reserva de GSH. Vários estudos sugerem que o desequilíbrio redox e o estresse oxidativo são partes integrantes da fisiopatologia do TEA (Chauhan e Chauhan, 2006 e 2015; Bjørklund et al., 2020).

Como tal, a avaliação precoce e o tratamento do estado antioxidante podem resultar em um melhor prognóstico, pois podem diminuir o estresse oxidativo no cérebro antes que ele possa induzir danos cerebrais mais irreversíveis. Além disso, coletivamente, os fatores de risco genéticos, ambientais e imunológicos induzem o dano oxidativo, promovendo o dano neuronal e reduzindo a atividade de metilação durante a síntese da proteína básica da mielina, fundamental para o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (Chauhan e Chauhan, 2006 e 2015).

1.1.2 Tratamento

Apesar do avanço no diagnóstico precoce e nas intervenções terapêuticas comportamentais, ainda não há nenhum tratamento farmacológico disponível até o momento capaz de reverter completamente os sintomas centrais do TEA (Goel et al, 2018). A terapia ocupacional (TO) com foco no comportamento, comunicação e habilidades adaptativas continua sendo a base do tratamento. O objetivo da TO é melhorar as habilidades funcionais e a qualidade de vida do indivíduo (Levy et al., 2009). Dentre os modelos de terapia intervencionista encontram-se a Análise do Comportamento Aplicada (ABA do inglês, *Applied Behavior Analysis*), Tratamento e Educação para Autistas e Crianças com Déficits Relacionados com a Comunicação (TEACCH do inglês, *Treatment and Educational of Autistic and Related Communication-Handicapped Children*) e Abordagem Baseada em Relações de Diferença Individual de Desenvolvimento (do inglês, *Developmental Individual Difference Relations-Ship-Based Approach* ou *Floortime*). Destes, os programas de

intervenções baseadas no ABA são considerados a primeira linha para o tratamento de TEA na infância (Brentani et al., 2013).

Como mencionado previamente, atualmente não existem medicamentos disponíveis para tratar os déficits de comunicação e interação social do TEA, embora o tratamento medicamentoso de crianças e adultos com TEA é prática clínica comum, sendo focado para as comorbidades. Em torno de 45-75% das crianças com TEA são medicadas com fármacos psicotrópicos (Brentani et al., 2013).

Intervenções farmacológicas incluem diferentes classes de medicamentos para tratar as comorbidades associadas ao TEA. Dentre os fármacos incluem-se psicoestimulantes, antipsicóticos atípicos, antidepressivos, agonista alfa-2 adrenérgicos, inibidores da colinesterase, antagonistas do receptor N-Metil-D-aspartato (NMDA) e anticonvulsivantes estabilizadores do humor. É importante ressaltar que estes dois fármacos estão associados a eventos metabólicos adversos, como ganho de peso, dislipidemia e hiperglicemia (Eissa et al., 2018; Goel et al., 2018). Fármacos psicotrópicos são comumente prescritos para sintomas comportamentais, principalmente os antipsicóticos atípicos, como a risperidona, que são eficazes na redução da agressividade, da irritabilidade, dos comportamentos estereotipados e da hiperatividade (Goel et al., 2018).

Neste contexto, a N-acetilcisteína (NAC) é um pré-fármaco de cisteína que é conhecida por seu papel como antídoto contra danos hepáticos induzidos por overdose de acetaminofeno, mantendo ou restaurando as concentrações hepáticas de cisteína, levando à síntese de GSH. A cisteína fornecida pelo tratamento com NAC também pode ser oxidada em cistina, um substrato para o antiportador glutamato-cistina (Hardan et al., 2012). Estudos demonstram que a NAC apresenta propriedades anti-inflamatórias, reduzindo citocinas pró-inflamatórias, além de atuar sobre os efeitos glutamatérgicos e dopaminérgicos (Arent et al., 2012; Hardan et al., 2012). Alguns estudos em pacientes com transtorno bipolar documentaram que a NAC tem efeito antidepressivo (Berk et al., 2008; Berk et al., 2011; Magalhães et al., 2011).

Coletivamente, as propriedades glutamatérgicas e antioxidantes da NAC estimularam o interesse em examinar sua eficácia em outros distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo o TEA. De fato, um estudo randomizado mostrou que a NAC oral melhorou significativamente a irritabilidade em comparação ao placebo em crianças com TEA (Hardan et al., 2012). No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da NAC sobre parâmetros moleculares e comportamentais em modelos animais de

TEA, bem como não há nenhum estudo publicado sobre o efeito da NAC intranasal para o TEA.

1.1.3 A via intranasal e seu potencial na terapia de TEA

Recentemente, a administração intranasal tem recebido atenção como uma via não invasiva para entrega de fármacos ao cérebro, pois a administração intranasal pode transportar substâncias diretamente para o cérebro a partir da cavidade nasal, contornando a barreira hematoencefálica (BHE). Além disso, a administração intranasal pode superar os principais obstáculos farmacocinéticos associados à administração oral de medicamentos, como pH gastrointestinal e enzimas, pode evitar o metabolismo hepático de primeira passagem e reduzir o risco de efeitos colaterais sistêmicos (Kurano et al., 2022).

O epitélio nasal fornece uma superfície de absorção ideal para administração de fármacos devido à sua alta permeabilidade, complexos juncionais intercelulares permeáveis e extensa vascularização; além disso, as vias dos nervos olfatório e trigêmeo que inervam o epitélio nasal fornecem uma rota direta para o cérebro, resultando em maior biodisponibilidade terapêutica no SNC, diminuição dos efeitos colaterais periféricos e dosagem reduzida (Lofts et al., 2022).

A via olfatória se dá através da porção póstero-superior da cavidade nasal, onde se concentram os neurônios olfatórios no epitélio olfatório. Os axônios são agrupados na lâmina própria pelas células olfatórias embainhadas e se projetam diretamente para os bulbos olfativos. Dessa forma, esses axônios formam o nervo olfatório e fornecem uma conexão direta entre o epitélio olfatório e o cérebro. As células olfatórias embainhadas envolvem os neurônios olfatórios e formam um canal contínuo entre a lâmina própria e o espaço subaracnóideo entre os bulbos olfativos (Lofts et al., 2022). Já a via trigeminal acontece através da comunicação dos ramos oftálmico e maxilar do nervo trigêmeo, que inervam a cavidade nasal, com o tronco encefálico. Vários estudos demonstraram o transporte intraneuronal, perineuronal, perivascular e perilinfático de substâncias dentro do nervo trigêmeo após a administração de medicamento intranasal, usando mecanismos de transporte intracelular e extracelular (Lochhead et al., 2012; Lofts et al., 2022).

Atualmente, quatro medicamentos já são estudados para tratamento do TEA via intranasal. O medicamento mais promissor é a ocitocina. Em uma revisão de

literatura, foi sugerido que a ocitocina intranasal a 0,4 UI/kg/dose em crianças e adolescentes com TEA é segura e tem potencial terapêutico (Anagnostou et al., 2014). Também foi feito um estudo piloto cruzado, duplo-cego, de pessoas com TEA de 14 a 29 anos, controlado por placebo e de duas doses de cetamina intranasal, mas nenhum impacto significativo foi observado (Wink et al., 2021). Outro estudo duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, em 30 crianças com TEA, demonstrou um potencial da arginina vasopressina para tratar deficiências sociais (Parker et al., 2019). Ainda, a dopamina intranasal foi testada em 2 modelos distintos de autismo em camundongos, no qual foi observado uma melhora comportamental (Chao et al., 2020).

1.2 MODELO ANIMAL DE AUTISMO

A alta heterogeneidade e complexidade do TEA limita muito o estudo da fisiopatologia do autismo em seres humanos. Além disso, estudos em humanos utilizando métodos de investigação neurofisiológica com eletroencefalografia ou magnetoencefalografia oferecem apenas dados indiretos e inespecíficos acerca do equilíbrio excitatório/inibitório do SNC. Apenas recentemente se tornou possível a avaliação *in vivo* dos níveis de glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) no SNC, através da utilização da ressonância magnética associada a espectroscopia por emissão de pósitrons. Tal método, devido ao seu elevado custo e a necessidade de anestesia geral, torna a sua aplicação dificilmente justificável para fins de pesquisa (Ruggeri et al., 2013).

Dessa forma, a utilização de modelos animais torna factível o estudo das alterações comportamentais encontradas no TEA além da sua relação com a exposição pré-natal a intoxicantes e agentes ambientais, permitindo ainda o estudo direto dos mecanismos moleculares relacionados. De fato, grande parte dos avanços alcançados na compreensão da fisiopatologia do TEA e no desenvolvimento de terapêuticas é atribuído aos modelos animais (Hrabovska e Salyha, 2016).

Entre os modelos animais de indução de TEA, a indução química do transtorno via administração de ácido valpróico (VPA) é um dos mais aplicados e reproduzidos. O VPA tem sido utilizado, há décadas, como medicação anticonvulsivante e como estabilizador do humor (Roullet et al., 2013). O modelo animal, baseia-se na exposição de ratas prenhes ao VPA no 12º dia de gestação (DG), período crítico para a

diferenciação neuronal. Ratas expostas ao VPA no período pré-natal apresentam diminuição da interação social, aumento de comportamentos repetitivos e estereotipados, atrasos no desenvolvimento neurológico e alterações na sensibilidade (Schlickmann e Fortunato, 2013).

Considerando a enorme prevalência do TEA na atualidade, sendo um dos transtornos de neurodesenvolvimento mais comuns, ainda pouco se sabe a respeito das suas causas e do seu tratamento. Assim, percebe-se a necessidade de estudos que avaliem o efeito terapêutico de novos medicamentos, sendo a NAC um potencial tratamento pelos seus efeitos antioxidantes. A aplicação intranasal deste medicamento traz um potencial método de tratamento por ser uma via não invasiva para entrega de drogas ao cérebro, a partir da cavidade nasal, contornando a BHE. Para isso, a avaliação comportamental e de marcadores de estresse oxidativo em ratos expostos a NAC intranasal em um modelo animal de TEA induzido por VPA nos ajuda a avaliar o efeito terapêutico deste medicamento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito terapêutico da NAC intranasal em um modelo animal de TEA induzido por VPA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o peso da prole, realizar o teste de busca pelo ninho e realizar o teste de geotaxia negativa como indicadores de desenvolvimento e crescimento em ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e tratados com NAC intranasal;
- Avaliar o comportamento do tipo autista através do teste de open field e teste das três câmaras em ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e tratados com NAC intranasal;
- Avaliar o sistema de defesa antioxidante (superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e sulfidrilas totais) e danos oxidativos (diclorofluoresceína) em córtex posterior e pré-frontal, hipocampo, estriado e cerebelo de ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e tratados com NAC intranasal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo 62/2022 (Anexo A). Todos os cuidados foram adotados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos.

