

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

**JOSÉ MARCELO BOTACIN CAMPOS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO RESVERATROL  
ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS EM MODELO ANIMAL DE  
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

**CRICIÚMA, AGOSTO DE 2024**

**JOSÉ MARCELO BOTACIN CAMPOS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO RESVERATROL  
ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS EM MODELO ANIMAL DE  
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

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

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

**CRICIÚMA, AGOSTO DE 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C198a Campos, José Marcelo Botacin.

Avaliação do efeito terapêutico do resveratrol acoplado a nanopartículas em modelo animal de transtorno do espectro autista / José Marcelo Botacin Campos. - 2024.

109 p. : il.

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

Orientação: Cinara Ludvig Gonçalves.

1. Resveratrol - Uso terapêutico. 2. Resveratrol - Efeito fisiológico. 3. Lipossomas. 4. Ácido valpróico. 5. Transtornos do espectro autista - Tratamento. 6. Fatores de crescimento neural. I. Título.

CDD 23. ed. 615.1


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




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 N° 609 de 14.03.2019

## ATA DA 189ª DEFESA DE TESE


**Ata da Defesa Pública da Tese de Doutorado de José Marcelo Botacin Campos.** No dia 15 (quinze) do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e quatro às 8 (oito) horas e 30 (trinta) minutos, reuniram-se na Sala 003/Bloco XXI-B os membros da Banca Examinadora, composta pelos(as) senhores(as) professores(as): **Dra. Samira da Silva Valvassori** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Fabricia Cardoso Petronilho** (Membro Interno – UNESC), **Dra. Sabrina Arcaro** (Membro Externo – UNESC) e **Dra. Michelle Lima Garcez** (Membro Externo – UFSC), designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de argüirem a tese de doutorado de **José Marcelo Botacin Campos**, subordinada ao título: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DO RESVERATROL ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS EM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA”**. Aberta a sessão pelo Presidente da mesma, coube ao candidato, de forma regimental, expor o tema de sua tese, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionado pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente para avaliação final do candidato. Retornando à sessão, o Presidente, lendo o Parecer, declarou **José Marcelo Botacin Campos** Aprovado.

Documento assinado digitalmente  
 **SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**  
Data: 15/08/2024 17:15:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


**Profa. Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**  
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente  
 **FABRICIA CARDOSO PETRONILHO**  
Data: 15/08/2024 15:11:23-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


**Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO**  
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente  
 **SABRINA ARCARO**  
Data: 15/08/2024 17:06:52-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


**Profa. Dra. SABRINA ARCARO**  
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente  
 **MICHELLE LIMA GARCEZ**  
Data: 15/08/2024 13:29:02-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


**Profa. Dra. MICHELLE LIMA GARCEZ**  
Membro Externo – UFSC

Documento assinado digitalmente  
 **CINARA LUDVIG GONCALVES**  
Data: 15/08/2024 13:31:02-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES**  
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente  
 **EMILIO LUIZ STRECK**  
Data: 15/08/2024 18:01:34-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. EMILIO LUIZ STRECK**  
Coordenador do PPGCS

Documento assinado digitalmente  
 **JOSE MARCELO BOTACIN CAMPOS**  
Data: 16/08/2024 06:01:00-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**JOSE MARCELO BOTACIN CAMPOS**  
Candidato(a)



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

No dia 15 (quinze) do mês de agosto de 2024, às 8 (oito) horas e 30 (trinta) minutos, na Sala 003/Bloco XXI-B, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: “**AValiação do Efeito Terapêutico do Resveratrol ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS EM MODELO ANIMAL DE TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**”, do candidato **José Marcelo Botacin Campos**. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): **Dra. Samira da Silva Valvassori** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Fabricia Cardoso Petronilho** (Membro Interno – UNESC), **Dra. Sabrina Arcaro** (Membro Externo – UNESC) e **Dra. Michelle Lima Garcez** (Membro Externo – UFSC). Após a apresentação, o candidato foi arguido pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

- Trabalho aprovado  
 Trabalho não aprovado

Observações: Adequar a tese conforme comentários pontuados pela banca examinadora.

Criciúma, SC, 15 de agosto de 2024.

Documento assinado digitalmente  
**SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**  
Data: 15/08/2024 17:15:33-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

**Profa. Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**  
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente  
**FABRICIA CARDOSO PETRONILHO**  
Data: 15/08/2024 15:11:23-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

**Profa. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO**  
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente  
**SABRINA ARCARO**  
Data: 15/08/2024 17:06:52-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

**Profa. Dra. SABRINA ARCARO**  
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente  
**MICHELLE LIMA GARCEZ**  
Data: 15/08/2024 13:23:15-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

**Profa. Dra. MICHELLE LIMA GARCEZ**  
Membro Externo – UFSC

Documento assinado digitalmente  
**CINARA LUDVIG GONCALVES**  
Data: 15/08/2024 13:33:08-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

**Profa. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES**  
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente  
**EMILIO LUIZ STRECK**  
Data: 15/08/2024 18:01:34-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

**Prof. Dr. EMILIO LUIZ STRECK**  
Coordenador do PPGCS

## **FOLHA INFORMATIVA**

Esta tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT, com adaptações especificadas na Resolução nº 05/2024 do Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS). A apresentação foi realizada no formato tradicional.

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

## DEDICATÓRIA

"Ao dedicar esta tese, sou levado por um turbilhão de emoções. Ela é um testemunho do amor, da resiliência e da determinação que permearam esta jornada.

Dedico esta tese à minha amada família, cujo amor, apoio e compreensão me ajudaram nesta conquista. Durante os muitos desafios e longas jornadas, vocês foram minha fortaleza e inspiração.

À Gilnara Busato Campos, cujo amor, paciência e apoio inabaláveis tornaram suportáveis as noites em claro e os momentos de dúvida. Esta tese é dedicada a você, como um tributo à nossa parceria e ao nosso futuro, juntos. Aos meus filhos, que me lembrem constantemente do valor da educação e do exemplo que desejo ser para eles.

Aos meus pais, Francisco de Assis Campos (em memória) e Cecília Botacin Campos, cuja incansável dedicação, superação das dificuldades e muito apoio moldaram a pessoa que me tornei, esta tese é uma homenagem ao amor que vocês sempre direcionaram a mim.

Dedico à minha orientadora professora Doutora Cinara Ludvig Gonçalves, que além de guiar meu caminho acadêmico, também foi um farol de sabedoria, de muita paciência e inspiração. Suas crenças em meu potencial fizeram toda a diferença.

Aos amigos que compartilham os altos e baixos dessa jornada, esta tese é uma expressão da nossa amizade e da força que encontramos uns nos outros. Somos muito capazes!

Dedico também a todos os indivíduos exclusivos que, através de sua singularidade, nos ensinam a enxergar o mundo de maneira mais aberta e empática. Cada página deste trabalho é uma homenagem à sua força, resiliência e capacidade de desafiar as normas preestabelecidas.

E, finalmente, aos meus amigos e colegas de pesquisa/laboratório, cuja colaboração e entusiasmo conseguiram compartilhar comigo um pouco de suas vivências e somaram para este estudo.

Que esta tese represente não apenas minha dedicação à pesquisa, mas também minha profunda gratidão a cada um de vocês por fazerem parte desta jornada. Vocês são a alicerce do meu sucesso e a alegria do meu coração."

## **AGRADECIMENTOS**

"A conclusão desta tese de doutorado marca o término de uma jornada desafiadora e enriquecedora, repleta de aprendizado, crescimento e descobertas. Gostaria de expressar a minha profunda gratidão a todos que tornaram este feito possível.

É com profunda gratidão e humildade que não poderia começar de outra maneira senão agradecendo a Deus. Agradeço pela saúde que me permitiu empreender esta jornada desafiadora, pela dádiva de fazer novas amizades e pela oportunidade de me aprimorar como profissional.

Quero expressar minha imensa gratidão à minha esposa Gilnara, cujo apoio inabalável e crença em mim durante os momentos difíceis foram alicerces essenciais para o meu sucesso. Agradeço também à minha mãe, cujo apoio, conselhos e acolhimento foram inestimáveis nos momentos em que mais precisei.

Não posso deixar de agradecer à UNESC Colatina-ES pela oportunidade concedida através do programa MINTER que me abriu as portas para o Doutorado. Esse ambiente de aprendizado contribuiu significativamente para o meu crescimento profissional, expandindo minha visão diante da tríade ensino-pesquisa-extensão.

Agradeço especialmente à minha orientadora, a prof. Dr<sup>a</sup> Cinara Ludvig Gonçalves, que não só me acolheu em seu grupo de estudos, mas também guiou meus estudos com sua imensa sabedoria. Meus agradecimentos se estendem aos membros do grupo de estudos/laboratório LAND, cujo suporte e colaboração foram vitais para a realização dos experimentos e o desenvolvimento do trabalho.

Esta jornada contou com a participação de muitas outras pessoas. A todos aqueles que, mesmo não mencionados nominalmente, ofereceram palavras de encorajamento, orientações valiosas e apoio direto, sejam amigos, coordenadores de curso ou familiares, meu sincero agradecimento.

Cada uma dessas contribuições foi um elemento fundamental para a conclusão deste curso e, por isso, expresso minha mais profunda gratidão."



"O autismo não fala em palavras, mas no caleidoscópio de uma mente única. Vamos aprender a abraçar suas cores e desenvolver o brilho oculto interior, pois ele não é uma falha a ser corrigida, mas um espectro da humanidade a ser compreendido, celebrado e abraçado."

José Marcelo B. Campos

## RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição neuropsiquiátrica complexa, caracterizada por déficits nas habilidades sociais, comunicação prejudicada, comportamentos repetitivos e interesses restritos. Atualmente, não existe um tratamento farmacológico eficaz para os sintomas centrais do TEA, o que motiva a busca por novas abordagens terapêuticas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do RSV acoplado a lipossomas em um modelo animal de TEA induzido por VPA. Neste estudo, utilizou-se o modelo animal de autismo por indução química, através da administração de VPA (600 mg/kg) no 12,5º dia gestacional para induzir o autismo nos filhotes. Após o nascimento, os filhotes foram divididos em grupos e submetidos ao tratamento pós-natal, por 20 dias, com lipossomas contendo RSV (LIP). No 27º e 28º dias, foram aplicados testes comportamentais, como o teste de campo aberto, o teste das três câmaras e o teste de enterramento de mármore, para avaliar parâmetros de interação social, comportamento repetitivo e atividade locomotora. Além disso, foram realizadas análises bioquímicas para quantificar os níveis de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ ) e neurotrofinas (BDNF e NGF) em diferentes regiões cerebrais, incluindo o córtex posterior, cerebelo e hipocampo, além de (TNF- $\alpha$ ) no soro. Os resultados indicaram que o VPA foi eficaz em induzir comportamentos característicos do TEA, como o aumento de comportamentos repetitivos e déficits na interação social. O tratamento com LIP mostrou-se capaz de atenuar parcialmente esses comportamentos, com destaque para a redução dos comportamentos repetitivos e uma modulação positiva dos níveis de BDNF e NGF, particularmente no córtex posterior. No entanto, a eficácia do tratamento variou entre as diferentes regiões cerebrais e os parâmetros comportamentais avaliados, não sendo suficiente para restaurar completamente os comportamentos ao nível do controle. Conclui-se que o RSV acoplado a lipossomas apresenta um potencial terapêutico promissor para o tratamento dos sintomas do TEA, especialmente na modulação de neurotrofinas e redução de comportamentos repetitivos. No entanto, a variação na resposta terapêutica observada entre diferentes regiões cerebrais sugere a necessidade de otimizações na formulação e na administração do tratamento para maximizar seus benefícios terapêuticos e alcançar uma eficácia mais consistente.

**Palavras-chave:** Transtorno do Espectro Autista; Resveratrol; Lipossomas; Ácido Valpróico; Neurotrofinas; Citocinas Inflamatórias.

## ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex neuropsychiatric condition characterized by deficits in social skills, impaired communication, repetitive behaviors, and restricted interests. Currently, there is no effective pharmacological treatment for the core symptoms of ASD, which drives the search for new therapeutic approaches. The present study aimed to evaluate the efficacy of RSV encapsulated in liposomes in a valproic acid (VPA)-induced animal model of ASD. In this study, the chemical induction of autism was achieved through the administration of VPA (600 mg/kg) on the 12.5th gestational day to induce autism in the offspring. After birth, the offspring were divided into groups and subjected to postnatal treatment for 20 days with liposomes containing RSV (LIP). On the 27th and 28th days, behavioral tests were conducted, including the open field test, the three-chamber test, and the marble-burying test, to evaluate parameters of social interaction, repetitive behavior, and locomotor activity. In addition, biochemical analyses were performed to quantify the levels of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ ) and neurotrophins (BDNF and NGF) in different brain regions, including the posterior cortex, cerebellum, and hippocampus, as well as TNF- $\alpha$  in serum. The results indicated that VPA effectively induced behaviors characteristic of ASD, such as increased repetitive behaviors and deficits in social interaction. Treatment with LIP was able to partially attenuate these behaviors, particularly by reducing repetitive behaviors and positively modulating BDNF and NGF levels, especially in the posterior cortex. However, the efficacy of the treatment varied between different brain regions and the behavioral parameters evaluated, and it was not sufficient to fully restore behaviors to control levels. It is concluded that RSV encapsulated in liposomes presents promising therapeutic potential for the treatment of ASD symptoms, particularly in the modulation of neurotrophins and the reduction of repetitive behaviors. However, the variation in therapeutic response observed across different brain regions suggests the need for optimization in the formulation and administration of the treatment to maximize its therapeutic benefits and achieve more consistent efficacy.

**Keywords:** Autism Spectrum Disorder; Resveratrol; Liposomal Nanoparticles; Valproic Acid; Neurotrophins; Inflammatory Cytokines.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo integrado de fatores contribuintes para o Transtorno do Espectro Autista. ....	20
Figura 2: Mecanismos de sinalização das neurotrofinas e seus efeitos na sobrevivência, diferenciação e apoptose celular. ....	25
Figura 3: Modelo de indução química de autismo - modelo animal VPA. ....	28
Figura 4: Tipos de lipossomas e suas aplicações em nanomedicina. ....	35
Figura 5: Delineamento temporal do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do RSV em modelo animal de Transtorno do Espectro Autista (TEA). A. ....	41
Figura 6: Fluxograma - Protocolo de indução do modelo animal VPA de autismo. ....	43
Figura 7: Peso dos animais ao longo do período de tratamento. ....	58
Figura 8: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e tratamento pós-natal com lipossoma de RSV na latência de busca pelo ninho. ....	59
Figura 9: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e tratamento pós-natal com lipossoma de RSV no tempo para virar-se (geotaxia negativa). ....	60
Figura 10: Efeitos do tratamento com lipossomas contendo RSV nos parâmetros comportamentais dos grupos experimentais no teste de campo aberto. ....	61
Figura 11: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e do tratamento pós-natal com lipossomas de RSV no tempo de latência para iniciar a interação no teste das três câmaras. ....	63
Figura 12: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e tratamento pós-natal com lipossomas no comportamento de enterramento de mármore. ....	66
Figura 13: Concentrações de TNF- $\alpha$ no córtex posterior e soro de animais modelo de autismo (VPA) tratados com lipossoma de RSV. ....	68
Figura 14: Concentrações de NGF no córtex, cerebelo e hipocampo de animais modelo de autismo (VPA) tratados com lipossoma de RSV. ....	69
Figura 15: Concentrações de BDNF no córtex posterior, cerebelo e hipocampo de animais modelo de autismo (VPA) tratados com lipossoma de RSV. ....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades Químicas e Biológicas do RSV .....	30
Tabela 2: Distribuição de filhotes machos em subgrupos experimentais com diferentes exposições e intervenções pós-natais.....	44
Tabela 3: Distribuição dos filhotes machos em grupos experimentais com diferentes condições de base e tratamentos pós-natal por via intraperitoneal.....	45
Tabela 4: Caracterização físico-química de lipossomas contendo RSV: Raio Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta.....	56
Tabela 5: Síntese dos resultados dos testes comportamentais .....	67
Tabela 6: Síntese das alterações bioquímicas em diferentes regiões cerebrais e soro .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ASD:** Autism Spectrum Disorder (Transtorno do Espectro Autista)
- BDNF:** Brain-Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)
- BHE:** Barreira Hematoencefálica
- CaMKII:** Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (Quinase de Cálcio/Calmodulina II)
- CDC/EUA:** Centers for Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos)
- CEUA:** Comitê de Ética no Uso de Animais
- CNV:** Copy Number Variation (Variação do Número de Cópias)
- CREB:** cAMP Response Element-Binding Protein (Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao AMPc)
- DG:** Dia Gestacional
- DPN:** Dia Pós-Natal
- DNPH:** 2,4-dinitrofenil-hidrazina
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
- ERK:** Extracellular Signal-Regulated Kinase (Cinase Regulada por Sinais Extracelulares)
- ERO:** Espécies Reativas de Oxigênio
- FDA:** Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos)
- GDNF:** Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (Fator Neurotrófico Derivado da Glia)
- GSH:** Glutathiona Redutase
- HPA:** Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis (Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal)
- IFN- $\gamma$ :** Interferon Gamma
- IL-1 $\beta$ :** Interleucina-1 $\beta$
- IL-4:** Interleucina-4
- IL-6:** Interleucina-6
- IP:** Intraperitoneal
- LIP:** Lipossomas
- LPS:** Lipopolissacarídeo
- MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase (Proteína Cinase Ativada por Mitógenos)
- MDA:** Malondialdeído
- NaCl:** Cloreto de Sódio
- NGF:** Nerve Growth Factor (Fator de Crescimento Neural)
- NF- $\kappa$ B:** Nuclear Factor Kappa B (Fator Nuclear Kappa B)
- nm:** Nanômetro
- nmol:** Nanomol
- PI3K:** Phosphoinositide 3-Kinase (Fosfatidilinositol 3-Cinase)
- PKC:** Protein Kinase C (Proteína Cinase C)
- PTEN:** Phosphatase and Tensin Homologue (Homólogo de Fosfatase e Tensina)
- RSV:** Resveratrol

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**SOD:** Superóxido Dismutase

**TBA:** Ácido Tiobarbitúrico

**TBARS:** Thiobarbituric Acid Reactive Species (Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

**TCD4:** Linfócito TCD4+

**TCD8:** Linfócito TCD8+

**TEA:** Transtorno do Espectro Autista

**TEP:** 1,1,3,3-tetra-etoxi-propano

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor Alpha (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

**Trk:** Tropomyosin Receptor Kinase (Receptor Tirosina Quinase)

**VPA:** Valproic Acid (Ácido Valpróico)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1 Caracterização do Transtorno do Espectro Autista - TEA	18
1.2 Mecanismos de neuroinflamação no TEA	21
1.2.1 Neurobiologia do TEA	21
1.2.2 Impactos da neuroinflamação no neurodesenvolvimento	23
1.2.3 Neuroinflamação e neurotrofinas	24
1.3 Modelos pré-clínicos de autismo: ferramentas e desafios	27
1.4 Importância da pesquisa em novos tratamentos para TEA: atualidades e limitações	28
1.5 Resveratrol (RSV) como agente terapêutico	29
1.6 Potencial das nanopartículas como sistema de entrega de medicamentos	33
1.7 Contexto e relevância científica	36
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
2.1 Objetivo geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
3.1 Aspectos Éticos	40
3.2 Desenho Experimental	40
3.2.1 Indução do autismo em modelo animal com VPA	41
3.2.2 Organização e distribuição dos grupos experimentais	43
3.3 Constituição do lipossoma de RSV (LIP)	45
3.3.1 Materiais	45
3.3.2 Síntese	46
3.3.3 Preparação dos lipossomas	46
3.3.4 Caracterização dos lipossomas	47
3.3.5 Análise dinâmica de dispersão de luz (DLS)	47
3.3.5.1 Determinação de distribuição de tamanho por espalhamento de luz dinâmico (DLS)	48
3.3.6 Potencial Zeta (ZP)	49
3.4 Avaliação do crescimento e desenvolvimento pós-natal do modelo animal	50
3.5 Avaliação comportamental em modelos animais de TEA	50
3.5.1 Discriminação olfativa: Teste da busca pelo ninho	50
3.5.2 Teste de geotaxia negativa	51
3.5.3 Teste de campo aberto ( <i>Open-Field</i> )	51
3.5.4 Avaliação da interação social: teste das três câmaras	52



3.5.5 Avaliação de comportamentos obsessivo-compulsivos e movimentos repetitivos: teste de enterramento de mármore ( <i>Marble Burying Test</i> ) .....	52
3.6 Análises Bioquímicas .....	53
3.7 Análise por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	53
3.8 Análise Estatística.....	53
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
4.1 Características físico-química dos lipossomas contendo RSV .....	55
4.2 Análise do crescimento e desenvolvimento pós-natal do modelo animal VPA	56
4.3 Avaliação de comportamentos semelhantes ao autismo em modelo animal VPA.....	58
4.3.1 Discriminação olfativa: Teste da busca pelo ninho .....	58
4.3.2 Teste de geotaxia negativa .....	59
4.3.3 Análise da atividade locomotora e memória de habituação ( <i>Open-Field</i> ) .	60
4.3.4 Análise de interação social: teste das três câmaras.....	61
4.3.5 Análise de comportamentos obsessivo-compulsivos e movimentos repetitivos ( <i>Marble Buring teste</i> ) .....	65
4.4 Análise do conteúdo imunoenzimático: TNF- $\alpha$ , BDNF e NGF .....	67
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
5.1 Caracterização físico-química de lipossomas contendo RSV .....	73
5.2 Validação do Modelo de autismo quimicamente induzido por VPA pré-natal ..	74
5.3 Efeitos dos lipossomas de RSV na regulação de TNF, NGF e BDNF em modelo animal VPA de autismo.....	86
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>94</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>108</b>
<b>CERTIFICADO.....</b>	<b>109</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Caracterização do Transtorno do Espectro Autista - TEA

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição neurológica complexa que afeta o desenvolvimento social, comportamental e a comunicação dos indivíduos (American Psychiatric Association, 2013; Hyman *et al.*, 2020; Takuma *et al.*, 2015). Caracterizado por uma ampla variabilidade de sintomas e graus de suporte, o TEA inclui dificuldades persistentes nas habilidades de comunicação e interação social, além de padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades (American Psychiatric Association, 2013; Bossu; Roux, 2019; Genovese; Butler, 2020).

