

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIA GORETI ALÉSSIO CRISPIM

**EFEITO DO TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA COMBINADA
A RISPERIDONA EM UM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2024

MARIA GORETI ALÉSSIO CRISPIM

**EFEITO DO TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA COMBINADA
A RISPERIDONA EM UM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves.

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C932e Crispim, Maria Goreti Aléssio.

Efeito do tratamento com N-acetilcisteína combinada a risperidona em um modelo animal de transtorno do espectro autista / Maria Goreti Aléssio Crispim. - 2024.

78 p. : il.

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

Orientação: Cinara Ludvig Gonçalves.

1. Transtornos do espectro autista - Tratamento. 2. N-acetilcisteína - Efeito fisiológico. 3. Risperidona - Efeito fisiológico. 4. Ácido valpróico. I. Título.

CDD 23. ed. 616.85882



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

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO** apresentada pela candidata **MARIA GORETIALÉSSIO CRISPIM**, sob o título **“EFEITO DO TRATAMENTO COM N- ACETILCISTEÍNA COMBINADA A RISPERIDONA EM UM MODELO ANIMAL**

DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela **“APROVAÇÃO”** da Tese.

Criciúma, SC, 29 de fevereiro de 2024.

Profa. Dra. JAQUELINE DA SILVA GENEROSO
Membro Relator – UNESC

Profa. Dra. FABRÍCIA CARDOSO PETRONILHO
Membro Interno – UNESC

Profa. Dra. FERNANDA DE OLIVEIRA MELLER

Membro Externo – UNESC

Profa. Dra. JADE DE OLIVEIRA
Membro Externo – UFRGS

Cinara Ludvig Gonçalves



Documento assinado digitalmente

EMILIO LUIZ STRECK

Data: 27/03/2024 15:55:08-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves
Luiz Streck Orientadora
PPGCS

Prof. Dr. Emilio
Coordenador do

BANCA EXAMINADORA:

Jaqueline Generoso

Profa. Dra. JAQUELINE DA SILVA GENEROSO (Membro Relator - UNESC)

Fabricia Cardoso Petronilho

Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO (Membro Interno – UNESC)

Fernanda de Oliveira Meller

Profa. Dra. FERNANDA DE OLIVEIRA MELLER (Membro Externo – UNESC)

Jade de Oliveira

Profa. Dra. JADE DE OLIVEIRA (Membro Externo – UFRGS)

CANDIDATA:

Maria Goreti Aléssio Crispim

MARIA GORETI ALÉSSIO CRISPIM

Folha informativa

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Dedico esta tese a Deus, que me abençoou com mais uma jornada de conhecimentos em minha vida; à minha família, caminho de amor e resiliência; ao Guilherme, que todos os dias me ensina o verdadeiro significado de ser mãe; e em especial ao meu amado pai, Henrique Aléssio (in memoriam), cujo apoio e incentivo foram fundamentais em minha trajetória

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente contribuíram de forma significativa na elaboração da minha tese, à minha orientadora Dr^a. Cinara, que ao longo desses quatro anos dividiu seu conhecimento e principalmente quais caminhos a serem trilhados no processo de aprendizado.

Aos alunos de Iniciação Científica de Pesquisa Sobre Neurodesenvolvimento e Autismo, uma equipe coesa e sempre disposta ajudar. A mestranda Maiara e doutoranda Victoria, que se dedicaram para a finalização desse trabalho.

Ao corpo docente, faço meu agradecimento a todos, pois o PPGCS da UNESC não teria o reconhecimento que tem se faltasse um de vocês. Aos que realizei minhas disciplinas e aqueles que encontrei aqui e ali ao longo desses quatro anos na UNESC, Dra. Jaqueline, Dra. Josiane, Dra. Fabrícia, Dra. Vanessa, Dr. Emilio, Dr. Eduardo, Dr. Ricardo, Dr. Paulo, Dr. Quevedo, Dra. Gislaine, Dra. Alexandra, Dra. Tatiana, muito obrigado. Aos colegas de disciplinas, em especial a minha sobrinha Gláucia, obrigado pela troca de conhecimentos e ajuda quando foi necessário.

Aos meus amigos do Instituto Federal Catarinense - Campus Camboriú e aqui um abraço carinhoso para Sirley, Sandra, Maria Helena, Gleisson, Anderson, Neusa, Ticiane e Rose que não pouparam esforços nas horas em que mais precisei.

Obrigada a minha família pelo apoio e entenderem minha ausência quando foi necessário.

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

RESUMO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno evolutivo comportamental caracterizado por déficits na comunicação, interação e reciprocidade social, associado a interesses restritos, repetitivos e estereotipados. No Brasil, a risperidona (RISP) é uma das poucas medicações com indicação formal e aprovada para o tratamento de alguns sintomas associados ao TEA. No entanto, diversos agentes farmacológicos, como a N-acetilcisteína (NAC), são frequentemente empregadas *off label* para auxiliar nos comportamentos de agressividade, agitação e impulsividade. Estudos anteriores mostram efeitos promissores da NAC, com melhora no estresse oxidativo e inflamação, sendo visto como uma terapia promissora para o tratamento de doenças psiquiátricas, inclusive o TEA. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito neurológico da NAC associado a RISP sob parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo em modelo animal de TEA. Para isto, ratas *Wistar* grávidas foram expostas a uma dose única de 600 mg/kg de ácido valpróico (VPA) via intraperitoneal (i.p) no 12º dia gestacional (VPA-expostos) ou salina (SAL-expostos). Após o nascimento, no dia pós-natal (DPN) 9, 17 e 21-35 foi verificado o peso das proles. No DPN 10 foi realizado o teste busca pelo ninho e DPN 15 o teste de geotaxia negativa. Após o desmame, no 21º DPN, as proles foram divididas em 4 grupos (n=10) e foram tratadas do 21º ao 35º DPN: I) animais expostos à SAL na gestação, SAL-gavagem (gav.) e SAL-subcutâneo (s.c.) no pós-natal; II) animais expostos à SAL na gestação, 0,1 mg/Kg de RISP (gav.) e 150 mg/Kg de NAC (s.c.) no pós-natal; III) animais exposto ao VPA na gestação, SAL (gav.) e SAL (s.c.) no pós-natal; IV) animais expostos ao VPA na gestação, 0,1 mg/Kg de RISP (gav.) e 150 mg/Kg de NAC (s.c.) no pós-natal. No DPN 36, foram verificados parâmetros comportamentais: teste das três câmaras e campo aberto. Posteriormente, os animais foram eutanasiados e os cérebros foram dissecados em córtex posterior, cerebelo, hipocampo, e estriado para a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo. Os resultados mostram que não houve alteração significativa no peso da prole. Além disso, os animais VPA-expostos apresentaram maior déficit no teste de busca pelo ninho e levaram tempo significativamente maior para virar em torno do seu próprio eixo no teste de geotaxia negativa. No teste das três câmaras, os animais do grupo VPA apresentaram prejuízo na interação social e o tratamento com RISP+NAC foi capaz de melhorar esse parâmetro. Os grupos VPA-expostos e VPA+RISP+NAC apresentaram maior atividade exploratória em relação ao grupo CT. Além disso, os animais VPA-expostos apresentaram um aumento nos níveis das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e o tratamento com RISP+NAC foi capaz de reverter esse parâmetro no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais. Ainda, verificou-se aumento de nitrito/nitrato no hipocampo dos ratos. Por fim, os animais VPA-

expostos tratados com RISP+NAC tiveram conteúdo de sulfidrilas diminuído em relação ao grupo VPA. Conclui-se que o modelo animal de TEA induzido por VPA apresenta alterações nos parâmetros comportamentais e bioquímicos semelhantes ao fenótipo autista e o tratamento com RISP+NAC parece promissor em tratar essa sintomatologia.

Palavras-chave: NAC; TEA; Ácido valpróico; Risperidona.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a developmental behavioral disorder characterized by deficits in communication, interaction, and social reciprocity, associated with restricted, repetitive, and stereotyped interests. In Brazil, risperidone (RISP) is one of the few medications formally approved and indicated for the treatment of some symptoms associated with ASD. However, various pharmacological agents, such as N-acetylcysteine (NAC), are frequently used off-label to assist with behaviors of aggression, agitation, and impulsivity. Previous studies show promising effects of NAC, with improvements in oxidative stress and inflammation, being seen as a promising therapy for the treatment of psychiatric diseases, including ASD. The aim of this study was to analyze the neurological effect of NAC in combination with RISP on biochemical parameters of oxidative stress in an animal model of ASD. For this, pregnant Wistar rats were exposed to a single dose of 600 mg/kg of valproic acid (VPA) via intraperitoneal (i.p.) on the 12th day of gestation (VPA-exposed) or saline (SAL-exposed). After birth, on postnatal day (PND) 9, 17, and 21-35, the weight of the offspring was verified. On PND 10, the nest-seeking test was conducted, and on PND 15, the negative geotaxis test was performed. After weaning, on the 21st PND, the offspring were divided into 4 groups (n=10) and were treated from the 21st to the 35th PND: I) animals exposed to SAL during gestation, SAL-gavage (gav.) and SAL-subcutaneous (s.c.) postnatally; II) animals exposed to SAL during gestation, 0.1 mg/Kg of RISP (gav.) and 150 mg/Kg of NAC (s.c.) postnatally; III) animals exposed to VPA during gestation, SAL (gav.) and SAL (s.c.) postnatally; IV) animals exposed to VPA during gestation, 0.1 mg/Kg of RISP (gav.) and 150 mg/Kg of NAC (s.c.) postnatally. On PND 36, behavioral parameters were verified: the three-chamber test and the open field test. Subsequently, the animals were euthanized, and their brains were dissected into the posterior cortex, cerebellum, hippocampus, prefrontal, and striatum for the evaluation of oxidative stress parameters. The results show that there was no significant change in the weight of the offspring. Furthermore, VPA-exposed animals showed a greater deficit in the nest-seeking test and took significantly longer to turn around their own axis in the negative geotaxis test. In the three-chamber test, VPA group animals showed impairment in social interaction, and treatment with RISP+NAC was able to improve this parameter. The VPA-exposed and VPA+RISP+NAC groups showed greater exploratory activity compared to the control group. In addition, VPA-exposed animals showed an increase in the levels of the antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), and treatment with RISP+NAC was able to reverse this parameter in the hippocampus and prefrontal cortex of the animals. Also, an increase in nitrite/nitrate was observed in the hippocampus of the rats. Finally, VPA-exposed

animals treated with RISP+NAC had decreased thiol content compared to the VPA group. It is concluded that the VPA-induced animal model of ASD presents changes in behavioral and biochemical parameters like the autistic phenotype, and treatment with RISP+NAC appears promising in treating this symptomatology.

Keywords: NAC; ASD; Valproic Acid; Risperidone

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Linha do tempo do experimento	32
Figura 2 - Peso dos animais	37
Figura 3 - Teste comportamental de busca pelo ninho.....	38
Figura 4 - Teste de geotaxia	39
Figura 5 - Teste das três câmaras	40
Figura 6 - Teste do campo aberto	41
Figura 7 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do córtex posterior de animais submetidos ao modelo animal de TEA	43
Figura 8 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do cerebelo de animais submetidos ao modelo animal de TEA	44
Figura 9 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do hipocampo de animais submetidos ao modelo animal de TEA	45
Figura 10 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do córtex pré-frontal animais submetidos ao modelo animal de TEA	46
Figura 11 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do estriado de animais submetidos ao modelo animal de TEA	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADDM - Rede de Monitoramento de Deficiências de Autismo e Desenvolvimento
- AO - Antioxidantes
- APA - Associação Americana de Psiquiatria
- BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*)
- CAT - Catalase
- CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CNV - Variação no Número de Cópias (do inglês, *Copy Number Size Variation*)
- CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CT - Grupo controle
- DG - Dia Gestacional
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- DPM - Desvio padrão da média
- DPN -Dia pós-natal
- DSM - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)
- DSM-5-TR - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – Revisão de Texto (do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)
- DTNB - Ácido ditionitrobenzóico
- EO - Estresse oxidativo
- ERN - Espécie reativa de nitrogênio
- ERO - Espécie reativa de oxigênio
- EUA - Estados Unidos da América
- FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)
- GABA - Ácido gama aminobutírico
- GPx - Glutathiona peroxidase
- GSH - Glutathiona
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
- IL - Interleucina
- IP - Intraperitoneal

MDA - Malondialdeído

NAC - N-acetilcisteína

Nox - Nitrito e nitrato

ON - Óxido Nitroso

PN - Pós-natal

RISP – Risperidona

SAL - Salina

SH - Sulfidrina

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *Thiobarbituric acid reactive substances*)

TDAH - Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TEA - Transtorno do Espectro Autista

TOC - Transtorno Obsessivo-Compulsivo

VPA - Ácido Valpróico (do inglês, *Valproic acid*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	10
1.1.1 Histórico	10
1.1.2 Sinais, sintomas e diagnóstico	12
1.1.3 Epidemiologia	13
1.2 ETIOLOGIA	16
1.2.1 Fatores genéticos	18
1.2.2 Fatores ambientais	19
1.3 FISIOPATOLOGIA	20
1.3.1 Estresse oxidativo	22
1.4 N-ACETILCISTEÍNA	24
1.5 RISPERIDONA	25
1.6 MODELO ANIMAL	26
2. OBJETIVO	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 PRINCÍPIOS ÉTICOS	29
3.2 ANIMAIS	29
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL	29
3.4 AVALIAÇÃO DO NEURODESENVOLVIMENTO	32
3.4.1. Avaliação do peso	32
3.4.2 Teste da busca pelo ninho	33
3.4.3 Teste de geotaxia negativa	33
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	33
3.5.1 Teste das três câmaras	33
3.5.2 Teste de campo aberto	34
3.6 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	34
3.6.1 Catalase	35
3.6.2 Superóxido Dismutase	35
3.6.3 Conteúdos de Sulfidril	35
3.6.4 Concentração de nitrato/nitrito	35
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4. RESULTADOS	37
4.1 AVALIAÇÃO DO NEURODESENVOLVIMENTO	37
4.1.1 Peso Corporal	37
4.1.2 Avaliação da busca pelo ninho	37
4.1.3 Avaliação da geotaxia negativa	38
4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS	39

4.2.1 Teste das três câmaras	39
4.2.2 Teste de campo aberto.....	40
4.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	42
4.3.1 Córtex posterior	42
4.3.2 Cerebelo	43
4.3.3 Hipocampo.....	44
4.3.4 Córtex pré-frontal	45
4.3.4 Estriado	46
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIA	59
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	78

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

1.1.1 Histórico

Em 1802, na França, Jean Itard realizou um estudo com um menino que vivia isolado do contato humano. Esse foi um dos primeiros diagnósticos documentados de transtorno do espectro autista (TEA) que se desenvolveu à margem do campo médico-psiquiátrico (Banks-Leite e Galvão, 2000). Souza et al., (2004) fala em seu artigo que Plouller psiquiatra suíço, introduziu o adjetivo autista na literatura psiquiátrica em 1906, para descrever pacientes que buscavam isolamento frequente e com dificuldade em se conectar. Em 1911 Eugen Bleuler, renomado psiquiatra suíço, utilizou o termo, embora o tenha inicialmente associado à esquizofrenia.

Os pioneiros no estudo do TEA foram Asperger (1944) e Kanner (1943), Kanner psiquiatra austríaco que atuava na Universidade Johns Hopkins, nos Estados Unidos da América (EUA) e Hans Asperger, pediatra austríaco na Áustria. Em 1943, Kanner publicou um estudo descrevendo 11 crianças com comportamentos atípicos, incluindo dificuldades de comunicação, interações sociais limitadas e padrões de comportamento repetitivos (Kanner, 1943). Ele observou que essas crianças apresentavam um isolamento extremo e dificuldade de se relacionar com o mundo, marcando o início do entendimento moderno do TEA (Kanner, 1943). Na década de 1940, Asperger identificou crianças com padrões semelhantes ao de Kanner quanto a interação social e comportamentos repetitivos, mas que também podiam exibir habilidades notáveis em áreas específicas, como matemática ou música (Asperger, 1944). Asperger descreveu essas crianças como tendo "psicopatia autista", enfatizando sua diversidade e habilidades únicas, suas observações contribuíram para a compreensão inicial do TEA e influenciaram a inclusão da Síndrome de Asperger no manual de diagnóstico e estatística de transtornos mentais (DSM)-IV (Asperger, 1944). Posteriormente, esta síndrome foi incorporada ao TEA no DSM-5 pela *American Psychiatric Association* (APA) (American Psychiatric Association, 2013). Os estudos pioneiros de Kanner e Asperger são fundamentais para o entendimento contemporâneo do TEA, destacando a complexidade e variabilidade deste transtorno (Kanner, 1943; Associação Americana de Psiquiatria, 1994; Asperger, 1968; American Psychiatric Association, 2013).

Kanner (1943) e Bettelheim (1967) sugeriram que o TEA poderia ser causado por mães que eram emocionalmente frias e distantes, consequentemente o ambiente familiar não era adequado para o desenvolvimento saudável da criança, as chamadas "mãe geladeira". Esses psiquiatras defendiam a separação das crianças de seus pais. Posteriormente essa teoria foi amplamente desacreditada e considerada prejudicial, pois não haviam evidências científicas que a sustentassem (Yule e Rutter, 1988; Rutter, 1972)

Wing (1976) trouxe à tona o trabalho de Asperger (1944) através de um artigo que resumia suas descobertas. A psiquiatra inglesa associou o TEA de Kanner (1943) e Asperger (1944), apontando que ambas as condições eram variações da mesma anormalidade (Wing, 1981). Além disso, um achado relevante da pesquisa de Wing (1981) relacionado a epidemiologia do TEA no trabalho de Asperger (1944), foi a observação de uma prevalência significativamente maior em meninos. Em seu trabalho revolucionário, Wing (1979) propôs uma conceitualização inovadora do TEA, caracterizando-o através de uma tríade de déficits primários que compreendem dificuldades na comunicação, na interação social, e a presença de comportamentos, interesses ou atividades repetitivos e restritos. Esta visão do TEA como um espectro sugere uma variedade de manifestações e intensidades desses déficits entre indivíduos, desafiando assim concepções anteriores que viam o autismo como uma condição homogênea. O reconhecimento da heterogeneidade inerente ao TEA é fundamental para o diagnóstico e a elaboração de intervenções individualizadas, permitindo uma abordagem mais precisa e adaptada às necessidades específicas de cada pessoa com autismo. Esta perspectiva proposta por Wing contribuiu significativamente para a evolução das práticas diagnósticas e terapêuticas no campo do autismo, destacando a importância de considerar a ampla gama de variações na expressão dos sintomas ao avaliar e planejar o tratamento para indivíduos com TEA. Rutter (1979), primeiro psiquiatra nomeado como professor de psiquiatria infantil no Reino Unido, estabeleceu critérios distintos para o TEA, baseados em atrasos sociais, dificuldades na comunicação, comportamentos incomuns e início antes dos 30 meses. Realizou também análises de DNA e exames de imagem (Rutter, 1983).

O TEA foi definido por uma tríade de características: deficiências na comunicação social, dificuldades na interação social e comportamentos repetitivos e interesses restritos (Associação Americana de Psiquiatria, 1994). Dezenove anos depois o TEA foi considerado um espectro, englobando várias condições, incluindo a Síndrome de Asperger, sob o termo TEA (American Psychiatric Association, 2013). O diagnóstico é

realizado baseado em indicadores comportamentais, com foco em comunicação social, e é individualizado devido à diversidade no espectro. A APA trouxe alguns critérios específicos para diagnóstico, abordando sintomas sensoriais e ampliando a definição para incluir adultos que estão sendo diagnosticados pela primeira vez (American Psychiatric Association, 2022).

1.1.2 Sinais, sintomas e diagnóstico

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento que se caracteriza por prejuízos na comunicação e interação social, comportamentos restritos e repetitivos, interesse intenso em um assunto ou atividade específica, e hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais (Frye, 2018). Os prejuízos na comunicação social podem incluir dificuldade em iniciar ou manter conversas, dificuldade em entender e responder a pistas sociais, e dificuldade em compartilhar interesses ou brincar com outras pessoas (American Psychiatric Association, 2013).

Na área da comunicação, as crianças com TEA frequentemente apresentam atrasos no desenvolvimento da linguagem e têm dificuldade em compreender e responder à comunicação verbal e não verbal. Ecolalia, que é a repetição mecânica de palavras ou frases, também é uma característica observada em alguns casos de TEA (American Psychiatric Association, 2022). Além disso, indivíduos com TEA podem apresentar comportamentos repetitivos como movimentos estereotipados, balançar ou bater as mãos, bem como manifestar interesses intensos em atividades específicas ou objetos, como observado pelo DSM-5-TR (American Psychiatric Association, 2022). Esses comportamentos podem interferir no funcionamento diário e causar estresse ou ansiedade para o indivíduo, lembrando que se trata de um espectro as características do TEA podem variar de pessoa para pessoa, onde algumas pessoas com podem apresentar apenas alguns dos sintomas, enquanto outras podem apresentar todos eles (Frye et al., 2018). Essas manifestações complexas ilustram a diversidade clínica do TEA e destacam a necessidade de avaliações detalhadas para um diagnóstico preciso, conforme definido pelos critérios estabelecidos pela APA (Howlin et al., 2014; Frye et al., 2018; American Psychiatric Association, 2022)

As habilidades sensoriais e motoras em crianças neurotípicas ocorrem em duas fases. Na primeira fase, os bebês processam estímulos sensoriais, como visão, audição e tato. Na segunda fase, os bebês desenvolvem habilidades motoras avançadas. Estudos têm mostrado que essas habilidades formam a base para interações sociais saudáveis e

adaptação ao ambiente (Uehara et al., 2016; Dawson, 2008; Chawarska et al., 2013). Os sinais do TEA começam a se manifestar nos primeiros doze meses de vida e podem ser identificados por profissionais entre os 6 e 18 meses de idade, conforme observado por Tanner e Dounavi (2021). No entanto, a média de idade para o diagnóstico é de 4 anos ou mais na América do Norte, destacando a necessidade de uma detecção mais precoce e precisa (Chakrabarti e Fombonne, 2005; Chakrabarti, 2001)

Os déficits na comunicação social no TEA podem incluir dificuldade em manter contato visual, dificuldade em compreender e usar a linguagem, ou dificuldade em formar relacionamentos sociais (Silva e Mulick, 2009; Associação Americana de Psiquiatria, 1994). Os padrões de comportamento repetitivos e restritos podem incluir interesse obsessivo por certos objetos ou temas, comportamentos motores repetitivos, ou rotinas rígidas. A severidade dos sintomas do TEA no DSM-5-TR 2022 é estratificada em três níveis de suporte: i) Nível 1: caracteriza-se por déficits substanciais na comunicação social, exigindo suporte. Indivíduos neste nível demonstram dificuldades consideráveis nas interações sociais, frequentemente exibindo respostas atípicas ou ineficazes. ii) Nível 2: refere-se a indivíduos com desafios mais acentuados em comunicação social que necessitam de suporte substancial. Este nível é marcado por dificuldades mais pronunciadas em habilidades de comunicação e interações sociais limitadas ou atípicas. iii) Nível 3: reservado para indivíduos com deficiências severas em comunicação social, que demandam um nível de suporte altamente substancial. Estes indivíduos enfrentam desafios consideráveis que impactam significativamente o funcionamento em diversos contextos (American Psychiatric Association, 2022).