3.2 ANIMAIS

Neste estudo, foram utilizados 9 fêmeas e 9 machos adultos e 90 filhotes (sendo usados apenas os 40 filhotes machos), totalizando 108 animais. Os animais foram acondicionados em gaiolas (comprimento 41 cm x largura 34 cm x altura 17 cm) com 5 animais cada (exceto no período de acasalamento), sob ciclo de claro e escuro de 12 horas (6:00 às 18:00h), com livre acesso ao alimento padrão para roedores da Nuvelab (NUVITAL) e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em bebedouros para os animais em gaiolas de tamanho padrão do biotério. O ambiente foi mantido à temperatura constante e diária de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. A maravalha que forra as caixas dos animais foi trocada a cada 2 dias e a sala apresenta o sistema de exaustor, de modo a mantê-los com o máximo de conforto possível.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

3.3.1 Fase experimental 1 (geração das proles)

Para sincronizar o período gestacional das fêmeas que foram utilizadas como matrizes, primeiramente foi colocado parte da maravalha da caixa contendo machos à caixa das fêmeas no fim do ciclo claro. Nos 7 dias seguintes foi coletado a secreção vaginal das ratas para verificar o período do ciclo fértil de cada rata. A secreção foi coletada com pipeta, através de um lavado com 80 μL de salina no orifício vaginal da rata e avaliado em microscópio (40x) para verificar o padrão de células encontradas. Quando encontrado o padrão de células que correspondem a fase estro, a rata foi

acasalada com um rato e, na manhã seguinte ao acasalamento, foi realizado um outro lavado vaginal com salina para verificar a presença de espermatozoides. Quando encontrado, foi considerado o dia 0,5 embrionário, e então a rata foi isolada e denominada matriz.

No 12º dia de gestação, conforme esquematizado na figura 2, as matrizes foram divididas em dois grupos: grupo VPA-expostos, que receberam uma administração intraperitoneal (i.p.) em dose única de 600 mg/kg de VPA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dissolvida em salina a 0,9%, pH 7,4, e grupo SAL-expostos, sendo o grupo controle, que recebeu uma injeção de salina i.p.. Com relação ao número de animais para acasalamento, previu-se aproximadamente 4 filhotes (2 fêmeas e 2 machos) por prole do grupo VPA e 8 filhotes por prole (4 fêmeas e 4 machos) do grupo salina. O modelo animal prevê a utilização somente de machos, uma vez que as fêmeas não reproduzem bem o comportamento tipo-autista (Anshu et al., 2017).

As fêmeas matrizes e as fêmeas da prole foram eutanasiadas após o desmame, visto que foram expostas ao VPA ou à salina durante a gestação. Os animais adultos machos utilizados no acasalamento foram devolvidos ao biotério, pois não foram expostos a nenhuma droga ou protocolo experimental.

3.3.2 Fase experimental 2 (tratamento das proles)

Após o nascimento, no 21º dia pós-natal (DPN), os 40 animais machos foram desmamados e subdivididos em 4 grupos com 10 machos cada.

3.3.2.1 Protocolo de tratamento NAC intranasal

Os animais foram tratados com NAC (solução salina no grupo controle) diário por 15 dias, do 21º ao 35º DPN. A exposição diária de NAC, via intranasal, foi de 100 µg (8µl de NAC dissolvido em 992 µL de salina 0,9%, em uma solução de 800 µg/ml de NAC). Foram divididos em quatro grupos, conforme tabela 1. Posteriormente foram analisados parâmetros comportamentais e bioquímicos no córtex posterior, pré-frontal, hipocampo, estriado e cerebelo.

Tabela 1 - Divisão em 4 grupos: tratamento com NAC intranasal.

Grupos	Rata Prenha 12º Dia Gestação (i.p.)	Prole 21º-35º DPN (i.n.)	Prole (n)
1	Salina	Salina	10
2	Salina	NAC 100 µg	10
3	VPA	Salina	10
4	VPA	NAC 100 µg	10
		TOTAL	40

DPN: dia pós natal; i.n.: intranasal; i.p.: intraperitoneal; n: número; NAC: n-acetilcisteína; µg: microgramas; VPA: ácido valpróico.

Para avaliar os indicadores de desenvolvimento e crescimento, foi registrado o peso dos animais nos DPN 9, 17, 21 ao 35, bem como foi realizado o teste de busca pelo ninho em DPN 10 e realizado o teste de geotaxia negativa no DPN 15. No DPN 36 os grupos experimentais foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação do comportamento social, atividade locomotora, comportamento estereotípico e comportamento repetitivo. No DPN 36, após o último teste comportamental, os animais foram eutanasiados por decapitação, no qual foram retiradas amostras de tecido cerebral dos 40 animais para as análises bioquímicas. A figura 2 apresenta a linha do tempo e um resumo de todo desenho experimental e análises realizadas.

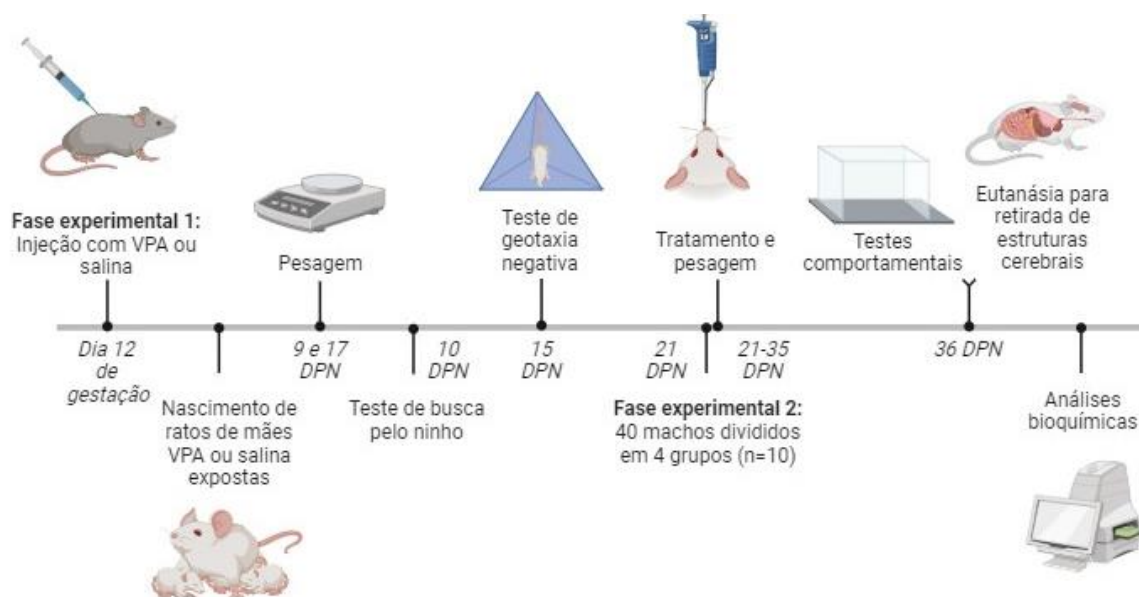


Figura 2: Representação esquemática do desenho experimental. Na fase experimental 1, foi realizado o modelo animal de TEA, com injeção de VPA ou salina no 12º dia de gestação. Houve o nascimento de ratos de mães VPA ou salina expostas. Para avaliar os indicadores de desenvolvimento e crescimento, foi registrado o peso dos animais nos DPN 9, 17, 21 ao 35, bem como foi realizado o teste de busca pelo ninho em DPN 10 e realizado o teste de geotaxia negativa no DPN 15. No DPN 36 os grupos experimentais foram submetidos aos testes comportamentais e, após o último teste comportamental, os animais foram eutanasiados por decapitação, no qual foram retiradas amostras de tecido cerebral dos 40 animais para as análises bioquímicas. DPN: dia pós natal, n: número, VPA: ácido valpróico.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Teste de busca pelo ninho

No DPN 10 os animais foram submetidos ao teste que avalia perfil olfatório (Gregory e Pfaff, 1971). Em uma gaiola de rato, adiciona-se de um lado maravalha com odor da caixa original e de outro lado, maravalha estéril. Entre as duas maravalhas, no centro, deixa-se livre 6 cm da caixa. O animal é inserido nesse local livre de maravalha com a cabeça voltada para o pesquisador e então é contabilizado o tempo que o animal precisa para tomar uma atitude e o tempo para chegar em uma das maravalhas.

3.4.2 Teste geotaxia negativa

No DPN 15 os animais dos quatro grupos foram colocados em uma rampa com 45 graus de inclinação, com a cabeça direcionada para baixo (Staubli e Houston, 1979). Foi registrado o tempo que cada animal leva para virar para a posição oposta, ou seja, com a cabeça voltada para cima. 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

3.4.3 Teste do *open field*

No DPN 36, os ratos foram submetidos ao teste de *open field* ou campo aberto. A partir deste teste, foi possível avaliar a atividade locomotora e exploratória, bem como comportamento ansioso dos animais, conforme descrito por Novas et al. (1988) e adaptado. No interior do campo aberto, com o piso marcado em 9 quadrantes, o animal foi colocado em um dos vértices do aparato e durante 5 minutos foram contabilizados quantas vezes o animal mudou de quadrante (locomução e comportamento ansioso) e quantas vezes se posicionou sobre as patas traseiras (comportamento exploratório).

3.4.4 Teste das três câmaras

No DPN 36 foi realizado o teste das três câmaras. O teste, adaptado de Kaidanovich-Beilin et al. (2011), é baseado na tendência natural que os roedores têm de investigar animais considerados desconhecidos e intrusos. Os animais foram inseridos em um aparato composto por 3 câmaras (120x40x40cm) de acrílico conectadas com divisórias removíveis. Primeiramente, o rato foi colocado na câmara central para habituação por 5 min. Após a habituação, um rato desconhecido pelo rato teste (rato 1) foi colocado em uma gaiola pequena na câmara esquerda, enquanto a câmara direita permanece apenas com a gaiola vazia, e as divisórias foram removidas para que o rato teste pudesse explorar livremente as três câmaras por 10 minutos. Depois deste tempo, o rato teste foi colocado na câmara central, fechada pelas divisórias e um segundo rato desconhecido (rato 2) foi inserido na câmara direita. Após isso, as divisórias foram removidas para que o animal teste explorasse o aparato por

mais 10 minutos. Após o fim do teste, o aparato era limpo com álcool 70% seguido de álcool 10% e o animal voltava para sua caixa de origem. Foram registrados os seguintes parâmetros: latência para o primeiro encontro com o rato 1 e rato 2, o número de encontros com rato 1 e rato 2 em cada uma das fases, o tempo de interação com o rato 1 e com o rato 2 e o tempo gasto em cada câmara (direita, esquerda e central).

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os 40 animais advindos das proles foram eutanasiados por decapitação por guilhotina após o último teste comportamental. Estruturas cerebrais (córtex posterior e pré-frontal, hipocampo, estriado e cerebelo) foram dissecadas e armazenadas em freezer a -80°C para posterior análise de parâmetros de estresse oxidativo.

3.5.1 Diclorofluoresceína (DCFH)

A produção de espécies reativas em cérebros submetidos à exposição ao VPA pré-natal foi determinada de acordo com o método de LeBel et al., utilizando-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA). Às alíquotas de amostras (80 µg de proteína) previamente homogeneizadas, foram adicionadas diacetato do 2',7'-diclofluoresceína (DCF), a qual é permeável à membrana celular, sendo as alíquotas incubadas durante 30 minutos à 37°C. No meio intracelular, esterases clivaram o grupamento acetato do DCF-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidaram o DCFH, produzindo o produto fluorescente DCF. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 (excitação) e 535 nm (emissão). A curva de calibração foi realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 µM) e os resultados foram expressos como pmol de DCF.mg de proteína-1.

3.5.2 Glutathiona redutase (GR)

Para determinar a glutathiona total, um fragmento do tecido cerebral foi desproteinizado com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 minutos a 1000g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação conteve tampão fosfato 100mmol/L (pH 7,2), NADPH 2 mmol/L, glutathiona redutase

0,2 U/mL, ácido ditionitrobenzóico 70 $\mu\text{mol/L}$. Na determinação da glutathiona reduzida, o sobrenadante neutralizado reagiu com ácido ditionitrobenzóico 70 $\mu\text{mol/L}$ e foi lido no espectrofotômetro a 420nm.