O comprometimento e a gravidade do TEA estão organizados, segundo o DSM-5-TR (2022), em três níveis de suporte nos quais a exigência de apoio, por familiares ou cuidadores para a pessoa autista, varia de acordo com o nível diagnosticado sendo nível 1, necessita de suporte pontual; nível 2, necessita de suporte frequente e; nível 3, necessita de suporte extensivo), assim também, a própria classificação de gravidade pode variar de acordo com o contexto ou variar/oscilar segundo o tempo (idade), ou mesmo, se apresentar muito além dos níveis de diagnóstico já estabelecidos (American Psychiatric Association, 2013; Hyman *et al.*, 2020; Lord *et al.*, 2018).

Estudos epidemiológicos estimam que no mundo, uma (1) a cada cem (100) crianças são diagnosticadas com TEA (Bossu; Roux, 2019; Zeidan *et al.*, 2022). Estudos atuais relatam aumento na prevalência medida do TEA ao longo dos últimos anos, por identificação precoce e melhora dos processos diagnósticos, à vista disso, Zeidan e colaboradores (2022) realizaram uma ampla revisão sobre os números do autismo no mundo e relataram que a estimativa global (prevalência) de TEA apresenta média de 65/10.000.

Com uma prevalência crescente globalmente, o TEA apresenta desafios significativos tanto para o diagnóstico precoce quanto para intervenções terapêuticas. Analisando estatisticamente, é relevante mencionar as projeções de dois relatórios emitidos em 2021 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC/EUA), os quais indicam um crescimento na prevalência do espectro do autismo no país quando contrastados com os dados de 2020 (Maenner, 2021).

Em estudo atual, a proporção de TEA é de uma (1) em cinquenta e nove (59) crianças de quatro (4) anos e a prevalência dos homens foi 3,4 maior do que em mulheres (3,4:1) (Shaw, 2021). O mesmo ocorreu na avaliação de crianças com 8 anos de idade. Foi identificada a proporção de uma (1) em cada quarenta e quatro (44) crianças e a prevalência entre meninos foi 4,2 vezes maior do que entre meninas (4,2:1), segundo estudo divulgado em 2021 (Maenner, 2021).

Devido a heterogeneidade clínica do TEA (Motttron; Bzdok, 2020), a ciência ainda não conseguiu determinar biomarcadores confiáveis, logo, o diagnóstico do TEA deve ser feito com base na clínica, por meio da avaliação comportamental (Lord *et al.*, 2018). A triagem e diagnóstico é feita na primeira infância aos 18-24 meses de idade (Hyman *et al.*, 2020; Takumi *et al.*, 2020; Zeidan *et al.*, 2022), seguindo os critérios do DSM-5.

De acordo com Zeidan e colaboradores (2022) é na primeira infância que os sintomas característicos podem ser diferenciados do desenvolvimento típico de outros atrasos, de outras condições do desenvolvimento, ou mesmo mais cedo, a partir dos 12 meses se os atrasos do desenvolvimento forem graves (American Psychiatric Association, 2013). O TEA é diagnosticado com menor frequência em mulheres do que em homens e, em conformidade com achados de estudos do comportamento, nas mulheres os sintomas de comportamentos restritos e repetitivos parecem ser menos graves do que os observados em homens (Supekar *et al.*, 2022).

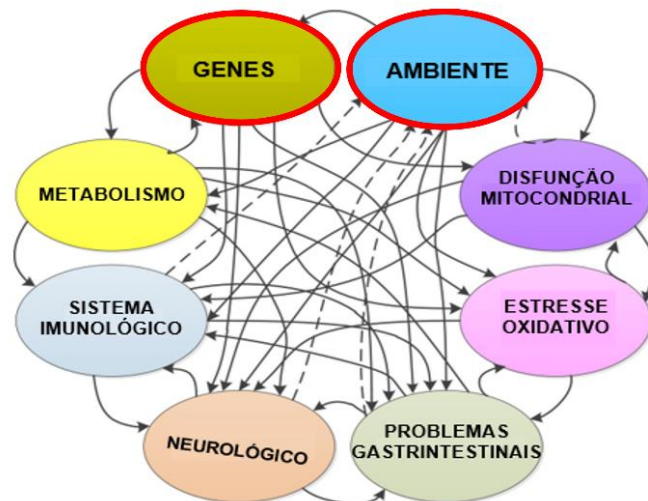
O TEA apresenta uma fisiopatologia complexa, de desenvolvimento multifatorial envolvendo caracterizações genéticas e fatores ambientais, isolados ou em conjunto (Baio *et al.*, 2018; Posar; Visconti, 2017). Acredita-se que fatores ambientais tais como exposição a toxinas, pesticidas, infecções e drogas teratogênicas, podem levar ao TEA por meio de alterações epigenéticas, ativação imunológica materna, modificações do microbioma materno, estresse oxidativo pelo aumento da espécies reativa de oxigênio (EROS) e disfunção mitocondrial, interferindo nos processos de desenvolvimento do organismo em formação (Nicolini; Fahnstock, 2018; Posar; Visconti, 2017).

Sabe-se que o “risco genético” desempenha um papel crítico na etiologia do TEA, e na última década, estudos sistemáticos de genes específicos foram identificados e relacionados como responsáveis pelo TEA (Searles Quick; Wang; State, 2021). Vorstman e colaboradores (2017), apontam que as alterações genéticas interferem em processos biológicos diferentes como na desregulação do

funcionamento sináptico, remodelação de cromatina, sinalização Wnt, regulação transcricional, interações com gene do X Frágil e Retardo Metal (FMR1, do inglês, *Fragile X Mental Retardation 1*) e na sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*).

Síndromes genéticas como X Frágil, Rett, Esclerose Tuberosa, mutações no gene homólogo de tensina e fosfatase (PTEN do inglês, *Phosphatase and Tensin Homologue*) e deleções ou duplicações cromossômicas estruturais (variação do número de cópias – CNV) estão intimamente relacionadas ao TEA (Betancur, 2011; Genovese; Butler, 2020).

Apesar dos progressos científicos, a causa exata do TEA permanece desconhecida. Como mencionado anteriormente, a condição apresenta uma ampla gama de casos, envolvendo uma interação complexa entre diversos fatores genéticos e influências do ambiente, os quais provocam mudanças fisiológicas em indivíduos com predisposição genética. Assim, muitos são os mecanismos subjacentes comuns, aos distúrbios genéticos, com vias neurobiológicas sobrepostas, que podem conduzir ao fenótipo cognitivo-comportamental do autismo (Tordjman *et al.*, 2018). A figura 1 representa a interrelação complexa entre os sistemas potencialmente envolvidos no TEA.



**Figura 1: Modelo integrado de fatores contribuintes para o Transtorno do Espectro Autista.** A figura 1 apresenta um modelo integrado que descreve as interações complexas entre fatores genéticos (Genes) e ambientais (Ambiente) e suas influências no desenvolvimento do TEA. Os principais fatores incluem alterações no metabolismo, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, sistema imunológico, problemas gastrointestinais e disfunções neurológicas. As conexões entre esses fatores, representadas por setas bidirecionais, indicam que cada componente pode influenciar e ser influenciado pelos outros, refletindo a natureza multifatorial do TEA. Este modelo sublinha a necessidade de abordagens multidisciplinares na pesquisa e no tratamento do TEA, que considerem a complexidade e a interdependência dos fatores genéticos e ambientais. Fonte: adaptado de Randolph-Gips; Srinivasan (2012).

## 1.2 Mecanismos de neuroinflamação no TEA

Estudos indicam que a neuroinflamação desempenha um papel crucial na patogênese do TEA, contribuindo significativamente para os sintomas observados nos indivíduos afetados (Posar; Visconti, 2017; Stervbo; Vang; Bonnesen, 2007). A neuroinflamação é um processo caracterizado pela ativação das células imunes do sistema nervoso central (SNC), levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios (Ahmad *et al.*, 2018). Este processo é frequentemente observado em transtornos neuropsiquiátricos, onde pode contribuir para as anomalias no desenvolvimento neural e comportamentos típicos do TEA (Frasch *et al.*, 2023; Komada; Nishimura, 2022).

A neuroinflamação no autismo envolve vários mecanismos, incluindo a ativação persistente da microglia e dos astrócitos, que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina -6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (do inglês, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) e Interferon -  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Ahmad *et al.*, 2018; Komada; Nishimura, 2022). Estas citocinas são críticas para a regulação das respostas imunes e inflamatórias no cérebro, mas sua produção excessiva pode levar a danos neuronais e disfunções sinápticas (Hughes; Moreno; Ashwood, 2024; Morgan *et al.*, 2014; Morgan; Liu, 2011).

Fatores ambientais, como a exposição a poluentes e pesticidas, também foram associados ao aumento da prevalência de TEA e podem agravar a disfunção imunológica e a neuroinflamação (Posar; Visconti, 2023). Por exemplo, a exposição a poluentes do ar, como material particulado fino (PM<sup>2.5</sup>) e ozônio (O<sup>3</sup>), podem induzir a formação de ERO e espécies reativas nitrogênio (ERN), exacerbando a neuroinflamação (Ramírez-Mendoza *et al.*, 2024).

Estudos recentes também apontam a importância dos mediadores inflamatórios na condução da neuroinflamação no TEA (Than *et al.*, 2023). A ativação da microglia e a expressão de IL-17A durante a ativação imunológica materna desempenham um papel significativo na neuroinflamação do TEA (Usui; Kobayashi; Shimada, 2023).

### 1.2.1 Neurobiologia do TEA

Diversos tipos de células do SNC estão envolvidos na neuroinflamação associada ao TEA, incluindo micróglia e astrócitos (Bambini-Junior *et al.*, 2014; Burns

*et al.*, 2002; Stervbo; Vang; Bonnesen, 2007). A micróglia, sendo a principal célula imune residente no SNC, desempenha um papel crítico na manutenção da homeostase cerebral (Stervbo; Vang; Bonnesen, 2007). Quando ativada, libera uma variedade de substâncias pró-inflamatórias e neurotóxicas que podem exacerbar a inflamação e o dano neuronal (Ahmad *et al.*, 2018; Komada; Nishimura, 2022). A micróglia também participa do desenvolvimento de circuitos neurais funcionais por meio da poda sináptica, e sua disfunção pode contribuir para a patogênese do TEA (Koyama; Ikegaya, 2015). O aumento da ativação microglial e a densidade de microglias são observados em várias regiões cerebrais de indivíduos com TEA (Toscano *et al.*, 2021).

Os astrócitos, por sua vez, são células gliais que auxiliam o funcionamento e nutrição dos neurônios, mas também podem contribuir para a inflamação quando ativados (Frasch *et al.*, 2023; Morgan *et al.*, 2014). A coordenação entre micróglia e astrócitos é essencial para a modulação da neuroinflamação, e ambos os tipos celulares podem liberar citocinas e quimiocinas que exacerbam a inflamação (Xiong; Chen; Li, 2023). De fato análise de perfis transcriptômicos neuronais específicos em cérebros *pos-mortem* revelou presença de estresse celular e ativação de vias neurais-imunes/inflamatórias em neurônios indivíduos com TEA, indicando uma interação complexa entre inflamação e atividade neuronal alterada (Zhang *et al.*, 2023).

Além disso, a elevação de citocinas inflamatórias no líquido cerebrospinal de pacientes com TEA corrobora a presença de neuroinflamação crônica, sugerindo que estes mediadores desempenham um papel crucial na progressão do transtorno (Than *et al.*, 2023). Neste contexto, a Barreira Hematoencefálica (BHE) é uma estrutura crucial que protege o cérebro de substâncias potencialmente nocivas na circulação sanguínea. No entanto, a inflamação pode comprometer a integridade da BHE, permitindo a infiltração de células imunes periféricas e aumentando a neuroinflamação (Ahmad *et al.*, 2018; Komada; Nishimura, 2022).

Estudos mostraram que a disfunção da BHE está associada a um aumento na permeabilidade, facilitando a entrada de citocinas pró-inflamatórias no cérebro e exacerbando a sintomatologia do TEA (Frasch *et al.*, 2023). Por exemplo, a exposição a poluentes do ar, como PM<sup>2.5</sup> e O<sup>3</sup>, pode danificar a BHE, exacerbando a neuroinflamação (Ramírez-Mendoza *et al.*, 2024). Durante a gestação, a ativação imunológica materna, decorrente de diversos fatores, como infecções virais ou bacterianas, inflamações crônicas e até mesmo estresse severo, pode alterar a

barreira hematoencefálica (BHE), tornando-a mais permeável e permitindo a passagem de substâncias inflamatórias para o ambiente fetal, o que contribui para o desenvolvimento de inflamação no feto (Usui; Kobayashi; Shimada, 2023).

Uma característica chave da neuroinflamação no TEA é a resposta imunológica superativada, que é evidenciada por níveis elevados de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no sangue e no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com TEA (Ahmad *et al.*, 2018; Hughes; Moreno; Ashwood, 2024). A superativação do sistema imune pode levar a um ciclo vicioso de inflamação crônica e dano neuronal, contribuindo para os déficits comportamentais e cognitivos observados no TEA (Komada; Nishimura, 2022).

### 1.2.2 Impactos da neuroinflamação no neurodesenvolvimento

A neuroinflamação pode impactar significativamente o desenvolvimento neural, interferindo na neurogênese, migração neuronal e formação de sinapses (Ahmad *et al.*, 2018; Hughes; Moreno; Ashwood, 2024). Por exemplo, a IL-6 tem sido associada na alteração da adesão e migração celular neuronal, além de contribuir para um desequilíbrio nas redes excitatórias e inibitórias no cérebro, fatores que são críticos para o desenvolvimento normal (Komada; Nishimura, 2022).

Além disso, a poda sináptica inadequada pela micróglia favorece o excesso de sinapses excitatórias imaturas, podendo comprometer o balanço excitatório-inibitório (E/I) e levar a disfunções comportamentais e cognitivas (Komada; Nishimura, 2022). De fato, anormalidades nas áreas cerebrais envolvidas no controle emocional, interações sociais e coordenação motora são observadas em indivíduos com TEA (Toscano *et al.*, 2021).

Estudos recentes destacam a disfunção do sistema imunológico inato em indivíduos com TEA, mostrando uma ativação excessiva de células imunes inatas, como monócitos e células dendríticas, assim, essas células produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , que por sua vez, tem seus níveis elevados em indivíduos com TEA e estão associadas a piora dos comportamentos (Hughes; Moreno; Ashwood, 2024). A ativação desregulada das células imunológicas pode contribuir para uma inflamação crônica e disfunções no desenvolvimento neural (Komada; Nishimura, 2022).

### 1.2.3 Neuroinflamação e neurotrofinas

A ativação de células gliais e a liberação de citocinas pró-inflamatórias na neuroinflamação aumentam a produção de ERO e ERN, exacerbando a neurotoxicidade e promovendo o declínio cognitivo (Numakawa; Kajihara, 2023).

Não obstante, o desbalanço redox afeta negativamente a regulação das neurotrofinas BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, do inglês - *Brain-derived neurotrophic factor*) e do NGF (Fator de Crescimento Neural, do inglês - *nerve growth factor*), pois, o estado de estresse celular alteram seus níveis séricos, compromete a neuroplasticidade, a função cognitiva, e está associado ao desenvolvimento de várias condições neuropsiquiátricas (Kashyap *et al.*, 2018; Lima Giacobbo *et al.*, 2019), transtornos neurodegenerativos (Lucaci *et al.*, 2022), e à patogênese do TEA (Galvez-Contreras *et al.*, 2017).

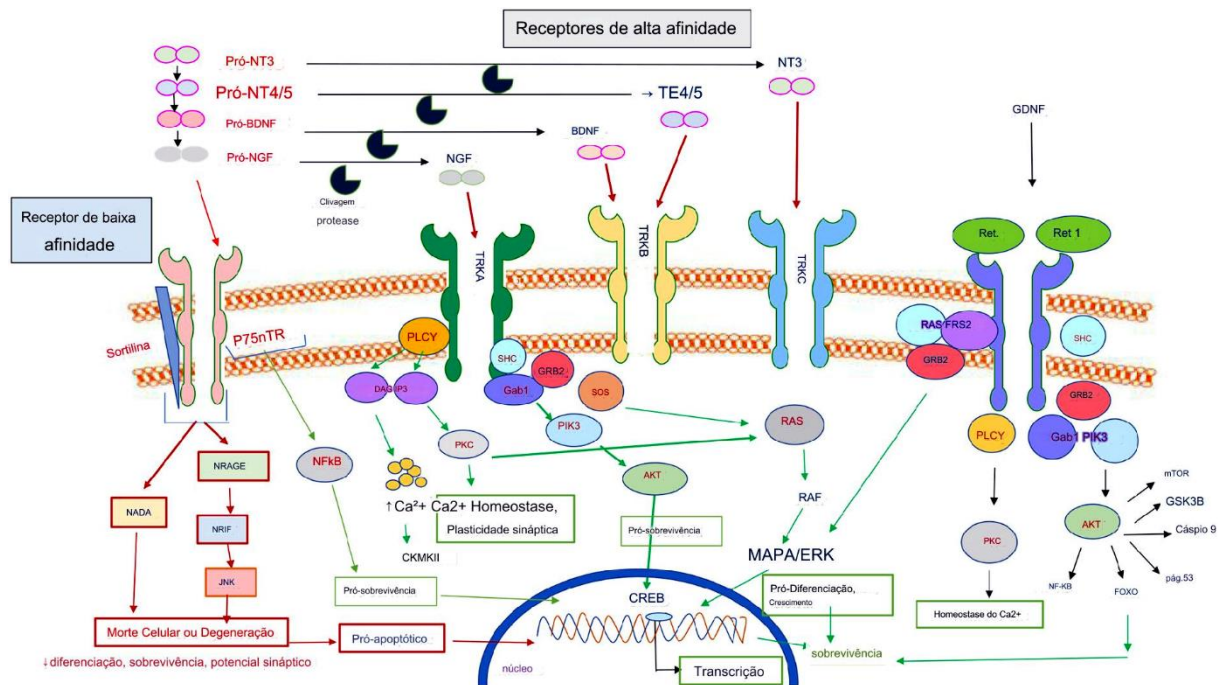
Conforme revisado anteriormente por Huang & Reichardt (2001) e Kashyap *et al.*,(2018), as neurotrofinas são importantes reguladores da sobrevivência, desenvolvimento, função e plasticidade do sistema nervoso. Os efeitos biológicos de cada uma das neurotrofinas são mediados pela ativação de um ou mais dos três membros da família de receptores tirosina quinase (Trk), que inclui TrkA, TrkB e TrkC; além disso, todas as neurotrofinas ativam o receptor de neurotrofinas p75 (p75<sup>L<sup>N</sup>TR</sup> - também referido como CD271 em células imunes), um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (Skaper, 2012). Cada receptor contem domínios extracelulares ricos em cisteína, domínios de reprodução ricos em leucina e domínios semelhantes a imunoglobulinas (Skaper, 2018). (Detalhes – figura 2).