1.1.3 Epidemiologia

As pesquisas sobre a prevalência do TEA remontam às décadas de 1960 e 1970, antes da classificação oficial do TEA em diagnósticos internacionais (Wing, 1979; Lotter, 1966). Uma meta-análise significativa, analisando estudos de 1994 a 2019 em 29 países, revelou variações na prevalência do TEA. Nos EUA, a prevalência foi a mais alta (1,12%), enquanto em Taiwan, foi a mais baixa (0,11%) Esses dados indicam uma prevalência maior do TEA na América do Norte (1,01%) em comparação com a Europa (0,73%) e Ásia (0,41%) (Talantseva et al., 2023)

Estudos mostram que países de alta renda apresentam índices mais elevados de TEA. Esse fenômeno pode estar ligado ao melhor acesso a diagnósticos e maior conscientização. Contudo, a maioria dos estudos provém de países de alta renda,

especialmente dos EUA, e foram limitados a artigos publicados em inglês. Isso sugere que os dados podem ser influenciados por esses fatores geográficos e socioeconômicos (Talantseva et al., 2023).

A prevalência mundial do TEA aumentou significativamente ao longo do tempo, passando de 0,25% em 1994-1999 para 0,99% em 2015-2019. Isso significa que a quantidade de pessoas com TEA no mundo quadruplicou em um período de 20 anos. A faixa etária compreendida entre 6 e 12 anos demonstrou as mais elevadas taxas de prevalência, um fenômeno que pode ser atribuído a uma combinação de fatores, incluindo uma maior capacidade de detecção de sintomas de TEA nesta faixa etária específica, o aprimoramento do acesso aos serviços de diagnóstico e acompanhamento, além de um incremento na sensibilização acerca do TEA tanto pela população geral quanto pelos profissionais da saúde (Talantseva et al., 2023; Maenner et al., 2023; Li et al., 2019; Fombonne, 2023).

A heterogeneidade nas estimativas de prevalência se deve existência de variações significativas nas taxas de prevalência do TEA entre diferentes nações, regiões geográficas e populações. Tal variabilidade pode ser justificada por diversos elementos, que abarcam desde as discrepâncias nos critérios diagnósticos empregados até as diferenças nas metodologias de pesquisa, na percepção pública e na acessibilidade aos serviços de saúde (Talantseva et al., 2023; Maenner et al., 2023, 2021; Li et al., 2022; Fombonne, 2023).

A menção específica à faixa etária de 6 a 12 anos indica que, dentro das estimativas de prevalência do TEA mencionadas, essa faixa etária em particular mostrou as taxas mais altas de prevalência. No entanto, a afirmação sobre a "heterogeneidade substancial nas estimativas" não se limita apenas a essa faixa etária, mas sim ao conceito de prevalência do TEA de maneira mais ampla, abrangendo diferentes faixas etárias e contextos estudados (Talantseva et al., 2023; Maenner et al., 2023; Li et al., 2019; Fombonne, 2023).

Outro artigo chama atenção para o impacto do aumento da prevalência como um problema de saúde pública e enfatiza a necessidade de criação de políticas de saúde pública para detecção precoce do TEA para reduzir os distúrbios durante o desenvolvimento (Zeidan et al., 2022; Solmi et al., 2022). Esse estudo analisou dados de 2951 registros que incluíam 71 estudos com mais de 30 milhões de participantes. A pesquisa revelou uma prevalência mundial de TEA de 0,6%, com variações regionais:

0,4% na Ásia, 1% na América, 0,5% na Europa, 1% na África e 1,7% na Austrália (Zeidan et al., 2022)

O TEA ocorre em todos os grupos raciais, étnicos e socioeconômicos, embora existam grupos sub-representados nos dados de diagnóstico de TEA (Lord et al., 2018; Hodges et al., 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, uma em cada 160 crianças no mundo tem diagnóstico de TEA. No entanto, a prevalência do TEA em países de baixa e média renda ainda é desconhecida (Maenner et al., 2023; Elsabbagh et al., 2012).

Nos EUA, aproximadamente uma em cada 44 crianças é diagnosticada com TEA, de acordo com a Rede de Monitoramento de Autismo e Deficiências do Desenvolvimento (ADDM) dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (Maenner et al., 2023). O TEA é mais comum em indivíduos do sexo masculino, observação inicialmente feita por Asperger em 1944 (Wing, 1981), com uma proporção estimada de três homens para cada mulher (Loomes et al., 2017; Hodges et al., 2020). A percepção equivocada do TEA como uma condição majoritariamente masculina não apenas perpetua estereótipos, mas também contribui diretamente para as dificuldades enfrentadas por mulheres no contexto diagnóstico, aumentando a probabilidade de diagnósticos tardios ou incorretos (Hodges et al., 2020; Bargiela et al., 2016). Esta realidade é particularmente problemática à luz das disparidades de gênero existentes, as quais intensificam os obstáculos no diagnóstico de mulheres com TEA, resultando em atrasos e desafios diagnósticos adicionais que comprometem o acesso oportuno a intervenções e suportes adequados (Lai et al., 2022).

No Relatório de Vigilância da Rede de Monitoramento de Deficiências no Desenvolvimento e Autismo (ADDM) em 2020, a estimativa de prevalência de TEA em crianças de 8 anos foi de 27,6 por 1.000, variando de 23,1 em Maryland a 44,9 na Califórnia, superior às estimativas anteriores da Rede ADDM (Maenner et al., 2021). O relatório também mostra que, pela primeira vez, a prevalência geral de TEA para meninas foi maior do que 1%. A prevalência entre meninos já havia sido observada como mais alta no primeiro relatório da Rede ADDM em 2002 (Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2006 Principal Investigators e Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2009; Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2002 Principal Investigators e Centers for Disease Control and Prevention, 2007).

Embora o Brasil esteja entre os países que realizam pesquisas sobre a prevalência de TEA, um estudo piloto em Atibaia mostrou uma prevalência de 0,3% (Paula et al.,

2011a; 2011b) e outro nas regiões metropolitanas com 1% de prevalência (Portolese et al., 2017), ainda há uma escassez de dados epidemiológicos. Este cenário reforça a importância de políticas públicas efetivas para promover um diagnóstico preciso e intervenções adequadas para pessoas com TEA, considerando as particularidades sociodemográficas e as necessidades específicas dessa população.

1.2 ETIOLOGIA

A patologia e a etiologia do TEA ainda permanecem indefinidas, embora uma interação entre fatores genéticos, neurológicos e ambientais seja amplamente aceita como mecanismos plausíveis de patogênese (Sauer et al., 2021). O TEA é caracterizado por uma gama de alterações no neurodesenvolvimento, manifestando-se de maneiras diversas e afetam principalmente a comunicação, a interação social, e resultam em comportamentos, interesses e atividades restritivos e repetitivos. Indivíduos com TEA podem experimentar atrasos significativos ou ausência completa da fala, além de enfrentar dificuldades para iniciar conversas e compreender o uso não literal da linguagem, incluindo ironias e expressões idiomáticas (Uehara et al., 2016; Dawson, 2008; Chawarska et al., 2013).

A interação social também é profundamente impactada, evidenciada por desafios em estabelecer relacionamentos, dificuldades em compartilhar interesses ou responder a sinais sociais, como expressões faciais e contato visual (Silva e Mulick, 2009). Caracteristicamente, o TEA apresenta comportamentos estereotipados, como balançar ou girar, uma adesão inflexível a rotinas, interesses intensamente focados e uma resposta atípica a estímulos sensoriais, o que pode incluir tanto a hiperatividade quanto a hiporreatividade (Wing, 1979). Além disso, o desenvolvimento atípico é um aspecto central do TEA, com alguns indivíduos exibindo habilidades excepcionais em áreas específicas, contrastando com atrasos em outras, e enfrentando desafios em habilidades motoras.

A natureza diversificada dessas manifestações reflete a complexidade do TEA e enfatiza a necessidade de abordagens diagnósticas e terapêuticas personalizadas que considerem a singularidade de cada indivíduo afetado pelo transtorno (American Psychiatric Association, 2022). As variantes podem se manifestar nas disfunções precoces, seja na interação social ou comportamentos sensório-motores restritos, repetitivos ou estereotipados (Lai et al., 2014). Podem apresentar condições concomitantes, incluindo epilepsia, depressão, ansiedade e Transtorno de Déficit de

Atenção e Hiperatividade (TDAH), além de comportamentos desafiadores como problemas de sono e automutilação (Yang et al., 2023). Indivíduos autistas apresentam déficits cognitivos atípicos na percepção social, cognição prejudicada, disfunção executiva e processamento atípico de percepção e informação (Weir et al., 2022).

Fatores genéticos são essenciais na compreensão do TEA, pesquisas envolvendo irmãos demonstram que o diagnóstico de TEA em um irmão eleva consideravelmente a probabilidade de o outro irmão apresentar TEA, em relação à prevalência observada na população em geral (Sandin et al., 2014). Além disso, observa-se uma concordância consideravelmente maior, embora não seja absoluta, no diagnóstico de TEA em gêmeos monozigóticos (Kim et al., 2019). A literatura sugere que 35% a 40% dos casos de TEA têm origem em fatores genéticos (Hallmayer, 2011), enquanto os outros 60% a 65% são oriundos de fatores ambientais (Posar e Visconti, 2023; Gardener et al., 2011).

Embora nenhum fator ambiental por si só seja suficiente para causar o TEA, a exposição a vários fatores ambientais em conjunto pode desempenhar um papel importante na incidência dessa condição (Salehi et al., 2017). Os fatores ambientais podem ser divididos em pré-natais, natais e pós-natais. Neste sentido, estudos têm examinado a possível relação entre o TEA e complicações durante a gravidez e o parto, infecções durante a gestação e o uso de certos medicamentos (Posar e Visconti, 2018; Posar e Visconti, 2023; Gardener et al., 2011). Outro fator de risco está relacionado à idade avançada dos pais (Wang et al., 2017).

Estudos sugerem que a autoimunidade materna pode ter um papel relevante, com uma prevalência maior de autoanticorpos específicos em mães de crianças com TEA durante a gravidez (McLellan et al., 2022; Libbey e Fujinami, 2010). Paralelamente, anormalidades nas respostas inflamatórias, como alterações nos níveis de citocinas, também foram observadas em indivíduos com TEA, indicando que desregulações nas vias inflamatórias podem influenciar o desenvolvimento cerebral (Hallmayer, 2011). Além disso, as interações entre genes ligados ao sistema imunológico e ao TEA estão sendo investigadas, com pesquisas apontando para uma compreensão mais profunda de como variações genéticas podem influenciar o sistema imunológico e, conseqüentemente, o desenvolvimento do TEA (Suri e El-Baz, 2022; Pardo et al., 2005; McLellan et al., 2022; Hallmayer, 2011).

1.2.1 Fatores genéticos

De modo geral, os transtornos do neurodesenvolvimento têm uma alta herdabilidade devido a fatores genéticos envolvidos (Iakoucheva et al., 2019). No TEA o aumento do risco relacionado à genética desempenha um papel importante; estudos mostram maior incidência em segundos filhos de pais que já tenham com um filho com TEA (10-20%), em irmãos gêmeos monozigóticos (70-90%) e dizigóticos (10-20%) (Sandin et al., 2014). Sabe-se que o TEA é poligênico, estes genes, embora contribuam com pequenos riscos, estão ligados a diferentes variantes genéticas e os genes susceptíveis respondem coletivamente por 10-20% dos casos (Geschwind, 2011). Cada gene individualmente tem uma contribuição pequena, e nenhum deles possui especificidade completa, visto que alguns desempenham papéis em uma variedade de transtornos do neurodesenvolvimento (Rutter, 2005). Além disso, interações ambientais em indivíduos geneticamente predispostos, pode desencadear o TEA através de mecanismos epigenéticos (Nardone e Elliott, 2016; Kubota e Mochizuki, 2016).

A heterogeneidade fenotípica do TEA e as diferentes variações genéticas podem afetar diferentes aspectos do desenvolvimento neurológico e provocar uma variedade de sintomas e características associadas ao TEA (Hu, 2013). A pesquisa genética atual sobre o TEA está utilizando técnicas avançadas de análise de genoma, foram identificados mais de 100 loci mutados associados ao TEA, que resultam em alterações na codificação de proteínas. Adicionalmente, estudos de genômica ampla revelaram a expansão de repetições de DNA em tandem em pessoas com TEA. Estas repetições são frequentemente expressas em estágios precoces do desenvolvimento de neurônios e suas células precursoras (Schaaf et al., 2020).

Um estudo recente em camundongos mostrou que a deleção genética 16p11.2 reduz a comunicação pré-frontal com as regiões temporal-parietais, isso significa que a comunicação entre a região pré-frontal do cérebro, que desempenha um papel crucial no planejamento, tomada de decisões, modulação de emoções, e as regiões parietais temporais, envolvidas em processamento sensorial e atenção, é menos eficaz em pessoas com a deleção 16p11.2. A deleção afeta também a função cerebral e aumenta o risco de distúrbios neurológicos como o autismo (Bertero et al., 2018). O mesmo experimento com a mesma deleção genética em camundongos apresentou impactos similares, sugerindo uma relação direta entre a variação genética e alterações na conectividade cerebral que podem levar a comprometimentos sociocognitivos. Este entendimento ajuda a direcionar possíveis intervenções terapêuticas (Bertero et al., 2018). Foram

estabelecidos correlatos genéticos e hereditariedade com diagnósticos de TEA. De fato, alterações cromossômicas foram encontradas apenas em aproximadamente 25% das crianças estudadas, sem predomínio de nenhuma variância única (Miles, 2011).

1.2.2 Fatores ambientais

Embora a genética desempenhe um papel significativo no TEA, estudos mostram que fatores ambientais também tem possíveis riscos para o TEA. Dos fatores relacionados à gestante, pode-se ter fatores positivos e negativos que podem estar ligados ao TEA, entre esses encontra-se a desnutrição e a obesidade que podem ser fatores negativos (Li et al., 2016). Entretanto, a exposição materna ao ácido fólico e suplementos multivitamínicos antes e durante a gravidez está associada a um risco reduzido de TEA na prole em comparação com a prole de mães sem tal exposição (Levine et al., 2018). A parte neurológica persiste por toda a vida, e fatores ambientais, incluindo substâncias tóxicas, inseticidas, infecções e medicamentos, são conhecidos por contribuir para a suscetibilidade ao TEA (Wang et al., 2023).

O estudo de Mintál et al. (2022) buscou esclarecer os fatores ambientais associados ao diagnóstico de TEA, entre eles uso de medicamentos, uso de cigarro, idade gestacional mais tardia e utilização das vitaminas pré-natais por membro da família foram correlacionados com o diagnóstico de TEA. Os componentes ambientais podem contribuir para o desenvolvimento do TEA nas exposições pré-natais às substâncias químicas ou a radiação, causando a interrupção das redes genéticas dos neurônios, afetando o ciclo celular, o dobramento de proteínas, o reparo de danos ao DNA e a apoptose celular (Miles, 2011). O estudo de Harding e colaboradores (2021) avaliou os efeitos da exposição pré-natal ao ácido valpróico (VPA), um medicamento antiepiléptico comumente prescrito para mulheres grávidas com epilepsia. Os resultados mostraram que a exposição ao VPA está associada a um risco aumentado de características semelhantes às do TEA em humanos e animais.

Os modelos animais utilizados atualmente para estudar o TEA englobam uma variedade de abordagens, cada uma com suas próprias vantagens e limitações na replicação dos aspectos do TEA. Estes incluem modelos animais genéticos, modelos animais de TEA com síndrome induzida por variações no número de cópias (CNVs), modelos animais idiopáticos e modelos induzidos ambientalmente (Wang et al., 2023; Li et al., 2021).

É importante notar que a pesquisa sobre os fatores ambientais do TEA está em constante evolução e novos estudos continuam a explorar essas associações. Esses estudos fornecem evidências adicionais de que os fatores ambientais podem desempenhar um papel no desenvolvimento do TEA. No entanto, é importante ressaltar que esses fatores não são causas diretas do TEA. Acredita-se que eles podem aumentar o risco de TEA, mas não causar o transtorno (Van Meter et al., 2010; Petruzzi et al., 1995; Kalkbrenner et al., 2012; Hallmayer, 2011; Durkin et al., 2010; Chen et al., 2010; Calderón-Garcidueñas et al., 2008; Beckerman et al., 2008).

1.3 FISIOPATOLOGIA

A inflamação crônica do sistema nervoso central (SNC), ou neuroinflamação, tem sido associada à fisiopatologia de vários distúrbios do neurodesenvolvimento, incluindo o TEA. Pesquisas demonstram que a neuroinflamação pode ter um efeito no desenvolvimento do cérebro e nos déficits cognitivos sociais observados no TEA (Thom et al., 2019; Nakagawa e Chiba, 2016; Carlezon et al., 2019)

Estudos apontam que a ativação das células gliais, que são componentes fundamentais do sistema imunológico do cérebro, está relacionado ao TEA (Gesundheit et al., 2013; Estes e McAllister, 2015). A microglia e a astroglia, em condições normais, desempenham papéis cruciais no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso, como na neurogênese e na plasticidade sináptica (McDougle et al., 2015). Os desequilíbrios das citocinas e quimiocinas, que são moléculas sinalizadoras que medeiam a resposta inflamatória, podem influenciar a função neuronal e a interação neuronal-glia que estão associados ao TEA (Rodríguez e Kern, 2011). O estudo de Liao et al., (2020) sugere que devido à ativação excessiva da microglia em várias regiões do cérebro, com possível secreção de citocinas e citotoxinas, ocorre disfunção neuronal ou danos provocando o TEA (Zimmerman et al., 2005; Rodríguez e Kern, 2011; Morgan et al., 2010)

Este enfoque na neuroinflamação como um fator importante na fisiopatologia do TEA é um passo significativo na compreensão desta condição complexa. Ele abre caminho para novas abordagens terapêuticas que tratam os processos inflamatórios no cérebro, oferecendo novas maneiras de tratar ou mitigar os sintomas do TEA (Kern et al., 2016; González-Toro et al., 2013). A nível molecular, a fisiopatologia do TEA parece envolver modificações nos sistemas de neurotransmissão, como glutamatérgico,

GABAérgico e serotoninérgico em indivíduos com TEA (Provençal et al., 2020; Marotta et al., 2020). Essas alterações se manifestam em níveis de atividade sináptica, incluindo redução e hiperconectividade regional específica no TEA, indicando mudanças anatômicas, de conectividade e funcionais (Matta et al., 2019). Além disso, relata-se desregulação imunológica (Bauman e Kemper, 2005); estresse oxidativo (Usui et al., 2023) e desequilíbrio na excitação-inibição neural (Rubenstein e Merzenich, 2003; Gogolla et al., 2009). A desregulação do sistema imunológico, incluindo citocinas pró-inflamatórias como a interleucina (IL)-6, tem sido associada a vários déficits neurológicos relacionados ao TEA (Ashwood et al., 2008).

Estudos de neuroimagem em humanos e animais com TEA têm mostrado alterações semelhantes em várias regiões do cérebro, incluindo diminuição do volume de substância cinzenta e aumento do volume de substância branca em áreas associadas à comunicação social, ao processamento sensorial e à cognição. Foi verificado também a diminuição do tamanho do corpo caloso, hipertrofia do cerebelo afetando a conectividade entre diferentes regiões cerebrais. Esses achados fornecem indícios importantes sobre as bases neurobiológicas do TEA (Pierce, 2001).

Para Smith e Jones (2018) as semelhanças entre humanos e animais indicam que as mudanças estruturais no cérebro que afetam o TEA são uma característica transversal entre as espécies. No entanto, é crucial considerar as diferenças entre os achados em humanos e modelos animais. Eles observam que, nos modelos animais, as alterações no cérebro associadas ao TEA são geralmente mais pronunciadas do que em humanos. Além disso, a natureza das alterações pode variar dependendo do modelo de animal específico utilizado. Essas diferenças sublinham a complexidade do TEA e a necessidade de abordagens de pesquisa diversificada, conforme indicado por Green et al. (2018).

O estudo de Alexander e colegas (2017) revela alterações apresentadas na substância branca em casos de TEA, tanto em humanos quanto em modelos animais. Como observado, essas alterações sugerem uma organização diminuída das fibras nervosas, resultando em uma comunicação cerebral menos eficiente e destacam que a desorganização das fibras nervosas compromete a conectividade neural, essencial para o funcionamento cerebral otimizado (Alexander et al., 2017).

Apesar destas variações, os resultados de estudos de neuroimagem em humanos e animais com TEA fornecem *insights* valiosos sobre as bases biológicas do distúrbio. Como (Ellegood et al., 2015) apresentou em sua análise de vinte e seis modelos de TEA em camundongos, alterações frequentes foram observadas em áreas como o lobo parietal

temporal, córtex cerebelar, lobo frontal, hipotálamo e corpo estriado. Este estudo fornece uma base importante para a compreensão das alterações específicas do TEA. Da mesma forma, o estudo de (Lai et al., 2014), que examinaram imagens de ressonância magnética de 546 crianças com TEA e 546 sem o transtorno, corroboraram a importância das alterações específicas no TEA, apontando que estas são específicas, um aspecto crucial do distúrbio.

1.3.1. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo, um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante do organismo, é subproduto natural do metabolismo celular, mas níveis excessivos podem levar a danos e disfunções celulares. Um estudo de 2023, que analisou amostras de tecido cerebral de pessoas com TEA, descobriu que os níveis de ERO estavam elevados no hipocampo (Bjørklund et al., 2020). Níveis elevados de indicadores como óxido nítrico (ON) e malondialdeído (MDA) foram observados no cérebro de pacientes com TEA, indicando danos celulares associados (Kartawy et al., 2020; Amal et al., 2020).

Estudos em modelos de TEA em camundongos evidenciam um aumento significativo nos níveis de ON, tanto no SNC quanto no periférico. Nesse estudo, os autores investigaram os mecanismos moleculares do estresse oxidativo no TEA e analisaram camundongos com uma mutação no gene SHANK3, que é associada ao TEA, e verificaram níveis elevados de ON, tanto no cérebro quanto no sangue e no fígado, concluindo que a mutação pode levar ao aumento dos níveis de ERO através de vários mecanismos moleculares, incluindo a redução da expressão de enzimas antioxidantes e o aumento da produção de ERO (Chen et al., 2023). Entretanto, a regulação delicada do ON é essencial, pois concentrações excessivas podem levar a sinalização celular anormal. O ON pode se ligar a proteínas de sinalização, alterando sua função (Nakamura et al., 2015), podendo levar a problemas de crescimento, desenvolvimento e função celular ou danificar o DNA, levando à morte celular programada. O ON pode, ainda, estimular a produção de moléculas inflamatórias, que podem causar danos às células e tecidos (Wang et al., 2017; Nakamura et al., 2015; Chen et al., 2023).