3.5.3 Medida de sulfidrilas totais

Este método determina quantidade de sulfidrilas não oxidadas que estão presentes nos aminoácidos. Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery. A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto; o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo, o ácido 5-tio-2- nitrobenzóico (TNB), lido a 412 nm em espectrofotômetro. Com isso, o método determina os tióis totais (TT) da amostra.

3.5.4 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

Primeiramente foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Foram adicionados à amostra catalase 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente a 480 nm a temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína (Bannister e Calabrese, 1987).

3.5.5 Atividade da catalase (CAT)

As amostras foram suspensas em tampão PBS e uma alíquota desta suspensão foi diluída em tampão CAT, posteriormente uma alíquota desta diluição foi novamente diluída em tampão CAT. Após centrifugação da solução resultante, o meio reacional foi preparado com a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 8,8 M e tampão CAT. O branco foi preparado sem a adição de H_2O_2 e a atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm a temperatura ambiente nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos. A atividade da CAT foi expressa em U/mg de proteína (Aebi, 1984).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad versão 7.0. Para as comparações entre os grupos foi utilizada a análise ANOVA de uma via, seguido de post hoc de *Newman-keuls*, e entre dois grupos o *test T*. Para as análises comportamentais foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas em * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4. RESULTADOS

Os animais foram monitorados quanto ao ganho de peso ao longo dos 36 dias de experimento. A figura 3 apresenta o ganho de peso nos dias experimentais DPN 9, 17, 21, 23, 26, 29, 32 e 35. Na análise do peso da prole foi observado que ao longo de todo o período experimental não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos experimentais.

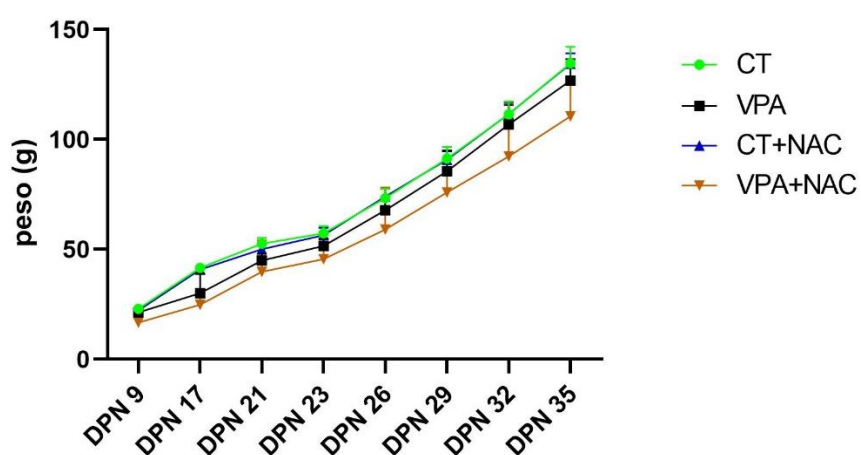


Figura 3: Peso dos animais nos dias experimentais DPN 9, 17, 21, 23, 26, 29, 32 e 35 nos grupos controle, e nos submetidos ao modelo animal de TEA com VPA, no controle com NAC (100 µg) e no VPA com NAC. Dados expressos como média ± desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de *Newman-keuls*. CT: controle; DPN: dia pós natal; g: gramas; NAC: n-acetilcisteína; VPA: ácido valpróico.

O teste de geotaxia negativa avalia o neurodesenvolvimento dos animais através da capacidade de perceber a inclinação do ambiente e se virar para a inclinação positiva. Como demonstrado na figura 4, observou-se que o grupo tratado com VPA levou mais tempo na aquisição de uma posição contrária ($p < 0,01$).

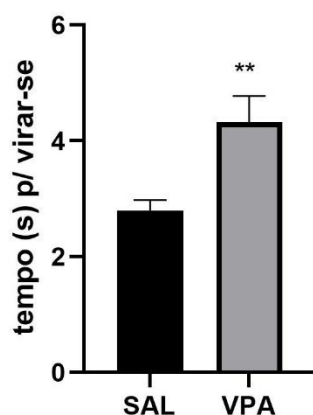


Figura 4: Tempo expresso em segundos, que os animais do grupo controle e do grupo VPA levaram para adotar uma posição contrária no teste de geotaxia negativa. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através do test T, $**p<0,01$. S: segundos; SAL: salina; VPA: ácido valpróico.

Na resposta a busca pelo ninho, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas na discriminação olfativa entre os filhotes do grupo controle (CT) e VPA. Os animais do grupo VPA tiveram um tempo maior para reconhecer o ninho doméstico e virar-se em direção a ele quando comparado ao grupo CT ($p<0,05$) (figura 5). Analisando o tempo de chegada no ninho (figura 6), o grupo VPA também apresentou tempo total para chegar no ninho familiar ($p<0,0001$) significativamente maior quando comparado ao grupo CT.

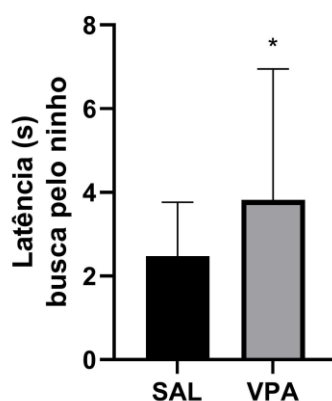


Figura 5: Latência em segundos no teste de busca pelo ninho, entre o grupo controle e o grupo VPA. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através do test T, $*p<0,05$. S: segundos; SAL: salina; VPA: ácido valpróico.

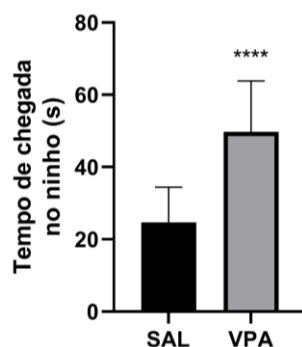


Figura 6: Tempo de chegada no ninho em segundos, no teste de busca pelo ninho, entre o grupo controle e o grupo VPA. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através do test T, **** $p < 0,0001$. S: segundos; SAL: salina; VPA: ácido valpróico.

Com relação à atividade locomotora, que foi avaliada pelo teste de campo aberto ou *open field*, foram registrados os dados referentes ao número de levantadas (figura 7A) e de cruzamentos (figura 7B). Os dados coletados e analisados demonstraram uma redução do número de levantadas estatisticamente significativa nos grupos tratados com VPA ($p < 0,05$), CT + NAC ($p < 0,01$) e VPA + NAC ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo CT. Também houve uma redução estatisticamente significativa no grupo VPA + NAC comparado ao grupo VPA ($p < 0,05$). Já sobre o número de cruzamentos, não houve diferença significativa entre os grupos.

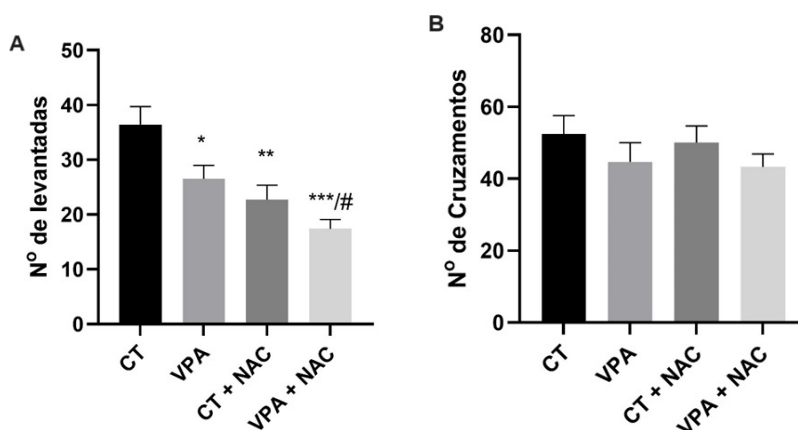


Figura 7: Efeito no comportamento locomotor e exploratório, através do teste do campo aberto, dos animais testados. Para avaliar a locomoção foram utilizados número de levantamentos (A) e número de cruzamentos (B). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de *Newman-keuls*, com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e # $p < 0,05$. CT: controle; Nº: número; NAC: n-acetilcisteína; VPA: ácido valpróico.

A figura 8 apresenta os dados do teste das três câmaras, realizado em DPN 36, que avalia a sociabilidade e interesse em novidade social em modelos de roedores de distúrbios do SNC.

Com relação aos dados de sociabilidade, onde a referência para interações é o rato 1 (rato desconhecido), foram registrados os seguintes parâmetros: latência para o primeiro encontro com o rato 1 (figura 8 A), o número de encontros com rato 1 (fase 1 e 2) (B), o tempo de interação com o rato 1 (C) e o tempo gasto na câmara esquerda com o rato 1 (D). Na avaliação da latência do primeiro encontro, foi observado um significativo aumento temporal nos ratos expostos ao VPA durante a gestação ($p < 0,05$) comparado ao grupo CT. Observou-se uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) no número de encontros com o rato 1 nos grupos tratados com VPA, CT + NAC e VPA + NAC quando comparados ao grupo CT. Ainda, observou-se que os ratos expostos ao VPA ($p < 0,01$), CT + NAC ($p < 0,01$) e VPA + NAC ($p < 0,001$) tiveram uma redução significativa no tempo total de interação com o rato 1 quando comparados ao grupo CT.

Na análise do tempo total que o animal teste permanece na câmara esquerda (câmara onde está o rato desconhecido 1), houve uma redução significativa na fase 2 comparado a fase 1 no grupo CT ($p < 0,0001$), CT + NAC ($p < 0,05$) e VPA + NAC ($p < 0,05$), demonstrando que os roedores controle preferiram passar mais tempo com o rato 2, e que a NAC melhorou esse parâmetro, o que indica boa sociabilidade e novidade social. Não houve diferença significativa no grupo VPA, indicando déficit no reconhecimento do rato desconhecido 1

Com relação aos dados de novidade social, onde a referência para interações é o rato desconhecido 2, foram registrados os seguintes parâmetros: número de encontros com o rato 2 (figura 8E), o tempo de interação com o rato 2 (figura 8F) e a latência para o encontro com o rato 2 (figura 8G).

Quando se analisou o número de encontros com o rato 2 (figura 8E), houve uma redução significativa no número de encontros nos grupos VPA ($p < 0,01$), comparado ao grupo CT. Interessantemente, os grupos CT + NAC ($p < 0,01$) e VPA + NAC ($p < 0,001$) também apresentaram uma diminuição significativa quando comparado ao grupo CT. Fato semelhante foi observado no tempo total de interação com o rato 2, em que houve uma redução significativa nos grupos VPA ($p < 0,05$), comparado ao grupo CT, evidenciando mais uma vez a validade no modelo de autismo induzido por VPA. No entanto, os grupos CT + NAC ($p < 0,01$) e VPA + NAC ($p < 0,01$)

mantiveram o mesmo déficit. Já no parâmetro que avalia a latência para primeiro encontro com o rato 2, não houve alteração significativa entre os grupos.