Durante o desenvolvimento, as neurotrofinas atuam como fatores de sobrevivência, garantindo que o número de neurônios sobreviventes corresponda à necessidade de inervação a densidade necessária apropriada do alvo (Skaper, 2012). Além disto, elas também regulam decisões de destino celular, crescimento de axônios, poda de dendritos, o padrão de inervação e a expressão de proteínas cruciais para a função neuronal normal, como neurotransmissores e canais iônicos (Huang; Reichardt, 2001). As neurotrofinas conhecidas incluem: GDNF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-6 e NT-7 (Huang; Reichardt, 2001; Skaper, 2012).

BDNF e NGF são produzidas tanto no SNC quanto periférico, com o BDNF estando mais presente em áreas do cérebro associadas à cognição e regulação emocional (Lima Giacobbo *et al.*, 2019). O NGF, por outro lado, regula o crescimento,



a sobrevivência e a diferenciação das células nervosas, sendo expressamente presente no córtex cerebral, hipocampo e amígdala (Bove *et al.*, 2024).



## Figura 2: Mecanismos de sinalização das neurotrofinas e seus efeitos na sobrevivência, diferenciação e apoptose celular.

A figura 2 destaca a complexidade da sinalização das NTs, demonstrando como diferentes combinações de ligantes e receptores podem modular diversas respostas celulares. Detalhadamente ilustram-se os mecanismos de sinalização das neurotrofinas (NTs) e seus receptores de alta e baixa afinidade, destacando as vias de transdução de sinal intracelular e seus efeitos na sobrevivência, diferenciação e apoptose celular. As neurotrofinas apresentadas incluem as formas precursoras pró-NT3, pró-NT4/5, pró-BDNF e pró-NGF, bem como suas formas maduras NT3, NT4/5, BDNF e NGF, que são geradas através de clivagem proteolítica. Os receptores de alta afinidade detalhados na figura incluem TRKA, específico para NGF; TRKB, específico para BDNF e NT4/5; TRKC, específico para NT3; e Ret, que atua como receptor para GDNF, interagindo com co-receptoras GFR $\alpha$ . O receptor de baixa afinidade, p75<sup>NTR</sup>, também é representado, demonstrando sua capacidade de se associar à sortilina e modular a sobrevivência e apoptose celular. A sinalização intracelular mediada por TRKA envolve a ativação de PLC $\gamma$ , resultando na geração de DAG e IP<sub>3</sub>, que subsequentemente promovem a ativação de PKC. Além disso, a ativação de PI3K leva à fosforilação de Akt, promovendo a sobrevivência celular. A via de RAS ativa a cascata MAPK/ERK, que é crucial para a diferenciação e crescimento celular. Similarmente, TRKB ativa PLC $\gamma$ , PI3K e RAS, desencadeando respostas de sobrevivência, plasticidade sináptica e crescimento celular. TRKB também ativa CaMKII e CREB, facilitando a transcrição de genes associados à sobrevivência e plasticidade sináptica. TRKC segue uma via sinalizadora análoga, ativando RAS e a cascata MAPK/ERK. O receptor Ret, por sua vez, ativa PI3K, PLC $\gamma$  e vias envolvendo RAS e ERK, promovendo sobrevivência e crescimento celular. Em contraste, a sinalização através do receptor p75<sup>NTR</sup>, especialmente quando associado à sortilina, ativa NRAGE, NRIF e JNK, culminando em apoptose celular ou degeneração. As ações pró-apoptóticas e anti-sobrevivência de p75<sup>NTR</sup> contrastam significativamente com os efeitos dos receptores de alta afinidade. Em termos de resultados funcionais, a sinalização mediada pelas NTs através dos receptores de alta afinidade geralmente promove a sobrevivência, diferenciação e plasticidade sináptica. Por outro lado, a sinalização via p75<sup>NTR</sup> pode resultar em apoptose e degeneração celular, especialmente na ausência de co-estimulação pelos receptores de alta afinidade, sendo essencial para a regulação do equilíbrio entre sobrevivência e morte celular. Fonte: figura adaptada de Kashyap *et al* (2018).

O BDNF é um mediador essencial da montagem, desenvolvimento e maturação do cérebro humano, sendo implicado em diversos transtornos cerebrais (Lucaci *et al.*, 2022). O BDNF desempenha um papel crucial na resposta ao estresse oxidativo, promovendo a sobrevivência neuronal e a plasticidade sináptica, porém, a expressão de BDNF pode ser modulada em resposta ao estresse oxidativo, o que indica sua importância na manutenção da homeostase neuronal sob condições de estresse, além disso, variações no gene codificador do BDNF, estão associadas a alterações na secreção desta neurotrofina e na vulnerabilidade ao estresse oxidativo (Bove *et al.*, 2024).

Além da micróglia, os astrócitos desempenham diversas funções cruciais no SNC, incluindo a manutenção da BHE, regulação da comunicação neurônio-glia e modulação do fluxo sanguíneo cerebral (Cordiglieri; Farina, 2010). Conforme Tiberi *et al.* (2023), os astrócitos desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase do SNC, modulando a neurotransmissão e a resposta inflamatória. Segundo os autores a modulação dos níveis de NGF pode afetar a fisiologia dos astrócitos, levando-os a um fenótipo neurotóxico. Além disso, a redução dos níveis de NGF resulta em alterações morfológicas nesta célula e ativação de transcritos neurotóxicos, culminando na morte neuronal. Esse fenótipo neurotóxico é mediado pela liberação de glutamato pelos astrócitos, causando excitotoxicidade, e pela ativação de vias de sinalização de cálcio (Tiberi *et al.*, 2023).

Micróglia e astrócitos são células gliais versáteis que reagem a todos os tipos de insultos no SNC, passando por mudanças morfológicas e funcionais que dependem do contexto, além disso, se comunicam e se influenciam bidirecionalmente (Nimmerjahn; Kirchhoff; Helmchen, 2005). Segundo Bhusal *et al.* (2023), a comunicação bidirecional entre micróglia e astrócitos em condições neuroinflamatórias é crucial para regular suas funções em diferentes estados: **a)** micróglia podem promover a ativação de vias inflamatórias, como NF- $\kappa$ B, MAPK, e Akt, resultando na liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , ERO, entre outros, que aumentam as atividades neuroinflamatórias e neurotóxicas dos astrócitos; **b)** e também ao contrário, leva a funções anti-inflamatórias e neuroprotetoras dos astrócitos de forma específica através da liberação de IGF-1, TGF- $\alpha$  e miR-124.

Essa interação bidirecional é essencial para a modulação da neuroinflamação, sendo crucial tanto para a defesa quanto para a reparação tecidual no SNC (Xiong;

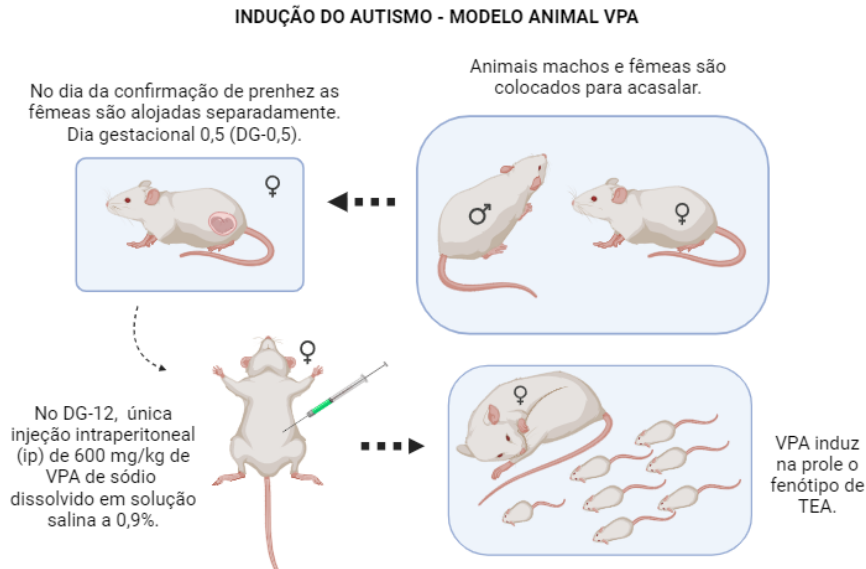
Chen; Li, 2023). A compreensão dessa interação entre micróglia e astrócitos é importante para o desenvolvimento de intervenções que visem modular a neuroinflamação e proteger contra a neurodegeneração.

### 1.3 Modelos pré-clínicos de autismo: ferramentas e desafios

Modelos animais, como os induzidos por ácido valpróico (VPA) e os geneticamente modificados, têm sido amplamente utilizados (Ellegood; Crawley, 2015). A administração pré-natal de VPA em roedores, proporciona um modelo animal aceito de TEA (apresenta validade de face e validade de construção) e tem sido amplamente utilizado para explorar novas intervenções farmacológicas em roedores (Chaliha *et al.*, 2020; Mabunga *et al.*, 2015). Conforme esquema apresentado figura 3. O VPA é um medicamento anticonvulsivante, estabilizador de humor, amplamente prescrito, eficaz para epilepsia, transtorno bipolar e também é usado *off label* para outras patologias como a enxaqueca; o VPA é o mais teratogênico de todos os antiepilépticos atualmente disponíveis (Tartaglione *et al.*, 2019). Estudos apontaram que as vias afetadas pelo VPA e seu mecanismo incluem o estresse oxidativo, a inibição da histona desacetilase, o desequilíbrio excitatório / inibitório dos neurônios e a hiperserotonemia (Mabunga *et al.*, 2015). Estudos clínicos, demonstraram que a exposição pré-natal (*in útero*)<sup>1</sup> ao VPA acarreta defeitos congênitos, déficits cognitivos e aumentam o risco de autismo (Nicolini; Fahnestock, 2018; Rouillet; Lai; Foster, 2013; Tartaglione *et al.*, 2019).

---

<sup>1</sup> Os efeitos da exposição *in útero* ao VPA mudam de acordo com a dose administrada e a janela de tempo da exposição: no 1º trimestre resulta em malformações de órgãos importantes; exposição mais tarde na gravidez aumenta o risco de efeitos mais sutis no desenvolvimento neurológico, defeitos do tubo neural, malformações congênitas que afetam os sistemas gastrointestinal, cardiovascular, dermatológico, genital, urinário, pulmonar e musculoesquelético. Maiores conhecimentos sobre os efeitos do VPA podem ser encontrados no estudo de Tartaglione e colaboradores (2019).



**Figura 3: Modelo de indução química de autismo - modelo animal VPA.** Para a indução do modelo animal de autismo com VPA, são utilizados animais adultos, tanto fêmeas em período estral quanto machos, que são colocados para acasalar. Durante todo o experimento, os animais são mantidos em condições controladas de temperatura (24°C) e com um ciclo claro/escuro de 12 horas. Eles recebem alimentação padrão e água ad libitum. Para a confirmação da gestação, as fêmeas são examinadas todas as manhãs. A prenhez é identificada pela detecção de espermatozoides em esfregaços vaginais. Uma vez confirmada a prenhez, este é considerado o dia gestacional (DG) 0,5. Em seguida, as fêmeas grávidas são alojadas individualmente até o nascimento dos filhotes. No 12º dia gestacional (DG12), uma dose única de 600 mg/kg de VPA de sódio, dissolvido em solução salina a 0,9%, é administrada por injeção intraperitoneal (i.p.) às fêmeas do grupo modelo. Os filhotes permanecem com as mães até o desmame, que ocorre no dia pós-natal (PND) 21. Filhotes de ambos os sexos podem ser incluídos nos estudos subsequentes. Adaptado de Schneider; Przewłocki (2005) e Elnahas e colaboradores (2021). Fonte: figura elaborada pelo autor, criado em BioRender.com.

#### 1.4 Importância da pesquisa em novos tratamentos para TEA: atualidades e limitações

Os tratamentos atuais para o TEA são predominantemente de natureza comportamental, com intervenções farmacológicas sendo utilizadas para manejar sintomas específicos, como irritabilidade, hiperatividade e comportamentos repetitivos (Lord *et al.*, 2018). . Essas intervenções têm a perspectiva de auxiliar no alívio de alguns sintomas do autismo.

Os modelos de tratamento são divididos em categorias: abordagens de comportamento e comunicação, abordagens dietéticas, medicamentos, e medicina complementar e alternativa (CDC, 2020). Na intervenção farmacológica, são utilizadas medicações das classes dos antidepressivos, antipsicóticos, medicamentos anti-TDAH e estabilizadores de humor (Correll *et al.*, 2021), além de medicação *off-label* (Masi *et al.*, 2017). O tratamento medicamentoso visa melhorar sintomas de

hiperatividade, desatenção, impulsividade, irritabilidade, agressão, comportamento auto lesivo, comportamentos repetitivos (incluindo estereotípias) e insônia (Genovese; Butler, 2020). O aripiprazol e a risperidona são os dois fármacos aprovados pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (do inglês, *Food and Drug Administration* -FDA) (Correll *et al.*, 2021; Masi *et al.*, 2017). No entanto, não existem tratamentos farmacológicos para os sintomas centrais do TEA, como interação social e comprometimento da linguagem (Chaliha *et al.*, 2020).

A heterogeneidade associada a fatores genéticos e ambientais, que induzem grande variabilidade de sintomas, sugere a necessidade de inúmeras intervenções. De acordo com Sanchack e Thomas (2016), é importante considerar os efeitos adversos das medicações utilizadas para o controle dos distúrbios neuropsicológicos ou comorbidades associadas, como sedação, ganho de peso, tremor e sintomas extrapiramidais.

De acordo com Baribeau e Anagnostou (2022), a falta de tratamentos farmacológicos eficazes para os sintomas centrais do TEA, como déficits sociais e comportamentos repetitivos, tem direcionado a pesquisa para novos agentes com mecanismos psicofarmacológicos inovadores e/ou alvos moleculares.

### **1.5 Resveratrol (RSV) como agente terapêutico**

O resveratrol (RSV), é um polifenol pertencente à família dos estilbenos, que vem sendo amplamente estudado por suas propriedades terapêuticas em diversas condições de saúde devido à sua atividade antioxidante natural (Vestergaard; Ingmer, 2019). Primeiramente identificado na planta *Veratrum grandiflorum*, em 1940, e posteriormente isolado das raízes de *Polygonum cuspidatum*, em 1963, conhecido popularmente como nó japonês ou bambu mexicano (Kaur *et al.*, 2022). O RSV é encontrado em várias outras plantas, incluindo a casca de uvas vermelhas, amoras, amendoins, mirtilos, cranberries (Burns *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2022; Vestergaard; Ingmer, 2019).

O interesse pelo RSV como agente terapêutico deriva de suas diversas propriedades biológicas, tais como efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, neuroprotetores, cardioprotetores, anti-cancerígenos, antimicrobianos, imunomoduladores e radioprotetores (Kaur *et al.*, 2022). O RSV é reconhecido por sua capacidade de neutralizar radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo, que é

um fator contribuinte em muitas doenças neurodegenerativas e outras condições crônicas (Schwingel *et al.*, 2023).

Na tabela 1 detalham-se as principais propriedades químicas e biológicas do RSV, destacando sua estrutura química, isômeros, solubilidade, estabilidade e peso molecular. Além disso, aborda suas múltiplas ações biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, cardioprotetoras, neuroprotetoras, antidiabéticas, antienvelhecimento, imunomoduladoras e antimicrobianas.

**Tabela 1: Propriedades Químicas e Biológicas do RSV**

Propriedades Químicas	
Característica	Descrição
Estrutura Química	Estilbeno, consistindo em dois anéis aromáticos ligados por uma ponte etilênica. Fórmula molecular: $C_{14}H_{12}O_3$ .
Isômeros	Existe em duas formas isoméricas: trans-resveratrol (mais comum e estável) e cis-resveratrol.
Solubilidade	Pouco solúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos como etanol e DMSO.
Estabilidade	Trans-resveratrol é estável na ausência de luz, mas pode se isomerizar para a forma cis quando exposto à luz UV.
Propriedades Biológicas	
Característica	Descrição
Antioxidante	Possui propriedades antioxidantes, ajudando a neutralizar radicais livres e prevenir danos oxidativos nas células.
Anti-inflamatório	Inibe várias vias inflamatórias, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias e enzimas como a COX-2.
Anticancerígeno	Possui propriedades antiproliferativas, induz apoptose em várias linhas celulares cancerígenas, e pode inibir angiogênese e metástase.
Cardioprotetor	Melhora a função endotelial, reduz o risco de doenças cardiovasculares e promove a vasodilatação através da ativação da via do óxido nítrico (NO).
Neuroprotetor	Atua na prevenção de doenças neurodegenerativas, reduz a neuroinflamação e o estresse oxidativo no SNC.
Antidiabético	Melhora a sensibilidade à insulina e tem efeitos benéficos no controle da glicose no sangue.
Antienvelhecimento	Ativa as sirtuínas, proteínas associadas à longevidade e ao envelhecimento saudável, e aumenta a expressão de genes envolvidos na reparação do DNA e na resposta ao estresse.
Efeitos no Sistema Imunológico	Modula a resposta imune, possuindo tanto efeitos imunossupressores quanto imunomoduladores dependendo do contexto.
Atividade Antimicrobiana	Possui propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas.

A tabela 1 detalha as principais propriedades químicas e biológicas do RSV, conforme revisado anteriormente (Ahmad *et al.*, 2018; Bhandari; Kuhad, 2017; Kaur *et al.*, 2022; Santos-Terra *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2010). Fonte: tabela elaborada pelo autor.

Quimicamente, o RSV é identificado como 3,5,4'-trihidroxiestilbeno; possui dois isômeros principais: cis-resveratrol e trans-resveratrol, sendo o último o mais biologicamente ativo, e o mais estudado devido à sua maior disponibilidade e estabilidade (Cottart *et al.*, 2010; Stervbo; Vang; Bonnesen, 2007). O RSV é sintetizado pelas plantas em resposta a danos causados por ataques fúngicos e irradiação ultravioleta (UV) (Belhadj *et al.*, 2006). Este composto atua como um mecanismo de defesa, sendo produzido em maior quantidade quando a planta enfrenta esses tipos de estresse (Wang *et al.*, 2002). O *trans*-resveratrol pode ser convertido em sua forma cis quando exposto à luz ultravioleta, logo, a estabilidade do RSV torna-se uma preocupação significativa, pois ele é suscetível à oxidação e à degradação quando exposto ao ar, luz e calor, o que pode limitar sua eficácia terapêutica (Schwingel *et al.*, 2023).

A propriedades biológicas mais relevantes do RSV é sua potente capacidade antioxidante, pois, ele age neutralizando os radicais livres e reduzindo o estresse oxidativo, um fator chave em muitas doenças crônicas e neurodegenerativas (Schwingel *et al.*, 2023; Shayganfard, 2020; Sun *et al.*, 2010). Além disso, o RSV exibe fortes propriedades anti-inflamatórias por meio da modulação de várias vias inflamatórias. Ele reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, e inibe a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), um regulador chave da resposta inflamatória, contribuindo para sua ação anti-inflamatória (Shayganfard, 2020).

Cottart *et al.* (2010), examinam a biodisponibilidade e toxicidade do RSV em humanos, destacando suas propriedades benéficas, como efeitos anti-inflamatórios e antitumorais. O estudo revela que, embora o RSV seja bem absorvido, sua biodisponibilidade é limitada devido ao rápido metabolismo. Após a absorção, o RSV é rapidamente convertido em formas mais solúveis através da ação das enzimas sulfotransferases e uridina difosfato glucuronosiltransferases (UGT), formando conjugados que são excretados pela urina, reduzindo a quantidade de RSV livre no sangue e, conseqüentemente, sua eficácia sistêmica. As altas doses (até 5 g) são geralmente bem toleradas, com poucos efeitos adversos leves relatados. Contudo, os efeitos a longo prazo e os impactos dos metabólitos do RSV requerem mais investigação (Cottart *et al.*, 2010).

Berman *et al.* (2017), destacam que o RSV mostrou-se promissor no tratamento de distúrbios neurológicos, como a doença de Alzheimer e acidente vascular cerebral

isquêmico. Segundo a revisão dos autores, os ensaios clínicos demonstraram que o RSV pode diminuir os níveis de MMP-9, um biomarcador associado à neurodegeneração, e reduzir a acumulação de beta-amiloide no cérebro, indicando sua capacidade de proteger o SNC e melhorar a integridade da BHE.