O estresse oxidativo está intrinsicamente ligado à inflamação, uma característica frequente em pacientes com TEA (Golomb et al., 2014). A persistência da inflamação pode desencadear vias de sinalização inflamatória, liberando citocinas pró-inflamatórias e afetando a neurotransmissão (Golomb et al., 2014). Além disso, o desequilíbrio entre a

produção de ERO e as defesas antioxidantes pode interferir no desenvolvimento neural, impactando a formação de neurônios, sinapses e outras etapas críticas (Chang et al., 2012).

Genes associados ao TEA desempenham papéis cruciais na resposta antioxidante. Mutações nesses genes podem aumentar a suscetibilidade ao estresse oxidativo, influenciando a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento do TEA. A homeostase do glutamato e GABA, neurotransmissores essenciais, é afetada pelo estresse oxidativo, contribuindo para desequilíbrios na atividade neural em pessoas com TEA (Chang et al., 2012). Além disso, a peroxidação lipídica, um produto do estresse oxidativo, contribui para danos celulares e pode ser medida através do ensaio Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

Tratamentos promissores, incluindo antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC) e melatonina, têm demonstrado melhorar sintomas comportamentais em pacientes com TEA (Rossignol, 2009). Estudos fornecem evidências de que o estresse oxidativo pode desempenhar um papel importante na patogênese do TEA e que a modulação do estresse oxidativo pode ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de tratamentos para o transtorno (Usui et al., 2023; Uddin et al., 2023; Manivasagam et al., 2020).

1.4. N-ACETILCISTEÍNA

A NAC é um derivado da L-cisteína que é produzido naturalmente no corpo humano. A L-cisteína é um aminoácido essencial que é encontrado em proteínas e outros compostos biológicos (Lushchak, 2012). Dentro da célula, a cistina pode ser reduzida a L-cisteína que rapidamente é oxidada no cérebro, que é o componente limitante da molécula antioxidante endógena glutathiona (GSH) (Rushworth e Megson, 2014). A capacidade da NAC de regular a cisteína e as atividades antitransportadoras do glutamato, bem como a biossíntese do GSH, são a chave para sua eficácia terapêutica. A L-cisteína é um precursor da GSH, um importante antioxidante que protege as células dos danos causados pelos radicais livres. A NAC é produzida pela adição de um grupo acetilo à molécula de L-cisteína (Pfaff et al., 2020), essa adição do grupo acetilo protege a L-cisteína da oxidação, o que pode aumentar sua biodisponibilidade e eficácia. Kau (2008) mostrou que a L-cisteína é rapidamente oxidada em cistina no cérebro.

A NAC pode ser encontrada em diferentes formas farmacêuticas, como comprimidos, xaropes e soluções injetáveis, e é usada no tratamento de condições

respiratórias, como bronquite, bronquiectasia, fibrose cística e outras doenças pulmonares em que o muco espesso é um problema. Também é usado em situações de intoxicação por paracetamol, onde sua administração rápida pode ser crucial para prevenir danos hepáticos graves (Frezza et al., 2019; Barnes et al., 2017). Além de suas propriedades mucolíticas e antioxidantes (por meio da doação de grupos sulfidríla para neutralizar os radicais livres), a NAC tem sido objeto de estudos e pesquisas em várias outras áreas de saúde, incluindo o tratamento de doenças psiquiátricas, como transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e dependência de cocaína. Embora essas aplicações ainda estejam em fase de investigação, alguns mecanismos de ação da NAC nessas condições já foram identificados (Wink et al., 2016; Frezza et al., 2019; Dean et al., 2011; Bradlow et al., 2022). Por exemplo, a NAC pode modular a atividade de neurotransmissores como a dopamina e a serotonina, reduzir o estresse oxidativo e a inflamação, que são fatores que contribuem para o desenvolvimento de doenças psiquiátricas e o TEA (Frezza et al., 2019; Bradlow et al., 2022). No entanto, são necessários mais estudos para confirmar esses resultados e determinar a dose e a duração ideal do tratamento (Muller et al., 2022; Hardan et al., 2015).

Além de aumentar os níveis de GSH, a NAC também tem efeitos benéficos sobre a via mTOR e o sistema GABA. O estresse oxidativo está relacionado à disfunção da via mTOR, uma das vias biológicas envolvidas no TEA. A via mTOR regula a síntese de proteínas e o crescimento celular e disfunções nessa via podem estar relacionadas aos sintomas do TEA. A NAC, como antioxidante, pode atuar reduzindo o estresse oxidativo e, indiretamente, influenciar na via mTOR (Gupta, 2016).

A NAC também pode ter efeitos no sistema GABAérgico, que é outra via biológica envolvida no TEA. O GABA é um neurotransmissor inibitório que regula a atividade cerebral e disfunções nessa via têm sido implicadas em problemas de conectividade neural e hiperexcitabilidade em pessoas com TEA. A NAC pode atuar indiretamente nessa via na redução da inflamação e atuando no estresse oxidativo que podem afetar o funcionamento do sistema GABAérgico (Wink et al., 2016).

As evidências clínicas encontradas em um estudo de 2015 sugerem que a NAC pode ser um possível tratamento para o TEA. O estudo foi realizado com 40 crianças com TEA e demonstrou uma redução significativa nos escores de irritabilidade e hiperatividade/abandono (Hardan et al., 2015) Dois estudos clínicos mais recentes, realizados em 2022 e 2023, também sugeriram que a NAC pode ser eficaz no tratamento de sintomas específicos do TEA, como irritabilidade e hiperatividade. No entanto, a

maioria dos estudos sobre a NAC para o tratamento do TEA foi realizada em amostras pequenas. Assim, mais pesquisas são necessárias para avaliar a eficácia e segurança da NAC em populações maiores (Tincani et al., 2023; Muller et al., 2022).

O estudo de Dean et al., (2017) envolvendo 102 crianças, testou o efeito do antioxidante NAC em doses de 500 mg/dia ou placebo, administrados por 6 meses, além do tratamento convencional. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre os grupos de NAC e placebo em relação aos estágios comportamentais avaliados, outros estudos sugerem que doses mais altas de NAC podem ser possíveis para obter benefícios (Ghanizadeh e Moghimi-Sarani, 2013).

Em um estudo de (Hardan et al., 2015) realizado por 12 semanas, duplo-cego, randomizado e controlado por placebo, os participantes receberam inicialmente 900 mg de NAC por dia, aumentando gradualmente para 2.700 mg por dia. Com essa dose mais alta foram observadas melhorias na subescala de irritabilidade da *Aberrant Behavior Checklist*, na escala de estereotipias revisadas da Escala de Comportamento Repetitivo e nos escores de maneirismos da Escala de Responsividade Social (Zhang et al., 2019; Wink et al., 2016; Gupta, 2016). Liu e colaboradores (2022) realizaram uma meta-análise de ensaios clínicos controlados por placebo para avaliar a eficácia das intervenções antioxidantes no tratamento do TEA. A meta-análise incluiu 14 estudos com um total de 1.175 participantes. Os resultados indicaram que as intervenções antioxidantes, incluindo a NAC, foram mais eficazes do que o placebo na melhoria dos sintomas de irritabilidade, distúrbios de comunicação e comportamentos estereotipados. No entanto, o tamanho do efeito foi pequeno. Considerar a NAC como uma terapia adjuvante para O TEA (Wink et al., 2016) parece ser bastante razoável em relação aos seus efeitos benéficos e perfil de segurança revelados neste estudo e em anteriores (Zhang et al., 2019).

1.5 RISPERIDONA

A risperidona (RISP) é um medicamento antipsicótico atípico muito utilizado no tratamento de diversos distúrbios mentais. Foi desenvolvido pela Janssen Pharmaceuticals, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, em 1993, para o tratamento da esquizofrenia em adultos. Em 2006, a FDA aprovou a RISP para o tratamento da irritabilidade associada TEA em crianças e adolescentes (Farmer et al., 2013)

Acredita-se que a RISP seja eficaz no tratamento da irritabilidade do TEA porque reduz os níveis de dopamina no cérebro. A dopamina está envolvida na regulação de comportamentos agressivos e impulsivos (Aman et al., 2005). A RISP também pode ser eficaz no tratamento de outros sintomas do TEA porque aumenta os níveis de serotonina no cérebro, que está envolvida no controle de comportamentos repetitivos e estereotipados (Posey e McDougle, 2001).

A eficácia da RISP em outros sintomas do TEA não está bem clara. No entanto uma revisão sistemática e meta-análise de 14 estudos randomizados controlados por placebo (RCTs) de Scherbanu e sua equipe, (2023) mostrou que a RISP foi associada a uma redução média de 40% da frequência e da gravidade dos comportamentos agressivos, auto lesivos e desafiadores em crianças com TEA (Scherbanu et al., 2023).

1.6 MODELO ANIMAL DE TEA POR ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO VALPROICO (VPA)

Em ratos, a exposição ao VPA durante a gravidez é um modelo que produz resultados neurais e comportamentais que se assemelham aos encontrados em pacientes autistas (Nicolini e Fahnstock, 2018; Mabunga et al., 2015; Ingram et al., 2000a; Bauman e Kemper, 2005). O modelo animal do TEA tem sido usado para estudar mais detalhadamente os potenciais efeitos comportamentais, fisiológicos, neuroanatômicos e moleculares subjacentes ao TEA (Roulet et al., 2013; Mabunga et al., 2015; Kim e Pessah, 2011; Kataoka et al., 2013; Juliandi et al., 2015). A exposição pré-natal ao VPA em ratos pode levar a comportamentos semelhantes ao TEA, como déficits sociais, repetições comportamentais, deficiências cognitivas, além de alterações de comportamentos sociosexuais (Dorantes-Barrios et al., 2024).

Os modelos animais de TEA são uma ferramenta valiosa para a pesquisa sobre o TEA, permitem que os pesquisadores estudem os mecanismos biológicos do distúrbio e desenvolvam novas abordagens terapêuticas. As alterações biológicas que são semelhantes às observadas em humanos incluem i) Alterações nos circuitos neurais, como alterações na conectividade entre diferentes regiões do cérebro ii) Alterações na função de neurotransmissores, como alterações na produção ou na atividade de neurotransmissores iii) Alterações no desenvolvimento cerebral, como alterações no tamanho ou no número de células nervosas (Nguyen e Jones, 2022).

Os modelos animais de TEA são criados por meio de uma variedade de métodos, entre eles i) Indução de mutações genéticas em animais ii) Exposição de animais a toxinas ou infecções iii) Manipulação da dieta ou do ambiente de animais. Os modelos animais do TEA também têm sido usados para testar a eficácia de novas abordagens terapêuticas. Essas abordagens incluem i) Terapia genética, que visa corrigir as mutações genéticas que estão associadas ao TEA ii) Terapia farmacológica, que visa modular a função de neurotransmissores ou neuromoduladores iii) Terapia comportamental, que visa ensinar habilidades sociais e de comunicação (Nguyen e Jones, 2022). Estes modelos demonstram muitas das características estruturais e comportamentais que podem ser observadas em indivíduos com TEA, permitindo assim a definição de vias relevantes de desregulação do desenvolvimento resultante da manipulação ambiental (Mabunga et al., 2015). Assim o modelo animal de TEA por administração de VPA, se torna uma ferramenta útil para avaliar a segurança, tolerabilidade e possível eficácia de novas drogas, estudar o mecanismo de ação de psicofármacos e auxiliar na elucidação dos mecanismos neurobiológicos subjacentes ao TEA.

A NAC surge como um agente promissor no TEA, dada a sua potencialidade em modular aspectos neuroquímicos e inflamatórios implicados na condição. Esta substância demonstra capacidade de elevar os níveis cerebrais de GSH, um antioxidante crucial que, ao ser potencializado, pode atenuar as disfunções oxidativas frequentemente observadas em indivíduos com TEA. Paralelamente, as propriedades anti-inflamatórias da NAC oferecem um meio de intervir nos processos inflamatórios que são sugeridos como contribuintes para a patogênese do TEA. Com base nessas evidências, este estudo visa investigar a eficácia e a segurança do uso adjuvante de NAC em combinação com a RISP, um tratamento farmacológico comumente prescrito para TEA.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito neurológico da NAC associado à RISP sob parâmetros comportamentais e bioquímicos de estresse oxidativo em modelo animal de TEA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Verificar o peso da prole como indicador de desenvolvimento e crescimento em ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e tratados com NAC associada à RISP;
- b. Avaliar o neurodesenvolvimento através do teste de geotaxia negativa e busca pelo ninho em ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA;
- c. Verificar o comportamento locomotor e social em ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e tratados com NAC associada à RISP;
- d. Avaliar parâmetros de dano oxidativo, como concentração de nitrato/nitrito no córtex posterior e cerebelo e conteúdo de sulfidrilas em córtex posterior, cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e tratados com NAC associada à RISP;
- e. Avaliar parâmetros de defesa antioxidante, como atividade da enzima CAT e SOD no córtex posterior, cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de ratos machos submetidos ao modelo animal de TEA e tratados com NAC associada à RISP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PRINCÍPIOS ÉTICOS

Este estudo seguiu todas as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais. Além disso, o projeto passou pela avaliação e aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) com o protocolo número 62/2022 (ANEXO A). Os animais foram procedentes do Biotério Central da UNESC e todos os cuidados foram adotados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante o experimento.

3.2 ANIMAIS

Para conduzir esta pesquisa, utilizou-se um total de 65 ratos *Wistar*, 15 machos e 15 fêmeas adultos, com peso médio de aproximadamente 300 g, que foram utilizados para acasalamento, para gerar 40 filhotes machos, com um peso médio de aproximadamente 10 gramas. As fêmeas são utilizadas somente como matriz. Esses animais foram alojados em gaiolas plásticas de dimensões 41 x 34 x 17 cm, com 4 animais cada, dois machos e duas fêmeas. As condições de alojamento incluíram controle de temperatura a 22 ± 1 °C, umidade de $\pm 55\%$ e um ciclo de iluminação de 12 horas, com luz disponível das 06:00 às 18:00. Além disso, os ratos tiveram livre acesso ao alimento padrão para roedores da Nuvilab (NUVITAL) e água do sistema público de fornecimento que foi filtrada, colocado em bebedouros para os animais em gaiolas de tamanho padrão do biotério. A maravalha que forra as caixas dos animais foi trocada a cada 2 dias e a sala apresentava o sistema de exaustor, de modo a mantê-los com o máximo de conforto possível.

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Para induzir a fase de estro em ratas, adotou-se uma metodologia baseada na exposição das fêmeas a estímulos olfativos provenientes de machos. Inicialmente, uma amostra do substrato (maravalha) utilizado na habitação dos machos é transferida para a caixa das fêmeas. Esse substrato, impregnado com o odor dos machos, serve como estímulo olfativo. A transferência ocorre no término ciclo claro, a exposição ao estímulo olfativo se estenda por todo ciclo escuro. A maravalha é removida ao início do subsequente ciclo claro. Este protocolo visa simular a presença de um macho no ambiente,

promovendo um estímulo natural para a indução do estro nas fêmeas, facilitando assim a sincronização dos períodos férteis para procedimentos experimentais subsequentes. Nos 7 dias seguintes foi coletado secreção vaginal das ratas para verificar em qual período do ciclo fértil ela se encontrava. A secreção foi coletada com pipeta, sendo que foi feito um lavado com 80 uL de salina (SAL) no orifício vaginal da rata e avaliado em microscópio (40 x) para averiguar o padrão de células encontradas. Quando encontrado o padrão de células que correspondem a fase estro, a rata foi acasalada com um rato em uma caixa isolada e na manhã seguinte ao acasalamento foi realizado um outro lavado vaginal com 80 uL de SAL para verificar a presença de espermatozoide. Quando encontrado espermatozoide foi considerado o dia 0,5 embrionário e a rata foi isolada e denominada matriz.

No 12º dia de gestação (DG), as matrizes foram separadas em dois grupos, um grupo com 5 e outro grupo com 10 ratas. O grupo com 10 fêmeas recebeu uma dose de 600 mg/kg de VPA, o volume injetado em cada rata é calculado de acordo com o peso do animal (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dissolvido em solução SAL estéril a 0,9%, com pH 7,4 (grupo VPA-expostos) via injeção intraperitoneal (i.p.), com o objetivo de induzir o modelo animal de TEA. O outro grupo, com 5 ratas, recebeu apenas solução SAL estéril a 0,9%, com pH 7,4 (grupo SAL-expostos) no mesmo protocolo, o volume injetado em cada rata é calculado de acordo com o peso do animal. A partir da injeção as fêmeas não foram manuseadas até o DG 18, quando foram isoladas uma por caixa para poderem iniciar com comportamento de ninho livremente.

Após o nascimento dos filhotes, foram verificados alguns parâmetros de neurodesenvolvimento nos machos. O primeiro a ser realizado, foi o peso da prole, que foi registrado no 9º, 17º e 25º dia pós-natal (DPN). Durante o período de intervenção, que ocorreu entre o 21º e o 35º DPN, a coleta de dados sobre o peso contínuo sendo efetuada. O segundo a ser verificado foi a busca pelo ninho, no 10º DPN. Por fim, o teste de geotaxia negativa, no 15º DPN. Os filhotes machos foram desmamados e separados das matrizes no 21º DPN e as fêmeas foram encaminhadas para descarte. 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).

Após o desmame, as proles VPA-expostos e SAL-expostos foram submetidas a um protocolo de tratamento com NAC via subcutânea (s.c.) e RISP via gavagem (gav.), uma vez ao dia, do 21º ao 35º DPN. O tratamento foi formado por 4 grupos: I) animais expostos à SAL na gestação, SAL (gav.) e SAL (s.c.) no pós-natal; II) animais expostos à

SAL na gestação, 0,1 mg/Kg de RISP (gav.) e 150 mg/Kg de NAC (s.c.) no pós-natal; III) animais exposto ao VPA na gestação, SAL (gav.) e SAL (s.c.) no pós-natal; IV) animais expostos ao VPA na gestação, 0,1 mg/Kg de RISP (gav.) e 150 mg/Kg de NAC (s.c.) no pós-natal.

Sendo assim, os filhotes machos foram divididos em quatro grupos para receberem o tratamento com SAL ou RISP 0,1 mg/mL via gav. e SAL ou NAC 150 mg/mL via s.c., com 10 animais cada grupo:

1. Grupo I – Controle (CT): SAL-expostos + SAL (gav.) + SAL (s.c.);
2. Grupo II (SAL + RISP + NAC): SAL-expostos + RISP 0,1 mg/kg (gav.) + NAC (s.c.);
3. Grupo III (VPA): VPA-expostos + SAL (gav.) + SAL (s.c.);
4. Grupo IV (VPA + RISP + NAC): VPA-expostos + RISP 0,1 mg/kg (gav.) + NAC (s.c.).

Todos os animais foram pesados nos dias de tratamento, ou seja, do 21° DPN ao 35° DPN. Após a conclusão do período de administração do tratamento com SAL, RISP 0,1 mg/kg e/ou NAC 150 mg/kg, no DPN 36° os ratos foram submetidos aos testes comportamentais (teste das três câmaras e campo aberto) e eutanasiados após o último teste comportamental através do uso de guilhotina. Seus cérebros foram removidos para a dissecação do córtex posterior, cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado sendo homogeneizados e utilizados para as análises bioquímicas. A figura 1 representa o delineamento experimental.

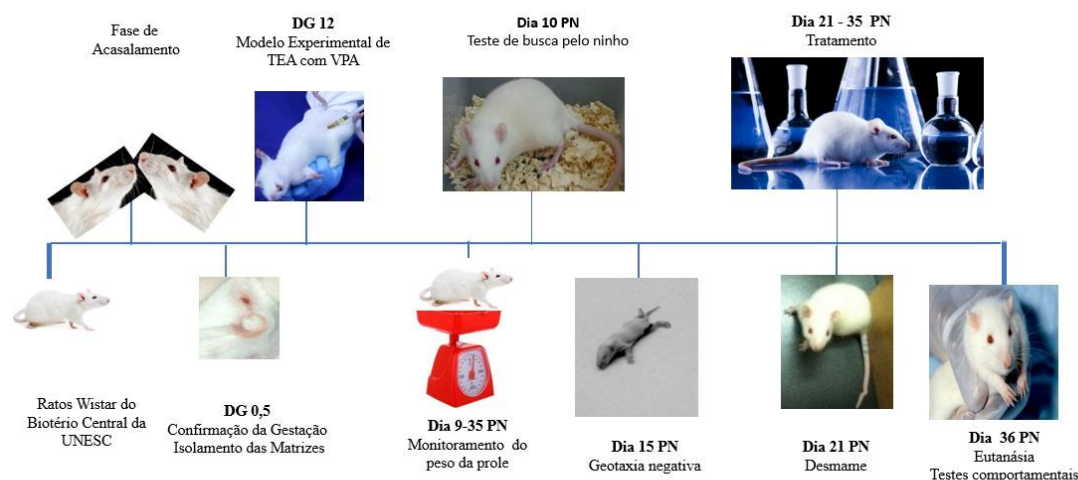


Figura 1 - Linha do tempo do experimento.

3.4 AVALIAÇÃO DO NEURODESENVOLVIMENTO

Para verificar o neurodesenvolvimento dos animais utilizados nestes experimentos, foram analisados alguns parâmetros, como avaliação do peso, teste de busca pelo ninho e teste de geotaxia negativa.

3.4.1. Avaliação do peso

Antes do desmame, nos dias 9º DPN, 17º DPN, 25º DPN, foi verificado o peso da prole. Para a realização desse parâmetro, a matriz foi retirada da caixa dos animais ainda filhotes e colocada em uma caixa limpa. Antes da pesagem, um recipiente de pesagem foi preparado com uma pequena quantidade de maravalha do ninho. A pesagem foi realizada com uma ninhada de cada vez, dividindo o peso pela quantidade de filhotes de cada ninhada. Após o desmame no DPN 21, os animais foram pesados de forma individual entre os DPN 21 e 35. Após cada procedimento, todos os animais eram recolocados na caixa original e devolvidos ao biotério. O recipiente de pesagem era higienizado com álcool 70%, seguido de álcool 10%, assim como a luva do pesquisador era trocada para não haver risco de transferir odor de uma ninhada para outra e a matriz abandonar ou matar os filhotes.