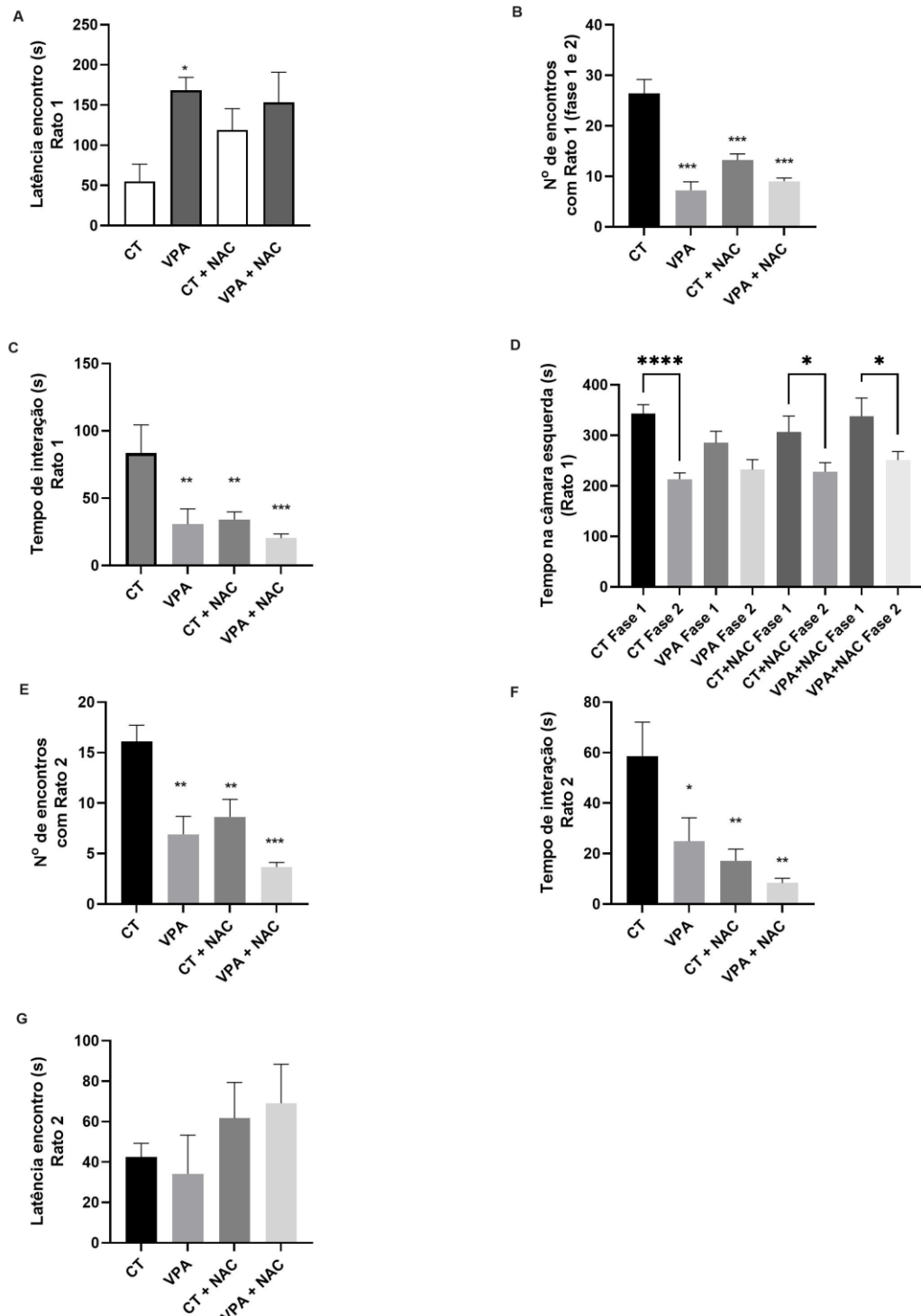


Figura 8: Teste das três câmaras. (A) Latência do primeiro encontro com rato 1. (B) Número de encontros com rato 1 (fase 1 e fase 2). (C) Tempo total de interação com rato 1. (D) Tempo total na câmara esquerda (rato 1). (E) Número de encontros com rato 2. (F) Tempo total de interação com rato 2. (G) Latência do primeiro encontro com rato 2. Dados expressos como média ± desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de post hoc de *Newman-keuls*, com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. CT: controle; N°: número; NAC: n-acetilcisteína; s: segundos; VPA: ácido valpróico.

Para análise de parâmetros de estresse oxidativo, foram avaliadas a atividade antioxidante através da dosagem da SOD, CAT, sulfidrilas e GSH e dos danos oxidativos através da DCF, em córtex posterior e pré-frontal, hipocampo, estriado e cerebelo, de ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e tratados com NAC intranasal.

Na figura 9, estão apresentados os dados da atividade da SOD no homogeneizado cerebral. No córtex pré-frontal (figura 9B), houve aumento da atividade antioxidante no grupo SAL+NAC ($p<0,05$) e VPA+NAC ($p<0,01$) comparado ao grupo SAL; além disso também houve um aumento significativo no grupo VPA+NAC comparado ao grupo VPA ($p<0,05$), demonstrando um aumento na atividade antioxidante após o uso de NAC. No cerebelo (figura 9E), também houve aumento da SOD no grupo SAL+NAC comparado ao grupo SAL ($p<0,01$). No córtex posterior (figura 9A), hipocampo (figura 9C) e estriado (figura 9D) não houveram alterações significativas da atividade da SOD.

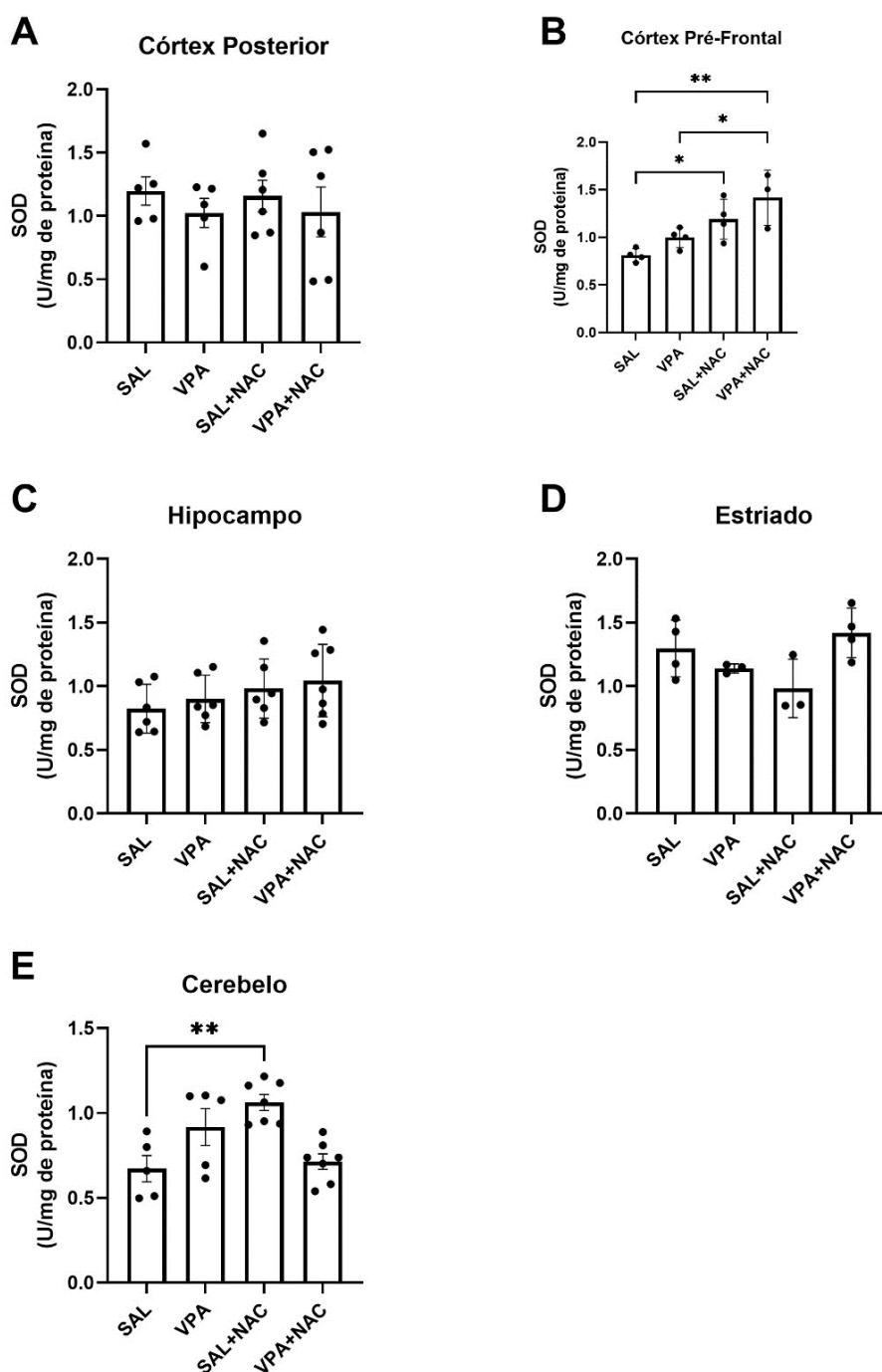


Figura 9: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com NAC intranasal, na concentração de superóxido dismutase (SOD), no cérebro em região de córtex posterior (A) e pré-frontal (B), hipocampo (C), estriado (D) e cerebelo (E) dos animais testados. A atividade da SOD foi avaliada em U/mg de proteína. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de *Newman-keuls*, com $*p < 0,05$ e $**p < 0,01$. NAC: n-acetilcisteína; SAL: salina; SOD: superóxido dismutase, VPA: ácido valpróico.

Quanto a enzima antioxidante CAT, na figura 10 observa-se que no córtex posterior (figura 10A) e no cerebelo (figura 10E), houve redução da atividade antioxidante no grupo VPA comparado ao grupo SAL ($p < 0,05$ no córtex e $p < 0,01$ no

cerebelo). Já no hipocampo, a administração de NAC aumentou a atividade da CAT no grupo VPA+NAC comparado ao grupo VPA ($p<0,05$). Córtex pré-frontal (figura 10B) e estriado (figura 10D) não apresentaram alterações significativas da atividade da CAT.