Zhang e colaboradores (2012), conduziram um estudo utilizando culturas de neurônio-glia do mesencéfalo de ratos para investigar os efeitos neurotróficos do RSV na Doença de Parkinson. A pesquisa demonstrou que o RSV promoveu a sobrevivência e a funcionalidade dos neurônios dopaminérgicos através da liberação dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF por astrócitos. Nas culturas de neurônio-astrócito, o RSV aumentou significativamente a captação de dopamina e a contagem de neurônios positivos para tirosina hidroxilase (TH), além disso, a liberação de BDNF e GDNF foi dependente da concentração e do tempo, com picos observados entre 24 e 36 horas após o tratamento com RSV. Segundo os autores, estes achados sugerem que o RSV oferece uma abordagem multifacetada para a neuroproteção em doenças neurodegenerativas, proporcionando uma estratégia terapêutica mais eficaz e com menos efeitos colaterais (Zhang *et al.*, 2012).

Em outro estudo, Xiong et al. (2020), desenvolveram nanocristais de RSV (RES-NCs) utilizando hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como estabilizador para melhorar a biodisponibilidade oral e a eficácia anti-Parkinsoniana. No modelo animal de Parkinson induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin (MPTP), os RES-NCs melhoraram a função motora; aumentaram os níveis de dopamina e seus metabólitos no cérebro, com efeitos neuroprotetores mediados pela via de sinalização Akt/Gsk3 $\beta$ . Além disso, os RES-NCs mostraram uma boa segurança, sem efeitos tóxicos significativos e potencial terapêutico do RSV no tratamento da Doença de Parkinson" (Xiong *et al.*, 2020).

A disfunção mitocondrial é outra condição patológica comum em várias doenças neurodegenerativas. As mitocôndrias regulam a homeostase do cálcio, produzem ERO e controlam a apoptose, além disto, a disfunção mitocondrial pode levar a uma série de consequências patológicas, incluindo estresse oxidativo, diminuição da produção de ATP e morte neuronal (Lin; Beal, 2006).

O estudo pré-clínico de Zhou et al. (2021), revelou que o tratamento com RSV melhora a biogênese mitocondrial e a função mitocondrial através da ativação da via de sinalização PGC-1 $\alpha$  em um modelo pré-clínico de lesão cerebral precoce após hemorragia subaracnóidea. O RSV promoveu a translocação nuclear de PGC-1 $\alpha$ ,



aumentou a expressão de proteínas NRF1 e TFAM, melhorou o potencial da membrana mitocondrial e os níveis de ATP intracelular, e restaurou a quantidade de mtDNA. Além disso, o RSV reduziu a apoptose neuronal e o estresse oxidativo, demonstrando seu potencial como agente neuroprotetor em condições de lesão (Zhou *et al.*, 2021).

Observa-se que o RSV demonstra significativo potencial terapêutico em condições neurológicas, modulando a biogênese mitocondrial, melhorando a função celular e reduzindo o estresse oxidativo, e por fim, o colocam como uma alternativa promissora para tratamentos em distúrbios como o TEA e outras patologias relacionadas.

## **1.6 Potencial das nanopartículas como sistema de entrega de medicamentos**

A nanotecnologia tem emergido como uma fronteira promissora na medicina no campo da entrega de medicamentos, pois, as nanopartículas, devido às suas propriedades únicas, como alta superfície específica, capacidade de modificação de superfície e a possibilidade de controlar a liberação de fármacos, representam uma inovação significativa nos sistemas terapêuticos (Patra *et al.*, 2018). Elas oferecem uma solução para vários desafios enfrentados pelos métodos tradicionais de administração de medicamentos, incluindo a superação de barreiras biológicas (Allen; Cullis, 2013), melhoria da biodisponibilidade (Anselmo; Mitragotri, 2016), e redução de efeitos colaterais (Patra *et al.*, 2018; Peer *et al.*, 2007).

Nanotecnologias exploram propriedades de materiais na escala nanométrica, diferenciando-se significativamente em suas propriedades físico-químicas e biológicas (Chaturvedi *et al.*, 2024). Os nanomateriais são caracterizados por terem pelo menos uma de suas dimensões menores que 100 nm, enquanto a nanotecnologia se refere ao estudo e à manipulação da matéria em escalas que variam de 1 a 100 nm, e suas aplicações estão presentes desde a indústria alimentícia à agricultura (Awashra; Młynarz, 2023).

Nanopartículas (NPs) possuem a capacidade de atravessar barreiras naturais, atingir novos alvos de entrega e interagir com DNA ou pequenas proteínas, tornando-se úteis em aplicações farmacêuticas, biomateriais e diagnósticas (Chaturvedi *et al.*, 2024). As NPs interagem com células e tecidos de maneiras únicas, devido às suas propriedades físico-químicas distintas, como tamanho, forma, carga de superfície e

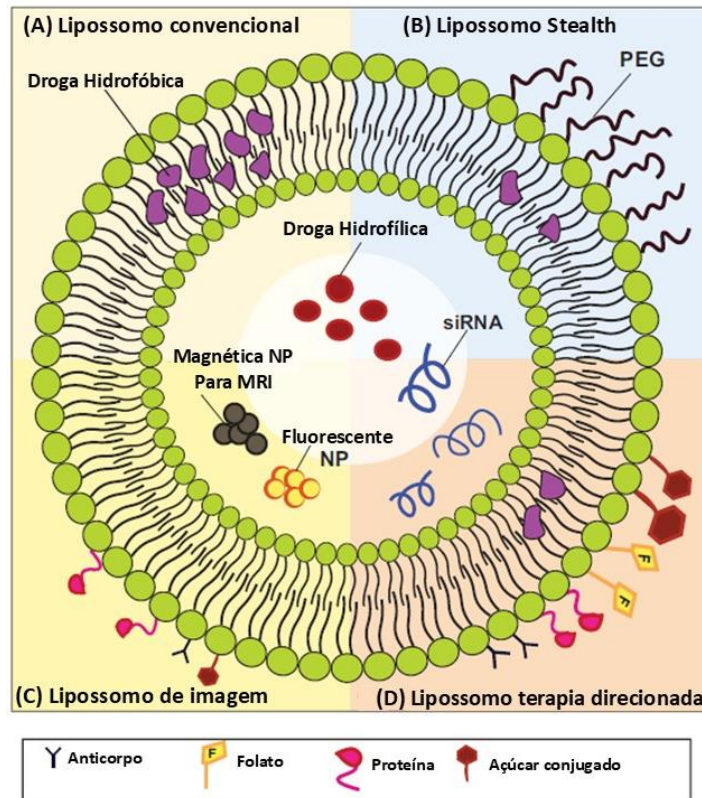
funcionalização, e desta forma, essas interações tornam-se eficazes em aplicações biomédicas, permitindo a internalização celular das nanopartículas por diferentes mecanismos de endocitose, incluindo fagocitose, pinocitose e endocitose mediada por receptor (Shang; Nienhaus; Nienhaus, 2014).

A capacidade dessas partículas de atravessar a barreira hematoencefálica (Singh, 2020), e de melhorar a estabilidade e biodisponibilidade dos fármacos são alguns dos principais benefícios que têm impulsionado sua pesquisa e aplicação clínica (Allen; Cullis, 2013; Anselmo; Mitragotri, 2016).

No entanto, a utilização de nanopartículas também apresenta desafios e limitações que precisam ser considerados para a implementação eficaz dessas tecnologias e incluem questões de complexidade na formulação, biocompatibilidade e toxicidade, custo e acessibilidade, além de interações com o sistema imunológico e controle do transporte e liberação de fármacos (Abdel-Mageed *et al.*, 2021).

Os lipossomas foram descritos pela primeira vez por Alec Bangham em 1960, e desde então, têm sido o centro de interesse por várias décadas, especialmente após a aprovação do Doxil® pela FDA, usado em ensaios clínicos (Ge *et al.*, 2019). Lipossomas são vesículas microscópicas esféricas compostas por fosfolipídios e esteroides naturais ou sintéticos, que possuem propriedades biocompatíveis, biodegradáveis e não imunogênicas (Feng *et al.*, 2020).

Conforme apresentado na figura 4, existem quatro tipos principais de lipossomas: lipossomas convencionais, lipossomas PEGuilados (Stealth), lipossomas alvo e lipossomas multifuncionais, adiante, a estrutura dos lipossomas, semelhante à membrana celular, permite aumentar a estabilidade e a biodistribuição dos fármacos carregados, cada um com aplicações específicas em nanomedicina incluindo a terapia de várias doenças como Alzheimer, câncer e diabetes, administrados por várias vias como intravenosa, oral ou transdérmica (Bhatt *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2019). Eles são usados como transportadores de moléculas lipofílicas, intercaladas na bicamada lipídica, e hidrofílicas, onde as moléculas hidrofílicas são encapsuladas no compartimento aquoso interno (Feng *et al.*, 2020).



**Figura 4: Tipos de lipossomas e suas aplicações em nanomedicina.** A figura 4 ilustra diferentes tipos de lipossomas e suas respectivas aplicações. No painel (A), temos o lipossoma convencional, que mostra a estrutura básica de um lipossoma com uma bicamada lipídica. Este tipo é utilizado para encapsular fármacos hidrofóbicos nas camadas lipídicas e fármacos hidrofílicos no núcleo aquoso. No painel (B), vemos o lipossoma stealth, que apresenta lipossomas revestidos com PEG (polietilenoglicol) na superfície externa, projetados para evadir o sistema imunológico e prolongar a circulação no corpo. O painel (C) destaca o lipossoma de imagem, incorporando nanopartículas magnéticas (para imagem de ressonância magnética - RMI) e nanopartículas fluorescentes, utilizado para técnicas de imagem médica, permitindo o rastreamento e a visualização de lipossomas no corpo. Por fim, no painel (D), temos o lipossoma de terapia alvo, funcionalizados com vários ligantes de superfície, incluindo anticorpos, folato, proteínas e açúcares conjugados. Estes são direcionados para células ou tecidos específicos, melhorando a entrega de fármacos para áreas-alvo, como células cancerígenas. Os componentes comuns a todos os tipos de lipossomas incluem a camada lipídica, que forma a base dos lipossomas, fármacos hidrofóbicos encapsulados na camada lipídica e fármacos hidrofílicos no núcleo aquoso. O siRNA, pequenas moléculas de RNA interferente, é incorporado para aplicações de terapia genética. Os símbolos e legendas incluem o anticorpo (Y), indicando a presença de anticorpos na superfície do lipossoma para direcionamento específico; folato, para melhorar a captação celular; proteínas conjugadas para funcionalização de superfície; e açúcares conjugados para direcionamento específico. Fonte: adaptado de Abdel-Mageed et al. (2021).

Álvarez et al. (2019) demonstraram que a estrutura bilaminar dos lipossomas, que imita a membrana fisiológica humana, facilita o direcionamento ao cérebro, protegendo as enzimas de degradação e minimizando as reações imunológicas associadas, além de aumentar a compatibilidade com a camada lipoidal da barreira hematoencefálica. Em outro estudo, verificou-se que nanocarregadores podem melhorar a solubilidade e biodisponibilidade do RSV, oferecendo liberação sustentada

e controlada do fármaco. Essas tecnologias protegeriam o RSV da degradação, aumentando sua absorção e permitindo a entrega direcionada a tecidos específicos, minimizando os efeitos colaterais possibilitando sua utilização em uma variedade de aplicações terapêuticas e biomédicas (Singh, 2020).

Com visto, as nanopartículas têm um potencial significativo para revolucionar a medicina, proporcionando uma entrega precisa e eficaz de fármacos diretamente às células-alvo, aumentando a eficácia terapêutica e redução dos efeitos colaterais. Os lipossomas, destacam-se por sua capacidade de encapsular tanto fármacos hidrofílicos quanto lipofílicos, protegendo-os da degradação e facilitando a liberação controlada e direcionada. Essa combinação de propriedades torna os lipossomas uma ferramenta promissora para o tratamento de diversas doenças, incluindo câncer e doenças neurodegenerativas.

Neste contexto, O RSV tem atraído atenção significativa por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetoras e cardioprotetoras (Kaur *et al.*, 2022). Contudo, a baixa biodisponibilidade do RSV limita sua eficácia clínica.

Ao acoplar o RSV a nanopartículas, é possível melhorar sua estabilidade, biodisponibilidade e direcionamento específico, potencializando seus efeitos terapêuticos (Bhatt *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2019). Essa abordagem inovadora pode superar as limitações do uso isolado do RSV, oferecendo uma estratégia terapêutica mais eficaz para o TEA.

### **1.7 Contexto e relevância científica**

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits na interação social, habilidades de comunicação e padrões de comportamento restritos, repetitivos e estereotipados (American Psychiatric Association, 2013). Afetando aproximadamente 2% da população mundial, o TEA é uma das condições neurocomportamentais mais prevalentes, com grande impacto individual e social (CDC, 2020; Lai; Lombardo; Baron-Cohen, 2014a; Talantseva *et al.*, 2023). Apesar dessa alta prevalência, as causas subjacentes e os mecanismos fisiopatológicos do TEA permanecem incompletamente compreendidos, o que dificulta o desenvolvimento de intervenções terapêuticas eficazes. Nesse contexto, a utilização de modelos animais se torna uma

ferramenta indispensável para avançar no entendimento da fisiopatologia e no desenvolvimento de novos tratamentos para o TEA.

Fatores pré-natais, como a exposição a substâncias tóxicas e estressores ambientais, estão associados a alterações no desenvolvimento do SNC que mimetizam algumas das características do TEA (Schlickmann; Fortunato, 2013). Modelos animais, como a exposição pré-natal ao VPA, têm demonstrado relevância ao reproduzir fenômenos como o crescimento cerebral acelerado e a hiperexcitabilidade neuronal, aproximando-se dos mecanismos observados no TEA em humanos (Nicolini; Fahnestock, 2018). Contudo, tais modelos não conseguem refletir completamente a complexidade do quadro clínico e fisiopatológico do TEA, o que evidencia a necessidade de abordagens complementares para o estudo dessa condição (Deckmann *et al.*, 2018).

Atualmente, não há cura para o TEA, e as intervenções disponíveis são predominantemente paliativas, focando na redução de comorbidades e maximização da independência funcional por meio de equipes inter e multidisciplinares (Lord *et al.*, 2018). Nesse cenário, há uma carência de estratégias terapêuticas que possam atuar diretamente nos mecanismos fisiopatológicos do TEA. Uma dessas estratégias emergentes é o uso de nanopartículas, que se destacam por suas propriedades físico-químicas únicas, como tamanho reduzido, alta área superficial específica e capacidade de modificação para funções específicas, proporcionando a entrega dirigida e controlada de fármacos, o que pode aumentar significativamente a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos colaterais (Anselmo; Mitragotri, 2016; Patra *et al.*, 2018; Peer *et al.*, 2007).

Um dos maiores desafios no tratamento de transtornos neurológicos, como o TEA, é a entrega de compostos terapêuticos diretamente ao SNC devido à barreira hematoencefálica. As nanopartículas têm demonstrado capacidade de atravessar essa barreira, permitindo a entrega precisa de medicamentos ao cérebro e promovendo uma liberação controlada, o que pode aumentar a eficácia terapêutica (Chaturvedi *et al.*, 2024; Singh, 2020).

O RSV, um polifenol presente em diversas plantas, especialmente nas uvas, possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetoras e cardioprotetoras, sendo um composto de grande interesse terapêutico (Kaur *et al.*, 2022). Estudos pré-clínicos indicam que o RSV pode modular positivamente processos envolvidos na fisiopatologia do TEA, como a neuroplasticidade, o estresse

oxidativo e a inflamação, o que sugere seu potencial terapêutico (Schwingel *et al.*, 2023). No entanto, sua baixa biodisponibilidade limita consideravelmente seu uso clínico, o que destaca a necessidade de tecnologias que melhorem suas propriedades farmacológicas.

O acoplamento do RSV a nanopartículas tem sido proposto como uma solução promissora para superar essas limitações. Essa estratégia aumenta sua estabilidade, melhora sua biodisponibilidade e permite uma entrega mais direcionada, potencializando seus efeitos terapêuticos (Bhatt *et al.*, 2018; Ge *et al.*, 2019). Além disso, estudos preliminares mostram que a combinação de RSV e nanopartículas pode modular marcadores de inflamação e estresse oxidativo no cérebro, resultando em melhorias comportamentais significativas em modelos animais de TEA (Ahmad *et al.*, 2018; Bhandari; Kuhad, 2017).

A relevância deste estudo está no fato de que ele explora uma abordagem inovadora que combina as propriedades benéficas do RSV com a tecnologia de nanopartículas, o que pode abrir novas possibilidades para o tratamento do TEA. Superar as limitações das terapias atuais e oferecer uma estratégia terapêutica mais eficaz é um avanço crucial. Investir em pesquisas que exploram essas fronteiras tecnológicas é fundamental para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais eficazes e para a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos com TEA.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia terapêutica do resveratrol acoplado a lipossomas na reversão dos sintomas de um modelo animal do Transtorno do Espectro Autista.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o peso do perfil nos dias 9, 17 e 25 pós-natal, monitorar a abertura dos olhos entre os dias 12 e 16 pós-natal, realizar o teste de busca pelo ninho no 10º dia e o teste de geotaxia negativa no 15º dia pós-natal, como indicadores de desenvolvimento e crescimento em um modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA e tratado com lipossomas carregados com RSV no período pós-natal;
- Avaliar o comportamento do tipo autista nos dias 27 e 28 pós-natal, utilizando o teste de interação social (teste das 3 câmaras), o teste de comportamentos repetitivos (marble burying), e a análise de atividade exploratória, locomotora e memória (teste de campo aberto – “*open field*”) em um modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA e tratado com lipossomas carregados com RSV no período pós-natal;
- Avaliar os níveis de TNF- $\alpha$  no soro, bem como os níveis de TNF- $\alpha$ , NGF e BDNF no córtex posterior, hipocampo e cerebelo em um modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA e tratado com lipossomas carregados com RSV no período pós-natal.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados de acordo com as recomendações internacionais para o cuidado e o uso de animais de laboratório, além das recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento para cuidados com animais. Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e aprovado sob protocolo número 07/2023 (anexo).

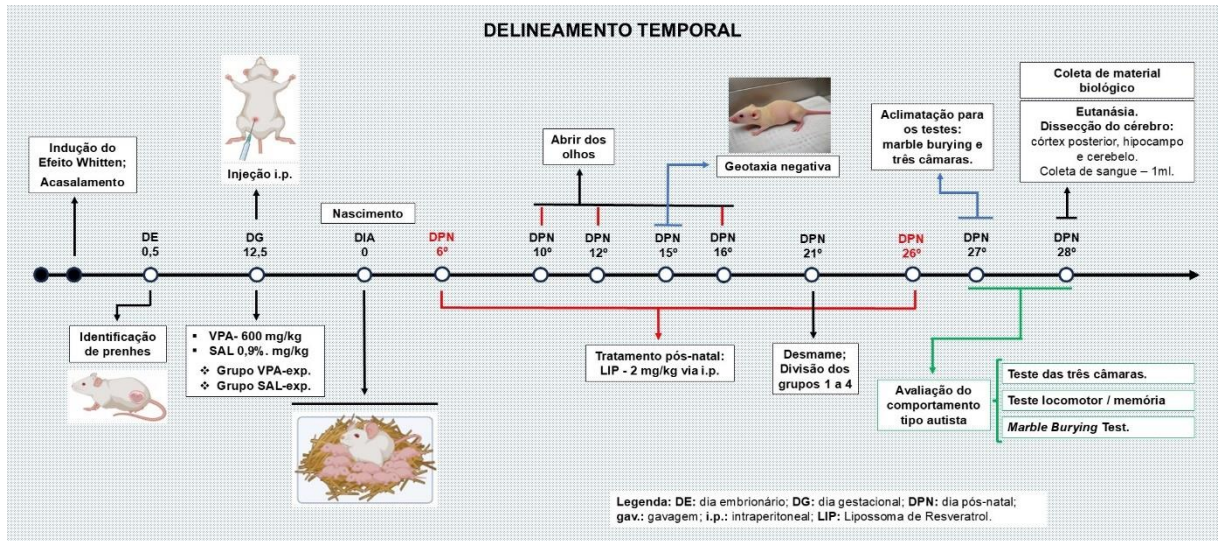
### 3.2 Desenho Experimental

A figura 5 apresenta o delineamento temporal detalhado do estudo experimental, ilustrando as principais etapas desde a indução do efeito *Whitten* até o processo final com a coleta de material biológico. O protocolo experimental inicia com a indução do efeito *Whitten* e acasalamento dos animais. Quando verificado a presença de espermatozoide no esfregaço vaginal (pós-acasalamento), as fêmeas foram consideradas grávidas em fase embrionária (DE 0,5). No dia gestacional 12,5<sup>o</sup>, foi administrada uma injeção intraperitoneal (i.p.) de VPA a 600 mg/kg ou solução salina (SAL) a 0,9%, diferenciando os grupos experimentais (Grupo VPA-exp. e Grupo SAL-exp.).