3.4.2 Teste da busca pelo ninho

No 10º DPN todos os animais foram avaliados. O aparato utilizado foi um recipiente plástico (30 × 20 × 13 cm) que foi dividido em três partes e teve as partes laterais cobertas com maravalha, mas deixando um centro claro descoberto. Um lado foi preenchido com a cama da gaiola (aparas do ninho) e o outro lado com aparas esterilizadas. O filhote foi colocado no centro do aparato e a latência para alcançar as maravalhas do ninho e o tempo para fazer qualquer escolha foram registrados. O tempo total do teste foi limitado a 60 segundos. Para manter o cheiro da ninhada/mãe, não foi trocada a maravalha da gaiola-casa nos 2 dias anteriores ao teste (Schneider e Przewłocki, 2005). Após o teste comportamental, o aparato foi limpo com álcool 70% seguindo de álcool 10%, o animal voltou para sua caixa de origem e foi devolvido ao biotério.

3.4.3 Teste de geotaxia negativa

No 15º DPN os animais foram colocados em uma rampa com 45 graus de inclinação, com a cabeça direcionada para baixo. 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 (Ruhela et al., 2019)

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os animais foram submetidos a testes comportamentais para verificar a sociabilidade e preferência social por meio do teste das três câmaras e a locomoção e comportamento exploratório por meio do teste de campo aberto.

3.5.1 Teste das três câmaras

No DPN 35, os ratos foram submetidos ao teste de interação social. O teste, é adaptado de (Kaidanovich-Beilin e Woodgett, 2011) e baseia 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 (120 x 40 x 40) 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%, o animal voltava para sua caixa de origem e era devolvido ao biotério. Foram registrados os seguintes parâmetros: latência para o primeiro encontro com o rato 1 e rato 2, o número de encontro com rato 1.

3.5.2 Teste de campo aberto

No DPN 36 os ratos foram submetidos à avaliação do comportamento da atividade exploratória e locomotora, que foi realizada no teste de campo aberto. O teste é realizado em uma arena quadrada (60 x 60 x 48cm) com piso dividido em 9 quadrados iguais. O animal foi colocado em um quadrante do vértice e deixado explorar por 5 minutos. Dentro deste tempo, foram contabilizados o número de vezes que o animal cruzou os quadrantes com as quatro patas (indicador de atividade locomotora) e número de vezes que ele se levantou sobre as patas traseiras (indicador de atividade exploratória). Após o teste comportamental, o aparato foi limpo com álcool 70% seguido de álcool 10%, o animal voltou para sua caixa de origem e foi devolvido ao biotério (Crawley, 2008, 2007, 1985).

3.6 ANÁLISE DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Para a realização das técnicas bioquímicas, o córtex posterior, cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado foram previamente homogeneizados em tampão PBS (PH 7,4) para atividade da enzima catalase, atividade da enzima superóxido dismutase, para os conteúdos de sulfidrilas e para a determinação da concentração de nitrato e nitrito de modo que a quantidade de tecido utilizado é padronizada em 100 mg e a quantidade de tampão é padronizada para 10 vezes, em μL /peso da amostra (100 mg amostra – 1000 μL tampão PBS). Após esse processo, as amostras homogeneizadas foram centrifugadas, e o sobrenadante armazenado para a realização das análises bioquímicas.

3.6.1 Catalase (CAT)

O seguinte procedimento foi adaptado de (Aebi, 1984) Este método é baseado na diminuição da absorbância a 240 nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água. Após a determinação de cada concentração de proteína, as amostras foram colocadas em contato com o (H_2O_2), ou com o tampão para ter-se um controle branco. Após o contato a absorbância foi imediatamente medida espectrofotometricamente a 240 nm em 3 intervalos entre 1 segundo e 60 segundos. As medições foram expressas como μmols de H_2O_2/mg de proteína degradada.

3.6.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina segundo (Bannister e Calabrese, 1987) Em placa de 96 poços, foi utilizado 5, 10 e 15 μL da amostra (homogeneizadas em tampão glicina), adicionado 5 μL de CAT, pipetado 185 μL , 180 μL e 175 μL (respectivamente) de tampão glicina e 5 μL de adrenalina. A leitura foi realizada em 180 segundos com intervalo de 10 segundos medida espectrofotometricamente a 480nm e os valores foram expressos em unidade de SOD por mg de proteína (U/mg proteína).

3.6.3 Conteúdos de Sulfidrina

Resíduos de aminoácidos – as cisteínas – que contêm sulfidrina (SH) nas proteínas, são alvos suscetíveis a uma variedade de pró-oxidantes. Em diferentes tecidos, as células, incluindo o cérebro, possuem um sistema que regula o status redox dos tióis celulares e protegem as proteínas que contêm SH contra oxidação excessiva. Os radicais sulfidrilas (SH) representam todos os grupos tióis, portanto, conforme descrito por (Aksenov e Markesbery, 2001) para a análise do teor de tiol total e ligado às proteínas, as amostras foram processadas e suspensas em tampão fosfato (PBS, pH, 7,5). O conteúdo total de tiol de cada amostra foi determinado usando ácido ditionitrobenzóico (DTNB) que reduz os grupos tióis e forma um derivado de cor amarela (TNB) e quantificado de acordo com a absorbância a 412 nm usando um espectrofotômetro. Os dados foram expressos como nmol de TNB por mg de proteína.

3.6.4 Concentração de nitrato/nitrito

Uma solução padrão de nitrato de sódio (100 mL) foi diluída seriadamente (200 μM à 1,6 mM) em duplicata, em placa de 96 poços. Após o preparo da curva, 100 μL das

amostras homogeneizadas foram pipetadas em cada poço; em seguida, 100 μL solução de cloreto de vanádio foram adicionados aos poços, rapidamente seguido da adição de reativo de Griess (50 μL de SULF + 50 μL de NEED). Após trinta minutos foi realizada a leitura em 540 nm (Kvietys e Granger, 2012).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados e construídos no programa Graphpad versão 9.0. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média (DPM), o teste de Grubbs e de Shapiro-Wilk foram aplicados para avaliar os *outliers* e a normalidade dos dados, respectivamente. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliadas por meio do teste Kruskal-Wallis. O teste t foi usado para avaliar as diferenças entre as fases e nos testes de desenvolvimento. Para a avaliação das diferenças entre os grupos, foi realizado o teste ANOVA de duas vias. Os critérios de significância utilizados foram de $p < 0,05$. Os asteriscos (* $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) caracterizam o grau de significância.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO NEURODESENVOLVIMENTO

4.1.1 Peso Corporal

Os animais foram monitorados quanto ao ganho de peso antes de receberem o tratamento (DPN 9 e 17) e ao longo dos 15 dias de tratamento (DPN 21 ao 35). A Figura 2 apresenta o ganho de peso nos dias experimentais DPN 9, 17, 21, 23, 26, 29, 32 e 35. Todos os grupos tiveram o ganho de peso normal como o esperado, sem diferenças significativas entre os grupos.

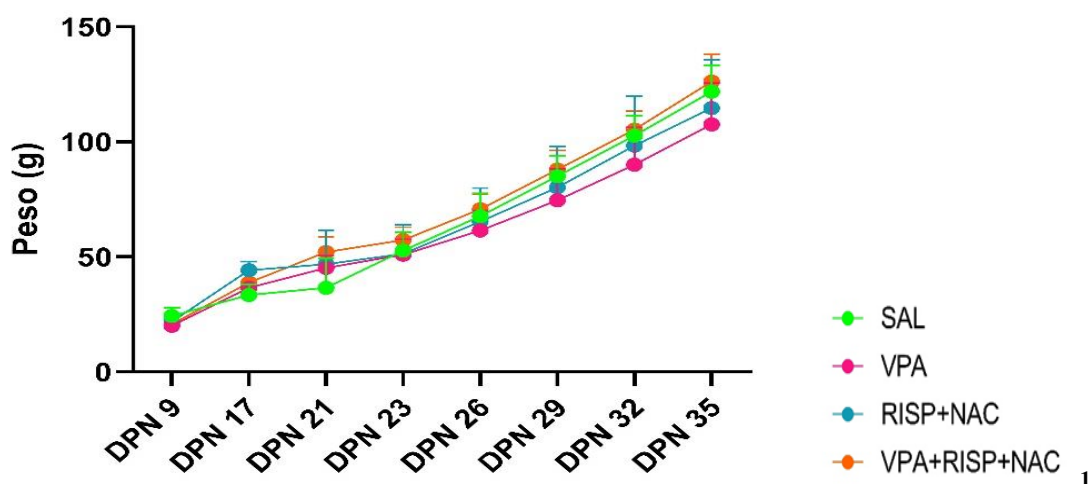


Figura 2 - Peso dos animais. Acompanhamento do peso (g) dos animais (n= 15-18) submetidos ao modelo experimental de TEA induzido por VPA, pré (9 e 17 DPN) e pós-tratamento com RISP+NAC (21, 23, 26, 29, 32 e 35 DPN) (n= 11-31).

4.1.2 Avaliação da busca pelo ninho

A Figura 3A representa o tempo de latência e a Figura 3B, o tempo de chegada ao ninho em segundos durante o teste comportamental de busca pelo ninho. As análises estatísticas, realizadas por meio do teste T, revelaram uma diferença significativa ($p < 0,001$) entre o grupo CT e o grupo VPA nas duas situações, nas quais o grupo CT concluiu a atividade com maior rapidez em comparação com o grupo VPA.

¹SAL: SAL-expostos + SAL (gav.) + SAL (s.c.)

VPA: VPA-expostos + SAL + SAL (gav.) + SAL (s.c.)

RISP + NAC: SAL-expostos + RISP 0,1 mg/kg (gav.) + NAC (s.c.)

VPA+RISP+NAC: VPA-expostos + RISP 0,1 mg/kg (gav.) + NAC (s.c.).

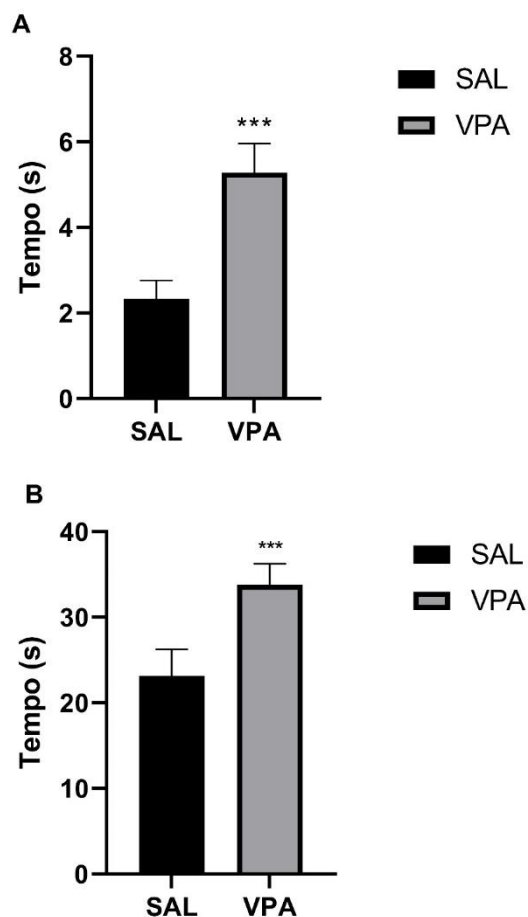


Figura 3 - Teste comportamental de busca pelo ninho. A) Tempo de latência. B) Tempo de chegada ao ninho (n= 11-31). No teste realizado o tempo está medido em segundos. Os dados são representados como média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste T, com post-hoc de Mann-Whitney e foram consideradas significativas quando *** $p < 0,001$.

4.1.3 Avaliação da geotaxia negativa

Um outro parâmetro utilizado para analisar o neurodesenvolvimento, foi a geotaxia negativa. A análise da Figura 4 revela que os animais expostos ao VPA utilizaram um tempo significativamente maior ($p < 0,05$) para girar 180° no seu próprio eixo corporal sobre o aparato, em comparação com os animais do grupo CT.

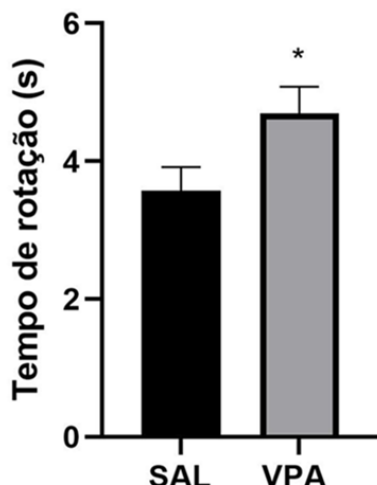


Figura 4 - Teste de geotaxia (tempo em segundos) (n= 16-26). Os dados são representados como média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram conduzidas usando o teste T, com post-hoc de Mann-Whitney e os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$.

4.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

Ao fim do tratamento de 15 dias com NAC isolada ou em associação com a RISP, foram realizados testes comportamentais para verificar o comportamento social e locomotor dos animais com o objetivo de verificar os efeitos destes compostos nos diferentes grupos.

4.2.1 Teste das três câmaras

A Figura 5 mostra o comportamento social dos animais. Na Figura 5A e 5B é mostrado que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na latência do primeiro encontro com o rato 1 e uma diminuição ($p < 0,05$) no número de encontros com o rato 1, no grupo VPA + SAL em relação com grupo CT. Isto significa que os animais do modelo animal de TEA levaram mais tempo para interagir a primeira vez com o rato desconhecido e buscaram encontrá-lo menos vezes do que os animais CT. Conforme esperado, quando os animais expostos ao VPA foram tratados com RISP + NAC, o tempo de latência para o primeiro encontro foi atenuado em relação aos que não receberam o tratamento (VPA + SAL).

A análise de ANOVA de duas vias, revelou a presença de interação ($p < 0,01$) entre a exposição pré-natal ao VPA e a exposição pós-natal à RISP + NAC no parâmetro de

latência para o primeiro encontro com o animal desconhecido. Já o efeito principal foi exercido pelo tratamento RISP + NAC ($p < 0,001$).

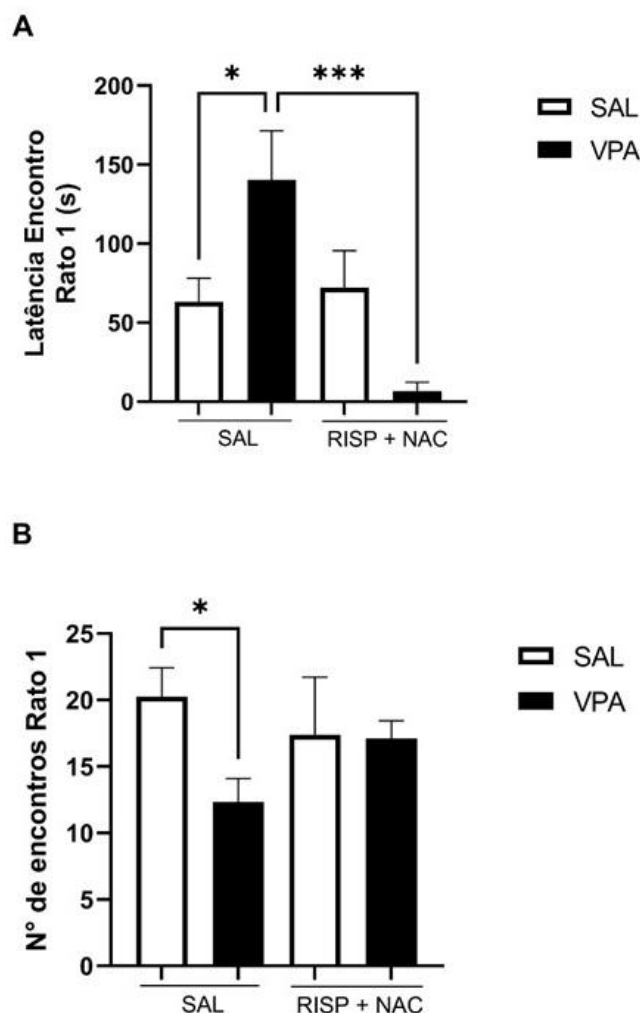


Figura 5 - Teste das três câmaras. A) Latência encontro com rato 1 (tempo em segundos). B) Número de encontros com rato 1 (tempo em segundos) ($n = 8-20$). Os dados são representados como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância two-way ANOVA, seguido do teste de post-hoc de Tukey, $*p < 0,05$ e $***p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle (CT).

4.2.2 Teste de campo aberto

No teste de campo aberto (Figura 6), que avalia a atividade locomotora dos animais, foram registrados os dados referentes ao número de cruzamentos (Figura 6A) e de levantamentos (Figura 6B).

Os dados coletados e analisados demonstraram aumento do número de cruzamentos nos grupos VPA tratados com SAL ($p < 0,001$) e com RISP + NAC ($p <$

0,01), quando comparados ao grupo CT (Fig 6A). Na Figura 6B, foi observado o número de levantamentos, onde o grupo VPA + SAL e o grupo VPA + RISP + NAC apresentaram um aumento neste parâmetro ($p < 0,01$) em relação ao grupo CT.

Nestes parâmetros, não foi encontrado interação entre a exposição pré-natal ao VPA e a exposição pós-natal à RISP + NAC após a análise de ANOVA de duas vias. Porém, foi verificado que houve um efeito principal pela exposição ao VPA, nos resultados dos cruzamentos ($p < 0,001$) e dos levantamentos ($p < 0,001$), efetuados pelos animais.

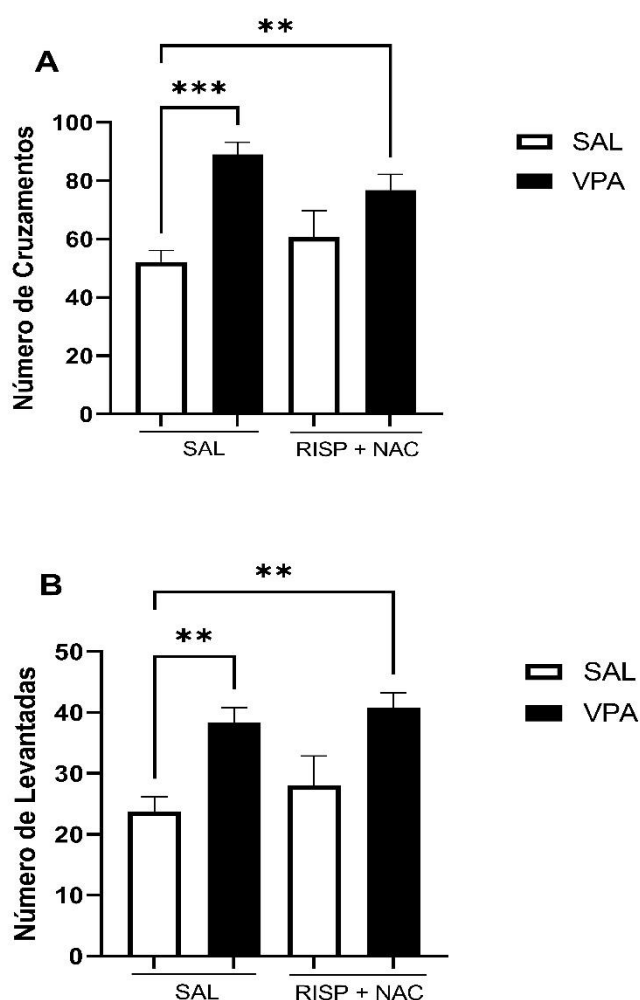


Figura 6 - Teste do campo aberto. A) Número de cruzamentos. B) Número de levantadas (n= 8-15). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via seguido do post hoc de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

4.3 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Para avaliar os efeitos da NAC associado com a RISP, foram avaliados parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo no cérebro de ratos submetidos ao modelo animal de TEA induzido por VPA no período pré-natal e que foram tratados com NAC associada à RISP no período pós-natal. Para isso, técnicas como atividade da enzima CAT, atividade da enzima SOD e conteúdo de sulfidrilas foram realizadas nas regiões do córtex posterior, cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado. Ademais, as regiões de córtex e cerebelo ainda foram analisadas quando a concentração de nitrato/nitrito.

4.3.1 Córtex posterior

Quando avaliado os parâmetros bioquímicos do córtex posterior, foi observado que enzimas antioxidantes de animais expostos ao VPA estavam com atividade enzimática diminuída (Figura 7). Isto porque a atividade da enzima CAT (Figura 7A) e a atividade da enzima SOD (Figura 7B) foi menor no grupo VPA + SAL ($p < 0,05$), quando comparadas com a ação antioxidante destas enzimas no grupo CT. Além disso, a região do córtex posterior mostrou que o grupo SAL + RISP + NAC também apresentou menor atividade da enzima CAT ($p > 0,01$) quando comparada com o grupo CT (Figura 6A).

A análise de ANOVA de duas vias, revelou a presença de interação entre a exposição pré-natal ao VPA e a exposição pós-natal à RISP + NAC, tanto em CAT ($p < 0,01$) quanto em SOD ($p < 0,05$). A exposição que exerceu efeito principal nos resultados da atividade da enzima CAT, foi a RISP + NAC ($p < 0,05$), já na atividade da enzima SOD, foi o VPA ($p < 0,05$).

Já nos parâmetros de dano oxidativo verificados através da quantificação de conteúdo de sulfidrilas (Figura 7C) e concentração de nitrato/nitrito (Figura 7D), não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Nestes indicadores, não houve interação entre as exposições.