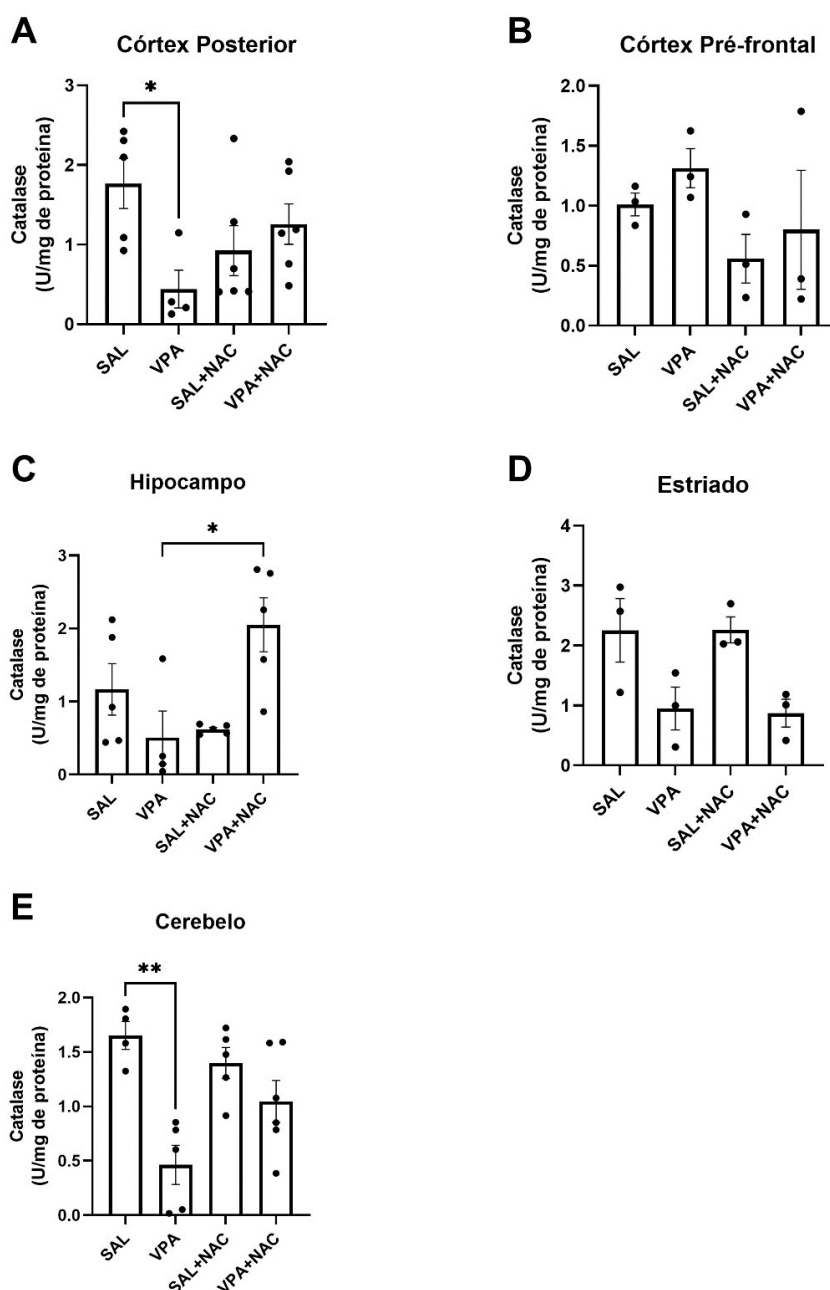


Figura 10: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com NAC intranasal, na concentração da catalase, no cérebro em região de córtex posterior (A) e pré-frontal (B), hipocampo (C), estriado (D) e cerebelo (E) dos animais testados. A atividade da catalase foi avaliada em U/mg de proteína. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de *Newman-keuls*, com $*p<0,05$ e $**p<0,01$. NAC: n-acetilcisteína; SAL: salina; VPA: ácido valpróico.

Em relação a atividade de GR, na figura 11 pode-se observar que no córtex posterior (figura 11A) houve redução da atividade antioxidante no grupo VPA comparado ao grupo SAL ($p<0,05$). As demais estruturas não apresentaram alterações significativas da atividade da GR.

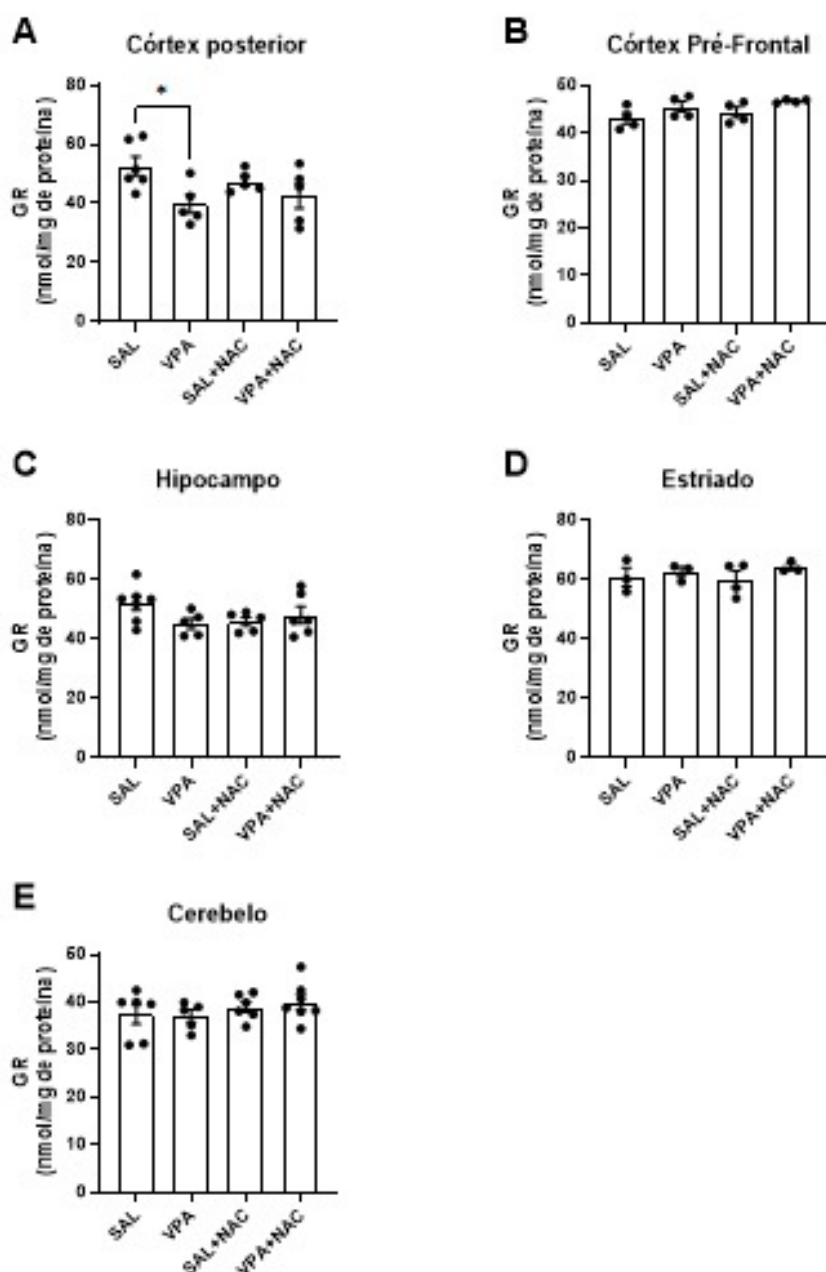


Figura 11: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com NAC intranasal, em níveis de glutatona redutase (GR), no cérebro em região de córtex posterior (A) e pré-frontal (B), hipocampo (C), estriado (D) e cerebelo (E) dos animais testados. A atividade da GR foi avaliada em nmol/mg de proteína. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de *Newman-keuls*, com $*p<0,05$. GR: glutatona redutase, NAC: n-acetilcisteína; SAL: salina; VPA: ácido valpróico.

Com relação a formação de ERO, avaliada pela produção de DCF (figura 12), não houve diferença estatística entre os grupos em nenhuma das estruturas analisadas.

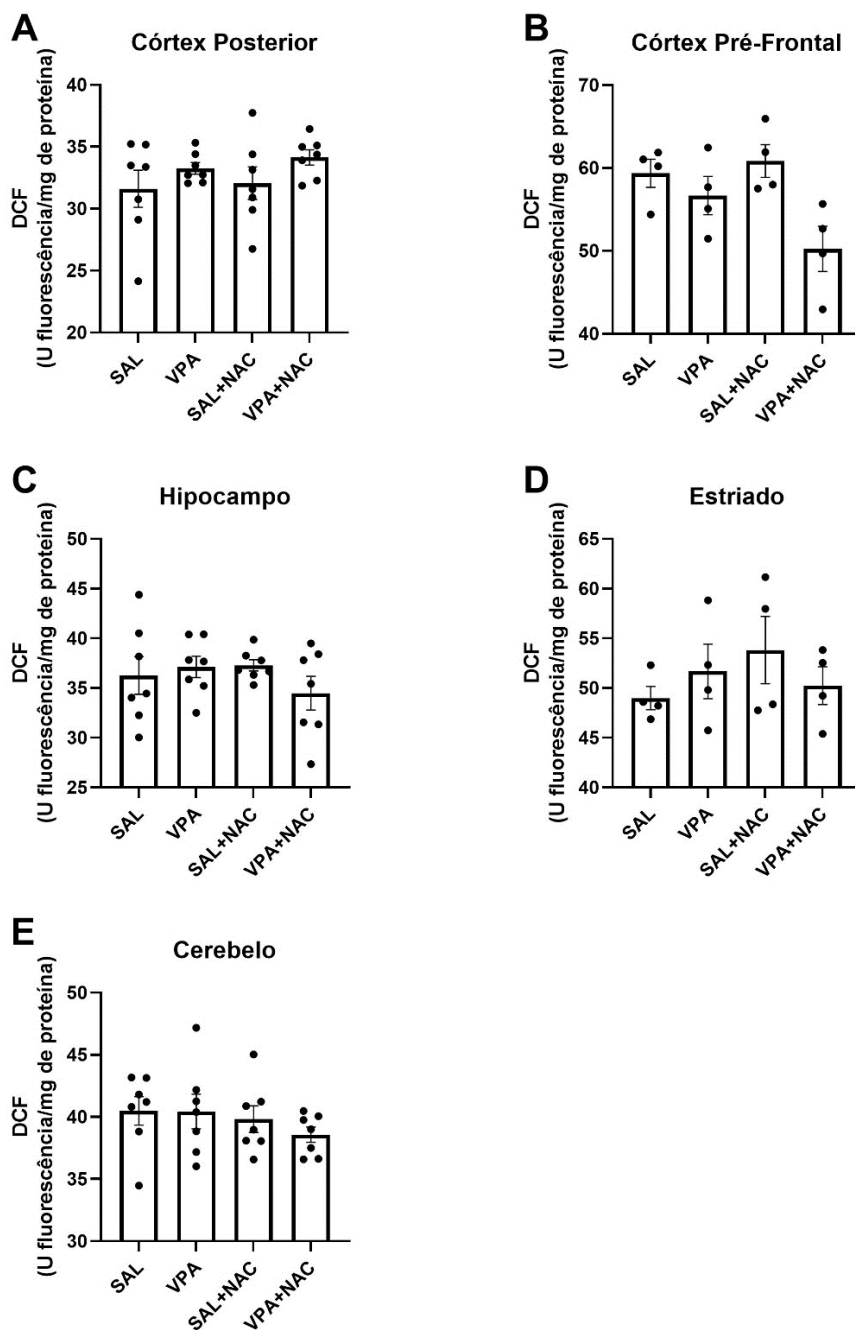


Figura 12: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com NAC intranasal, em níveis de DCF, no cérebro em região de córtex posterior (A) e pré-frontal (B), hipocampo (C), estriado (D) e cerebelo (E) dos animais testados. A atividade da DCF foi avaliada em U fluorescência/mg de proteína. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de *Newman-keuls*. DCF: diclofluoresceína, NAC: n-acetilcisteína; SAL: salina; VPA: ácido valpróico.

Quanto ao conteúdo de sulfidrilas (figura 13), não houve diferença estatística entre os grupos, no entanto foi observado uma tendência estatística ($p=0,08$) de redução no conteúdo de sulfidrilas no grupo VPA quando comparado ao grupo SAL, em hipocampo (figura 13C).