Após o nascimento (DIA 0), os filhotes foram mantidos com as mães até o desmame. Do 6<sup>o</sup> ao 26<sup>o</sup> dia, foi administrado o tratamento pós-natal com lipossomas de RSV (LIP) a 2 mg/kg (via i.p.). Também no 6<sup>o</sup> dia pós-natal, ocorreu a sexagem e a divisão dos grupos controle e experimental, com e sem tratamento. Os filhotes foram avaliados pelo teste de discriminação olfatória no dia 10 pós-natal e geotaxia negativa no dia 15 pós-natal. Avaliou-se também a abertura dos olhos nos dias 10, 12 e 16 pós-natal. No DPN 21, ocorreu o desmame.

Entre o 27<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia pós-natal, foram realizados testes comportamentais, incluindo o teste das três câmaras, teste locomotor/memória (*Open Field*) e teste de enterramento de mármore (*Marble Burying Test*). No DPN 28, foi realizada a coleta de material biológico para análise, incluindo dissecação do cérebro (córtex posterior, hipocampo e cerebelo), além da coleta de 1 ml sangue.





**Figura 5: Delineamento temporal do protocolo experimental para avaliação dos efeitos do RSV em modelo animal de Transtorno do Espectro Autista (TEA).** A figura delinea a distribuição dos eventos ao longo de um período específico, distribuídos em dias, com marcações no eixo horizontal para denotar cada intervalo temporal. Cada marcação representa uma variável ou condição experimental em análise. Através da observação e registro minuciosos, é possível analisar a evolução das variáveis em diferentes estágios da pesquisa, permitindo discernir sua dinâmica e correlações ao longo do período investigado. Fonte: figura elaborada pelo autor.

### 3.2.1 Indução do autismo em modelo animal com VPA

Neste estudo, empregamos o modelo animal induzido pelo VPA para investigar os mecanismos subjacentes TEA. Para isso, utilizamos 15 ratas Wistar adultas e 15 ratos Wistar machos, pesando aproximadamente 400g, provenientes do Biotério Central da UNESC.

Para garantir a receptividade sexual adequada e o controle programado dos nascimentos, a sincronização do estro nas ratas Wistar foi realizada por meio do procedimento conhecido como "*Efeito Whitten*". Utilizando a interferência do feromônio masculino, secretado pelas glândulas prepuciais e liberado na urina do macho, as fêmeas foram expostas a uma gaiola contendo cama suja de macho por três dias antes do acasalamento (Whitten, 1958; Wöflf; Zala; Penn, 2023). Este procedimento está em conformidade com a literatura, demonstrando que o estro pode ser induzido ou acelerado após a exposição à urina masculina (Ajayi; Akhigbe, 2020; Bronson; Whitten, 1968; Marchlewska-Koj *et al.*, 2000; Sardjono *et al.*, 2019; Wöflf; Zala; Penn, 2023).

Com o ciclo estral monitorado, as fêmeas foram colocadas para acasalar ao final do período de vigília em caixas contendo machos, sendo dois animais por gaiola (1

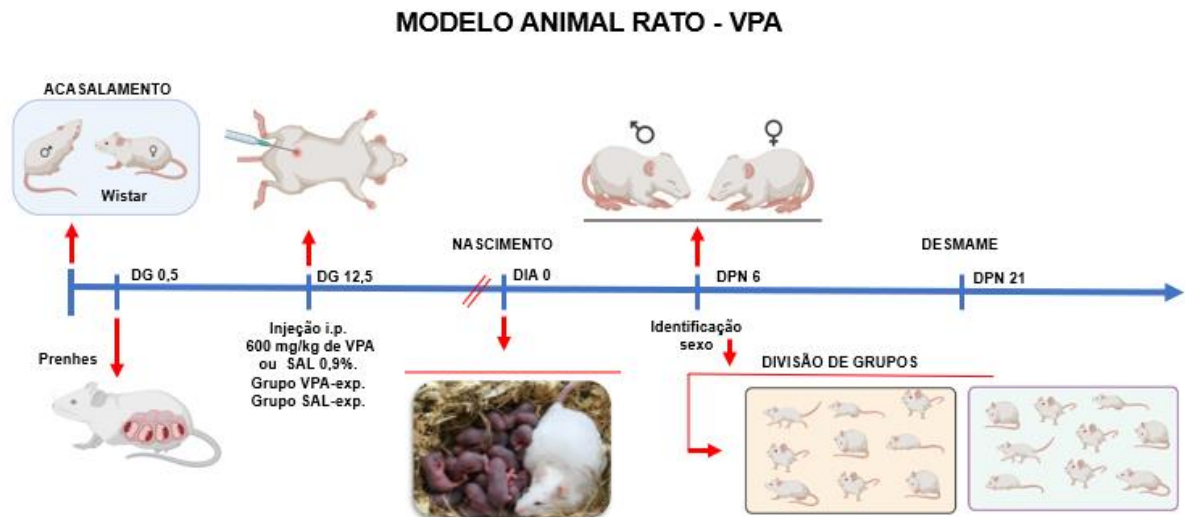
fêmea/1 macho). As condições ambientais foram rigorosamente controladas, com temperatura mantida a  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12 horas (fase clara das 7:00 às 19:00 horas), e livre acesso a água e comida. Este protocolo assegura o controle das variáveis ambientais e o bem-estar dos animais, conforme descrito a seguir:

- I) Inicialmente, parte da maravalha da caixa contendo machos foi adicionada à caixa das fêmeas no fim do ciclo claro, e nos 7 dias seguintes, foi coletado secreção vaginal das ratas para verificar em qual período do ciclo fértil elas se encontravam. A secreção foi coletada com pipeta, por meio de lavado com  $80 \mu\text{L}$  (0,08 ml) de salina (NaCl) a 0,9% no orifício vaginal das ratas e analisado em microscópio (40x) para averiguar o padrão de células encontradas conforme protocolo modificado de McLean e colaboradores (2012); Cora e colaboradores (2015) e Robert e colaboradores (2021).
- II) Quando encontrado o padrão de células correspondentes a fase Estro, a rata foi acasalada com um macho. Na manhã seguinte ao acasalamento, foi realizado outro lavado vaginal com salina para identificar a presença de espermatozoide. Quando encontrado espermatozoides no esfregaço vaginal, a contagem gestacional foi considerada como dia gestacional 0,5 (DG-0,5). A rata foi alocada em caixa durante o restante do período gestacional, e denominada Matriz.

No 12,5<sup>o</sup> dia de gestação, as matrizes foram divididas em dois grupos: um grupo com 10 matrizes e outro grupo com 5 matrizes. Fêmeas (n=10) receberam uma única injeção intraperitoneal de VPA na concentração de 600 mg/kg (grupo VPA-expostos), e as fêmeas controle (n=5), nas mesmas condições de administração, receberam salina (NaCl) a 0,9% (grupo SAL-expostos), e prosseguiram com a gestação.

Após o nascimento, os filhotes permaneceram com as mães. No 21<sup>o</sup> dia pós-natal os animais foram desmamados e divididos em grupos para integrarem os demais protocolos organizados para este estudo.

A figura 5 apresenta graficamente a linha temporal dos eventos discutidos neste tópico.



**Figura 6: Fluxograma - Protocolo de indução do modelo animal VPA de autismo.**

Ratos Wistar fêmeas em período estral ( $n=15$ ) e machos ( $n=15$ ), todos em idade reprodutiva e com peso médio de 400g, foram acasalados na proporção de 2 animais por gaiola (1 fêmeas por macho). A concepção foi caracterizada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, sendo este considerado o dia gestacional 0,5 (DG 0,5). As fêmeas foram então alojadas individualmente. No 12,5º dia de gestação, foi realizada a indução do modelo animal VPA de autismo. Ratas prenhes ( $n=10$ ) receberam uma única injeção intraperitoneal de 600 mg/kg de VPA (VPA-exposto), enquanto ratas prenhes ( $n=5$ ) receberam, nas mesmas condições, uma injeção de solução salina a 0,9% (Sal-exposto). O nascimento, ocorrido entre os dias 21-25, foi contado como dia zero (D 0), iniciando a contagem temporal para a aplicação dos protocolos de teste. No dia pós-natal 6 (DPN 6), foi feita a identificação do sexo dos filhotes e a divisão dos grupos de estudo. No DPN 21 ocorreu o desmame. Apenas machos foram utilizados neste estudo. Fonte: figura elaborada pelo autor.

### 3.2.2 Organização e distribuição dos grupos experimentais

Após a indução do TEA com VPA e a sexagem dos animais, procedemos à alocação dos animais em grupos distintos para diferentes intervenções. A distribuição foi realizada de maneira a assegurar a homogeneidade dos grupos em termos de número de animais e características básicas, como idade e sexo. Este cuidado metodológico é essencial para garantir a validade dos resultados e permitir comparações precisas entre os diferentes grupos experimentais, possibilitando uma avaliação rigorosa dos efeitos das intervenções propostas.

Após a indução do modelo animal VPA de autismo, estima-se que cada matriz do grupo Sal-exposto ( $n=5$  fêmeas) tenham uma prole de 8 animais (4 machos e 4 fêmeas, em média), e as matrizes VPA-exposto ( $n=10$  fêmeas) tenham uma prole de 4 animais (2 machos e 2 fêmeas), em média. Logo, para cada grupo do protocolo de exposição (15 matrizes) a previsão é de 40 nascimentos por grupo, sendo 20 fêmeas e 20 machos, em média, totalizando 80 filhotes.

Aos 6 dias de vida foi realizada a sexagem dos filhotes e alocação em grupos. Este estudo utilizou apenas machos nos experimentos (n=40 filhotes). No DPN 21, as proles das matrizes VPA-expostos (10 matrizes) e SAL-expostos (5 matrizes) foram subdivididos em 2 (dois) subgrupos cada.

A Tabela 2 organiza a distribuição dos filhotes machos em subgrupos experimentais, organizados de acordo com a intervenção recebida (salina ou lipossomas de RSV) e a exposição das matrizes (VPA ou SAL). Cada grupo de matrizes teve um número estimado de nascimentos e um total de filhotes esperados. Os subgrupos foram divididos em ratos tipo autista tratados com salina ou LIP, e ratos padrão tratados com salina ou LIP, totalizando 40 filhotes machos. Esta estrutura permite uma análise detalhada dos efeitos das diferentes intervenções sobre os animais estudados, facilitando a compreensão dos resultados esperados para cada condição experimental.

**Tabela 2: Distribuição de filhotes machos em subgrupos experimentais com diferentes exposições e intervenções pós-natais.**

Grupo de matrizes	Nascimentos estimados	Total estimado de filhotes	Subgrupos intervenção pós-natal	Número de filhotes
<b>VPA-expostos (n= 10)</b>	2 filhotes por matriz	20 filhotes	Ratos tipo autista + Salina	n= 11
			Ratos tipo autista + LIP	n= 10
<b>SAL-expostos (n= 5)</b>	4 filhotes por matriz	20 filhotes	Ratos padrão + Salina	n= 11
			Ratos padrão + LIP	n= 10

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

Considerando a intervenção nos períodos pré e pós-natal, a distribuição dos animais no estudo foi estruturada em 4 grupos experimentais, com 10 filhotes machos em cada grupo, totalizando 40 animais. Cada grupo foi delineado para examinar os efeitos combinados da condição de base (ratos padrão ou tipo-autista), e a intervenção com lipossomas de RSV (LIP). A seguir, detalham-se os grupos experimentais, permitindo uma análise robusta dos efeitos das variáveis a serem estudadas:

A Tabela 3 apresenta a distribuição dos 40 filhotes machos em 4 grupos experimentais, cada um contendo 10 animais. Esses grupos foram delineados para avaliar os efeitos combinados de duas variáveis principais: a condição de base (ratos padrão tratados com solução salina [SAL-i.p.] versus ratos tipo-autista tratados com

VPA [VPA-i.p.] e o tratamento pós-natal (solução salina [SAL-i.p.] versus lipossoma de RSV [LIP-i.p.]). Cada grupo representa uma combinação única dessas variáveis, permitindo uma análise detalhada dos efeitos das diferentes condições experimentais sobre os animais estudados.

**Tabela 3: Distribuição dos filhotes machos em grupos experimentais com diferentes condições de base e tratamentos pós-natal por via intraperitoneal.**

Grupos	Condição de Base	Tratamento LIP 2mg/kg ou Salina	Classificação	Número de animais
<b>Grupo 1</b>	Rato padrão (SAL-i.p.)	(SAL-i.p.)	<b>CT</b>	n= 11
<b>Grupo 2</b>	Rato padrão (SAL-i.p.)	(LIP- i.p.)	<b>CT+LIP</b>	n= 10
<b>Grupo 3</b>	Rato tipo-autista (VPA-i.p.)	(SAL-i.p.)	<b>VPA</b>	n= 11
<b>Grupo 4</b>	Rato tipo-autista (VPA-i.p.)	(LIP-i.p.)	<b>VPA+LIP</b>	n= 10

Fonte: tabela elaborada pelo autor.

O número ( $n$ ) amostral de 10 animais por grupo faz-se necessário devido à alta variabilidade nos dados vindos de testes comportamentais. Este número foi obtido utilizando o cálculo estatístico que considera o grau de confiança e a margem de erro dos testes comportamentais a fim de obter-se um ( $n$ ) amostral estatisticamente relevante. 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).

### 3.3 Constituição do lipossoma de RSV (LIP)

#### 3.3.1 Materiais

A fosfatidilcolina (PC) derivada da lecitina de soja foi fornecida pela Solae do Brasil, S.A. A composição molecular da PC de soja é aproximadamente 75% de diesteáreoil fosfatidilcolina (DSPC, 18:0), 12% de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC, 18:2), 8% de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, 16:0) e 5% de lisofosfatidilcolina e ácido fosfático (Cardoso dos Santos *et al.*, 2021; Dos Santos *et al.*, 2018; Micheletto *et al.*, 2015). Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), solução tampão fosfato (PBS) e RSV foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA).

### 3.3.2 Síntese

Na síntese dos lipossomas utilizou a “click chemistry”, uma abordagem para reações químicas desenvolvida para ser rápida, eficiente e altamente seletiva, definida por reações que têm altos rendimentos e geram poucos subprodutos indesejáveis, sendo altamente confiáveis e ocorrendo geralmente sob condições brandas, como em presença de água ou solventes benignos, além de ser modular, permitindo a construção de estruturas moleculares complexas a partir de blocos menores, com a cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (CuAAC) sendo um exemplo amplamente utilizado, facilitando a ligação de duas moléculas por meio de uma reação seletiva e controlada (Kolb; Finn; Sharpless, 2001; Spanedda *et al.*, 2023).

Assim, o anfifílico polimérico glicosilado N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil-PEG<sub>900</sub>-docosanato foi sintetizado conforme procedimento previamente relatado (Dos Santos *et al.*, 2018; Micheletto *et al.*, 2015). A funcionalização do carboidrato no anfifílico pode ser obtida usando reações de acoplamento “click chemistry”. Os anfifílicos foram preparados por esterificação de N<sub>3</sub>-PEG<sub>900</sub>-OH com ácido graxo (ácido docosanóico) com subsequente reação de “click chemistry” de cicloadição de azida-alcino catalisada por cobre entre o carboidrato propargil-2-acetamido-2-desoxi- $\beta$ -D-glucopiranosídeo e grupamento azida N<sub>3</sub>-PEG<sub>900</sub>C-C<sub>22</sub>. A reação foi realizada a 40°C com o sistema catalítico cobre/ascorbato em água/THF mistura para garantir uma boa solubilidade do anfifílico (De Castro *et al.*, 2019; Micheletto *et al.*, 2015).

### 3.3.3 Preparação dos lipossomas

O encapsulamento de RSV em lipossomas de (PC) foram preparados usando a evaporação de fase reversa método (Feuser *et al.*, 2021; Kroetz *et al.*, 2019). O RSV foi encapsulado na fase hidrofóbica da preparação dos lipossomas utilizando clorofórmio. As amostras de lipossomas, compreendendo estruturas automontadas de PC ou da mistura de PC e C22PEG900GlcNAc (PEG) na presença de 0,6 mg/mL de RSV, foram preparadas na proporção de 70:30 (p/p) para PC/PEG e solubilizadas em 10 mL de clorofórmio, seguido pela adição de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 10 mM) (200  $\mu$ L). A mistura foi então sonicada por 4 minutos a 25 °C em um sonicador com aquecimento (modelo LGI-LUC, São Paulo, Brasil), com potência máxima de 180 W, produzindo uma dispersão homogênea e opalescente de micelas

reversas. O clorofórmio foi evaporado sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo IKA® RV 10 (modelo IKA®, Staufen, Alemanha) a 30 °C, com rotação de 180 rpm e pressão de 380 bar, resultando em um organogel viscoso. Esse procedimento foi utilizado para produzir lipossomas de PC e lipossomas mistos (PC + C22PEG900GlcNAc) contendo RSV (6 mg/mL de PC e/ou 6 mg/mL de PC + PEG contendo 0,6 mg/mL de RSV). A solução foi filtrada (filtros de membrana de nylon Whatman®, poros de 0,45 µm) para remover possíveis agregados maiores. Os lipossomas foram mantidos à temperatura ambiente (20-25 °C). Desse modo, as propriedades físico-químicas dos lipossomas contendo RSV foram avaliadas.

### 3.3.4 Caracterização dos lipossomas

A distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) dos lipossomas foram determinados por análise dinâmica de dispersão de luz (DLS) usando um NanoBrook Omnia analisador de tamanho de partícula (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, EUA). Todas as medições foram realizadas em triplicata (n = 3) para obter a média e o desvio padrão (DP). Este protocolo está de acordo com a literatura conforme revisado anteriormente (Dal Bó *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2018; Micheletto *et al.*, 2015).

### 3.3.5 Análise dinâmica de dispersão de luz (DLS)

Conforme revisado por Dos Santos *et al.* (2018) Micheletto *et al.* (2015), os diâmetros médios das nanopartículas foram determinados utilizando uma técnica de análise de espalhamento dinâmico de luz em (inglês DLS, *Dynamic Light Scattering*), empregando um analisador de tamanho de partícula modelo NanoBrook Omni (Brookhaven Instruments Corp., EUA). A análise foi realizada utilizando um feixe de laser He-Ne monocromático coerente com um comprimento de onda fixo de 640 nm, fornecendo uma potência de saída de 40 mW. Os experimentos de DLS foram conduzidos em água Milli-Q e as medições foram realizadas em triplicata a  $25 \pm 1$  °C em um ângulo de 90°, abrangendo uma ampla faixa de diâmetros, variando de 1 nm a 6 µm. Com base nas medições obtidas, a equação de Stokes-Einstein foi aplicada para calcular o raio hidrodinâmico das partículas. Essa equação estabelece uma relação fundamental entre a difusão de partículas em um meio líquido e suas

propriedades físicas, permitindo assim a determinação precisa do tamanho das nanopartículas.

### 3.3.5.1 Determinação de distribuição de tamanho por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) é também designado na literatura com o nome de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento de luz quase elástico (QELS) é uma técnica capaz de mensurar as flutuações na intensidade de luz espalhada, as quais se originam de modificações locais do índice de refração da solução, como um resultado da difusão rotacional, difusão translacional e/ou relaxações internas das cadeias poliméricas (Micheletto *et al.*, 2015; Stetefeld; McKenna; Patel, 2016).

O tamanho e a polidispersão das nanopartículas foram acessados usando medições DLS conforme revisado anteriormente (Dal Bó *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2018; Micheletto *et al.*, 2015; Stetefeld; McKenna; Patel, 2016). Basicamente, a flutuação medida do sinal da luz espalhada é auto correlacionada no tempo através de uma função de correlação temporal (FCT). A técnica é eficaz para se detectar flutuações temporais na intensidade de luz espalhada devido a flutuações de concentração e, densidade na amostra (causas do movimento Browniano). Desta função, é possível obter a taxa de relaxação ( $\Gamma$ ), a qual pode ser relacionada ao coeficiente de difusão translacional ( $D$ ). O valor de  $\Gamma$  pode ser obtido através da análise de uma função de correlação temporal. O coeficiente de difusão  $D$  é o coeficiente angular de um gráfico da frequência de relaxação  $\Gamma$  ( $\Gamma = \tau^{-1}$ ) em função de  $q^2$ , obtido pela equação 1:

$$\frac{\Gamma}{q^2} |_{q \rightarrow 0} = D_{\text{app}} \quad (1)$$

onde  $q$  é o vetor de onda definido como

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2)$$



A extrapolação dos valores de  $D$  obtidos para diferentes concentrações, quando a concentração tende a zero, fornece o coeficiente de difusão à diluição infinita,  $D_0$ . Um importante parâmetro que pode ser acessado por intermédio de  $D_0$  é o raio hidrodinâmico,  $R_H$ , da macromolécula em solução, aplicando-se a relação de Stokes-Einstein e desde que se conheça a viscosidade do solvente,  $\eta_0$ , e a temperatura  $T$  na qual é realizada a medida. Assim,  $D_0$  pode ser obtido através da equação (3):

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta\Gamma} q^2 = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_{app}} \quad (3)$$

Na equação (3),  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$ ).