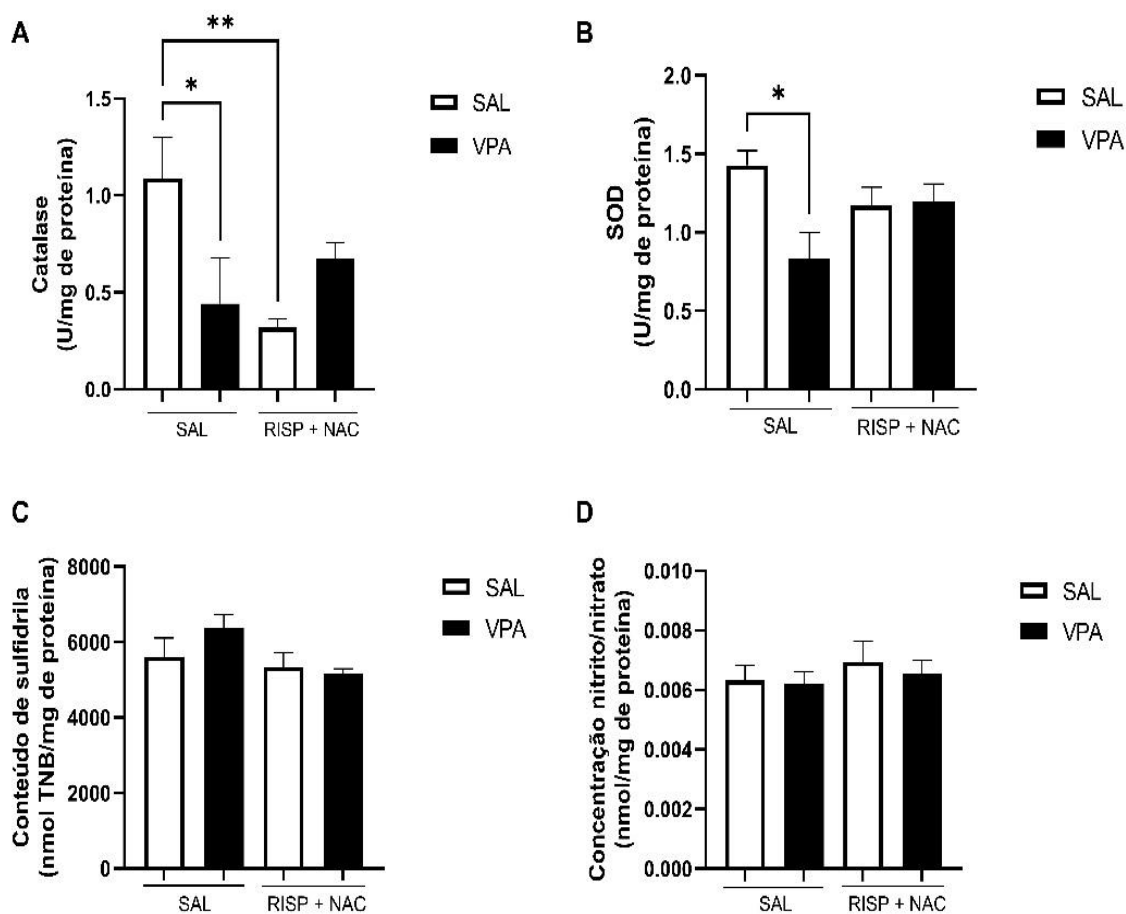


Figura 7 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do córtex posterior de animais submetidos ao modelo animal de TEA. Atividade da enzima catalase (A), Atividade da enzima SOD (B), Conteúdo de sulfidrila (C) e Concentração de nitrato/nitrito (n=3-8 animais/grupo). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância two-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Tukey, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle (CT).

4.3.2 Cerebelo

Na região cerebelar, foi observado que as enzimas antioxidantes CAT e SOD não apresentam alterações estatísticas significativas (Figura 8A e Figura 8B), assim como os conteúdos de sulfidrila (Figura 8C) também não demonstraram mudanças. Nesta mesma linha, também não foi encontrado interação entre as exposições.

Em relação à concentração de nitrato/nitrito (Figura 8D), houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos animais expostos ao VPA + SAL quando comparado com os animais do grupo CT. Não houve interação entre as exposições, mas houve efeito principal da exposição ao VPA ($p < 0,05$) sobre os resultados encontrados.

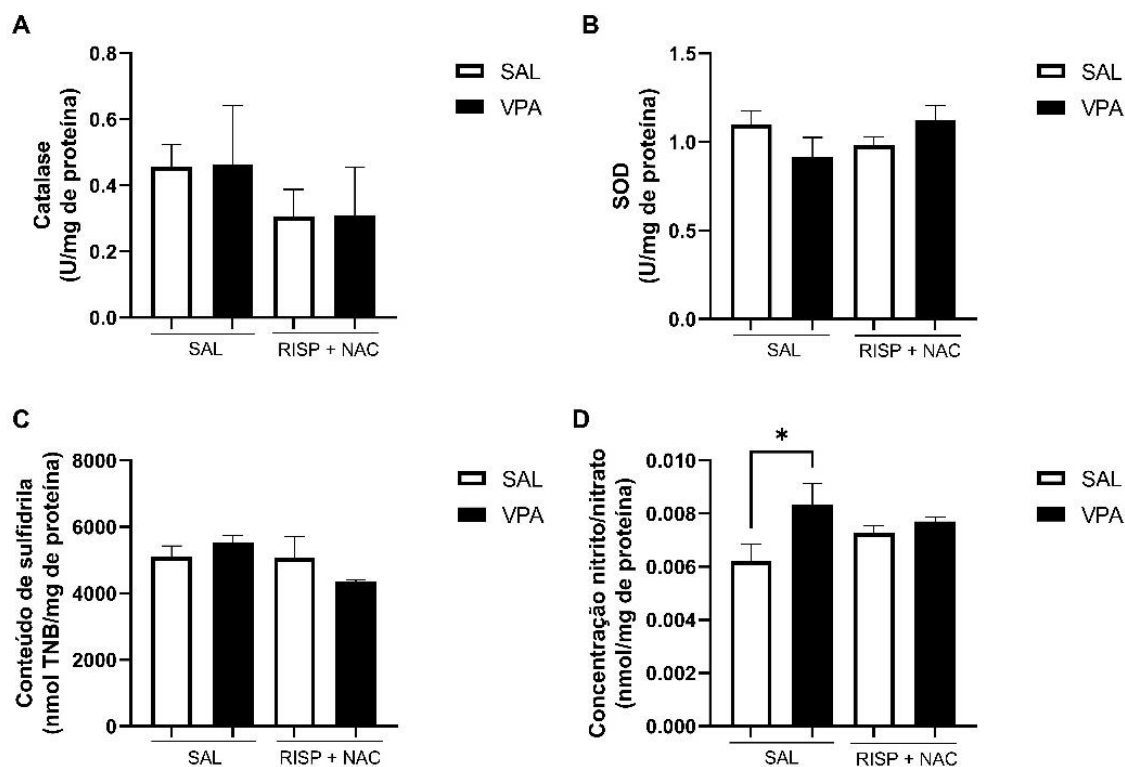


Figura 8 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do cerebelo de animais submetidos ao modelo animal de TEA. Atividade da enzima catalase (A), Atividade da enzima SOD (B), Conteúdo de sulfidrilas (C) e Concentração de nitrato/nitrito (n=3-8 animais/grupo). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância two-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Tukey, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (CT).

4.3.3 Hipocampo

No hipocampo (Figura 9), foi possível verificar diminuição ($p < 0,01$) na atividade da enzima SOD no grupo VPA + SAL (Figura 9B), em comparação com o grupo CT. Interessantemente, a atividade desta enzima nos animais expostos ao VPA, aumentou ($p < 0,001$) quando foram submetidos ao tratamento com RISP + NAC. Nesta análise, foi observado interação entre as exposições pré e pós-natal ($p < 0,001$), mas não houve uma exposição que exerceu efeito principal sobre os resultados.

Nos demais parâmetros, atividade da enzima catalase (Figura 9A) e conteúdo de sulfidrilas (Figura 9C), não foi observado alterações estatísticas significativas. Em nenhum dos parâmetros foi encontrado interação entre as exposições pré e pós-natal.

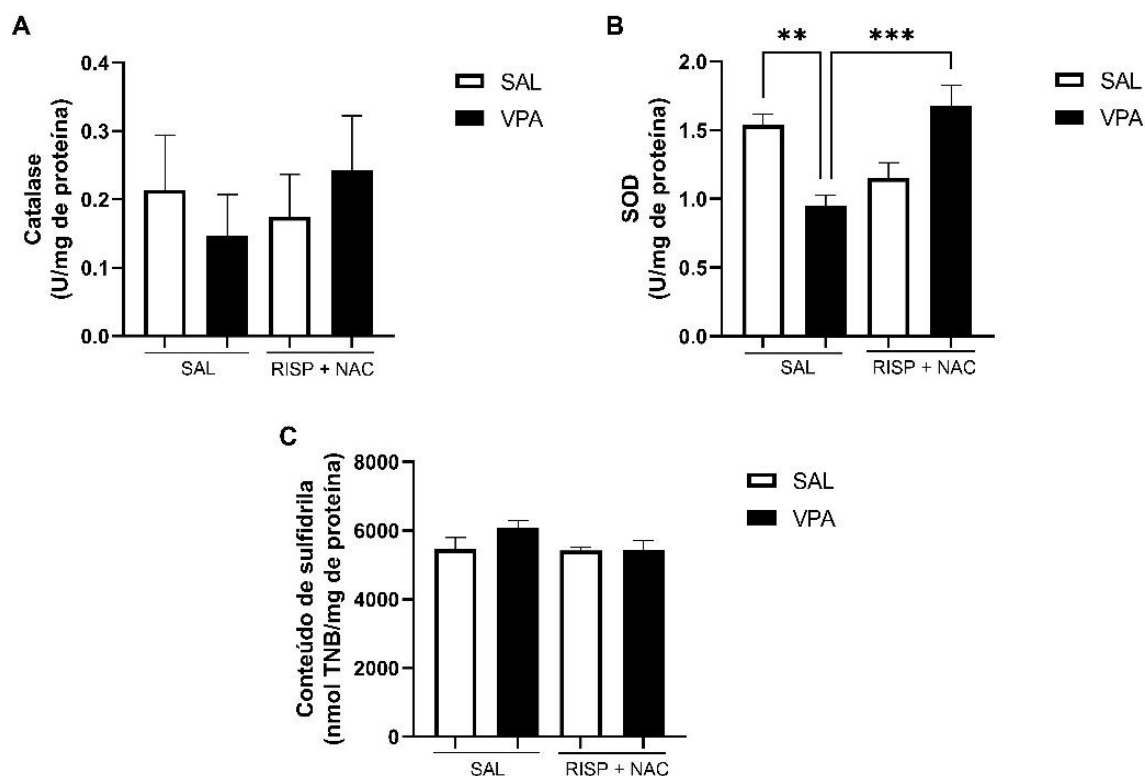


Figura 9 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do hipocampo de animais submetidos ao modelo animal de TEA. Atividade da enzima catalase (A), Atividade da enzima SOD (B), Conteúdo de sulfidrilas (C) e Concentração de nitrato/nitrito ($n=3-8$ animais/grupo). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância two-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Tukey, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle (CT).

4.3.4 Córtex pré-frontal

Em relação aos parâmetros bioquímicos na região do córtex pré-frontal (Figura 10), foram observadas algumas alterações. A atividade da enzima CAT (Figura 10A) se mostrou aumentada ($p < 0,01$) no grupo VPA + SAL, quando comparada com o grupo CT. Já quando os animais expostos ao VPA foram tratados com RISP+NAC, a atividade diminuiu ($p < 0,01$) em relação ao grupo VPA + SAL.

Nesta análise, foi verificado que houve interação ($p < 0,05$) entre a exposição ao VPA no período pré-natal e RISP + NAC no período pós-natal, respectivamente. Nesta estrutura, analisando a atividade da enzima CAT, ambas as exposições exerceram efeito principal ($p < 0,01$).

Quanto à atividade da enzima SOD (Figura 10B), houve aumento na atividade no grupo VPA + RISP + NAC em relação ao grupo VPA + SAL. Neste parâmetro, também houve interação entre as exposições ($p < 0,05$), sendo que a RISP + NAC, exerceu efeito

principal sobre os resultados ($p < 0,01$). Não houve alteração estatística entre grupos e exposições no conteúdo de sulfidrilas (Figura 10C) nesta região encefálica.

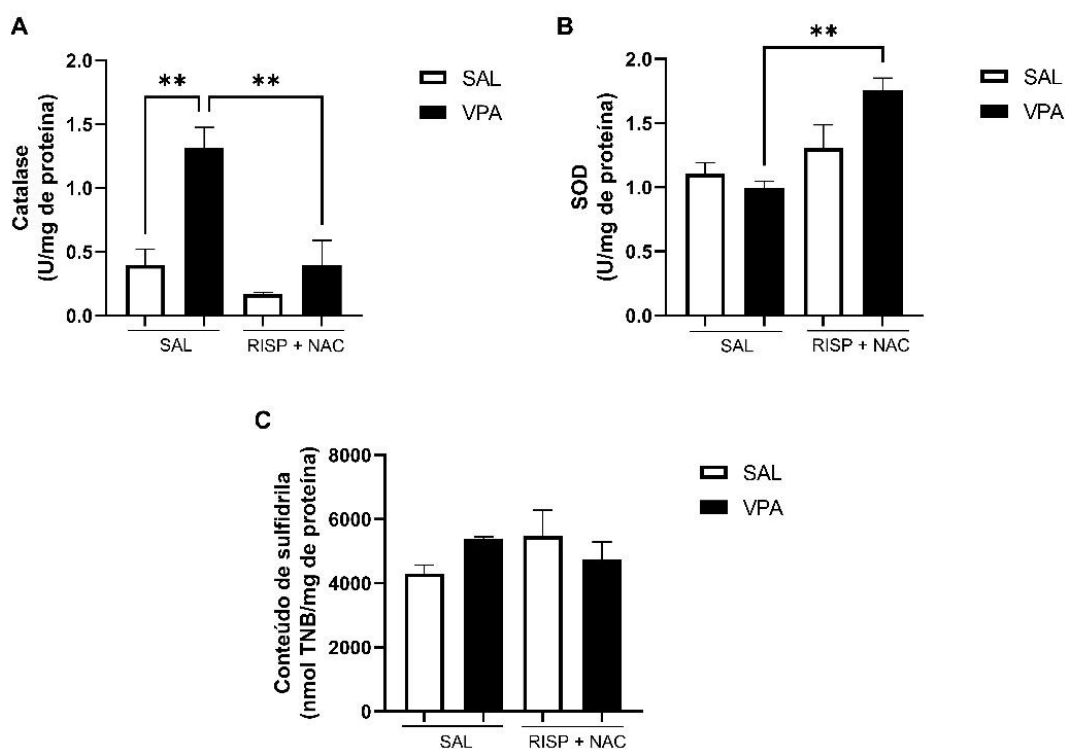


Figura 10 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do córtex pré-frontal animais submetidos ao modelo animal de TEA. Atividade da enzima catalase (A), Atividade da enzima SOD (B), Conteúdo de sulfidrilas (C) e Concentração de nitrato/nitrito ($n=3-8$ animais/grupo). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância two-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Tukey, $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (CT).

4.3.5 Estriado

Por fim, na estrutura do estriado (Figura 11), foi verificado a presença de uma tendência ($p = 0,06$), na atividade da enzima SOD (Figura 11B), no grupo VPA + RISP + NAC, em comparação com o grupo VPA + SAL. Neste parâmetro, houve interação entre as exposições ao VPA e à RISP + NAC ($p < 0,05$).

Já no conteúdo de sulfidrilas (Figura 11C), o grupo VPA + RISP + NAC mostrou diminuição ($p < 0,05$) deste parâmetro quando comparado ao grupo VPA + SAL. Além disso, não foi verificado interação entre as exposições, mas a exposição à RISP + NAC exerceu efeito principal ($p < 0,05$) sobre os resultados obtidos.

Por fim, não houve diferença estatística entre os grupos na atividade da enzima CAT (Figura 10A).

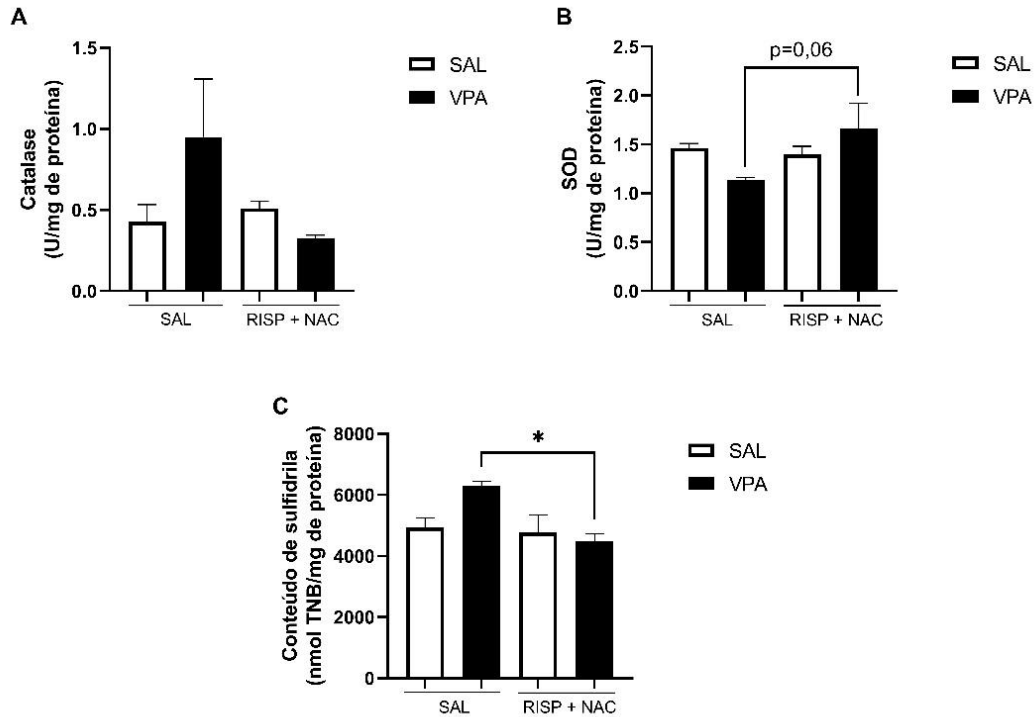


Figura 11 - Efeito do tratamento pós-natal com NAC+RISP sobre parâmetros bioquímicos na região do estriado de animais submetidos ao modelo animal de TEA. Atividade da enzima catalase (A), Atividade da enzima SOD (B) e Conteúdo de sulfidrilas (C) (n=3-8 animais/grupo). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância two-way ANOVA, seguido do teste de post hoc de Tukey, * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (CT).

5. DISCUSSÃO

Compreender o TEA tem sido um desafio cada vez maior para os pesquisadores devido ao aumento de sua prevalência e à complexidade da neurobiologia do cérebro humano (Mabunga et al., 2015) Esses fatores dificultam o desenvolvimento de tratamentos eficazes. O presente estudo investigou os efeitos terapêuticos da administração combinada de NAC e RISP em um modelo animal de TEA, induzido por VPA, durante o período pré-natal. Os resultados mostraram que o tratamento com NAC + RISP parece reduzir parcialmente os efeitos neurotóxicos do VPA.

A escolha de utilizar a RISP e a NAC como tratamentos se baseia em diferentes premissas: A RISP é um medicamento antipsicótico que tem sido usado para tratar sintomas comportamentais, como agressão e irritabilidade, em indivíduos com TEA. A RISP é o único medicamento especificamente aprovado pela FDA para tratar a irritabilidade e os comportamentos repetitivos associados ao TEA (Scahill et al., 2007) A NAC é um antioxidante que tem sido estudado devido aos seus efeitos neuroprotetores e à capacidade de reduzir a inflamação no cérebro. Acredita-se que esse medicamento possa ter benefícios na modulação dos mecanismos subjacentes ao TEA, como o estresse oxidativo (Zhang et al., 2017; Nikoo et al., 2015; Farokhnia et al., 2013).

A utilização da exposição pré-natal ao VPA em roedores, conforme adotado neste estudo, é de um modelo amplamente reconhecido para investigar o TEA, conforme estabelecido inicialmente por (Rodier et al., 1996). Este modelo é notável por sua validade de constructo, pois existe a hipótese de que a exposição pré-natal a certos agentes terapêuticos, nesse caso o VPA, pode aumentar o risco de TEA em humanos, além de apresentar fenótipos comportamentais e biológicos nos animais semelhantes aos observados no TEA humano. Embora os modelos de roedores expostos ao VPA não reproduzam integralmente a complexidade do TEA humano, eles têm se mostrado ferramentas valiosas para aprofundar o entendimento da etiologia e biologia do TEA. Esses modelos permitem investigações detalhadas sobre influências maternas, fatores ambientais e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas potenciais visando os principais sintomas do transtorno (Roulet et al., 2013; Markram et al., 2008)(Tartaglione et al., 2019; Silverman et al., 2010). A interpretação dos resultados obtidos a partir desses modelos requer cautela e deve ser considerada no contexto de um conjunto mais amplo de evidências e abordagens experimentais (Wagner et al., 2006; Schneider e Przewłocki, 2005; Roulet et al., 2013).

Um aspecto importante nos estudos com modelo animal de VPA é a avaliação do ganho de peso dos animais, um indicador do desenvolvimento físico geral. Nesta pesquisa, foi monitorado o ganho de peso dos animais antes do início do tratamento (DPN 9 e 17) e ao longo dos 15 dias de tratamento. Como observado, não houve diferença significativa no ganho de peso entre os diferentes grupos. Este padrão nos grupos sugere que o modelo animal experimental não afetou o crescimento básico dos animais. Isso é importante, pois garante que quaisquer diferenças observadas em parâmetros comportamentais ou bioquímicos estão relacionadas ao tratamento recebido pelos animais e não a um estado geral de saúde prejudicado, que alteraria os parâmetros monitorados (Schneider et al., 2008; Roullet et al., 2013; Bambini-Junior et al., 2011).

No presente estudo, as análises comportamentais foram conduzidas em quatro grupos distintos de ratos: o grupo CT, não exposto ao VPA; o grupo CT + NAC + RISP, submetido a um regime pós-natal de RISP+NAC; o grupo VPA + SAL, exposto ao VPA e tratado no pós-natal com solução SAL e o grupo VPA+NAC+RISP, igualmente exposto ao VPA e submetido a um regime pós-natal de RISP+NAC. Embora o mecanismo exato das alterações no neurodesenvolvimento induzidas pelo VPA em animais com fenótipo de TEA ainda não seja totalmente compreendido, pesquisas revelam comprometimento significativo na atividade motora e na orientação espacial desses animais (Morrison-Levy et al., 2018; Bi et al., 2018; Altman e Sudarshan, 1975).

Os testes comportamentais de busca pelo ninho e o geotaxia negativa são utilizados para avaliar diferentes aspectos do desenvolvimento e comportamento em modelos animais de TEA (Schneider e Przewłocki, 2005). Esses testes apresentam dados sobre como o VPA pode influenciar o neurodesenvolvimento e comportamento relacionado ao TEA. Alguns artigos sugerem que o tempo de latência em tarefas de busca e interação social pode ser um reflexo da acuidade olfativa e da capacidade cognitiva na percepção espacial em roedores (Ruhela et al., 2019). A acuidade olfativa é uma habilidade importante para os roedores, pois eles usam o olfato para se orientar, encontrar comida e evitar predadores. Além disso, muitos estudos relataram que o teste de geotaxia negativa é um componente importante na avaliação de diferentes distúrbios neurológicos (Santos et al., 2007) e do neurodesenvolvimento (Schneider et al., 2006; Wagner et al., 2006). Os estudos apresentados sugerem que os roedores com melhor acuidade olfativa (busca pelo ninho) e capacidade cognitiva (geotaxia) são mais rápidos em tarefas de busca e interação social. De fato, estudos como os de Tartaglione e colaboradores (2019) e Schneider e colaboradores (2008) fornecem evidências que sugerem que o VPA pode causar

alterações no neurodesenvolvimento que levam a déficits comportamentais relacionados ao TEA. Esses déficits podem incluir problemas de orientação, locomoção, exploração do ambiente e interesse por novos estímulos (Tartaglione et al., 2019; Schneider et al., 2008).