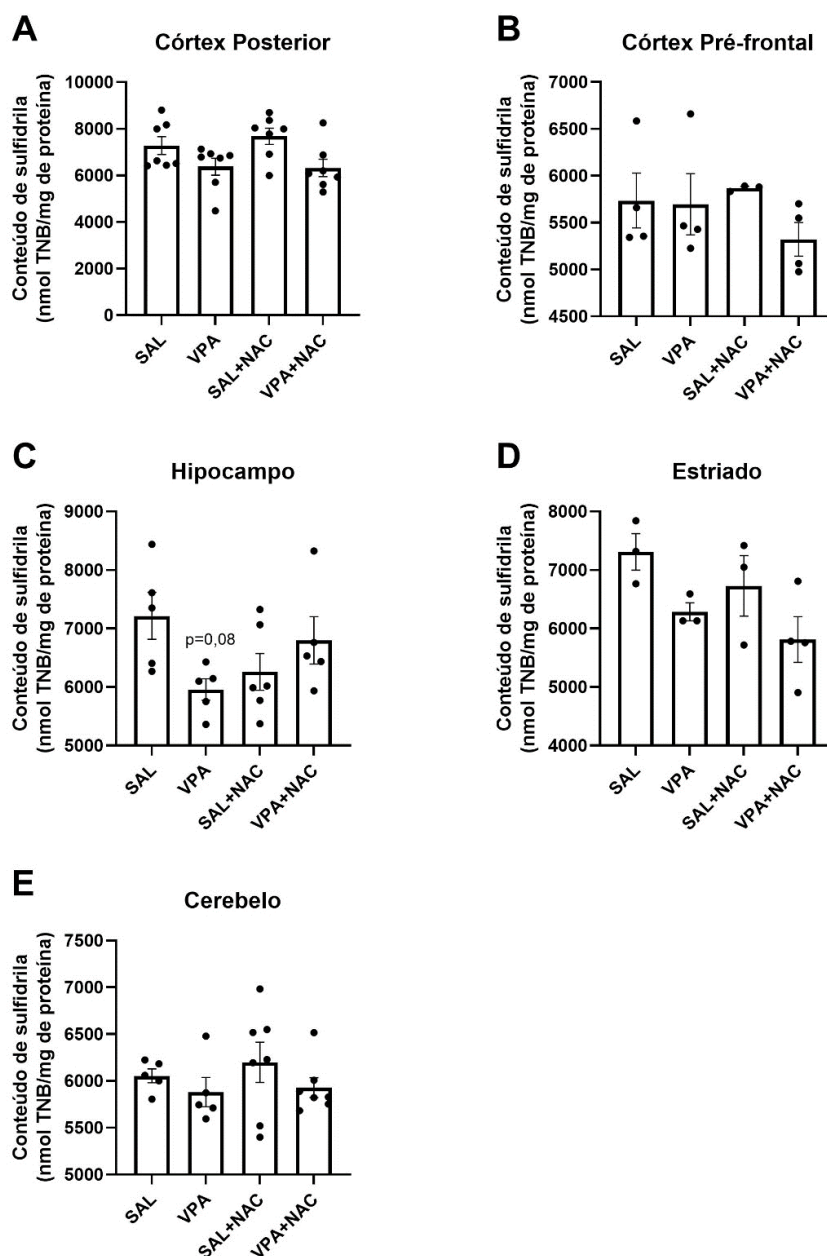


Figura 13: Efeito da exposição pré-natal ao VPA, e posterior tratamento com NAC intranasal, em conteúdo de sulfidrilas no cérebro em região de córtex posterior (A) e pré-frontal (B), hipocampo (C), estriado (D) e cerebelo (E) dos animais testados. O conteúdo de sulfidrilas foi avaliado em nmol ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) /mg de proteína. Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância one-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de *Newman-keuls*. NAC: n-acetilcisteína; SAL: salina; TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, VPA: ácido valpróico.

5. DISCUSSÃO

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por interação social e comunicação prejudicadas, além de padrões de comportamento restritos, repetitivos e estereotipados (APA, 2013). Dados dos Estados Unidos apresentados pelo CDC demonstram que a prevalência em 2023 é de 1 em 36 indivíduos (Maenner et al., 2023). Embora a causa do autismo permaneça indefinida, acredita-se que o distúrbio seja multifatorial, influenciado por fatores genéticos, ambientais e imunológicos, bem como pelo aumento da vulnerabilidade ao estresse oxidativo (Chauhan e Chauhan, 2006 e 2015).

A proposta deste estudo foi avaliar o efeito terapêutico da NAC intranasal em um modelo animal de TEA induzido por VPA, em parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo no cérebro de ratos jovens. Os modelos animais são fundamentais para a pesquisa por mimetizarem algumas características elementares de determinado estado patológico específico e reduzir o número de variáveis, assim, pode-se ter maior grau de controle experimental (Arruda et al., 2011).

Os dados do presente estudo mostram claramente um prejuízo no neurodesenvolvimento causados pela exposição pré-natal ao VPA. Neste estudo foi avaliado o neurodesenvolvimento dos animais através do teste de geotaxia negativa e busca pelo ninho, como forma de mensurar as possíveis implicações da exposição ao VPA durante a gestação. O teste de geotaxia negativa avalia o neurodesenvolvimento dos animais através da capacidade de perceber a inclinação do ambiente e se virar para a inclinação positiva (Staubli e Houston, 1979) e foi observado que o grupo tratado com VPA pré-natal levou mais tempo na aquisição de uma posição contrária.

O aumento no tempo necessário para reorientar no plano inclinado em roedores tratados com VPA pode ser devido aos efeitos deletérios do VPA no hipocampo e no desenvolvimento cerebelar (Yochum et al., 2008). A geotaxia é considerada uma ferramenta importante na análise comportamental do animal (Alberts et al., 2004) e é o teste mais amplamente empregado para avaliar o desenvolvimento da habilidade motora (Schneider et al., 2006). Vários estudos relatam a geotaxia negativa como um componente importante na avaliação de diferentes distúrbios neurológicos (Santos et al., 2007; Bouslama et al., 2007) e do neurodesenvolvimento (Schneider et al., 2006; Wagner et al., 2006).

Em estudo conduzido por Nakasato et al. (2008), onde foi avaliado se os ratos expostos ao VPA eram válidos como modelo de roedor de autismo, foi realizado o teste de geotaxia negativa para verificar o desenvolvimento da função motora dos animais e observou-se um comprometimento no desenvolvimento motor dos animais através do aumento da latência para os animais expostos ao VPA girarem a cabeça para o lado oposto em comparação ao grupo CT. Ruhela et al. (2019) também avaliaram o papel da geotaxia negativa como uma marca de comportamento precoce do autismo, e observaram que o grupo CT apresentou diminuição no tempo de rotação de 180 graus, quando colocado em um plano inclinado com a cabeça voltada para baixo em comparação ao grupo tratado com VPA pré-natal.

Outro importante teste que avalia padrões de neurodesenvolvimento com foco no amadurecimento do sistema olfatório é o teste da busca pelo ninho. Vários estudos utilizam este teste em pesquisas com animais expostos ao VPA e observam consistentemente que o grupo de animais VPA-expostos exibem um aumento na latência para encontrar o ninho doméstico/familiar em comparação ao grupo CT (Schneider e Przewlocki, 2005; Rouillet et al., 2010; Favre et al., 2013; Ruhela et al., 2019).

Corroborando com a literatura, os dados do presente estudo também observaram déficits estatisticamente significativos na discriminação olfativa dos filhotes do grupo VPA quando comparado ao grupo CT. O olfato tem sido associado ao desenvolvimento do comportamento social (orientação, agrupamento e sucção) em filhotes de ratos (Terry e Johanson, 1996). Schneider e Przewlocki (2005) relataram que ratos expostos ao VPA apresentaram maturação atrasada (abertura tardia dos olhos), menor peso corporal, desenvolvimento motor atrasado e resposta de busca de ninho atrasada.

Ainda, no presente estudo, de maneira geral, ao longo de todo o período experimental não foram encontradas diferenças estatísticas em relação ao peso em nenhum dos grupos analisados. Este resultado demonstra que o tratamento e a manipulação dos animais não afetou o consumo alimentar, mantendo o peso entre os grupos.

A partir do teste de campo aberto é possível avaliar a atividade locomotora e exploratória, bem como comportamento ansioso dos animais. Os dados deste estudo demonstraram uma redução do número de levantadas estatisticamente significativa nos grupos tratados com VPA, CT + NAC e VPA + NAC quando comparados aos ratos

expostos ao CT no período pré-natal, bem como houve uma redução estatisticamente significativa no grupo VPA + NAC comparado ao grupo VPA. Já sobre o número de cruzamentos, não houve diferença significativa entre os grupos.

Dados na literatura encontraram resultados semelhantes. Em 2019, Zhang e colaboradores analisaram a administração i.p. pós-natal de NAC em camundongos haploinsuficientes *Slc13a4* e viram que no teste de campo aberto, camundongos que foram expostos à NAC apresentaram menos *rearings* quando comparados com os não-expostos. Foi demonstrado que o tratamento com NAC reverte comportamentos locomotores anormais, incluindo atividade repetitiva/estereotípica em ratos expostos ao VPA no período pré-natal, em comparação a prole de VPA-expostos não tratados. Os efeitos benéficos da NAC nos déficits induzidos pelo TEA podem ser associados às suas propriedades antioxidantes, resultando na restauração da homeostase redox no cérebro. O estudo de Zhang et al. (2017) também evidenciou que a NAC atenuou a atividade repetitiva e estereotipada em ratos expostos ao VPA, e considera que seja por uma diminuição na hiper-reatividade ao estresse. O mais comum a ser encontrado no teste de campo aberto é que animais expostos ao VPA apresentem maior locomoção e comportamento exploratório, o que foi comprovado no estudo de Leão et al. (2021), em que camundongas fêmeas expostas ao VPA *in utero* apresentaram comportamento locomotor e exploratório mais intenso do que os controle.

O TEA também 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” (Schultz et al., 2000). Existe uma tendência natural dos roedores de investigar animais considerados desconhecidos e intrusos. Os roedores normalmente preferem passar mais tempo com outro roedor (teoria da sociabilidade), preferindo interagir com um novo rato do que com um já “familiar” (teoria da novidade social) (Kaidanovich-Beilin et al., 2011). Com base nessas premissas, o teste das três câmaras pode ajudar a identificar roedores com déficits de sociabilidade e/ou novidade social.

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, que é o comprometimento na sociabilidade (Rein et al., 2020).

No parâmetro tempo na câmara esquerda, animais expostos à NAC apresentaram uma melhora nesse parâmetro, o que indica boa sociabilidade e novidade social. O que também foi comprovado no estudo de Zhang et al. (2023), com modelos experimentais de VPA tratados com NAC i.p., em que no teste das três câmaras foi visto que o grupo controle estava mais interessado em elementos novos, assim como o grupo NAC. No estudo de Zhang et al. (2023) também, o grupo VPA + NAC teve um tempo maior gasto na câmara do rato estranho 1 do que gasto na câmara vazia, além de o tempo gasto na câmara do rato estranho 2 ter sido maior que o do rato estranho 1.

Além do déficit comportamental, os indivíduos com TEA também apresentam alterações a nível molecular, como um aumento da inflamação e estresse oxidativo (Chauhan e Chauhan, 2006 e 2015). O estresse oxidativo ocorre quando o nível de ERO excede a capacidade dos mecanismos de defesa antioxidante, causando peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, danos aos ácidos nucleicos e morte celular (Smaga et al, 2015). Evidências crescentes sugerem um papel do estresse oxidativo no desenvolvimento e manifestação clínica do TEA (Wang et al., 2016).

O cérebro é extremamente vulnerável ao estresse oxidativo devido à sua limitada capacidade antioxidante, alta demanda de energia e alto teor de lipídios insaturados e ferro. O tecido cerebral mostrou níveis aumentados de marcadores de dano oxidativo, juntamente com diminuição do status antioxidante no cérebro de indivíduos com TEA em comparação com pessoas com desenvolvimento típico da mesma idade. Ainda, as crianças são mais vulneráveis ao estresse oxidativo do que os adultos por causa de seus níveis naturalmente baixos de GSH, além da diminuição de outros antioxidantes como a SOD e a CAT, o que pode resultar em distúrbios do neurodesenvolvimento, como o TEA (Bjørklund et al., 2020; Liu et al., 2022).

Acredita-se que o principal mecanismo responsável por todos os efeitos negativos da exposição pré-natal ao VPA parece ser a inibição das histonas desacetilases. Estudos em animais mostram redução na expressão de genes envolvidos no comportamento social e aumento de citocinas hipocâmpais (Błaszczuk et al., 2022). Experimentos obtidos de embriões pós-implantação de camundongos expostos a VPA (0,6 mM que corresponde a 400 mg/kg *in vivo*) apontam o estresse

oxidativo como um fator envolvido nos defeitos do tubo neural. As concentrações de ERO foram significativamente aumentadas na região da cabeça, bem como os marcadores apoptóticos (Tung e Winn, 2011).