### 3.3.6 Potencial Zeta (ZP)

Conforme revisado por Dos Santos *et al* (2018) Micheletto *et al.* (2015), as medições do potencial zeta (ZP) foram realizadas utilizando um analisador NanoBrook Omni ZP (Brookhaven Instruments Corp., EUA) equipado com um laser vermelho de diodo padrão de 40 mW, utilizando a técnica de espalhamento de luz com análise de fase (PALS). A faixa de mobilidade foi de  $10^{11}$  a  $10^7 \text{ m}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ , a faixa ZP de trabalho varia de -500 a 500 mV, e o ângulo de espalhamento usado foi de  $15^\circ$ . As amostras foram medidas em água Milli-Q, e as medições foram realizadas em triplicata a  $25 \pm 1$  °C. Optou-se medir a mobilidade eletroforética ( $UE$ ) e converter o valor em potencial miliVolts (mV) através da equação de Henry:

$$U_E = \frac{2 \varepsilon \zeta f(ka)}{3 \eta}$$

onde  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do meio e  $\eta$  é a viscosidade. Além disso,  $f(ka)$  é a função de Henry, que foi calculada através da aproximação de Smoluchowski  $f(ka) = 1,5$ .

### **3.4 Avaliação do crescimento e desenvolvimento pós-natal do modelo animal**

Do 6<sup>o</sup> aos 26<sup>o</sup> dias pós-natal, cada filhote foi pesado individualmente utilizando uma balança de precisão. Serão registrados o peso de cada filhote para análise posterior. A avaliação do peso é uma medida importante do desenvolvimento físico e pode indicar a saúde geral da prole, bem como os efeitos de diferentes tratamentos ou manipulações experimentais (Hill; Lim; Stone, 2008; Schneider; Przewłocki, 2005).

### **3.5 Avaliação comportamental em modelos animais de TEA**

A avaliação comportamental em modelos animais de TEA é fundamental para entender as manifestações clínicas da condição e os efeitos de intervenções terapêuticas. Modelos animais, especialmente roedores, são amplamente utilizados para investigar os aspectos comportamentais do TEA devido à sua capacidade de replicar características essenciais do transtorno, como déficits de interação social, comportamentos repetitivos e anomalias na comunicação. Os testes comportamentais fornecem uma maneira robusta de quantificar e analisar esses comportamentos, permitindo a identificação de mudanças induzidas por fatores genéticos, ambientais ou farmacológicos. Entre os testes utilizados estão o teste das três câmaras, que avalia a interação social, e o teste de enterramento de mármore, que mede comportamentos obsessivo-compulsivos e movimentos repetitivos. A análise desses comportamentos é crucial para validar a eficácia dos modelos animais, entender os mecanismos subjacentes ao TEA e explorar potenciais terapias que possam melhorar a qualidade de vida dos indivíduos afetados pelo transtorno.

#### **3.5.1 Discriminação olfativa: Teste da busca pelo ninho**

No 10<sup>o</sup> dia pós-natal todos os animais foram avaliados (n=10 por grupo). O aparelho consistia em um recipiente plástico de (30 × 20 × 13 cm) dividido em três partes (duas laterais e uma central). As partes laterais foram cobertas com maravalha e foi deixado um centro claro descoberto sem maravalha. Um lado foi preenchido com a cama da gaiola (aparas do ninho familiar) e o outro lado com aparas esterilizadas. Os filhotes (individualmente) foram colocados 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 se limitou a 60 segundos. Para manter o cheiro da ninhada/mãe, não foi trocada a maravalha da gaiola-casa nos 2 dias anteriores ao teste (Gregory; Pfaff, 1971; Schneider; Przewłocki, 2005). Após o teste comportamental, o aparato deve ser limpo com álcool 70% seguindo de álcool 10%, e o animal deve voltar para sua caixa de origem e devolvido ao biotério.

### 3.5.2 Teste de geotaxia negativa

A geotaxia negativa é uma mudança automática e vinculada a estímulos na orientação, considerada diagnóstica da função vestibular e/ou proprioceptiva, e de forma progressiva pode ser examinada por este teste. No 15º dia pós-natal os animais (individualmente) foram colocados em uma rampa com 45 graus de inclinação, com a cabeça direcionada para baixo (n=10 por grupo). Foi registrado o tempo que cada animal levou 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 tentativas foram registrados (Horiquni Barbosa *et al.*, 2016; Ruhela *et al.*, 2019).

### 3.5.3 Teste de campo aberto (*Open-Field*)

No 27º e 28º dias pós-natal, os ratos (n=10 por grupo), foram submetidos à avaliação do comportamento da atividade exploratória, locomotora e memória de habituação, realizados por meio do 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 a 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 o número de vezes que ele se levantou sobre as patas traseiras (indicador de atividade exploratória) (Schneider; Przewłocki, 2005; Wultz *et al.*, 1990). Após o teste comportamental, o aparato foi limpo com álcool 70% seguido de álcool 10%, o animal devolvido para sua caixa de origem e devolvido ao biotério.

#### 3.5.4 Avaliação da interação social: teste das três câmaras

No 28º dia pós-natal, os ratos foram submetidos ao teste de interação social (n=10 por grupo). O teste, conforme Crawley (2004), e adaptado de Kaidanovich-Beilin *et al.* (2011), se 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 (fase 1). Após a habituação, um rato desconhecido pelo rato teste (rato 1) foi colocado em uma gaiola pequena na câmara esquerda, enquanto a câmara direita permaneceu apenas com a gaiola vazia. Seguidamente, as divisórias foram removidas e o rato teste pôde explorar livremente as três câmaras por 10 minutos (fase 2). Passados este tempo, o rato teste foi colocado na câmara central e fechadas as divisórias. Um segundo rato desconhecido (rato 2) foi inserido na câmara direita. Imediatamente as divisórias foram removidas e o animal teste explorou o aparato por mais 10 minutos (fase 3). Foram registrados os seguintes parâmetros: latência para o primeiro encontro com os ratos (1 e 2); o número de encontro com os ratos (1 e 2) nas fases 2 e 3; o tempo de interação com os ratos (1 e 2), e o tempo gasto em cada câmara (central, direita e esquerda). Ao fim do teste, o aparato foi limpo com álcool 70% seguido de álcool 10%, o animal devolvido para sua caixa de origem e ao biotério.

#### 3.5.5 Avaliação de comportamentos obsessivo-compulsivos e movimentos repetitivos: teste de enterramento de mármore (*Marble Burying Test*)

No 28º dia pós-natal, os ratos (n=10 por grupo), foram submetidos ao teste para avaliação do comportamento obsessivo-compulsivo e movimentos repetitivos por meio do teste do “*marble burying*” conforme revisado anteriormente (Angoa-Pérez *et al.*, 2013; Archer *et al.*, 1987). Utilizando as caixas/gaiolas, preenchidas com maravalha limpa e inodora (5 cm de altura, superfície nivelada) foram colocadas bolinhas de gudes (lavadas e higienizadas previamente) alinhadas em 5 filas de 4 bolinhas (20 bolinhas por caixa). O rato foi colocado no canto da caixa, sem ser perturbado por 30 min. Ao fim dos 30 min, foram contadas a quantidade de bolinhas que foram enterradas. Contabilizou-se como enterrada, se dois terços da bolinha,

estivesse recoberta pela maravalha. Animais com comportamento obsessivo compulsivo e repetitivo tendem a enterrar mais bolinhas de gude na maravalha.

### **3.6 Análises Bioquímicas**

Após a conclusão dos testes comportamentais, no 28<sup>o</sup> dia pós-natal, os ratos foram eutanasiados por decapitação; o cérebro removido e dissecado em: córtex posterior (CP), hipocampo (HPC) e cerebelo (CRB), de acordo com o método descrito por Glowinski et al. (1966).

### **3.7 Análise por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

As amostras cerebrais das regiões do córtex posterior (CP), hipocampo (HPC) e cerebelo (CRB) foram processadas e homogeneizadas. Em seguida, as placas de ELISA foram sensibilizadas para a subsequente incubação com os anticorpos específicos. A dosagem de citocinas, incluindo TNF- $\alpha$ , e neurotrofinas, como BDNF e NGF, foi realizada utilizando o método de captura enzyme-linked immunosorbent assay (Duoset ELISA) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, EUA), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante.

### **3.8 Análise Estatística**

Os dados obtidos nos diferentes testes comportamentais e bioquímicos foram analisados utilizando procedimentos estatísticos apropriados, assegurando rigor metodológico e precisão nas inferências. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 9.0). A verificação da normalidade dos dados foi conduzida através do teste de Shapiro-Wilk, sendo este critério determinante para a escolha dos testes subsequentes. Para dados que apresentaram distribuição normal, foi aplicada a ANOVA unidirecional, seguida do teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos. No caso de dados que não seguiram uma distribuição normal, optou-se pelo teste de Kruskal-Wallis, que é uma alternativa não paramétrica à ANOVA.

No experimento Open Field, para avaliar a habituação de memória, os dados foram analisados por meio de ANOVA de medidas repetidas para avaliar a evolução

temporal considerando as mesmas amostras em diferentes condições. A esfericidade foi verificada, e, quando violada, utilizou-se a correção de Greenhouse-Geisser para ajustar os graus de liberdade da análise.

Para comparações entre dois grupos de dados pareados, aplicou-se o teste t de Student pareado. Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DPM), e o nível de significância adotado foi de  $*p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

Neste estudo, foram investigados aspectos comportamentais e bioquímicos do TEA para compreender seus mecanismos subjacentes e avaliar a eficácia terapêutica do lipossoma com RSV em diferentes grupos experimentais: tratados com salina - controle (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e lipossomas contendo RSV (CT+LIP) e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas + RSV (VPA+LIP). O modelo animal de TEA foi validado focando em déficits de interação social e comportamentos obsessivo-compulsivos. Em seguida, foram avaliados os perfis de citocinas inflamatórias e neurotrofinas (TNF- $\alpha$ , BDNF, NGF) por ensaios imunoenzimáticos, oferecendo uma visão das alterações imunológicas associadas ao TEA.

### 4.1 Características físico-química dos lipossomas contendo RSV

A tabela 4 apresenta a caracterização físico-química dos lipossomas contendo RSV. Os parâmetros analisados incluem o raio hidrodinâmico (2RH), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (ZP), que são fundamentais para avaliar a estabilidade, uniformidade e eficiência dos lipossomas como sistemas de liberação.

A análise dos dados revela mudanças significativas nas propriedades dos lipossomas após a incorporação do RSV. O aumento do raio hidrodinâmico (2RH) em todas as amostras com a adição de RSV indica que o composto bioativo foi eficientemente incorporado às membranas dos lipossomas, resultando em um aumento no volume das partículas.

O índice de polidispersão (PDI) apresentou variação relativamente pequena entre as amostras, sugerindo uma distribuição de tamanho razoavelmente uniforme. No entanto, uma exceção foi observada nos lipossomas fosfatidilcolina + PEG + RSV, com um PDI mais elevado (0.255), indicando uma maior heterogeneidade no tamanho das partículas, possivelmente devido à interação entre o RSV e a fosfatidilcolina na composição dos lipossomas.

No que diz respeito à estabilidade coloidal, avaliada pelo potencial zeta (ZP), todas as amostras apresentaram valores negativos significativos, o que sugere uma boa estabilidade. Contudo, houve uma leve redução do ZP após 30 dias de armazenamento, especialmente nas amostras contendo RSV, o que pode indicar uma

pequena perda de estabilidade ao longo do tempo. O potencial zeta mais negativo nas amostras iniciais (-55.4 mV a -56.0 mV) reforça a boa estabilidade inicial, um fator crucial para garantir a dispersão e evitar a agregação das partículas de lipossomas.

**Tabela 4: Caracterização físico-química de lipossomas contendo RSV: Raio Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta**

Amostras	2R <sub>H</sub> (nm)	PDI	ZP (mV)	ZP (mV) <sup>b</sup>
Lipossoma PEG	294.1	0.207	-55.4± 0.8	-53,2± 0.5
Lipossoma PEG + Resveratrol	319.5	0.190	-54.7± 0.2	-48.5± 0.4
Lipossoma fosfatidilcolina + PEG	321.3	0.177	-56.0± 0.9	-52.6± 0.5
Lipossoma fosfatidilcolina + PEG + Resveratrol	343.0	0.255	-51.3± 0.5	-47.4± 0.2

(R<sub>H</sub>): Raio Hidrodinâmico; (PDI): Índice de Polidispersão; (ZP): Potencial Zeta.

<sup>b</sup> Análises de potencial zeta após 30 dias

## 4.2 Análise do crescimento e desenvolvimento pós-natal do modelo animal VPA

Do 6<sup>o</sup> ao 26<sup>o</sup> dia pós-natal, todos os animais (n=10 animais/grupo) foram pesados individualmente e os dados registrados. Os resultados estão apresentados na figura 7. No gráfico (A) estão registrados a média dos dados coletados nos dias pós-natal 6 ao 26. Os dados obtidos dos gráficos B, C e D, que representam os pesos dos filhotes nos dias pós-natais 6, 16 e 26 e revelam o impacto do VPA no desenvolvimento físico e o efeito do tratamento com RSV encapsulado em lipossomas.

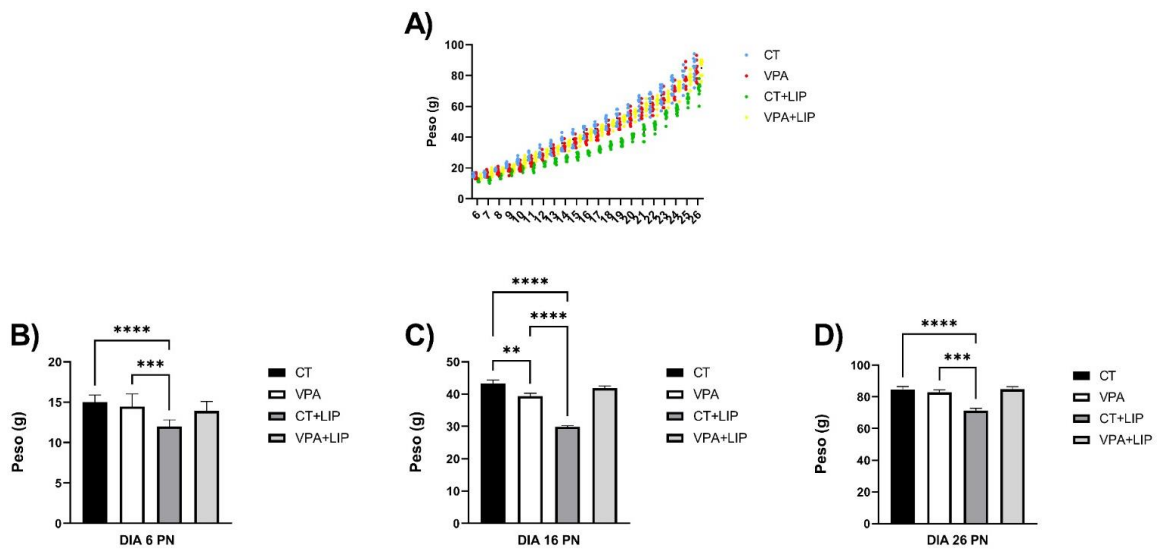
O gráfico (B), apresenta a média do peso no dia 6. O grupo controle VPA apresenta um peso menor do que o grupo CT, mas sem diferença estatística. Isso indica que, já no início do desenvolvimento, o VPA causa uma redução significativa no ganho de peso. O grupo CT+LIP apresenta um peso significativamente menor do que o grupo CT (\*\*\*\*p < 0,0001). Isso indica que, no início do desenvolvimento, o LIP pode causa uma redução significativa no ganho de peso. O grupo CT+LIP apresenta um peso significativamente menor em comparação ao grupo VPA (\*\*p < 0,001), isso mostra que os lipossomas, neste estágio inicial, não revertem os efeitos do VPA. O



grupo VPA+LIP também tem peso menor em comparação com o grupo CT, porém sem diferença estatística, sugerindo que, neste estágio inicial, o RSV ainda não foi capaz de mitigar os efeitos negativos do VPA.

O gráfico (C) apresenta a média do peso. No dia 16, não há diferença estatisticamente significativa entre o grupo CT e o grupo VPA, sugerindo que, nesse ponto específico do desenvolvimento, o VPA não causou uma alteração significativa no peso em comparação ao grupo CT. Já o grupo CT+LIP apresenta um peso significativamente menor em comparação ao grupo CT, com ( $****p < 0,0001$ ). Este resultado é inesperado, já que se poderia esperar que os lipossomas, por si só, não tivessem um impacto negativo no peso. Esse dado pode indicar uma possível interferência dos lipossomas no desenvolvimento, que merece uma investigação mais aprofundada. Curiosamente também, não há diferença estatisticamente significativa entre o grupo CT e o grupo VPA+LIP, porém sugere-se que o tratamento com RSV encapsulado em lipossomas pode ter mitigado os efeitos negativos do VPA, aproximando o peso dos filhotes ao nível do grupo controle. Surpreendentemente, o gráfico indica uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo VPA e o grupo CT+LIP, com o grupo CT+LIP apresentando um peso significativamente menor do que o grupo VPA ( $****p < 0,0001$ ). Isso sugere que, o tratamento com lipossomas sozinho pode ter impactado negativamente o ganho de peso em relação ao VPA.

O gráfico (D) Média do peso no dia 26. Neste período, os dados mostram que não há diferença estatisticamente significativa entre o grupo CT e o grupo VPA. Isso sugere que, até o 26º dia pós-natal, o VPA não resultou em uma diferença estatisticamente significativa no ganho de peso em comparação ao grupo controle. O grupo CT+LIP ainda apresenta um peso significativamente menor em comparação ao grupo CT ( $****p < 0,0001$ ). Isso indica que os lipossomas, novamente, parecem ter um efeito negativo no ganho de peso dos filhotes, semelhante ao que foi observado nos dias 6 e 16 pós-natal. Também não há diferença estatisticamente significativa entre o grupo CT e o grupo tratado com VPA+LIP, sugerindo que o tratamento com RSV encapsulado em lipossomas não foi capaz de neutralizar o efeito negativo do VPA ao ponto de equilibrar o peso dos filhotes com o do grupo CT. Continuadamente, o grupo CT+LIP, tratado apenas com lipossomas, mostra um peso significativamente menor em comparação ao grupo VPA ( $***p < 0,001$ ), conforme também visto nos dias 6 e 16. Isso reforça a ideia de que os lipossomas, por alguma razão, têm um impacto adverso no ganho de peso, mais pronunciado do que o efeito do próprio VPA.



### 4.3 Avaliação de comportamentos semelhantes ao autismo em modelo animal

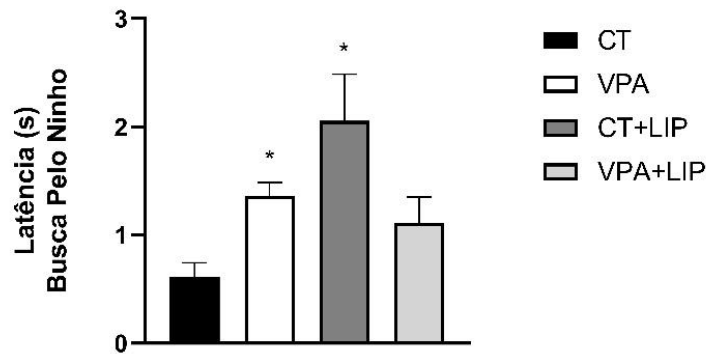
#### VPA

##### 4.3.1 Discriminação olfativa: Teste da busca pelo ninho

No 10º dia pós-natal todos os animais passaram pelo teste discriminação olfativa (n=10 animais/grupo). A capacidade de discriminação olfatória é um aspecto crucial da percepção sensorial em muitos animais, incluindo roedores. Essa habilidade permite a identificação de alimentos, parceiros sexuais, predadores e territórios, desempenhando um papel essencial na sobrevivência e na interação social (Brennan & Kendrick, 2006). O principal parâmetro medido é a latência, que se refere ao tempo que o animal leva para iniciar e completar determinada ação durante o teste. Os resultados são apresentados na figura 8. A significância estatística é dada por valores \* $P < 0,05$ .