Nesse estudo, o teste de busca pelo ninho mostrou diferenças marcantes entre os grupos CT e VPA. Tais alterações são vistas como potenciais indicadores de problemas no desenvolvimento neurológico, importantes no contexto de estudos sobre o TEA, especialmente em situações sem pistas visuais (Schneider e Przewłocki, 2005; Ruhela et al., 2019; Altman e Sudarshan, 1975). Para a compreensão da patogênese do TEA e para o desenvolvimento de novas terapias os animais submetidos ao modelo animal VPA fornecem evidências que sugerem que o VPA pode causar alterações no neurodesenvolvimento, comportamento social e comportamento repetitivo que contribuem para o desenvolvimento de comportamentos autistas (Servadio et al., 2018; Schneider et al., 2008; Ruhela et al., 2019; Rouillet et al., 2013). Estudos mostraram que o tempo de latência em tarefas como a busca pelo ninho pode ser um reflexo da capacidade olfativa e cognitiva em roedores, sendo que os ratos expostos ao VPA apresentaram um tempo de latência mais longo, sugerindo que eles podem apresentar déficits no olfato e/ou na capacidade cognitiva (Tartaglione et al., 2019; Schneider et al., 2008; Ruhela et al., 2019).

Essas características de atraso do neurodesenvolvimento foram encontradas também em outros estudos, que indicam que os ratos expostos ao VPA exibem padrões atípicos no desenvolvimento de habilidades motoras, como virar-se e subir em planos inclinados indicando atrasos ou deficiências no desenvolvimento motor e cognitivo (Ruhela et al., 2019). Déficits semelhantes foram encontrados no teste da geotaxia, no qual os resultados mostraram que o grupo CT completou a atividade em um tempo mais curto em comparação com o grupo VPA. Tais alterações na geotaxia negativa são vistas como potenciais indicadores de problemas no desenvolvimento neurológico, importantes no contexto de estudos sobre o TEA (Schneider e Przewłocki, 2005a; Ruhela et al., 2019; Altman e Sudarshan, 1975).

Outra análise comportamental realizada foi o teste das três câmaras, o qual permite a avaliação de comportamentos sociais e preferências em animais, sendo particularmente útil para estudar o TEA, visto que este transtorno frequentemente envolve alterações no comportamento social. No teste das três câmaras, o comportamento do animal é observado enquanto ele tem a opção de interagir com um outro animal (geralmente

colocado em uma das câmaras laterais) ou permanecer sozinho. Isso é especialmente relevante para o estudo do TEA, pois uma das características do transtorno é a dificuldade em interações sociais (Frye, 2018). Este teste é fundamental para entender como certas condições ou tratamentos podem afetar o comportamento social de modelos animais e, por extensão, oferece uma base para o entendimento do TEA em humanos. Através dele, é possível avaliar não apenas a preferência social, mas também comportamentos repetitivos e anormais, que são aspectos chave no diagnóstico do TEA (Bambini-Junior et al., 2011). No presente estudo, ficou evidente o prejuízo social nos animais VPA-expostos (aumento no tempo de latência para o primeiro encontro e menor número de encontros com o rato novo).

Em 2005, Schneider e Przewlocki foram os primeiros a avaliar de forma detalhada o comportamento de ratos que receberam uma única injeção de VPA no dia 12,5 de gestação. Seu estudo demonstrou que os ratos machos expostos ao VPA apresentavam alteração no padrão comportamental semelhantes às dos pacientes autistas, sendo esse uma diminuição no número de explorações sociais e um aumento da latência para comportamentos sociais, sugerindo déficits sociais (Schneider e Przewlocki, 2005). Esses achados corroboram com de Moldrich e colaboradores (2013), o qual observou que ratos submetidos a uma dose de 600 mg/kg de VPA no período pré-natal apresentam prejuízos no comportamento social. De modo interessante, a combinação RISP + NAC melhorou significativamente o parâmetro de latência ao primeiro encontro. Quando avaliados separadamente, a RISP e a NAC apresentam resultados diferentes em relação ao comportamento social (Schiavi et al., 2022). O NAC, quando ofertado em dose de 150 mg/kg parece atenuar os efeitos deletérios causados pela administração de VPA na interação social de animais submetidos ao teste das três câmaras (Schiavi et al., 2022). Por outro lado, o tratamento com RISP apresenta resultados contraditórios. Apesar de a RISP demonstrar eficácia na diminuição de comportamentos repetitivos em modelos animais de TEA, alguns estudos indicam que a sua administração não é eficaz em diminuir deficiências de abordagem social em camundongos BTBR (Silverman et al., 2010; Chadman, 2011; Gould et al., 2011). Em contraste, um estudo de Atia e colaboradores (2023), mostra que animais cujas mães receberam uma injeção de VPA (500 mg/kg) durante a gestação expressaram déficits comportamentais, visto que quando apresentados a um novo objeto ou novo rato, os animais passaram mais tempo interagindo com o novo objeto. No entanto, os animais que receberam o tratamento com RISP

resgataram o déficit de sociabilidade observado nos roedores VPA expostos no período pré-natal.

O teste de campo aberto, é empregado para avaliar locomoção e comportamento ansioso em roedores (Seibenhener e Wooten, 2015). O número de cruzamentos é um parâmetro usado como um indicador de atividade locomotora e exploração do ambiente, onde o maior número de cruzamentos pode sugerir maior atividade e mobilidade do animal no espaço de teste. A análise desse parâmetro pode ajudar a avaliar o comportamento geral do animal, incluindo seu nível de ansiedade, hiperatividade ou interesse pelo ambiente. Já o número de levantamentos é um parâmetro utilizado como indicador de comportamento exploratório e vigilância. Os animais levantam-se para obter uma visão mais ampla do ambiente. A análise desse parâmetro pode fornecer informações sobre a atenção do animal ao ambiente, seu nível de ansiedade e sua disposição para explorar ou reagir a estímulos (Cheng et al., 2020).

Os resultados do presente estudo apontaram que o VPA promoveu um aumento no comportamento locomotor e exploratório, e o tratamento com RISP+NAC não foi capaz de atenuar os efeitos da exposição pré-natal ao VPA. De maneira semelhante, a administração de VPA na dose de 500 mg/kg no período pré-natal levou a um aumento da atividade locomotora e diminuição da atividade exploratória em ratos, através do teste de campo aberto (Fereshetyan et al., 2021). Por outro lado, Schneider e Przewlocki (2005) mostram que a injeção de 600 mg/kg de VPA ocasiona uma diminuição da atividade exploratória, enquanto eleva o comportamento estereotipado e compulsivo. Em complemento, quando administrado na dose de 500 mg/kg, o VPA também apresentou, a diminuição da atividade exploratória (Kataoka et al., 2013). Este resultado reforça a noção de que a exposição ao VPA pode induzir alterações comportamentais associadas ao fenótipo do TEA, conforme relatado em estudos anteriores (Tartaglione et al., 2019; Silverman et al., 2010; Rouillet et al., 2013; Ingram et al., 2000). Conforme mencionado anteriormente, a RISP e a NAC são promissoras em tratar os sintomas comportamentais em modelos animais de TEA quando avaliados de maneira isolada. Desse modo, estudos demonstram que o tratamento com NAC em um modelo de TEA induzido por uma injeção única de VPA (600 mg/kg) durante a gestação, é capaz de melhorar o comportamento ansioso e estereotipado evidenciado pelo teste de campo aberto (Zhang et al., 2023). Ao translacionar para os humanos o tratamento com NAC, um ensaio piloto randomizado e controlado realizado com crianças autistas que receberam NAC via oral, demonstrou que o tratamento foi capaz de melhorar o comportamento estereotipado/repetitivo, além de

diminuir significativamente a irritabilidade (Hardan et al., 2012). Ainda, o tratamento com RISP em camundongos mutantes para o gene codificador da quinase 1 induzível por sal (SIK1) foi capaz de melhorar o comportamento repetitivo, mas não demonstrou nenhuma alteração no comportamento social (Badawi et al., 2021). Conforme reportado acima, o tratamento com RISP apresenta contradições no que se refere ao comportamento autista. Sugere-se que a não efetividade da monoterapia com este antipsicótico nos parâmetros exploratórios e repetitivos, possa estar relacionada com a redução da função sináptica inibitória causada pelo tratamento, levando a um maior desequilíbrio excitatório/inibitório, o qual é observado na fisiopatologia do TEA (Badawi et al., 2021).

O presente estudo também investigou os efeitos bioquímicos da administração combinada da NAC e RISP em relação a parâmetros relacionados ao estresse oxidativo cerebral em ratos submetidos a um modelo animal de TEA. Métodos analíticos específicos foram utilizados para quantificar as atividades das enzimas antioxidantes catalase e SOD, além do nível de grupos sulfidrilas e nitritos e nitratos no córtex posterior, cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de animais submetidos ao modelo animal de TEA.

O cérebro, em particular, é extremamente vulnerável ao estresse oxidativo devido à sua limitada capacidade antioxidante e alta demanda de energia (Bjørklund et al. 2020). O estresse oxidativo leva a lesões em neurônios e células gliais em áreas cerebrais associadas ao TEA, resultando em alterações comportamentais (Menezo et al., 2015; Hu et al., 2020). Desse modo, intervir e tratar o estresse oxidativo parece ser uma ação promissora para melhorar indivíduos com TEA. Portanto, diversos antioxidantes estão sendo investigados para o tratamento, incluindo a NAC (Liu et al., 2022).

A NAC é um medicamento precursor da cisteína, um componente importante do sistema antioxidante, desse modo atua como um pró-fármaco, desempenhando um papel crucial na conversão em GSH, essencial para a proteção celular contra o estresse oxidativo (Lushchak, 2012b; Iskusnykh et al., 2022; Gu et al., 2015; Deponte, 2017) No presente estudo observou-se que no córtex posterior os animais expostos somente ao VPA e aqueles tratados com NAC + RISP (grupo SAL + NAC + RISP) apresentaram uma diminuição significativa na atividade da enzima CAT quando comparado ao grupo CT. A atividade da enzima CAT é um importante indicador da capacidade antioxidante celular, pois atua no peróxido de hidrogênio, um oxidante potente que pode causar danos às células (Uddin et al., 2023; James et al., 2006).

Verificou-se também uma diminuição significativa de SOD no grupo exposto ao VPA, evidenciando os prejuízos da exposição pré-natal a este composto. De modo similar à CAT, a SOD é vital na defesa antioxidante ao converter radicais superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio, mitigando assim o potencial de dano a componentes celulares vitais como DNA, proteínas e lipídios. Este papel é crucial no cérebro, particularmente devido à sua alta suscetibilidade a danos oxidativos. Estudos destacam a importância da SOD no contexto de doenças neurodegenerativas e inflamatórias, evidenciando sua função como um biomarcador significativo e potencial alvo terapêutico (Rushworth e Megson, 2014; Lushchak, 2012; Iskusnykh et al., 2022; Deponte, 2017). Ademais, não foram observadas alterações nos níveis de sulfidrila e nitritos/nitratos no córtex posterior de ratos submetidos ao modelo animal de TEA. Os grupos tiol (-SH) nas proteínas, principalmente na cisteína, são importantes para a função enzimática, regulação da estrutura proteica, e sinalização celular (Guzzi e La Porta, 2008; Brandes et al., 2009).

O estresse nitrosativo é um tipo de estresse celular que ocorre devido ao acúmulo de espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o ON e seus derivados (Stamler et al., 2001). O ON é uma molécula de sinalização importante no corpo, envolvida na regulação da vasodilatação, neurotransmissão e respostas imunológicas (Moreno-López et al., 2004). Ele é produzido pelas células endoteliais, neurônios e macrófagos, entre outras células, a partir do aminoácido L-arginina, pela ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (Bjørklund et al., 2020). Quando produzido em excesso, o NO pode reagir com radicais superóxidos para formar peroxinitrito, um oxidante potente e nitrante que pode danificar uma ampla gama de moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas e DNA (Carreras et al., 1994; Giasson et al., 2002). Este processo pode contribuir para a patogênese do TEA (Okamoto e Lipton, 2015). A medição dos níveis de nitrato/nitrito fornece uma estimativa indireta da produção de NO e do estresse nitrosativo (Tripathi et al., 2020; Manivasagam et al., 2020; Amal et al., 2020). Em condições basais, nitratos e nitritos estão presentes em concentrações relativamente constantes, refletindo o equilíbrio entre a produção de NO e sua remoção ou conversão (Manivasagam et al., 2020). Um aumento nos níveis de nitrato/nitrito pode indicar um aumento na produção de ON e estresse nitrosativo, que podem estar associados a inflamação, danos celulares e morte. Por outro lado, uma redução pode indicar uma diminuição na produção de NO ou uma melhora na capacidade antioxidante celular de neutralizar radicais livres antes que eles possam reagir com o NO (Tripathi et al., 2020).

Já nos achados no cerebelo, foi observado um aumento significativo nos níveis de nitrito/nitrato nos animais expostos ao VPA quando comparado com os animais do grupo CT. Não houve interação entre as exposições, mas houve efeito principal da exposição ao VPA. O achado desse estudo está de acordo com a literatura onde alguns autores concluem que o estresse oxidativo e nitrosativo podem estar envolvidos na patogênese do TEA, contribuindo para os sintomas da doença, como déficits de comunicação e interação social, comportamentos repetitivos e restritos e hiperatividade (Zawadzka et al., 2021; Usui et al., 2023). Não houve alterações significativas na atividade de SOD, CAT e conteúdo de sulfidrila no cerebelo.

Quanto ao hipocampo, foi observado uma diminuição significativa somente na atividade de SOD, no grupo VPA-exposto, quando comparado ao grupo CT; e o tratamento NAC e RISP foi capaz de recuperar tal prejuízo, sugerindo um potencial terapêutico desta combinação no manejo do estresse oxidativo associado ao TEA. Na literatura científica, estudos como o de Napoli et al., (2013) têm demonstrado a importância das vias antioxidantes e do manejo do estresse oxidativo no cérebro de indivíduos com TEA (Usui et al., 2023). A RISP tem sido utilizada para tratar sintomas comportamentais associados ao TEA (Farmer et al., 2013), enquanto o NAC é conhecido por suas propriedades antioxidantes, como a promoção da síntese de glutathione, um antioxidante endógeno crucial (Rushworth e Megson, 2014; Dean et al., 2011). A combinação de tratamentos que abordam tanto os sintomas comportamentais quanto o estresse oxidativo pode oferecer uma abordagem terapêutica mais eficaz (Kong et al., 2021; Hardan et al., 2012; Behmanesh et al., 2019). A ausência de mudanças significativas na atividade da CAT e no conteúdo de sulfidrilas reforça a necessidade de uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos bioquímicos específicos afetados no TEA e de como diferentes tratamentos podem modular essas vias (Sweeten et al., 2004; Castro-Gago et al., 2008). Além disso, foi examinada a implicação do córtex pré-frontal em modelos animais do TEA. A análise dos dados bioquímicos revelou modificações significativas nesta região cerebral, que desempenha funções cruciais em processos cognitivos, abrangendo planejamento, tomada de decisões, controle inibitório e modulação afetiva (Mohapatra e Wagner, 2023). Observou-se um aumento significativo na atividade CAT no grupo VPA em comparação ao grupo CT. Curiosamente, este aumento foi atenuado no grupo VPA + RISP + NAC, indicando uma possível ação terapêutica destes agentes na modulação da atividade da CAT no contexto do TEA (Nikoo et al., 2015). Esses resultados sugerem que tanto a exposição ao VPA quanto o tratamento

subsequente com RISP + NAC influenciam de maneira principal a atividade da enzima CAT no córtex pré-frontal. Quanto a atividade da enzima SOD, houve aumento no grupo VPA + RISP + NAC em relação ao grupo VPA. Aqui, também houve interação entre as exposições, sendo que a RISP + NAC, exerceu efeito principal sobre os resultados. Não houve alteração estatística entre grupos e exposições no conteúdo de sulfidrilas nesta região encefálica. Disfunções no córtex pré-frontal são consistentemente associadas ao TEA, alterações em comportamentos sociais e cognitivo e na adaptação ambiental (Zhao et al., 2022). As variações bioquímicas observadas no córtex pré-frontal podem refletir ou influenciar o espectro comportamental e cognitivo do TEA. Deste modo, o estudo das intervenções farmacológicas capazes de modular essas disfunções são fundamentais para o aprimoramento das abordagens terapêuticas direcionadas a este distúrbio (Leisman et al., 2023). As disfunções bioquímicas no córtex pré-frontal podem ser tanto reflexas quanto contribuintes para as características comportamentais e cognitivas do TEA (Lai, Lombardo, Chakrabarti, et al., 2014). A pesquisa das implicações de intervenções farmacológicas que modulam essas alterações bioquímicas é de extrema importância para o avanço de terapias efetivas para o TEA (Chauhan e Chauhan, 2006).

Por fim, as análises do estriado revelaram uma tendência de aumento na atividade da SOD no grupo VPA + RISP + NAC, em comparação com o grupo VPA não tratado. Este resultado sugere que o tratamento pós-natal com RISP + NAC pode melhorar a atividade da SOD observado no grupo VPA, sem tratamento. De maneira interessante, um estudo demonstrou a capacidade do NAC de restaurar a expressão da SOD e da CAT no soro e nas células sanguíneas de trabalhadores expostos ao chumbo (Kasperczyk et al., 2014). Além disso, outro estudo recente verificou que pacientes infectados por SARS-CoV-2 apresentavam conteúdo de SOD diminuídos e o tratamento com NAC foi capaz de elevar esse parâmetro (Soto et al., 2023). Ainda, é importante ressaltar que a RISP quando administrada em camundongos adolescentes é capaz de diminuir a expressão indutível da NOS, além de aumentar a atividade de CAT e SOD em algumas áreas do cérebro (Casquero-Veiga et al., 2019). A análise da Figura 11C mostra que o grupo VPA + RISP + NAC apresentou diminuição no conteúdo de sulfidrilas, quando comparado ao grupo VPA. Este resultado sugere que o tratamento pós-natal com RISP + NAC pode contribuir para a diminuição do conteúdo de sulfidrilas no estriado de ratos expostos pré-natalmente ao VPA. Interessantemente, a RISP parece atuar de maneira antioxidante ao elevar os níveis de GSH, melhorando a defesa antioxidante e, concomitantemente, diminuindo os efeitos pró-oxidantes e deletérios do glutamato extracelular (Quincozes-

Santos et al., 2010). Além disso, Zerín et al. (2018) demonstrou que o tratamento com RISP por 3 meses foi capaz de elevar os níveis das defesas antioxidantes não enzimáticas, como GSH, vitamina E e vitamina C em pacientes esquizofrênicos. Esses efeitos também são visualizados *in vitro*, visto que a RISP inibiu a formação de ERO induzida por lipopolissacarídeo em células humanas U937 (Chen et al., 2013). Esses dados sugerem que a RISP é capaz de diminuir *in vivo* e *in vitro* o estresse oxidativo que caracterizou o dano cerebral ou celular mediado pela exposição a um insulto (Chen et al., 2013).

6. CONCLUSÃO

Esta pesquisa destacou a interface complexa entre o estresse oxidativo e nitrosativo e o TEA e informou como esses desequilíbrios bioquímicos podem influenciar o desenvolvimento neural. A exposição a fatores ambientais, como medicamentos durante o desenvolvimento pré-natal, surge como um influenciador crítico no surgimento de características autistas, ressaltando a importância da compreensão aprofundada desses mecanismos na identificação de alvos terapêuticos potenciais e estratégias de intervenção.

Embora limitado por um tamanho de amostra modesto, este estudo abriu caminhos para futuras investigações sobre a eficácia do tratamento combinado RISP + NAC. Essa abordagem promissora e holística demonstra potencial para abordar simultaneamente os sintomas comportamentais e os desequilíbrios bioquímicos no TEA, sugerindo uma estratégia terapêutica mais eficaz e personalizada.

Em síntese, a sinergia potencial de RISP + NAC no TEA destaca-se como uma área de pesquisa importante, com potencial para avançar significativamente nas abordagens terapêuticas. O desafio agora é expandir essas descobertas através de pesquisas adicionais, que poderão solidificar e expandir o entendimento e tratamento do TEA, conduzindo a avanços significativos na área da saúde mental.

REFERÊNCIA

- Aebi, H. (1984). [13] *Catalase in vitro* (p. 121–126). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Aksenov, M. Y., e Markesbery, W. R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 302(2–3), 141–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)
- Alexander, B., Akil, M., Rosen, S., e Charney, D. S. (2017). Neuroinflammation in psychiatric disorders: A review of the evidence and implications for treatment. *Neuropsychopharmacology*, 4(1), 17–32.
- Altman, J., e Sudarshan, K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*, 23, 896–920. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(75\)90114-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(75)90114-1)
- Amal, M., El-Khodary, H., e El-Sayed, S. (2020). Oxidative stress in autism spectrum disorder: A review of the literature. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 6940231. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.
- Aman, M. G., Arnold, L. E., Cook, E. H., Jr., e McDougle, C. J. (2005). Risperidone in children with autism spectrum disorders: Results of a double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 44(6), 563–572.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.)*.
- American Psychiatric Association. (2022). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed., text rev.)*. American Psychiatric Publishing.
- ASHWOOD, P., ENSTROM, A., KRAKOWIAK, P., HERTZPICCIOTTO, I., HANSEN, R., CROEN, L., OZONOFF, S., PESSAH, I., e DEWATER, J. (2008). Decreased transforming growth factor beta1 in autism: A potential link between immune dysregulation and impairment in clinical behavioral outcomes. *Journal of Neuroimmunology*, 204(1–2), 149–153. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.07.006>
- Asperger, H. (1944). Die “Autistischen Psychopathen” im Kindesalter. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 117(6), 76–136. <https://doi.org/10.1007/BF00666719>
- Asperger, H. (1968). Zur Differentialdiagnos des kindlichen Autismus. *Acta Pedopsychiatrica*, 35, 136–145.
- Associação Americana de Psiquiatria. (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed.)*.

- Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2002
Principal Investigators, e Centers for Disease Control and Prevention. (2007).
Prevalence of autism spectrum disorders--autism and developmental disabilities
monitoring network, 14 sites, United States, 2002. *Morbidity and mortality weekly
report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)*, 56(1), 12–28.
- Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2006
Principal Investigators, e Centers for Disease Control and Prevention (CDC).
(2009). Prevalence of autism spectrum disorders - Autism and Developmental
Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *Morbidity and mortality
weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)*, 58(10), 1–20.
- Badawi, M., Mori, T., Kurihara, T., Yoshizawa, T., Nohara, K., Kouyama-Suzuki, E.,
Yanagawa, T., Shirai, Y., e Tabuchi, K. (2021). Risperidone Mitigates Enhanced
Excitatory Neuronal Function and Repetitive Behavior Caused by an ASD-
Associated Mutation of SIK1. *Frontiers in molecular neuroscience*, 14, 706494.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.706494>
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G. A., Moreira, J. C. F., Riesgo, R., e Gottfried,
C. (2011). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate:
Behavioral changes and liver parameters. *Brain Research*, 1408, 8–16.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.015>
- Banks-Leite, L., e Galvão, I. (2000). *A educação de um selvagem*.
- Bannister, J. V., e Calabrese, L. (1987). *Assays for Superoxide Dismutase* (p. 279–312).
<https://doi.org/10.1002/9780470110539.ch5>
- Bargiela, S., Steward, R., e Mandy, W. (2016). The Experiences of Late-diagnosed
Women with Autism Spectrum Conditions: An Investigation of the Female Autism
Phenotype. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 46(10), 3281–3294.
<https://doi.org/10.1007/s10803-016-2872-8>
- Barnes, M. E., De Luca, R., Di Renzo, A., Di Giovanni, G., Di Lorenzo, G. ., e
Esposito, G. (2017). N-acetylcysteine for irritability in children with autism
spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *European Child e
Adolescent Psychiatry*, 31(1), 1–13.
- Bauman, M. L., e Kemper, T. L. (2005). Neuroanatomic observations of the brain in
autism: a review and future directions. *International Journal of Developmental
Neuroscience*, 23(2–3), 183–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.09.006>
- Beckerman, B., Jerrett, M., Brook, J. R., Verma, D. K., Arain, M. A., e Finkelstein, M.
M. (2008). Correlation of nitrogen dioxide with other traffic pollutants near a
major expressway. *Atmospheric Environment*, 42(2), 275–290.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.09.042>
- Behmanesh, H., Moghaddam, H. S., Mohammadi, M.-R., e Akhondzadeh, S. (2019).
Risperidone Combination Therapy With Propentofylline for Treatment of Irritability
in Autism Spectrum Disorders: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled

Clinical Trial. *Clinical Neuropharmacology*, 42(6), 189–196.
<https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000368>

- Bertero, A., Liska, A., Pagani, M., Parolisi, R., Masferrer, M. E., Gritti, M., Pedrazzoli, M., Galbusera, A., Sarica, A., Cerasa, A., Buffelli, M., Tonini, R., Buffo, A., Gross, C., Pasqualetti, M., e Gozzi, A. (2018). Autism-associated 16p11.2 microdeletion impairs prefrontal functional connectivity in mouse and human. *Brain*, 141(7), 2055–2065. <https://doi.org/10.1093/brain/awy111>
- Bettelheim, B. (1967). *The empty fortress: infantile autism and the birth of the self*. . Free Press of Glencoe.
- Bi, X., Liu, Y., Jiang, Q., Shu, Q., Sun, Q., e Dai, J. (2018). The Diagnosis of Autism Spectrum Disorder Based on the Random Neural Network Cluster. *Frontiers in Human Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00257>
- Bjørklund, S., Strömberg, M., e Svensson, K. (2020). Elevated oxidative stress in the hippocampus of individuals with autism spectrum disorder. . *Translational Psychiatry*, 10(1), 245., 10(1), 245.
- Bleuler, E. (1911). *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*. Deuticke.
- Bradlow, R. C. J., Berk, M., Kalivas, P. W., Back, S. E., e Kanaan, R. A. (2022). The Potential of N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) in the Treatment of Psychiatric Disorders. *CNS Drugs*, 36(5), 451–482. <https://doi.org/10.1007/s40263-022-00907-3>
- Calderón-Garcidueñas, L., Mora-Tiscareño, A., Ontiveros, E., Gómez-Garza, G., Barragán-Mejía, G., Broadway, J., Chapman, S., Valencia-Salazar, G., Jewells, V., Maronpot, R. R., Henríquez-Roldán, C., Pérez-Guillé, B., Torres-Jardón, R., Herriot, L., Brooks, D., Osnaya-Brizuela, N., Monroy, M. E., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., ... Engle, R. W. (2008). Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: A pilot study with children and dogs. *Brain and Cognition*, 68(2), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.bandc.2008.04.008>
- Carlezon, W. A., Kim, W., Missig, G., Finger, B. C., Landino, S. M., Alexander, A. J., Mokler, E. L., Robbins, J. O., Li, Y., Bolshakov, V. Y., McDougle, C. J., e Kim, K.-S. (2019). Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behaviors and neuroimmune function in mice. *Scientific Reports*, 9(1), 16928. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53294-z>
- Carreras, M. C., Pargament, G. A., Catz, S. D., Poderoso, J. J., e Boveris, A. (1994). Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS letters*, 341(1), 65–68. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80241-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80241-6)
- Casquero-Veiga, M., García-García, D., MacDowell, K. S., Pérez-Caballero, L., Torres-Sánchez, S., Fraguas, D., Berrocoso, E., Leza, J. C., Arango, C., Desco, M., e Soto-Montenegro, M. L. (2019). Risperidone administered during adolescence induced metabolic, anatomical and inflammatory/oxidative changes in adult brain: A PET and MRI study in the maternal immune stimulation animal model. *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of*

Neuropsychopharmacology, 29(7), 880–896.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2019.05.002>

- Castro-Gago, M., Blanco-Barca, O., Gómez-Lado, C., Pintos-Martínez, E., Campos-González, Y., e Eiris-Puñal, J. (2008). [Association between autistic spectrum and mitochondrial pathology]. *Revista de Neurologia*, 47(1), 52–53.
- Chadman, K.K. Fluoxetine but not risperidone increases sociability in the BTBR mouse model of autismo. (2011). *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 97(3):586-94. doi: 10.1016/j.pbb.2010.09.012.
- Chakrabarti, S. (2001). Pervasive Developmental Disorders in Preschool Children. *JAMA*, 285(24), 3093. <https://doi.org/10.1001/jama.285.24.3093>
- Chakrabarti, S., e Fombonne, E. (2005). Pervasive Developmental Disorders in Preschool Children: Confirmation of High Prevalence. *American Journal of Psychiatry*, 162(6), 1133–1141. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.6.1133>
- Chang, Y.-C., Lin, Y.-H., e Lee, Y.-T. (2012). Oxidative stress and autism spectrum disorder. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 42(10), 2119–2133.
- Chauhan, A., e Chauhan, V. (2006). Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*, 13(3), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.05.007>
- Chawarska, K., Macari, S., Klin, A., Volkmar, F. R., e Fombonne, E. (2013). Early motor development in autism spectrum disorders: A review. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 43, 146–160.
- Chen, L., Bell, E. M., Caton, A. R., Druschel, C. M., e Lin, S. (2010). Residential mobility during pregnancy and the potential for ambient air pollution exposure misclassification. *Environmental Research*, 110(2), 162–168.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.11.001>
- Chen, M. L., Wu, S., Tsai, T. C., Wang, L. K., e Tsai, F. M. (2013). Regulation of macrophage immune responses by antipsychotic drugs. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 35(5), 573–580. <https://doi.org/10.3109/08923973.2013.828744>
- Chen, X., Li, Y., He, Y., Zhou, M., Li, W., Huang, W., Wang, J., Wang, C., Zhang, Y., e Zhang, L. (2023). Shank3 mutation increases oxidative stress in the brain and periphery of autism spectrum disorder mice. *Neurochemical Research*, 48(2), 477–487.
- Cheng, Y., Na, Q., Wang, J., Wang, Y., Dong, J., Yin, J. (2020). RasGRF1 participates in the protective effect of tanshinone IIA on depressive like behaviors of a chronic unpredictable mild stress induced mouse model. *Gene*. 5;754:144817. doi: 10.1016/j.gene.2020.144817.
- Crawley, J. N. (1985). Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neuroscience e Biobehavioral Reviews*, 9(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90030-2)

- Crawley, J. N. (2007). Mouse Behavioral Assays Relevant to the Symptoms of Autism*. *Brain Pathology*, 17(4), 448–459. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00096.x>
- Crawley, J. N. (2008). Behavioral Phenotyping Strategies for Mutant Mice. *Neuron*, 57(6), 809–818. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.001>
- Dawson, G. (2008). Early behavioral intervention in autism spectrum disorders. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 17, 01–27.
- Dean, K. L., Lecavalier, L., Smith, I. M., e Aman, M. G. (2017). N-acetylcysteine for irritability in children with autism spectrum disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. . *Journal of the American Academy of Child e Adolescent Psychiatry*, 56(1), 41–51.
- Dean, O., Giorlando, F., e Berk, M. (2011). N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *Journal of Psychiatry e Neuroscience*, 36(2), 78–86. <https://doi.org/10.1503/jpn.100057>
- Deponte, M. (2017). The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures? *Antioxidants e Redox Signaling*, 27(15), 1130–1161. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7123>
- Durkin, M. S., Maenner, M. J., Meaney, F. J., Levy, S. E., DiGuseppi, C., Nicholas, J. S., Kirby, R. S., Pinto-Martin, J. A., e Schieve, L. A. (2010). Socioeconomic Inequality in the Prevalence of Autism Spectrum Disorder: Evidence from a U.S. Cross-Sectional Study. *PLoS ONE*, 5(7), e11551. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011551>
- Ellegood, J. A., Lee, J., Xu, J., e Geschwind, D. H. (2015). A systematic review of the neuropathology of autism spectrum disorder in animal models. *Brain Research*, 1–22.
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-Nava, C., Patel, V., Paula, C. S., Wang, C., Yasamy, M. T., e Fombonne, E. (2012). Global Prevalence of Autism and Other Pervasive Developmental Disorders. *Autism Research*, 5(3), 160–179. <https://doi.org/10.1002/aur.239>
- Estes, M. L., e McAllister, A. K. (2015). Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(8), 469–486. <https://doi.org/10.1038/nrn3978>
- Fereshetyan, K., Chavushyan, V., Danielyan, M., Yenkovyan, K. (2021). Assessment of behavioral, morphological and electrophysiological changes in prenatal and postnatal valproate induced rat models of autism spectrum disorder. *Science Reports*. 6;11(1):23471. doi: 10.1038/s41598-021-02994-6.
- Farmer, C., Thurm, A., e Grant, P. (2013). Pharmacotherapy for the Core Symptoms in Autistic Disorder: Current Status of the Research. *Drugs*, 73(4), 303–314. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0021-7>

- Farokhnia, M., Azarkolah, A., Adinehfar, F., Khodaie-Ardakani, M.-R., Hosseini, S.-M.-R., Yekehtaz, H., Tabrizi, M., Rezaei, F., Salehi, B., Sadeghi, S.-M.-H., Moghadam, M., Gharibi, F., Mirshafiee, O., e Akhondzadeh, S. (2013). N-Acetylcysteine as an Adjunct to Risperidone for Treatment of Negative Symptoms in Patients With Chronic Schizophrenia. *Clinical Neuropharmacology*, 36(6), 185–192. <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000001>
- Fombonne, E. (2023). Editorial: Is autism overdiagnosed? *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 64(5), 711–714. <https://doi.org/10.1111/jcpp.13806>
- Frezza, M., Di Matteo, V., Di Renzo, A., Di Giovanni, G., Di Lorenzo, G., e Esposito, G. (2019). Safety of N-acetylcysteine in children with autism spectrum disorder: A systematic review. *European Child e Adolescent Psychiatry*, 38(1), 1–12.
- Frye, C. W. (2018). The impact of autism spectrum disorder on the family. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 48, 3012–3028.
- Frye, C. W., Geurts, H. M., Jones, E. J., e Stahmer, A. C. (2018). The Impact of Autism Spectrum Disorder on Families: A Systematic Review. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 48, 3012–3028.
- Gardener, H., Spiegelman, D., e Buka, S. L. (2011). Perinatal and Neonatal Risk Factors for Autism: A Comprehensive Meta-analysis. *Pediatrics*, 128(2), 344–355. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-1036>
- Geschwind, D. H. (2011). Genetics of autism spectrum disorders. *Trends in Cognitive Sciences*, 15(9), 409–416. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.07.003>
- Gesundheit, B., Rosenzweig, J. P., Naor, D., Lerer, B., Zachor, D. A., Procházka, V., Melamed, M., Kristt, D. A., Steinberg, A., Shulman, C., Hwang, P., Koren, G., Walfisch, A., Passweg, J. R., Snowden, J. A., Tamouza, R., Leboyer, M., Farge-Bancel, D., e Ashwood, P. (2013). Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autoimmunity*, 44, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.05.005>
- Ghanizadeh, H., e Moghimi-Sarani, M. (2013). Effects of N-acetylcysteine on behavioral and cognitive functions in children with autism spectrum disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 23(1), 31–38.
- Giasson, B. I., Ischiropoulos, H., Lee, V. M., e Trojanowski, J. Q. (2002). The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free radical biology e medicine*, 32(12), 1264–1275. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00804-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00804-3)
- Gogolla, N., LeBlanc, J. J., Quast, K. B., Südhof, T. C., Fagiolini, M., e Hensch, T. K. (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 1(2), 172–181. <https://doi.org/10.1007/s11689-009-9023-x>
- Golomb, J. R., Chen, X., Weng, J., Guo, S., e Hu, X. (2014). Inflammation in autism spectrum disorders. *Neurotherapeutics*, 11(3), 695–711.

- González-Toro, M. C., Jdraque-Rodríguez, R., Sempere-Pérez, Á., Martínez-Pastor, P., Jover-Cerdá, J., e Gómez-Gosálvez, F. (2013). [Anti-NMDA receptor encephalitis: two paediatric cases]. *Revista de neurologia*, 57(11), 504–508.
- Gould, G.G., Hensler, J.G., Burke, T.F., Benno, R.H., Onaivi, E.S., Daws, L.C. (2011). Density and function of central serotonin (5-HT) transporters, 5-HT1A and 5-HT2A receptors, and effects of their targeting on BTBR T+tf/J mouse social behavior. *Journal Neurochemistry*. 116(2):291-303. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07104.x.
- Green, S. A., Hernandez, L. M., Bowman, H. C., Bookheimer, S. Y., e Dapretto, M. (2018). Sensory over-responsivity and social cognition in ASD: Effects of aversive sensory stimuli and attentional modulation on neural responses to social cues. *Developmental cognitive neuroscience*, 29, 127–139. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2017.02.005>
- Gupta, A. (2016). N-acetylcysteine for autism spectrum disorder: A review of the literature. . *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*, 26(6), 483–493.
- Hallmayer, J. (2011). Genetic Heritability and Shared Environmental Factors Among Twin Pairs With Autism. *Archives of General Psychiatry*, 68(11), 1095. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.76>
- Hardan, A. Y., Fung, L. K., Libove, R. A., Obukhanych, T. V., Nair, S., Herzenberg, L. A., Frazier, T. W., e Tirouvanziam, R. (2012). A randomized controlled pilot trial of oral N-acetylcysteine in children with autism. *Biological psychiatry*, 71(11), 956–961. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.01.014>
- Hardan, A. Y., Anderson, P., Aman, M. G., e McDougle, C. J. (2015). N-acetylcysteine for irritability in children with autism spectrum disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American Academy of Child e Adolescent Psychiatry*, 54(11), 1043–1052.
- Harding, S. M., Masters, E. C., D’Agata, C. M., Agudelo Rivera, A. C., e Smith, E. C. (2021). Prenatal exposure to valproic acid and treatment with intranasal oxytocin have sex-specific effects on behavior in Long Evans rats. *Behavioural Pharmacology*, 32(7), 561–570. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000650>
- Hodges, H., Fealko, C., e Soares, N. (2020). Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Translational Pediatrics*, 9(S1), S55–S65. <https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.09>
- Howlin, P., Goodyer, I. M., Hutton, J. L., Rutter, M., e Bailey, A. (2014). The Social Impact of Autism Spectrum Disorder: The Views of Parents, Adolescents, and Adults with Autism Spectrum Disorder. *Developmental Psychology*, 50, 321–333.
- Hu, V. W. (2013). From Genes to Environment: Using Integrative Genomics to Build a “Systems-Level” Understanding of Autism Spectrum Disorders. *Child Development*, 84(1), 89–103. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2012.01759.x>
- Iakoucheva, L. M., Muotri, A. R., e Sebat, J. (2019). Getting to the Cores of Autism. *Cell*, 178(6), 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.037>

- Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B., e Rodier, P. M. (2000a). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicology and Teratology*, 22(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00083-5)
- Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B., e Rodier, P. M. (2000b). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicology and Teratology*, 22(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00083-5)
- Iskusnykh, I. Y., Zakharova, A. A., e Pathak, D. (2022). Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(1). <https://doi.org/10.3390/molecules27010324>
- James, S. J., Melnyk, S., Jernigan, S., Cleves, M. A., Halsted, C. H., Wong, D. H., Cutler, P., Bock, K., Boris, M., Bradstreet, J. J., Baker, S. M., e Gaylor, D. W. (2006). Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, 141B(8), 947–956. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30366>
- Javik Dorantes-Barrios, C., Reyes-Meza, V., Camacho-Candia, J. A., Pfaus, J. G., e González-Flores, O. (2024). Influence of environmental enrichment on sexual behavior and the process of learning and memory in a rat model of autism with valproic acid. *Brain Research*, 1827, 148738. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148738>
- Juliandi, B., Tanemura, K., Igarashi, K., Tominaga, T., Furukawa, Y., Otsuka, M., Moriyama, N., Ikegami, D., Abematsu, M., Sanosaka, T., Tsujimura, K., Narita, M., Kanno, J., e Nakashima, K. (2015). Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. *Stem Cell Reports*, 5(6), 996–1009. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.012>
- Kaidanovich-Beilin, O., e Woodgett, J. R. (2011). GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00040>
- Kalkbrenner, A. E., Braun, J. M., Durkin, M. S., Maenner, M. J., Cunniff, C., Lee, L.-C., Pettygrove, S., Nicholas, J. S., e Daniels, J. L. (2012). Maternal Smoking during Pregnancy and the Prevalence of Autism Spectrum Disorders, Using Data from the Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. *Environmental Health Perspectives*, 120(7), 1042–1048. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104556>
- Kanner, L. (1943). Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 217–250.
- Kartawy, M., El-Batrany, A., El-Hefny, A., El-Sherif, A., El-Khodary, H., e El-Sayed, S. (2020). Elevated oxidative stress markers in autistic children. *Brain and Behavior*, 10(1), 58.

- Kasperczyk, S., Dobrakowski, M., Kasperczyk, A., Machnik, G., e Birkner, E. (2014). Effect of N-acetylcysteine administration on the expression and activities of antioxidant enzymes and the malondialdehyde level in the blood of lead-exposed workers. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(2), 638–647. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.01.024>
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., e Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>
- Kau, A. (2008). Oxidative stress in the brain of children with autism spectrum disorders. *Autism Research*, 1(1), 25–35.
- Kern, J. K., Geier, D. A., Sykes, L. K., e Geier, M. R. (2016). Relevance of Neuroinflammation and Encephalitis in Autism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00519>
- Kim, H., Keifer, C., Rodriguez-Seijas, C., Eaton, N., Lerner, M., e Gadow, K. (2019). Quantifying the Optimal Structure of the Autism Phenotype: A Comprehensive Comparison of Dimensional, Categorical, and Hybrid Models. *Journal of the American Academy of Child e Adolescent Psychiatry*, 58(9), 876-886.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2018.09.431>
- Kim, K. H., e Pessah, I. N. (2011). Perinatal exposure to environmental polychlorinated biphenyls sensitizes hippocampus to excitotoxicity ex vivo. *NeuroToxicology*, 32(6), 981–985. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.04.004>
- Kong, X.-J., Liu, J., Liu, K., Koh, M., Sherman, H., Liu, S., Tian, R., Sukijthamapan, P., Wang, J., Fong, M., Xu, L., Clairmont, C., Jeong, M.-S., Li, A., Lopes, M., Hagan, V., Dutton, T., Chan, S.-T. (Phoebe), Lee, H., ... Song, Y. (2021). Probiotic and Oxytocin Combination Therapy in Patients with Autism Spectrum Disorder: A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Pilot Trial. *Nutrients*, 13(5), 1552. <https://doi.org/10.3390/nu13051552>
- Kubota, T., e Mochizuki, K. (2016). Epigenetic Effect of Environmental Factors on Autism Spectrum Disorders. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(5), 504. <https://doi.org/10.3390/ijerph13050504>
- Kvietys, P. R., e Granger, D. N. (2012). Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free radical biology e medicine*, 52(3), 556–592. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.002>
- Lai, M.-C., Lin, H.-Y., e Ameis, S. H. (2022). Towards equitable diagnoses for autism and attention-deficit/hyperactivity disorder across sexes and genders. *Current Opinion in Psychiatry*, 35(2), 90–100. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000770>
- Lai, M.-C., Lombardo, M. V, e Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *The Lancet*, 383(9920), 896–910. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61539-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61539-1)

- Levine, S. Z., Kodesh, A., Viktorin, A., Smith, L., Uher, R., Reichenberg, A., e Sandin, S. (2018). Association of Maternal Use of Folic Acid and Multivitamin Supplements in the Periods Before and During Pregnancy With the Risk of Autism Spectrum Disorder in Offspring. *JAMA Psychiatry*, *75*(2), 176. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.4050>
- Leisman, G., Melillo, R., e Melillo, T. (2023). Prefrontal functional connectivities in autism spectrum disorders: A connectopathic disorder affecting movement, interoception, and cognition. *Brain Research Bulletin*, *198*, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.04.004>
- Li, Y.-M., Ou, J.-J., Liu, L., Zhang, D., Zhao, J.-P., e Tang, S.-Y. (2016). Association Between Maternal Obesity and Autism Spectrum Disorder in Offspring: A Meta-analysis. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *46*(1), 95–102. <https://doi.org/10.1007/s10803-015-2549-8>
- Li, Z., Yang, L., Chen, H., Fang, Y., Zhang, T., Yin, X., Man, J., Yang, X., e Lu, M. (2022). Global, regional and national burden of autism spectrum disorder from 1990 to 2019: results from the Global Burden of Disease Study 2019. *Epidemiology and Psychiatric Sciences*, *31*, e33. <https://doi.org/10.1017/S2045796022000178>
- Li, Z., Zhu, Y.-X., Gu, L.-J., e Cheng, Y. (2021). Understanding autism spectrum disorders with animal models: applications, insights, and perspectives. *Zoological Research*, *42*(6), 800–823. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.251>
- Liao, X., Yang, J., Wang, H., e Li, Y. (2020). Microglia mediated neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Journal of Psychiatric Research*, *130*, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychemes.2020.07.013>
- Libbey, J. E., e Fujinami, R. S. (2010). Role for antibodies in altering behavior and movement. *Autism Research*, *3*(4), 147–152. <https://doi.org/10.1002/aur.144>
- Liu, Y., Wang, H., Zhang, J., Zhang, X., e Li, J. (2022). Efficacy of antioxidant interventions for autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *52*(1), 1–14.
- Loomes, R., Hull, L., e Mandy, W. P. L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Academy of Child e Adolescent Psychiatry*, *56*(6), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., e Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, *392*(10146), 508–520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)
- Lotter, V. (1966). Epidemiology of autistic conditions in young children. *Social Psychiatry*, *1*(3), 124–135. <https://doi.org/10.1007/BF00584048>
- Lushchak, V. I. (2012a). Glutathione and autism spectrum disorders. *Neurochemical Research*, *37*(4), 822–831.