De fato, no cérebro de um ser humano saudável, as células endoteliais cerebrais possuem um sistema de defesa contra o estresse oxidativo, incluindo GSH, GPx, GR e CAT, que estão em níveis aumentados nesta região em comparação com o resto do cérebro (Bjørklund et al., 2020). Foi demonstrado que a GSH, em particular, desempenha um papel importante na manutenção da integridade da BHE. A GSH é um importante antioxidante no cérebro e está envolvida tanto na neuroproteção contra o estresse oxidativo quanto na neuroinflamação (Bjørklund et al., 2020). O desequilíbrio redox da GSH é um evento típico no TEA, sendo encontradas concentrações mais baixas de glutathiona reduzida e níveis mais altos de glutathiona oxidada (Liu et al., 2022); isto explica e corrobora em parte com os achados do presente estudo, onde foi observado uma redução da atividade antioxidante da GR no córtex posterior no grupo VPA comparado ao grupo SAL.

Desta forma, intervir e tratar o estresse oxidativo é uma das técnicas promissoras para melhorar o estado patogênico de indivíduos com TEA. Portanto, vários antioxidantes estão sendo estudados para o tratamento, incluindo a NAC (Liu et al., 2022). A NAC é amplamente utilizada como antioxidante, e estudos anteriores sugeriram que ela pode ter potencial como estratégia terapêutica alternativa para o tratamento de pacientes com TEA (Zhang et al., 2017; Liu et al., 2022). No entanto, os efeitos exatos da administração de NAC na melhora dos sintomas do autismo, bem como os mecanismos moleculares subjacentes às suas ações, ainda não foram totalmente elucidados.

No estudo de Zhang em 2017, ratos expostos ao VPA foram monitorados quanto a alterações comportamentais e indicadores de estresse oxidativo e demonstraram que a NAC melhorou a atividade repetitiva e estereotipada nestes ratos. Neste estudo de Zhang, foi sugerido que os efeitos benéficos da NAC no TEA podem estar associados às suas propriedades antioxidantes. No presente estudo, a administração intranasal de NAC promoveu aumento da atividade antioxidante no córtex pré-frontal no grupo SAL+NAC comparado ao grupo SAL, no grupo VPA+NAC comparado ao grupo VPA e ao grupo SAL. No cerebelo, também houve aumento da SOD no grupo SAL+NAC comparado ao grupo SAL.

Sabe-se que o córtex cerebral é responsável pelo controle de todas as funções executivas cerebrais, incluindo processamentos cognitivos mais complexos como tomada de decisões, memória de trabalho, emoções, comportamento social, aprendizagem e comunicação, funções essas de grande interesse no estudo do TEA (Donovan e Basson, 2016). Já o cerebelo é associado a funções de propriocepção e controle motor fino, além de funções cognitivas como a linguagem, processamento cognitivo e regulação do afeto (Becker e Stoodley, 2013). De fato, a hipoplasia do vérmis cerebelar foi uma das primeiras alterações neuroanatômicas a serem descritas em cérebros de pessoas com autismo (Courchesne et. al, 1988).

A NAC é uma fonte do aminoácido L-cisteína e é um precursor na formação de GSH, que é um importante antioxidante intracelular no SNC. Além de fornecer cisteína para a produção de GSH, a NAC elimina diretamente os radicais livres de oxigênio através de seu grupo redutor de tiol (Hardan et al., 2012; Zhang et al., 2017).

Uma outra enzima antioxidante estudada foi a CAT, que fornece uma importante via de desintoxicação para peróxidos no cérebro (Tayarani et al., 1987). Foi observado que no córtex posterior e no cerebelo houve uma redução da atividade da CAT no grupo VPA comparado ao grupo SAL. Já no hipocampo, a administração de NAC melhorou a atividade da CAT no grupo VPA+NAC comparado ao grupo VPA. Em um estudo com 30 crianças com TEA e 30 crianças controles com idade entre 3 e 15 anos, as suas células sanguíneas foram retiradas para análise, o que revelou uma diminuição da atividade da CAT em pacientes autistas comparado a controles da mesma idade (Al-Gadani et al., 2009).

Recentemente, a administração intranasal tem recebido atenção como uma via não invasiva para entrega de fármacos ao cérebro (Ogawa et al., 2020), pois a administração intranasal pode transportar drogas diretamente para o cérebro a partir da cavidade nasal, contornando a BHE. Tem sido estudado a NAC intranasal para algumas doenças neurológicas, como a esclerose lateral amiotrófica e transtorno depressivo maior (Kurano et al., 2022). Até o presente momento, não foram encontrados nenhum estudo sobre o efeito da NAC intranasal no TEA.

Dada a conexão direta entre o cérebro e a cavidade nasal, a entrega intranasal oferece uma maneira única de contornar muitos dos principais desafios relacionados ao tratamento de distúrbios do SNC: a BHE e toxicidade periférica. No entanto, a entrega pela via intranasal também cria novos desafios que precisam ser

considerados no desenvolvimento de novas formulações de medicamentos para distúrbios do SNC (Kurano et al., 2022).

As propriedades físico-químicas dos fármacos, como tamanho, peso molecular e equilíbrio lipofílico-hidrofílico, limitam significativamente quais fármacos podem ser administradas por via intranasal e a eficácia da absorção. O muco compreende 90-95% de água e, portanto, representa uma barreira fisiológica baseada na partição para o transporte de muitos fármacos hidrofóbicos e altamente lipofílicas (incluindo muitos antipsicóticos), bem como uma barreira difusora para o transporte de medicamentos de maior peso molecular para o epitélio nasal (Lofts et al., 2022). O tamanho da partícula também afeta a quantidade de fármaco absorvido, já que gotículas maiores são rapidamente eliminadas, uma vez que são mais propensas a causar irritação e espirros reflexos (Gänger e Schindowski, 2018). Além disso, a mucosa nasal também contém enzimas metabólicas defensivas que atuam para proteger a cavidade nasal de substâncias xenobióticas nocivas (Lofts et al., 2022).

Para humanos e a maioria dos animais, a via aérea preferencial é o nariz; como tal, o tratamento de distúrbios do SNC através da cavidade nasal pode interferir nos padrões respiratórios naturais. Como quase metade da resistência total das vias aéreas de um adulto é nasal, pequenos aumentos na resistência nasal podem ter efeitos significativos na respiração (Lofts et al., 2022). Dessa forma, o uso repetido de sprays nasais ou agentes mucoadesivos pode causar rinite induzida por medicamentos, inflamação e congestão das vias aéreas, devido ao próprio medicamento ou aos excipientes adicionais. Além disso, o ciclo nasal visa manter a superfície das vias aéreas hidratada e permite que cada via de passagem se reveze na execução de hidratação ou ressecamento nasal; isso pode representar um desafio de consistência de dosagem (Lofts et al., 2022). É necessário também refletir sobre narizes doentes, com infecções agudas como resfriados e gripe, além de crônicas, como desvio de septo e polipose nasal. Nessas doenças, pode haver alteração do pH nasal e alteração da absorção medicamentosa (Lofts et al., 2022).

Os roedores são frequentemente usados como cobaias em estudos pré-clínicos; no entanto, embora a estrutura geral do nariz do roedor seja semelhante à dos humanos, a área de superfície do epitélio olfatório (o principal ponto de contato para a entrega nariz-cérebro) é responsável por 50% da área de superfície da cavidade nasal em ratos de laboratório, mas apenas 10% em humanos. A diferença significativa na área alvo relativa nesses modelos pode superestimar a eficácia de

muitas formulações, levando a resultados translacionais ruins. A pequena área de superfície da cavidade nasal do roedor também limita grandemente a quantidade de formulação de medicamento que pode ser administrada (Crisler et al., 2020).

O presente estudo apresentou algumas limitações que devem ser colocadas para reflexão. Apesar das vantagens descritas inicialmente no texto, a utilização de modelo animal não pode ser considerada totalmente representativa de seres humanos. Seria importante avaliar os níveis de NAC e de seus intermediários também nos tecidos cerebrais. Além disso, outros parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo, como glutathione peroxidase e nitritos, além de parâmetros comportamentais que avaliem cognição e memória poderiam fornecer dados importantes sobre o mecanismo de ação e efeito da NAC no SNC.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram que o modelo animal de autismo induzido por VPA apresentou atraso no neurodesenvolvimento típico do modelo, sendo visto um atraso para encontrar seu ninho de origem e para rotacionar sobre o próprio eixo no teste de geotaxia negativa. E a NAC foi capaz de atenuar o dano oxidativo causado pelo VPA, além de mostrar efeito positivo na defesa antioxidante nas regiões analisadas. No entanto, os resultados do presente estudo devem ser interpretados com cautela, uma vez que o TEA é um transtorno complexo e altamente heterogêneo de sintomas, e um modelo de rato induzido por VPA não é representativo do amplo espectro de distúrbios que o autismo abrange.

8. REFERÊNCIAS

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

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

Al-Gadani Y, El-Ansary A, Attas O, Al-Ayadhi L. Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children. *Clinical Biochemistry.* 2009; 42(10–11): 1032-1040.

Alberts JR, Motz BA, Schank JC. Positive geotaxis in infant rats (*Rattus norvegicus*): a natural behavior and a historical correction. *J Comp Psychol.* 2004; 118(2):123-32.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.* 5th ed. Washington: American Psychiatric Association; 2013.

Anagnostou E, Soorya L, Brian J, Dupuis A, Mankad D, Smile S, Jacob S. Intranasal oxytocin in the treatment of autism spectrum disorders: a review of literature and early safety and efficacy data in youth. *Brain Res.* 2014; 1580:188-98.

Anshu K, Nair AK, Kumaresan UD, Kutty BM, Srinath S, Laxmi TR. Altered attentional processing in male and female rats in a prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Autism Res.* 2017; 10(12): 1929-1944.

Arent CO, Réus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Synergist effects of n-acetylcysteine and deferoxamine treatment on behavioral and oxidative parameters induced by chronic mild stress in rats. *Neurochem Int.* 2012; 61 (7): 1072-80.

Arruda Eder João De; Kitamura, Jefferson Hisamo; Chaves, Taila Penteado; Silva, Carlos Alberto Da; Mascarim, André Lico. *Comportamento exploratório e ansiolítico de*

ratos e ratas submetidos à estimulação somatossensorial. *Rev Bras Terap e Saúde*. 2011; 2(1): 7-12.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem. Anal.* 1987; 32: 279-313.

Becker EB, Stoodley CJ. Autism spectrum disorder and the cerebellum. *Int Rev Neurobiol.* 2013; 113:1-34.

Berk M, Copolov DL, Dean O, Lu K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Bush AI. N-Acetyl cysteine for depressive symptoms in bipolar disorder—a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Biol. Psychiatry.* 2008; 64 (6), 468–475.

Berk M, Dean O, Cotton SM, Gama CS, Kapczinski F, Fernandes BS, Kohlmann K, Jeavons S, Hewitt K, Allwang C, Cobb H, Bush AI, Schapkaitz I, Dodd S, Malhi GS. The efficacy of n-acetylcysteine as an adjunctive treatment in bipolar depression: an open label trial. *J. Affect. Disord.* 2011; 135 (1-3): 389–394.

Bernardi MM; Kirsten TB; Trindade MO. Autism, Neuroinflammation and Animal Models for the Study of Autism: A Review. *Rev Neurocienc.* 2012; 20(1):117-127.