A latência na busca pelo ninho foi significativamente maior nos grupos VPA e CT+LIP (\* $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo CT. Esses resultados sugerem que tanto a exposição ao VPA quanto o tratamento com lipossoma + RSV no grupo controle

influenciaram negativamente o comportamento de busca. No entanto, o grupo VPA+LIP, tratado com lipossoma + RSV após a exposição ao VPA, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo CT ( $p > 0,05$ ), indicando que o lipossoma+RSV pode ter atenuado os efeitos prejudiciais do VPA trazendo a latência de volta a um nível mais próximo do controle, embora sem atingir significância estatística.

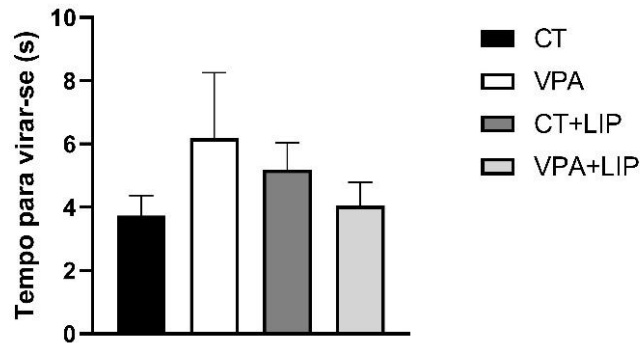


**Figura 8: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e tratamento pós-natal com lipossoma de RSV na latência de busca pelo ninho.** A latência foi medida em segundos (s). Os grupos experimentais incluíram: animais tratados com salina (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e lipossomas contendo RSV (CT+LIP) e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV (VPA+LIP). Os animais foram testados individualmente e a latência para encontrar o ninho foi registrada. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* de Tukey, considerando significância estatística com (\* $P < 0,05$ ). (n=10 animais/grupo).

#### 4.3.2 Teste de geotaxia negativa

A geotaxia negativa é usada para avaliar a função vestibular e/ou proprioceptiva, bem como a coordenação em animais. Os filhotes foram colocados em uma prancha inclinada a 45 graus, com as cabeças voltadas para baixo. A aquisição completa do reflexo é considerada quando os animais conseguem girar 180 graus ao redor de seus eixos transversais, virar a cabeça para cima e mover-se prancha acima (Motz; Alberts, 2005). No 15º dia pós-natal os animais (individualmente) foram avaliados (n=10 por grupo). Foram registrados os tempos que cada animal levou para se virar para a posição oposta, ou seja, com a cabeça voltada para cima. Os animais que falharam na primeira tentativa, foram testados mais duas vezes. A ocorrência de reflexo na primeira, segunda ou terceira tentativa foram registrados. Os resultados são apresentados na figura 9. A significância estatística é dada por valores \* $P < 0,05$ .

A figura 9 apresenta os tempos médios necessários para que os animais se virem, com base nos diferentes grupos experimentais. Observa-se que não há diferença estatística entre os grupos avaliados.



**Figura 9: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e tratamento pós-natal com lipossoma de RSV no tempo para virar-se (geotaxia negativa).** O tempo foi medido em segundos (s). animais tratados com salina (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e lipossomas contendo RSV (CT+LIP) e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV (VPA+LIP). Os animais foram testados individualmente e o tempo para virar-se foi registrado. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância ANOVA de uma via, seguida do teste de *post hoc* de Tukey. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $P > 0,05$ ). (n=10 animais/grupo).

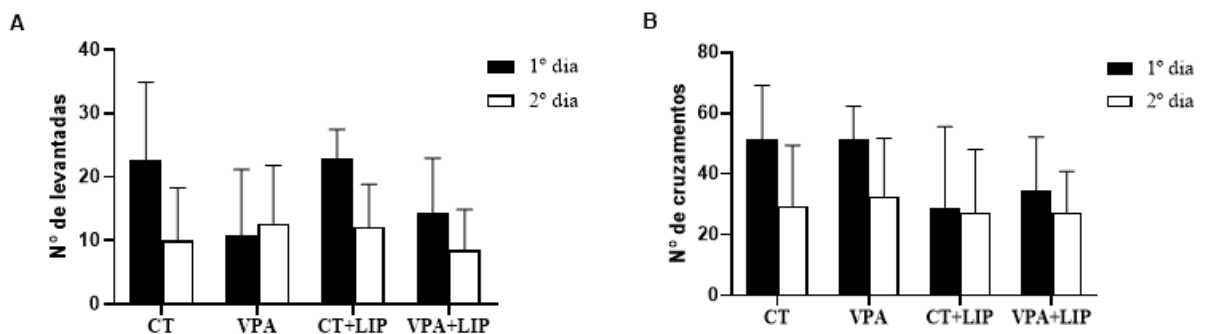
#### 4.3.3 Análise da atividade locomotora e memória de habituação (*Open-Field*)

O teste de campo aberto é uma metodologia amplamente utilizada em pesquisas comportamentais para avaliar a atividade locomotora, a exploração e a memória de habituação em modelos animais. Durante o teste, os animais são colocados em um espaço aberto, e seus movimentos e comportamentos são monitorados, incluindo o número de cruzamentos entre quadrantes, o tempo gasto nas áreas centrais versus periféricas e a frequência de levantadas. No 27<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias pós-natal, ratos (n=10 por grupo) foram submetidos ao teste para avaliação da atividade exploratória, locomotora e memória de habituação. Os resultados estão apresentados na figura 10. As barras pareadas correspondem aos dados computados nos respectivos dias. A análise estatística foi conduzida utilizando ANOVA de duas vias, com os fatores "grupo" e "dia" para avaliar os efeitos principais e a interação entre eles. A significância estatística foi determinada por  $*p < 0,05$ .

No número de levantadas (figura 10-A), observou-se redução geral no comportamento exploratório vertical do primeiro para o segundo dia nos grupos CT; CT+LIP e VPA+LIP, sugerindo um processo de habituação ao ambiente. Entretanto,

no grupo VPA, foi observado um leve aumento de levantadas no segundo dia. Porém, a ANOVA revelou que não houve um efeito principal significativo do fator "grupo", nem uma interação significativa entre os fatores "grupo" e "dia". Isso indica que, embora tenha havido variações entre os dias, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no comportamento de levantadas.

De forma semelhante, o número de cruzamentos (figura 10-B) também apresentou diminuição entre os dois dias, evidenciando o processo de habituação. No entanto, a ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos, nem uma interação significativa entre os fatores "grupo" e "dia". Esses resultados sugerem que o tratamento com lipossomas contendo RSV não foi suficiente para alterar significativamente o comportamento de cruzamentos nos grupos experimentais. Apesar da ausência de significância estatística, a tendência de diminuição dos cruzamentos entre o primeiro e o segundo dia segue o padrão esperado de habituação, corroborando a noção de que os animais, de maneira geral, apresentam uma redução na atividade exploratória conforme se familiarizam com o ambiente.



**Figura 10: Efeitos do tratamento com lipossomas contendo RSV nos parâmetros comportamentais dos grupos experimentais no teste de campo aberto.** Os gráficos apresentam (A) número de levantadas e (B) número de cruzamentos registrados durante o experimento animais tratados com salina (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e lipossomas contendo RSV (CT+LIP) e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV (VPA+LIP). Os animais foram testados individualmente, e os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As barras pretas representam os dados do 1º dia (27º DPN), enquanto as barras brancas correspondem ao 2º dia de teste (28º DPN). As análises estatísticas foram realizadas utilizando ANOVA de duas vias considerando significância estatística com (\* $P < 0,05$ ). ( $n=10$  animais/grupo).

#### 4.3.4 Análise de interação social: teste das três câmaras

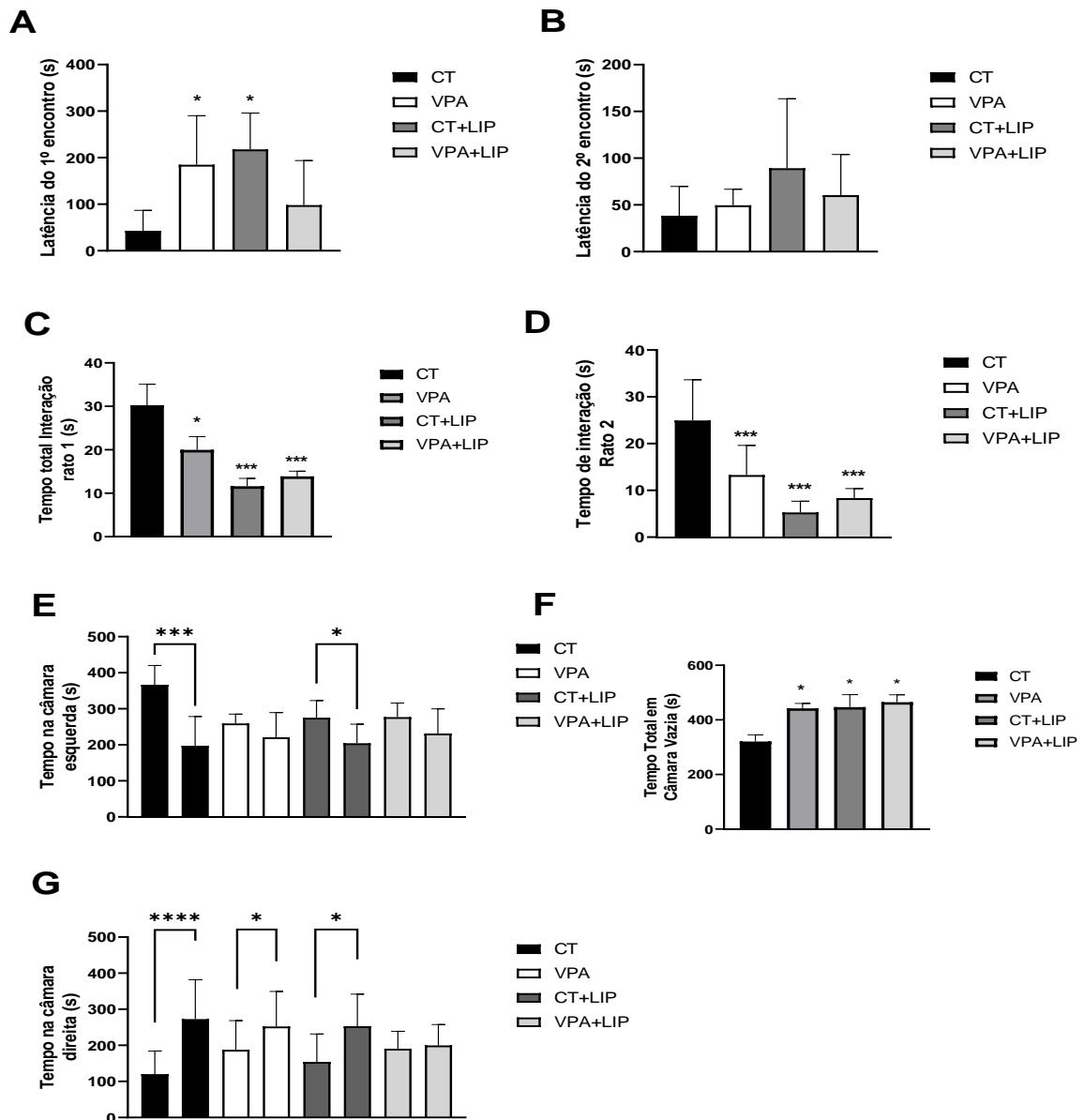
O teste das três câmaras é uma ferramenta amplamente reconhecida na neurociência comportamental para avaliar a sociabilidade e as preferências de interação social em roedores. Os animais foram aclimatados no dia anterior ao teste ao serem colocados na caixa de testes sem a presença de outros animais. O teste é

dividido em três fases: 1) Fase de habituação (5 min.): explorar todas as três câmaras para se familiarizar com o ambiente; 2) Fase de sociabilidade (10 min.): um objeto inanimado (gaiola vazia) é colocado na câmara direita e um animal desconhecido (rato 1) é colocado na câmara lateral esquerda. O animal de teste é então colocado na câmara central e sua movimentação entre as câmaras é observada. A preferência por passar mais tempo na câmara com o animal social indica comportamento sociável; 3) Fase de preferência por novidade social (10min.): um segundo animal desconhecido (rato 2) é colocado na câmara direita. O animal teste é novamente colocado na câmara central, e a preferência por interagir com o novo animal desconhecido (em comparação com o animal já conhecido) é medida, refletindo as tendências de interação social. No 28º dia pós-natal os animais foram testados (n=10 animais por grupo). As representações gráficas detalham os resultados na figura 11. Para melhor análise, separam-se as sequências: A-B; C-D; E-F-G.

A sequência A-B (figura 11), representa a latência, ou seja, o tempo que o animal leva para iniciar e completar determinada ação durante o teste, no 1º e no 2º encontro. A significância estatística é dada a partir de valores  $*P < 0,05$ .

Latência do primeiro encontro (sequência A): o grupo VPA apresentou uma latência significativamente maior para o primeiro encontro em comparação ao grupo CT ( $*p < 0,05$ ), indicando que o VPA impactou negativamente o comportamento social inicial dos animais. O grupo CT+LIP também exibiu uma latência significativamente maior em relação ao grupo controle ( $*p < 0,05$ ), sugerindo que o tratamento com lipossoma de RSV, neste contexto, pode ter interferido no atraso do primeiro encontro social. O grupo VPA+LIP não apresentou uma diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), sugerindo que o tratamento com lipossoma de RSV apesar de não apresentar diferença significativa com relação ao grupo VPA, conseguiu manter os indicadores semelhantes ao do grupo controle.

Latência do segundo encontro (sequência B): não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação à latência para o segundo encontro ( $p > 0,05$ ), indicando que o VPA e o tratamento com lipossoma de RSV não tiveram um efeito diferenciador claro sobre o comportamento social subsequente.



**Figura 11: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e do tratamento pós-natal com lipossomas de RSV no tempo de latência para iniciar a interação no teste das três câmaras.** O tempo de interação foi medido em segundos (s) e os grupos experimentais foram: animais tratados com salina (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e lipossomas contendo RSV (CT+LIP), e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV (VPA+LIP). **Encontro 1 (A) e Encontro 2 (B):** Os animais foram testados individualmente, e o tempo de latência para iniciar a interação foi registrado. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey, considerando significância estatística em  $*P < 0,05$ . ( $n=10$  animais/grupo). **Interação total com o Rato 1 (C) e Rato 2 (D):** O tempo total de interação foi registrado. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM. As análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de uma via, seguida do teste post hoc de Tukey, com significância estatística em  $*P < 0,05$  e  $***P < 0,001$ . ( $n=10$  animais/grupo). **Tempo total de interação/permanência nas câmaras:** O tempo de permanência foi registrado nas seguintes câmaras: câmara esquerda (E), câmara vazia (F) e câmara direita (G). As barras pareadas indicam a análise entre a fase 2 (1ª barra) na presença do rato 1, e a fase 3 (2ª barra) na presença dos dois animais (rato sociável 1 e rato desconhecido 2). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DPM. A análise estatística incluiu ANOVA de uma via seguida do teste post hoc de Tukey para comparação entre grupos, e o teste t de Student para comparação entre fases. Significância estatística foi considerada em  $*P < 0,05$ ,  $***P < 0,001$  e  $****P < 0,0001$ . ( $n=10$  animais/grupo).

A sequência C-D (figura 11) representa o tempo total de interação entre os animais. No gráfico C os dados referem-se à interação do rato teste com o rato desconhecido (rato 1), na câmara esquerda. No gráfico D os dados referem-se à interação do rato teste com o rato desconhecido (rato 2), na câmara direita. A significância estatística é dada com de valores \*P < 0,05 e \*\*\*P < 0,001.

Tempo total de interação com o rato 1 (sequência C): o grupo VPA apresentou uma redução significativa no tempo total de interação com o rato 1 em comparação ao grupo CT (\*p < 0,05), sugerindo que o VPA afetou negativamente a sociabilidade dos animais. Os grupos CT+LIP e VPA+LIP também mostraram uma redução ainda mais acentuada no tempo de interação em relação ao grupo CT (\*\*\*p < 0,001), indicando que o tratamento com lipossoma de RSV não apenas não restaurou a interação social, mas pode ter exacerbado o efeito negativo em comparação ao grupo VPA.

Tempo total de interação com o rato 2 (sequência D): todos os grupos experimentais (VPA, CT+LIP, e VPA+LIP) exibiram uma redução significativa no tempo de interação com o rato 2 em comparação ao grupo CT (\*\*\*p < 0,001). Isso sugere que tanto o VPA quanto o tratamento com lipossoma de RSV influenciaram de forma adversa a capacidade dos animais de manter interações sociais subsequentes.

A sequência E-F-G (figura 11) representa o tempo de interação entre os animais e nas câmaras. As barras pareadas, respectivamente, indicam análise entre a fase 2 (1ª barra) presença do rato 1 (câmara esquerda), e fase 3 (2ª barra) presença dos dois animais (rato sociável 1 e rato desconhecido 2 [na câmara direita]). No gráfico E os dados referem-se à permanência do rato teste na câmara esquerda. No gráfico F os dados referem-se à permanência do rato teste na câmara central (vazia). O gráfico G apresenta os resultados de permanência do rato teste na câmara direita. A significância estatística é dada com valores \*P < 0,05, \*\*\*P < 0,001 e \*\*\*\*P < 0,0001.

Tempo na câmara esquerda (sequência E): o grupo CT comparando as fases (2 e 3) apresenta significância estatística (\*\*\*p < 0,001), comportamento normal e esperado, sugerindo uma preferência maior pela câmara que apresenta um rato novo a ser explorado. O grupo CT+LIP também passou mais tempo na câmara esquerda em comparação ao grupo controle (\*p < 0,05), indicando que o tratamento com lipossoma de RSV não afetou este parâmetro nos animais. Os grupos VPA e VPA+LIP não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as fases



(2 e 3), sugerindo que tais grupos apresentaram deficit social quanto a preferência por um ambiente com a presença de um rato novo.

Tempo na câmara vazia (sequência F): todos os grupos experimentais (VPA, CT+LIP, e VPA+LIP) passaram significativamente mais tempo na câmara vazia em comparação ao grupo CT (\* $p < 0,05$ ), o que pode indicar uma menor motivação para interação social nos animais tratados, independentemente do tratamento com lipossoma de RSV.

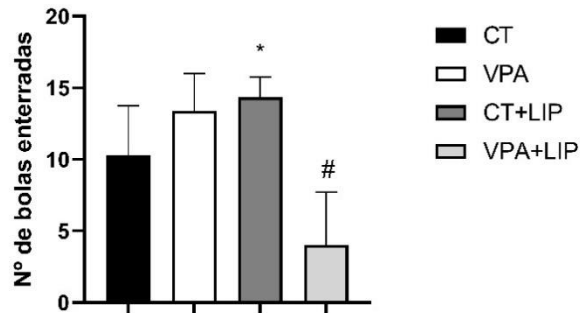
Tempo na câmara direita (sequência G): o grupo CT passou significativamente mais tempo na câmara direita, na fase 3 (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ), ou seja, a câmara com a presença de um rato novo. Os grupos VPA e CT+LIP também permaneceram mais tempo na câmara direita comparando as fases 2 e 3 (\* $p < 0,05$ ), porém isso não significa que o rato teste socializou, e sim, permaneceu na câmara. O grupo VPA+LIP não apresentou alteração significativa no tempo de permanência na câmara direita em comparação as fases 2 e 3 (\* $p < 0,05$ ), indicando um potencial deficit social ao evitar o ambiente que possui um rato novo.

#### 4.3.5 Análise de comportamentos obsessivo-compulsivos e movimentos repetitivos (*Marble Buring teste*)

O Teste de enterramento de mármore (do inglês - *Marble Buring teste*) é utilizado para avaliar comportamentos obsessivo-compulsivos e repetitivos em roedores, comportamentos frequentemente associados ao TEA. Os animais foram aclimatados no dia anterior ao serem colocados na caixa de testes contendo apenas o maravalha sem a presença das bolinhas para reduzir a ansiedade associada à novidade do ambiente. Durante o teste, os animais são colocados em um ambiente com pequenos objetos (20 bolinhas de gude) e o comportamento de enterrá-las é monitorado. No 28º dia pós-natal os animais foram testados (n=10 animais por grupo). Os resultados são apresentados na figura 12. A significância estatística é dada por valores \* $P < 0,05$  e # $P < 0,05$ .