- Lushchak, V. I. (2012b). Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/736837>
- Mabunga, D. F. N., Gonzales, E. L. T., Kim, J., Kim, K. C., e Shin, C. Y. (2015). Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 285–300. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>
- Maenner, M. J., Shaw, K. A., Bakian, A. V., Bilder, D. A., Durkin, M. S., Esler, A., Furnier, S. M., Hallas, L., Hall-Lande, J., Hudson, A., Hughes, M. M., Patrick, M., Pierce, K., Poynter, J. N., Salinas, A., Shenouda, J., Vehorn, A., Warren, Z., Constantino, J. N., ... Cogswell, M. E. (2021). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. *MMWR. Surveillance Summaries*, 70(11), 1–16. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7011a1>
- Maenner, M. J., Warren, Z., Williams, A. R., Amoakohene, E., Bakian, A. V., Bilder, D. A., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., Furnier, S. M., Hughes, M. M., Ladd-Acosta, C. M., McArthur, D., Pas, E. T., Salinas, A., Vehorn, A., Williams, S., Esler, A., Grzybowski, A., Hall-Lande, J., ... Shaw, K. A. (2023). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR. Surveillance Summaries*, 72(2), 1–14. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss7202a1>
- Manivasagam, T., Arunadevi, S., Essa, M. M., SaravanaBabu, C., Borah, A., Thenmozhi, A. J., e Qoronfleh, M. W. (2020). *Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Autism* (p. 193–206). https://doi.org/10.1007/978-3-030-30402-7_7
- Markram, K., Rinaldi, T., Mendola, D. La, Sandi, C., e Markram, H. (2008). Abnormal Fear Conditioning and Amygdala Processing in an Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*, 33(4), 901–912. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301453>
- Marotta, R., Risoleo, M. C., Messina, G., Parisi, L., Carotenuto, M., Vetri, L., e Roccella, M. (2020). The Neurochemistry of Autism. *Brain Sciences*, 10(3), 163. <https://doi.org/10.3390/brainsci10030163>
- Matta, S. M., Hill-Yardin, E. L., e Crack, P. J. (2019). The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 79, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.037>
- McDougle, C. J., Landino, S. M., Vahabzadeh, A., O'Rourke, J., Zurcher, N. R., Finger, B. C., Palumbo, M. L., Helt, J., Mullett, J. E., Hooker, J. M., e Carlezon, W. A. (2015). Toward an immune-mediated subtype of autism spectrum disorder. *Brain Research*, 1617, 72–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.048>
- McLellan, J., Kim, D. H. J., Bruce, M., Ramirez-Celis, A., e Van de Water, J. (2022). Maternal Immune Dysregulation and Autism—Understanding the Role of

Cytokines, Chemokines and Autoantibodies. *Frontiers in Psychiatry*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fpsyt.2022.834910>

- Menezo, Y. J., Elder, K., e Dale, B. (2015). Link Between Increased Prevalence of Autism Spectrum Disorder Syndromes and Oxidative Stress, DNA Methylation, and Imprinting: The Impact of the Environment. *JAMA pediatrics*, 169(11), 1066–1067.
<https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2015.2125>
- Miles, J. H. (2011). Autism spectrum disorders—A genetics review. *Genetics in Medicine*, 13(4), 278–294. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba>
- Mintál, K., Tóth, A., Hormay, E., Kovács, A., László, K., Bufa, A., Marosvölgyi, T., Kocsis, B., Varga, A., Vizvári, Z., Cserjési, R., Péczely, L., Ollmann, T., Lénárd, L., e Karádi, Z. (2022). Novel probiotic treatment of autism spectrum disorder associated social behavioral symptoms in two rodent models. *Scientific Reports*, 12(1), 5399. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09350-2>
- Mohapatra, A. N., e Wagner, S. (2023). The role of the prefrontal cortex in social interactions of animal models and the implications for autism spectrum disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2023.1205199>
- Moreno-López, B., Romero-Grimaldi, C., Noval, J. A., Murillo-Carretero, M., Matarredona, E. R., e Estrada, C. (2004). Nitric Oxide Is a Physiological Inhibitor of Neurogenesis in the Adult Mouse Subventricular Zone and Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience*, 24(1), 85–95. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1574-03.2004>
- Morgan, J. T., Chana, G., Pardo, C. A., Achim, C., Semendeferi, K., Buckwalter, J., Courchesne, E., e Everall, I. P. (2010). Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biological Psychiatry*, 68(4), 368–376.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.05.024>
- Morrison-Levy, N., Go, C., Ochi, A., Otsubo, H., Drake, J., Rutka, J., e Weiss, S. K. (2018). Children with autism spectrum disorders and drug-resistant epilepsy can benefit from epilepsy surgery. *Epilepsy e Behavior*, 85, 200–204.
<https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.06.023>
- Muller, S., De Luca, R., Di Renzo, A., Di Giovanni, G. D. L. G. , e E. G., Di Lorenzo, G. E. G., e Esposito, G. (2022). N-acetylcysteine for irritability in children with autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. . *European Child e Adolescent Psychiatry*, 31(1), 1–13.
- Nakagawa, Y., e Chiba, K. (2016). Involvement of Neuroinflammation during Brain Development in Social Cognitive Deficits in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 358(3), 504–515. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.234476>
- Nakamura, T., Zhang, S., e Wang, X. (2015). Nitric oxide: A versatile signaling molecule in brain development and neurodegeneration. . *Neurobiology of Disease*, 74, 15–27.

- Nardone, S., e Elliott, E. (2016). The Interaction between the Immune System and Epigenetics in the Etiology of Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00329>
- Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., Infante, T., e Ignarro, L. J. (2013). Effects of Nitric Oxide on Cell Proliferation. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(2), 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.03.070>
- Nguyen, T.-H., e Jones, M. B. (2022). Efficacy of risperidone for the treatment of challenging behaviors in children and adolescents with autism spectrum disorder: A systematic review. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 52(12), 5197–5213.
- Nicolini, C., e Fahnstock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology*, 299, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>
- Nikoo, M., Radnia, H., Farokhnia, M., Mohammadi, M.-R., e Akhondzadeh, S. (2015). N-Acetylcysteine as an Adjunctive Therapy to Risperidone for Treatment of Irritability in Autism. *Clinical Neuropharmacology*, 38(1), 11–17. <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000063>
- Pardo, C. A., Vargas, D. L., e Zimmerman, A. W. (2005). Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *International Review of Psychiatry*, 17(6), 485–495. <https://doi.org/10.1080/02646830500381930>
- Paula, C. S. et al. Autism in Brazil - perspectives from science and society. *Rev Assoc Med Bras*, v. 57, n. 1, p. 2-5, 2011a.
- Paula, C. S. et al. Brief Report: Prevalence of Pervasive Developmental Disorder in Brazil: A Pilot Study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 41, n. 12, p. 1738-1742, 2011b.
- Petruzzi, S., Fiore, M., Dell’Omo, G., Bignami, G., e Alleva, E. (1995). Medium and long-term behavioral effects in mice of extended gestational exposure to ozone. *Neurotoxicology and Teratology*, 17(4), 463–470. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(95\)00003-A](https://doi.org/10.1016/0892-0362(95)00003-A)
- Pfaff, A. R., Beltz, J., King, E., e Ercal, N. (2020). Medicinal Thiols: Current Status and New Perspectives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(6), 513–529. <https://doi.org/10.2174/1389557519666191119144100>
- Pierce, K. (2001). Face processing occurs outside the fusiform ‘face area’ in autism: evidence from functional MRI. *Brain*, 124(10), 2059–2073. <https://doi.org/10.1093/brain/124.10.2059>
- Portolese, J., Bordini, D., Lowenthal, R., Zachi, Elaine C., Paula, C. S. (2017). Mapeamento dos serviços que prestam atendimento a pessoas com transtorno do espectro autista no Brasil. *Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento*, 17(2), 79-91. <https://dx.doi.org/10.5935/cadernosdisturbios.v17n2p79-91>

- Posar, A., e Visconti, P. (2018). Sensory abnormalities in children with autism spectrum disorder. *Jornal de Pediatria*, 94(4), 342–350.
<https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2017.08.008>
- Posar A., e Visconti P. (2023). Autism Spectrum Disorder in 2023: A Challenge Still Open. *Turkish Archives of Pediatrics*.
<https://doi.org/10.5152/TurkArchPediatr.2023.23194>
- Posey, D. J., e McDougle, C. J. (2001). Pharmacotherapeutic management of autism. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2(4), 587–600.
<https://doi.org/10.1517/14656566.2.4.587>
- Provençal, N., Arloth, J., Cattaneo, A., Anacker, C., Cattane, N., Wiechmann, T., Röh, S., Ködel, M., Klengel, T., Czamara, D., Müller, N. S., Lahti, J., Räikkönen, K., Pariante, C. M., Binder, E. B., Kajantie, E., Hämäläinen, E., Villa, P., e Laivuori, H. (2020). Glucocorticoid exposure during hippocampal neurogenesis primes future stress response by inducing changes in DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(38), 23280–23285.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1820842116>
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Tonial, R. P., Bambini-Junior, V., Riesgo, R., e Gottfried, C. (2010). Effects of atypical (risperidone) and typical (haloperidol) antipsychotic agents on astroglial functions. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 260(6), 475–481. <https://doi.org/10.1007/s00406-009-0095-0>
- Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., Nelson, S., e Romano, J. (1996). Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *The Journal of Comparative Neurology*, 370(2), 247–261.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960624\)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2)
- Rodriguez, J. I., e Kern, J. K. (2011). Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *Neuron Glia Biology*, 7(2–4), 205–213.
<https://doi.org/10.1017/S1740925X12000142>
- Rossignol, D. A. (2009). Antioxidant therapy for autism spectrum disorders: A review of the evidence. *Journal of Child Neurology*, 24(9), 1027–1037.
- Roulet, F. I., Lai, J. K. Y., e Foster, J. A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism — A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.004>
- Rubenstein, J. L. R., e Merzenich, M. M. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior*, 2(5), 255–267. <https://doi.org/10.1034/j.1601-183X.2003.00037.x>
- Ruhela, R. K., Soni, S., Sarma, P., Prakash, A., e Medhi, B. (2019). Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Annals of Neurosciences*, 26(1), 25–31. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.260106>
- Rushworth, G. F., e Megson, I. L. (2014). Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: The need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant

- benefits. *Pharmacology e Therapeutics*, 141(2), 150–159.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.09.006>
- Rutter, M. (1972). *Maternal deprivation reassessed*. Penguin.
- Rutter, M. (1979). Autism: A clinical reappraisal. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 9, 01–25.
- Rutter, M. (1983). Autism: Concepts, characteristics, and definition. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 13, 01–25.
- Rutter, M. (2005). Autism Research: Lessons from the Past and Prospects for the Future. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 35(2), 241–257.
<https://doi.org/10.1007/s10803-004-2003-9>
- Salehi, M., Kamali, E., Karahmadi, M., e Mousavi, S. M. (2017). RORA and Autism in The Isfahan Population: Is There An Epigenetic Relationship. *Cell journal*, 18(4), 540–546. <https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4720>
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., e Reichenberg, A. (2014a). The Familial Risk of Autism. *JAMA*, 311(17), 1770.
<https://doi.org/10.1001/jama.2014.4144>
- Santos, M., Silva-Fernandes, A., Oliveira, P., Sousa, N., e Maciel, P. (2007). Evidence for abnormal early development in a mouse model of Rett syndrome. *Genes, brain, and behavior*, 6(3), 277–286. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00258.x>
- Sauer AK, Stanton JE, Hans S, et al. Autism Spectrum Disorders: Etiology and Pathology. In: Grabrucker AM, editor. Autism Spectrum Disorders [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2021 Aug 20. Chapter 1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK573613/>
- Scahill, L., Koenig, K., Carroll, D. H., e Pachler, M. (2007). Psychopharmacology. *Journal of Child and Adolescent Psychiatric Nursing*, 20(3), 188–190.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-6171.2007.00112.x>
- Schaaf, C. P., Betancur, C., Yuen, R. K. C., Parr, J. R., Skuse, D. H., Gallagher, L., Bernier, R. A., Buchanan, J. A., Buxbaum, J. D., Chen, C.-A., Dies, K. A., Elsabbagh, M., Firth, H. V., Frazier, T., Hoang, N., Howe, J., Marshall, C. R., Michaud, J. L., Rennie, O., ... Vorstman, J. A. S. (2020). A framework for an evidence-based gene list relevant to autism spectrum disorder. *Nature Reviews Genetics*, 21(6), 367–376. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0231-2>
- Scherbanu, A., Fernandes, J., e Silva, R. (2023). Risperidone for sleep disturbances in children and adolescents with autism spectrum disorder: A randomized controlled trial. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 53(3), 1293–1304.
- Schneider, T., e Przewłocki, R. (2005). Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*, 30(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., e Przewłocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological

- alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, *33*(6), 728–740.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.011>
- Seibenhener, M. L., e Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, *96*. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Servadio, M., Manduca, A., Melancia, F., Leboffe, L., Schiavi, S., Campolongo, P., Palmery, M., Ascenzi, P., di Masi, A., e Trezza, V. (2018). Impaired repair of DNA damage is associated with autistic-like traits in rats prenatally exposed to valproic acid. *European Neuropsychopharmacology*, *28*(1), 85–96.
<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.11.014>
- Silva, M., e Mulick, J. A. (2009). Diagnosticando o transtorno autista: aspectos fundamentais e considerações práticas. *Psicologia: Ciência e Profissão*, *29*(1), 116–131. <https://doi.org/10.1590/S1414-98932009000100010>
- Silverman, J. L., Yang, M., Lord, C., e Crawley, J. N. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature Reviews Neuroscience*, *11*(7), 490–502.
<https://doi.org/10.1038/nrn2851>
- Smith, A. D., e Jones, E. J. (2018). Animal models of autism spectrum disorder: Translational challenges and opportunities. *Neuropsychopharmacology*, *43*(1), 3–12.
- Solmi, M., Song, M., Yon, D. K., Lee, S. W., Fombonne, E., Kim, M. S., Park, S., Lee, M. H., Hwang, J., Keller, R., Koyanagi, A., Jacob, L., Dragioti, E., Smith, L., Correll, C. U., Fusar-Poli, P., Croatto, G., Carvalho, A. F., Oh, J. W., ... Cortese, S. (2022). Incidence, prevalence, and global burden of autism spectrum disorder from 1990 to 2019 across 204 countries. *Molecular Psychiatry*, *27*(10), 4172–4180.
<https://doi.org/10.1038/s41380-022-01630-7>
- Soto, M. E., Manzano-Pech, L., Palacios-Chavarría, A., Valdez-Vázquez, R. R., Guarner-Lans, V., e Pérez-Torres, I. (2023). N-Acetyl Cysteine Restores the Diminished Activity of the Antioxidant Enzymatic System Caused by SARS-CoV-2 Infection: Preliminary Findings. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, *16*(4), 591.
<https://doi.org/10.3390/ph16040591>
- Souza, M. T., Silva, A. A., e Campos, M. S. (2004). O autismo na infância: um estudo comparativo. *Psicologia: Reflexão e Crítica*, *17*(3), 367–374.
<https://doi.org/10.1590/S0102-79722004000300006>
- Stamler, J. S., Lamas, S., e Fang, F. C. (2001). Nitrosylation. *Cell*, *106*(6), 675–683.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00495-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00495-0)
- Suri, J., e El-Baz, A. S. (2022). *Neural Engineering Techniques for Autism Spectrum Disorder* (Vol. 2). <https://books.google.com.br/books?id=uRxoEAAAQBAJ>
- Sweeten, T. L., Posey, D. J., Shankar, S., e McDougle, C. J. (2004). High nitric oxide production in autistic disorder: a possible role for interferon- γ . *Biological Psychiatry*, *55*(4), 434–437. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.09.001>

- Talantseva, O. I., Romanova, R. S., Shurdova, E. M., Dolgorukova, T. A., Sologub, P. S., Titova, O. S., Kleeva, D. F., e Grigorenko, E. L. (2023). The global prevalence of autism spectrum disorder: A three-level meta-analysis. *Frontiers in Psychiatry*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1071181>
- Tanner, A., e Dounavi, K. (2021). The Emergence of Autism Symptoms Prior to 18 Months of Age: A Systematic Literature Review. *Journal of autism and developmental disorders*, 51(3), 973–993. <https://doi.org/10.1007/s10803-020-04618-w>
- Tartaglione, A. M., Schiavi, S., Calamandrei, G., e Trezza, V. (2019). Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. *Neuropharmacology*, 159, 107477. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.12.024>
- Tripathi, M. K., Kartawy, M., e Amal, H. (2020). The role of nitric oxide in brain disorders: Autism spectrum disorder and other psychiatric, neurological, and neurodegenerative disorders. *Redox Biology*, 34, 101567. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101567>
- Thom, R. P., Keary, C. J., Palumbo, M. L., Ravichandran, C. T., Mullett, J. E., Hazen, E. P., Neumeyer, A. M., e McDougale, C. J. (2019). Beyond the brain: A multi-system inflammatory subtype of autism spectrum disorder. *Psychopharmacology*, 236(10), 3045–3061. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05280-6>
- Tincani, M., Ferrari, F., Laghi, F., e Baron-Cohen, S. (2023). N-acetylcysteine for irritability and repetitive behaviors in children with autism spectrum disorder: A randomized controlled trial. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 53(1), 265–277.
- Uddin, M. N., Mondal, T., Yao, Y., Manley, K., e Lawrence, D. A. (2023). Oxidative stress and neuroimmune proteins in a mouse model of autism. *Cell Stress and Chaperones*, 28(2), 201–217. <https://doi.org/10.1007/s12192-023-01331-2>
- Uehara, T., Imaizumi, S., e Yamagata, Y. (2016). Developmental trajectories of motor skills in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. *Autism*, 20, 100–111.
- Usui, N., Kobayashi, H., e Shimada, S. (2023). Neuroinflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5487. <https://doi.org/10.3390/ijms24065487>
- Van Meter, K. C., Christiansen, L. E., Delwiche, L. D., Azari, R., Carpenter, T. E., e Hertz-Picciotto, I. (2010). Geographic distribution of autism in California: A retrospective birth cohort analysis. *Autism Research*, 3(1), 19–29. <https://doi.org/10.1002/aur.110>
- Wagner, G. C., Reuhl, K. R., Cheh, M., McRae, P., e Halladay, A. K. (2006). A New Neurobehavioral Model of Autism in Mice: Pre- and Postnatal Exposure to Sodium Valproate. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 36(6), 779–793. <https://doi.org/10.1007/s10803-006-0117-y>

- Wang, C., Geng, H., Liu, W., e Zhang, G. (2017). Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism. *Medicine*, 96(18), e6696. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006696>
- Wang, L., Wang, B., Wu, C., Wang, J., e Sun, M. (2023). Autism Spectrum Disorder: Neurodevelopmental Risk Factors, Biological Mechanism, and Precision Therapy. *International journal of molecular sciences*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/ijms24031819>
- Weir, E., Allison, C., e Baron-Cohen, S. (2022). Autistic adults have poorer quality healthcare and worse health based on self-report data. *Molecular Autism*, 13(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s13229-022-00501-w>
- Wing, L. (1976). Asperger's syndrome: A clinical account. *Psychological Medicine*, 6, 115–130.
- Wing, L. (1979). *The syndrome of autism: A psychological approach*. Pergamon Press.
- Wing, L. (1981). Asperger's syndrome: A review of the literature. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 11, 115–129.
- Wink, G., Li, J., e Chen, H. (2016). The potential role of N-acetylcysteine in autism spectrum disorder. . *Current Opinion in Pharmacology*, 31, 25–32.
- Yang, L., Chen, F., He, X., Tong, Y., Li, Q., Yang, T., Peng, R., Wang, H., e Shi, Z. (2023). Global burden and inequality of autism spectrum disorders: Based on data from the 2019 Global Burden of Disease study. *Preventive Medicine Reports*, 36, 102511. <https://doi.org/10.1016/j.pmedr.2023.102511>
- Yule, W., e Rutter, M. (1988). *Autism and pervasive developmental disorders*. Wiley.
- Zawadzka, A., Cieřlik, M., e Adamczyk, A. (2021). The Role of Maternal Immune Activation in the Pathogenesis of Autism: A Review of the Evidence, Proposed Mechanisms and Implications for Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11516. <https://doi.org/10.3390/ijms222111516>
- Zeidan, J., Fombonne, E., Scorch, J., Ibrahim, A., Durkin, M. S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., e Elsabbagh, M. (2022). Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Research*, 15(5), 778–790. <https://doi.org/10.1002/aur.2696>
- Zerin Khan F., Sultana S.P., Akhter N., Mosaddek A.S.M. (2018). Effect of olanzapine and risperidone on oxidative stress in schizophrenia patients. *International Biological and Biomedical Journal*, 4(2):89–97.
- Zhang, J., Zhang, X., Li, J. W. H., e Wang, H. (2019). The effects of N-acetylcysteine on behavior and oxidative stress in children with autism spectrum disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. . *Neuropsychopharmacology*, 44(1), 219–228., 44(1), 219–228.
- Zhao, H. C., Lv, R., Zhang, G. Y., He, L. M., Cai, X. T., Sun, Q., Yan, C. Y., Bao, X. Y., Lv, X. Y., e Fu, B. (2022). Alterations of Prefrontal-Posterior Information Processing Patterns in Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in neuroscience*, 15, 768219. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.768219>

Zimmerman, A. W., Jyonouchi, H., Comi, A. M., Connors, S. L., Milstien, S., Varsou, A., e Heyes, M. P. (2005). Cerebrospinal Fluid and Serum Markers of Inflammation in Autism. *Pediatric Neurology*, 33(3), 195–201.
<https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2005.03.014>

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, deferroxamina e risperidona na prole em um modelo experimental de transtorno do espectro autista
Project title	Analysis of the effect of n-acetylcysteine, deferroxamine and risperidone in offspring in an experimental model of autism spectrum disorder
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 Malochi, 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, Rosilane Ronchi Nascimento Costa, Simone Laspinasse Araujo, Sofia Januário Bolan, Tainara Gonçalves, Thais Marson Meneguzzo, Victória Linden de Rezende, Vitória Zaccaron Danielski, Willian dos Santos Horacio, William Tassil Moreira
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/01/2023 a 01/01/2024
Espécie/inhagem/raça	Rato heterogêneo / Wistar
Idade/Peso	60 dias /250-300g
Número de animais	Masculino 53 + Feminino 53 = 106
Espécie/inhagem/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