Bjørklund G, Meguid NA, El-Bana MA, et al. Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. *Mol Neurobiol.* 2020; 57: 2314–2332.

Błaszczyk B, Miziak B, Pluta R, Czuczwar SJ. Epilepsy in Pregnancy-Management Principles and Focus on Valproate. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(3):1369.

Bousslama M, Renaud J, Olivier P, Fontaine RH, Matrot B, Gressens P, Gallego J. Melatonin prevents learning disorders in brain-lesioned newborn mice. *Neuroscience.* 2007; 150(3): 712-9.

Brentani H; de Paula CS; Bordini D; Rolim D; Sato F; Portolese J; Pacifico MC; McCracken JT. Autism spectrum disorders: an overview on diagnosis and treatment. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 2013; 35(1): 62–72.

Chao OY, Pathak SS, Zhang H, Dunaway N, Li JS, Mattern C, Nikolaus S, Huston JP, Yang YM. Altered dopaminergic pathways and therapeutic effects of intranasal dopamine in two distinct mouse models of autism. *Mol Brain*. 2020; 13(1):111.

Chauhan A, Chauhan V. Increased Vulnerability to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Autism. *The Molecular Basis of Autism*. New York: Springer; 2015.

Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*. 2006; 13(3): 171-81.

Courchesne E, Yeung-Courchesne R, Press GA, Hesselink JR, Jernigan TL. Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. *N Engl J Med*. 1988; 318(21):1349-54.

Crisler R, Johnston NA, Sivula C, Budelsky CL. Functional anatomy and physiology. *Lab Rat*. 2020; 91-132.

Donovan A, Basson M. The neuroanatomy of autism – a developmental perspective. *J. Anat*. 2016; 230.

DSM IV TR (2000) Manual de diagnóstico e estatística de transtornos mentais, 4^a edição, Texto GH Revision. Associação Psiquiátrica Americana, Washington DC.

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: 304.

Favre MR, Barkat TR, Lamendola D, Khazen G, Markram H, Markram K. General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Front Behav Neurosci*. 2013; 7:88.

Gänger S, Schindowski K. Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: a review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa. *Pharmaceutics*. 2018; 10(3):116.

Gregory EH, Pfaff DW. Development of olfactory-guided behavior in infant rats. *Physiol Behav.* 1971; 7: 573–576.

Goel R, Hong JS, Findling RL, Ji NY. An update on pharmacotherapy of autism spectrum disorder in children and adolescents. *Int rev of psychiatry.* 2018; 30(1): 78-95.

Hardan AY, Fung LK, Libove RA, Obukhanych TV, Nair S, Herzenberg LA, Tirouvanziam R. A randomized controlled pilot trial of oral n-acetylcysteine in children with autism. *Biol Psychiatry.* 2012; 71 (11): 956–961.

Hrabovska SV, Salyha YT. Animal models of autism spectrum disorders and behavioral techniques of their examination. *Neurophysiology.* 2016; 48(5): 380-388.

Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp.* 2011; 25 (48): 2473.

Kumar V; Abbas AK; Aster JC; Coana C. Robbins, patologia básica. 9ª edição (Elsevier). RJ: Elsevier; 2013.

Kurano T, Kanazawa T, Iioka S, Kondo H, Kosuge Y, Suzuki T. Intranasal Administration of *N*-acetyl-L-cysteine Combined with Cell-Penetrating Peptide-Modified Polymer Nanomicelles as a Potential Therapeutic Approach for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Pharmaceutics.* 2022; 14 (12): 2590.

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; 111:101875.

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.

Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet*. 2009; 374: 1627-1638.

Liu Y, Yang Z, Du Y, Shi S, Cheng Y. Antioxidant interventions in autism spectrum disorders: A meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2022; 113:110476.

Liu X, Lin J, Zhang H, Khan NU, Zhang J, Tang X, Cao X, Shen L. Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder-Current Progress of Mechanisms and Biomarkers. *Front Psychiatry*. 2022; 13:813304.

Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(7):614–28.

Lofts, A., Abu-Hijleh, F., Rigg, N. *et al*. Using the Intranasal Route to Administer Drugs to Treat Neurological and Psychiatric Illnesses: Rationale, Successes, and Future Needs. *CNS Drugs*. 2022; 36, 739–770.

Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet*. 2018; 392(10146): 508-520.

Maenner MJ, Warren Z, Williams AR, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR Surveill Summ*. 2023; 72 (2): 1-14.

Magalhães V, Dean OM, Bush AI, Copolov DL, Malhi GS, Kohlmann K, Jeavons S, Schapkaitz I, Anderson-Hunt M, Berk M. N-acetylcysteine for major depressive episodes in bipolar disorder. *Rev. Bras. Psiquiatr*. 2011; 33, 374– 378.

Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behav Immun*. 2012; 26(4): 607-16.

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

Nakasato A, Nakatani Y, Seki Y, Tsujino N, Umino M, Arita H. Swim stress exaggerates the hyperactive mesocortical dopamine system in a rodent model of autism. *Brain Res.* 2008; 1193:128-35.

Novas ML, Wolfman C, Medina JH, de Robertis E. Proconvulsant and 'anxiogenic' effects of n-butyl beta carboline-3-carboxylate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988; 30(2): 331-6.

Ogawa K, Kato N, Kawakami S. Recent Strategies for Targeted Brain Drug Delivery. *Chem. Pharm.* 2020; 68: 567–582.

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

Parker KJ, Oztan O, Libove RA, Mohsin N, Karhson DS, Sumiyoshi RD, Summers JE, Hinman KE, Motonaga KS, Phillips JM, Carson DS, Fung LK, Garner JP, Hardan AY. A randomized placebo-controlled pilot trial shows that intranasal vasopressin improves social deficits in children with autism. *Sci Transl Med.* 2019; 11(491): eaau7356.

Rein B, Ma K, Yan Z. A standardized social preference protocol for measuring social deficits in mouse models of autism. *Nat Protoc.* 2020; 15(10): 3464-3477.

Roulet FI, Wollaston L, Decatanzaro D, Foster JA Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience.* 2010; 170: 514–522.

Roulet 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.

Ruggeri B, Sarkans U, Schumann G, Persico AM. Biomarkers in autism spectrum disorder: the old and the new. *Psychopharmacology*. 2013; 16(231): 1201-1216.

Ruhela RK, Soni S, Sarma P, Prakash A, Medhi B. Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Ann Neurosci*. 2019; 26(1): 25-31.

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.

Schlickmann E, Fortunato JJ. O uso de ácido valpróico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão. *J Bras Psiquiatr*. 2013; 62(2):153-159.

Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30(1):80-9.

Schneider T, Turczak J, Przewłocki R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacol*. 2006; 31(1): 36-46.

Schultz RT, Romanski LM, Tsatsanis KD. Neurofunctional models of autistic disorder and Asperger syndrome: clues from neuroimaging. *Asperger Syndr*. 2000; 1:172-209.

Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przeglaliński E, Pera J, Filip M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Rep*. 2015; 67(3): 569-80.

Staubli U, Huston JP. Up-hill Avoidance: A New Passive Avoidance Task. *Physiol Behav*. 1979; 22(4): 775-6.

Tayarani I, Chaudiere J, Lefauconnier JM, Bourre JM. Enzymatic protection against peroxidative damage in isolated brain capillaries. *J Neurochem*. 1987; 48:1399–1402.

Terry LM, Johanson IB. Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats' responses to odors. *Dev Psychobiol.* 1996; 29:353–377.

Tung EWY, Winn LM. Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: A role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube effects. *Mol. Pharmacol.* 2011; 80: 979–987.

Wagner GC, Reuhl KR, Cheh M, McRae P, Halladay AK. A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J Autism Dev Disord.* 2006; 36(6):779-93.

Wang L, Jia J, Zhang J, Li K. Serum levels of SOD and risk of autism spectrum disorder: A case-control study. *Int. J. Devl Neuroscience.* 2016; 51: 12-16.

Wink LK, Reisinger DL, Horn P, Shaffer RC, O'Brien K, Schmitt L, Dominick KR, Pedapati EV, Erickson CA. Brief Report: Intranasal Ketamine in Adolescents and Young Adults with Autism Spectrum Disorder-Initial Results of a Randomized, Controlled, Crossover, Pilot Study. *J Autism Dev Disord.* 2021; 51(4): 1392-1399.

Yochum CL, Dowling P, Reuhl KR, Wagner GC, Ming X. VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice. *Brain Res.* 2008;1203: 126-32.

Zaky EA. Autism Spectrum Disorder (ASD); the past, the present, and the future. *J Child Adolesc Behav.* 2017; 5: e116-e120.

Zhang Y, Cui W, Zhai Q, Zhang T and Wen X: N-acetylcysteine ameliorates repetitive/stereotypic behavior due to its antioxidant properties without activation of the canonical Wnt pathway in a valproic acid-induced rat model of autism. *Mol Med Rep.* 2017; 16: 2233-2240.

Zhang YH, Wang T, Li YF, Deng YN, He XL, Wang LJ. N-acetylcysteine improves autism-like behavior by recovering autophagic deficiency and decreasing Notch-1/Hes-1 pathway activity. *Exp Biol Med.* 2023; 248(11):966-978.

Zhang Z, Dawson PA, Piper M, Simmons DG. Postnatal N-acetylcysteine administration rescues impaired social behaviors and neurogenesis in Slc13a4 haploinsufficient mice. *EBioMedicine*. 2019; 43:435-446.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



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 **20/09/2022**.

Título do projeto	Análise do efeito do uso de n-acetilcisteína, deferoxamina e risperidona na prole em um modelo experimental de transtorno do espectro autista
Project title	<i>Analysis of the effect of n-acetylcysteine, deferoxamine and risperidone in offspring in an experimental model of autism spectrum disorder.</i>
Número do protocolo Protocol number	62/2022
Pesquisador principal Principal Investigator	Cinara Ludvig Gonçalves
Pesquisadores Researchers	Anita Silva Brunel Alves, Beatriz Galatto Nesi, Bruna de Andrade Flauzino, Bruna Bittencourt Netto, Bruna de Moraes, Caroline Pacheco Rodrigues, Eduarda Maiochi, Flávia da Silva Darós, Gustavo Zanette Fernandes, Gláucia Crispim da Silva, Jaime Lin, João Victor Folle, José Marcelo Botacin Campos, Maiara de Aguiar da Costa, Maria Carolina Marciano Campos de Souza, Maria Fernanda Pedro Ebs de Souza, Maria Goreti Aléssio Crispim, Mariane Gomes Machado, Rosiane Ronchi Nascimento Costa, Simone Lespinasse Araujo, Sofia Januário Bolan, Tainara Gonçalves, Thais Marson Meneguzzo, Victória Linden de Rezende, Vitória Zaccaron Danielski, Willian dos Santos Horacio, William Tassi Moreira.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/01/2023 a 01/01/2024
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo / Wistar
Idade/Peso	60 dias /250-300g
Número de animais	Masculino 53 + Feminino 53 = 106
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo / Wistar
Idade/Peso	1 dia /10g
Número de animais	Masculino 140
Total	246
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

Criciúma-SC, 20 de setembro de 2022



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



Josiane Budni
Coordenadora da CEUA

ANEXO B – ATA DE MESTRADO

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
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 425

Com início às 10 (dez) horas do dia 19 (dezenove) de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três), realizou-se, na Sala 226/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **ANITA SILVA BRUNEL ALVES**, sob a orientação da **Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves**, intitulada **“ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA INTRANASAL EM UM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA”**. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Gislaine Zilli Réus (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Taiane Nascimento de Souza (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 **MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 12h (doze) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária 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, 19 (dezenove) de dezembro de 2023 (dois mil e vinte e três).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Secretária