O grupo CT+LIP mostrou um número significativamente maior de bolinhas enterradas em comparação ao grupo CT (\* $p < 0,05$ ), indicando um aumento na atividade compulsiva ou repetitiva dos animais tratados com lipossoma de RSV, sem a presença do fator VPA. O grupo VPA, não apresenta diferença estatisticamente

significativa ( $*p > 0,05$ ). O grupo VPA+LIP, no entanto, mostrou uma redução significativa no número de bolinhas enterradas em comparação ao grupo VPA ( $\#p < 0,05$ ). Essa redução sugere que o tratamento com lipossoma de RSV nos animais expostos ao VPA+LIP pode ter atenuado a atividade compulsiva induzida pelo VPA.



**Figura 12: Efeito da exposição pré-natal ao VPA e tratamento pós-natal com lipossomas no comportamento de enterramento de mármore.** O número de bolinhas enterradas no teste foi registrado. animais tratados com salina (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e lipossomas contendo RSV (CT+LIP) e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV (VPA+LIP). Os animais foram aclimatados no dia anterior ao teste, permitindo que se familiarizassem com o ambiente de teste e reduzissem a ansiedade causada pela novidade. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis, seguida do teste de *post hoc* de Dunn, considerando significância estatística com ( $*P < 0,05$ ) em comparação com o grupo controle e ( $\#P < 0,05$ ) em comparação com o grupo VPA. (n=10 animais/grupo).

**Tabela 5: Síntese dos resultados dos testes comportamentais**

Teste	Parâmetro	CT	VPA	CT+LIP	VPA+LIP
<b>Busca pelo ninho</b>	Latência (seg.)	Base	↑	↑	s-≠
<b>Geotaxia negativa</b>	Tempo para virar-se (seg.)	Base	s-≠	s-≠	s-≠
<b>Open Field</b>	Número de levantadas (comparação dias 27 e 28 pós-natal)	Base	s-≠	s-≠	s-≠
	Número de cruzamentos (comparação dias 27 e 28 pós-natal)	Base	s-≠	s-≠	s-≠
<b>Teste de Três Câmaras</b>	Latência do 1º encontro (rato 1)	Base	↑	↑	s-≠
	Latência do 2º encontro (rato 1 e rato 2)	Base	s-≠	s-≠	s-≠
	Tempo total de interação rato 1	Base	↓	↓↓↓	↓↓↓
	Tempo total de interação rato 2	Base	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
	Tempo total na câmara esquerda: (em relação rato 1 e ao rato 2)	Base (↓↓↓)	s-≠	↓	s-≠
	Tempo total na câmara vazia	Base	↑	↑	↑
	Tempo total na câmara direita: (em relação rato 2 e ao rato 1)	Base (↑↑↑↑)	↑	↑	s-≠
<b>Marble Burying</b>	Número de bolas enterradas	Base	s-≠	↑	#↓

Legenda:

- Base: Valores de referência do grupo controle (CT).
- s-≠ : Valores sem alteração estatística significativa ( $p > 0,05$ ).
- ↑ / ↓: Mudança significativa ( $*p < 0,05$ ).
- ↑↑ / ↓↓: Mudança significativa ( $*p < 0,01$ ).
- ↓↓↓: Mudança significativa ( $*p < 0,001$ ).
- ↑↑↑↑: Mudança significativa ( $*p < 0,0001$ ).
- #: Comparação ao grupo VPA ( $*p < 0,01$ ).

Fonte: Tabela criada pelo autor.

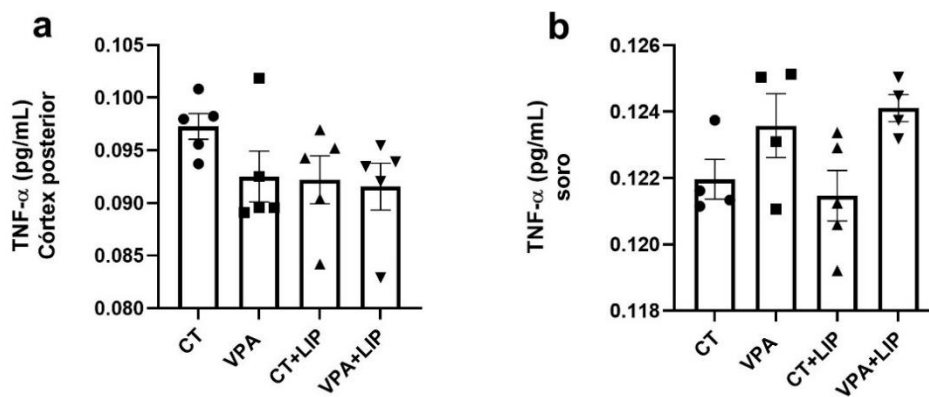
#### 4.4 Análise do conteúdo imunoenzimático: TNF- $\alpha$ , BDNF e NGF

No 28º dia pós-natal, os animais foram eutanasiados, coletado sangue (1ml), o cérebro foi removido e dissecadas áreas de interesse (córtex posterior, cerebelo e hipocampo) para avaliação molecular dos níveis de TNF- $\alpha$ , BDNF e NGF. Os resultados estão apresentados nas figuras 13 a 15. Na figura 14 mostram-se as concentrações de TNF- $\alpha$  medidas no córtex posterior (a) e no soro (b) dos diferentes grupos experimentais.

TNF- $\alpha$  no córtex posterior (13 a): os níveis de TNF- $\alpha$ , não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (CT, VPA, CT+LIP, e

VPA+LIP) ( $p > 0,05$ ). Isso sugere que, no córtex posterior, nem o VPA nem o tratamento com lipossoma de RSV tiveram um efeito significativo sobre os níveis de TNF- $\alpha$ .

TNF- $\alpha$  no soro (13 b): da mesma forma, as concentrações de TNF- $\alpha$  no soro não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ). Todos os grupos mostraram níveis de TNF- $\alpha$  relativamente semelhantes, sugerindo que o VPA e o lipossoma de RSV não alteraram significativamente as concentrações sistêmicas de TNF- $\alpha$  no soro dos animais.



**Figura 13: Concentrações de TNF- $\alpha$  no córtex posterior e soro de animais modelo de autismo (VPA) tratados com lipossoma de RSV.** As concentrações de TNF- $\alpha$  foram medidas no córtex posterior (a) e no soro (b) dos seguintes grupos: animais tratados com salina (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e lipossomas contendo RSV (CT+LIP), e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV (VPA+LIP). As medições foram realizadas utilizando ensaio de ELISA específico para TNF- $\alpha$ . Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post hoc de Tukey. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $P > 0,05$ ). (n=5 animais/grupo).

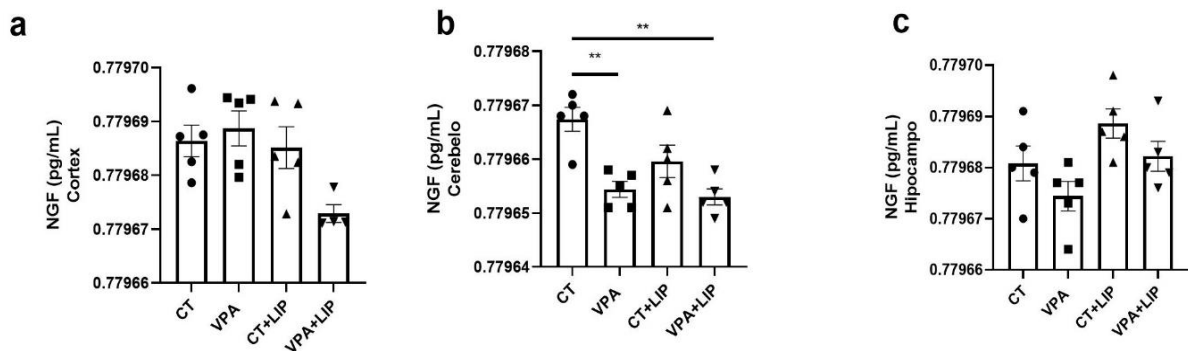
A figura 14 apresenta as concentrações de NGF (pg/mL) nas regiões do córtex posterior (a), cerebelo (b), e hipocampo (c) dos diferentes grupos experimentais.

NGF no córtex posterior (sequência a): as concentrações de NGF foram semelhantes entre todos os grupos (CT, VPA, CT+LIP, e VPA+LIP), e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Isso indica que nem o VPA nem o tratamento com lipossoma de RSV afetaram significativamente os níveis de NGF no córtex posterior.

NGF no cerebelo (sequência b): o grupo VPA apresentou níveis significativamente menores de NGF no cerebelo em comparação ao grupo CT (\*\* $p < 0,01$ ). Isso sugere que a administração de VPA resultou em uma redução significativa

dos níveis de NGF nessa região. Além disso, o grupo VPA+LIP também exibiu níveis reduzidos de NGF em comparação ao grupo CT (\*\* $p < 0,01$ ). Isso indica que o tratamento com lipossoma de RSV não foi capaz de restaurar os níveis normais de NGF no cerebelo.

NGF no Hipocampo (sequência c): as concentrações de NGF no hipocampo foram similares entre todos os grupos (CT, VPA, CT+LIP, e VPA+LIP), sem diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Esses resultados indicam que, no hipocampo, tanto o VPA quanto o tratamento com lipossoma de RSV não alteraram significativamente os níveis de NGF.



**Figura 14: Concentrações de NGF no córtex, cerebelo e hipocampo de animais modelo de autismo (VPA) tratados com lipossoma de RSV.** As concentrações de NGF foram medidas no córtex posterior (a), cerebelo (b) e hipocampo (c) dos seguintes grupos: animais tratados com salina (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e lipossomas contendo RSV (CT+LIP), e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV (VPA+LIP). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Considerando significância estatística com (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ). ( $n=5$  animais/grupo).

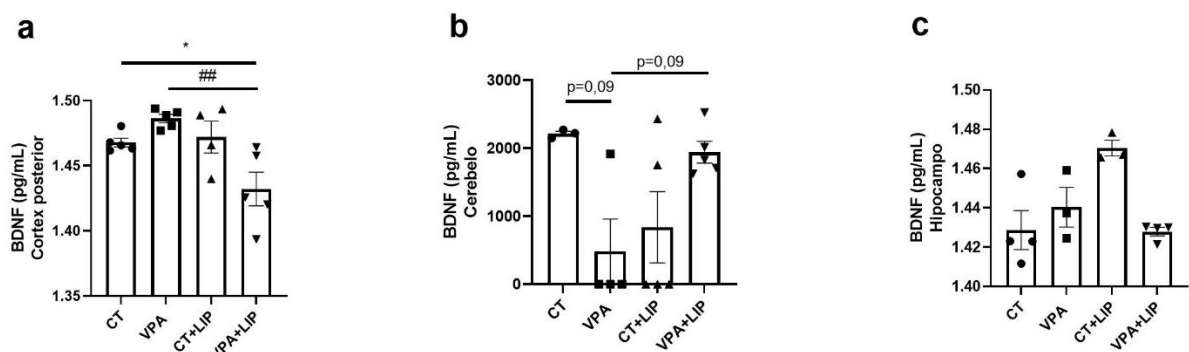
A figura 15 demonstra as concentrações de BDNF (pg/mL) nas regiões do córtex posterior (a), cerebelo (b), e hipocampo (c) dos diferentes grupos experimentais.

BDNF no córtex posterior (sequência a): os níveis de BDNF foram significativamente menores no grupo VPA+LIP em comparação ao grupo CT (\* $p < 0,05$ ), sugerindo que o tratamento com lipossoma de RSV diminuiu a expressão de BDNF nessa região. O grupo VPA+LIP também apresentou uma redução significativa nos níveis de BDNF em comparação ao grupo VPA (## $p < 0,01$ ), indicando que o tratamento com lipossoma de RSV em animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV resultou em uma diminuição dos níveis de BDNF no córtex posterior. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo

VPA e o grupo CT ( $p > 0,05$ ), sugerindo que o VPA, por si só, não alterou significativamente os níveis de BDNF no córtex posterior.

BDNF no cerebelo (sequência 14-b): o grupo VPA apresentou uma tendência de diminuição dos níveis de BDNF em comparação ao grupo CT ( $p = 0,09$ ), sugerindo que o VPA pode reduzir os níveis de BDNF no cerebelo. Do contrário, o grupo VPA+LIP mostrou uma tendência a aumentar os níveis de BDNF em comparação ao grupo VPA ( $p = 0,09$ ), sugerindo um possível efeito do lipossoma de RSV em contrabalancear a redução induzida pelo VPA, embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística.

BDNF no Hipocampo (c): as concentrações de BDNF no hipocampo foram semelhantes entre todos os grupos, sem diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Isso sugere que, no hipocampo, tanto o VPA quanto o tratamento com lipossoma de RSV não tiveram um impacto significativo nos níveis de BDNF.



**Figura 15: Concentrações de BDNF no córtex posterior, cerebelo e hipocampo de animais modelo de autismo (VPA) tratados com lipossoma de RSV.** As concentrações de BDNF foram medidas no córtex posterior (a), cerebelo (b) e hipocampo (c) dos seguintes grupos: animais tratados com salina (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e lipossomas contendo RSV (CT+LIP), e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV (VPA+LIP). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey. Significância estatística considerando (\* $P < 0,05$  em comparação com o grupo controle) e (\*\* $P < 0,01$  em comparação ao grupo VPA). (n=5 animais/grupo).

**Tabela 6: Síntese das alterações bioquímicas em diferentes regiões cerebrais e soro**

Marcador	Região / Fluido	CT	VPA	CT+LIP	VPA+LIP
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Córtex Posterior	Base	s- $\neq$	s- $\neq$	s- $\neq$
	Soro	Base	s- $\neq$	s- $\neq$	s- $\neq$
<b>NGF</b>	Córtex Posterior	Base	s- $\neq$	s- $\neq$	s- $\neq$
	Cerebelo	Base	$\downarrow\downarrow$	s- $\neq$	$\downarrow\downarrow$
	Hipocampo	Base	s- $\neq$	s- $\neq$	s- $\neq$
<b>BDNF</b>	Córtex Posterior	Base	$\uparrow$	s- $\neq$	$\downarrow$ / ###
	Cerebelo	Base	(p=0,09) $\downarrow$	s- $\neq$	(p=0,09) $\uparrow$
	Hipocampo	Base	s- $\neq$	s- $\neq$	s- $\neq$

Legenda:

- Base: Valores de referência do grupo controle (CT).
- s- $\neq$  : Valores sem alteração estatística significativa ( $p > 0,05$ ).
- $\uparrow$  /  $\downarrow$ : Mudança significativa ( $*p < 0,05$ ).
- $\uparrow\uparrow$  /  $\downarrow\downarrow$ : Mudança significativa ( $*p < 0,01$ ).
- ###: Comparação ao grupo VPA ( $*p < 0,01$ ).

Fonte: Tabela criada pelo autor

## 5 DISCUSSÃO

O autismo é um transtorno neurológico complexo caracterizado por déficits na comunicação social, padrões restritos e repetitivos de comportamento, além de uma variedade de desafios sensoriais. Nos últimos anos, tem-se observado um aumento significativo no número de diagnósticos de TEA, atribuído tanto à melhoria quanto à ampliação dos critérios diagnósticos (Hyman *et al.*, 2020; Mottron; Bzdok, 2020; Zyouid *et al.*, 2023). Além disso, há uma ênfase crescente na capacidade de identificar e avaliar crianças em estágios precoces do transtorno (Lord *et al.*, 2018; Shaw, 2021).

Embora avanços significativos tenham sido feitos na identificação de genes e regiões genômicas associadas à neurobiologia do autismo, a etiologia heterogênea, a penetrância variável e a ampla pleiotropia fenotípica continuam a ser características marcantes do autismo (Vorstman *et al.*, 2017). Fatores ambientais como dietéticos, infecções maternas, disbiose intestinal, estresse, medicamentos, exposição a pesticidas e uso de antibióticos também estão associados ao autismo (Posar; Visconti, 2017; Zyouid *et al.*, 2023).

Dada a natureza multifatorial do TEA, diversos modelos animais têm sido desenvolvidos e empregados como ferramentas para compreender os mecanismos da doença (Yenkoyan *et al.*, 2017). Esses modelos desempenham um papel crucial na montagem do quebra-cabeça do autismo, permitindo a investigação de diferentes fatores etiológicos que contribuem para sua fisiopatologia (Kim *et al.*, 2016).

Por meio de comportamentos alterados que se assemelham aos sintomas do TEA, esses modelos podem elucidar partes dos mecanismos subjacentes à patogênese do autismo e contribuir para o desenvolvimento de tratamentos eficazes (Roussin *et al.*, 2020; Yenkyoyan *et al.*, 2017).

Os resultados deste estudo, investigam o modelo animal de TEA induzido por exposição pré-natal ao VPA e a intervenção terapêutica com lipossomas de RSV pós-natal. A discussão é estruturada para abordar a eficácia do modelo animal, as alterações comportamentais observadas, e os impactos bioquímicos, fornecendo uma compreensão dos mecanismos subjacentes ao TEA e das possibilidades terapêuticas.



## 5.1 Caracterização físico-química de lipossomas contendo RSV

A caracterização físico-química dos lipossomas contendo RSV é crucial para avaliar sua eficiência como sistemas de liberação de fármacos. Parâmetros como o raio hidrodinâmico (2RH), o índice de polidispersão (PDI) e o potencial zeta (ZP) desempenham um papel central na estabilidade, uniformidade e comportamento coloidal desses sistemas nanométricos (Carugo *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2023; Singh, 2020; Vijayakumar *et al.*, 2016).

Os resultados apresentados demonstram que o RSV foi eficientemente incorporado às membranas dos lipossomas, como evidenciado pelo aumento no raio hidrodinâmico (2RH) de todas as amostras após sua adição. O aumento no tamanho das partículas de lipossomas, como observado nos lipossomas PEG e fosfatidilcolina + PEG após a incorporação do RSV, está em conformidade com estudos recentes que indicam que a inclusão de compostos bioativos dentro da bicamada lipídica pode causar uma expansão física das vesículas devido à interação do composto com os lipídios (Barenholz, 2012; Cardoso dos Santos *et al.*, 2021; Feng *et al.*, 2020; Mijajlovic *et al.*, 2013). Tal aumento no raio hidrodinâmico é um indicativo de que o RSV está devidamente associado às membranas dos lipossomas, o que, segundo Kanásová (2017), Vijayakumar (2016), Li *et al.* (2023) e Singh (2020), pode melhorar a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica do composto.

Em relação ao índice de polidispersão (PDI), o presente estudo demonstra que as amostras possuem uma distribuição de relativamente uniforme, com exceção dos lipossomas fosfatidilcolina + PEG + RSV, que exibem um aumento significativo no PDI (0,255). De acordo com Carugo *et al.* (2016), Barenholz (2012), (Dos Santos *et al.*(2018) e Feng *et al.*(2020) um PDI elevado pode ser atribuído à heterogeneidade no processo de formação dos lipossomas, especialmente quando compostos hidrofóbicos, como o RSV, são encapsulados. Essa manifestação pode ser explicada pela interação entre o RSV e a fosfatidilcolina, o que provoca uma variação no tamanho das partículas devido à sua incorporação na bicamada lipídica, alterando a organização estrutural dos lipossomas.

O potencial zeta (ZP) das amostras demonstradas reflete uma boa estabilidade coloidal, com valores iniciais altamente negativos (-55,4 mV a -56,0 mV). Como descrito por Mijajlovic *et al.* (2013) e Singh (2020), valores de ZP significativamente negativos indicam uma forte repulsão eletrostática entre as partículas, o que previne

a agregação, promovendo uma dispersão estável. No entanto, observa-se um nível aumentado no potencial zeta após 30 dias, particularmente nas amostras contendo RSV. Essa redução pode ser atribuída à reorganização da bicamada lipídica ou à interação prolongada do RSV com os componentes lipídicos, conforme descrito por Yuan et al. (2024) e Li et al. (2023) que descobriu que compostos bioativos podem alterar as propriedades da superfície das partículas de lipossomas ao longo do tempo.

A estabilidade coloidal dos lipossomas é um fator crítico para a eficácia de sua aplicação terapêutica. Como visto por Carugo et al. (2016) e Feng et al. (2020), o potencial zeta negativo da alta apresentação nas amostras iniciais é essencial para garantir que os lipossomas permaneçam dispersos, evitando a agregação que poderia comprometer sua função como sistemas de liberação de fármacos. Uma pequena redução no potencial zeta após 30 dias pode indicar uma ligeira perda de estabilidade ao longo do tempo, mas os valores ainda se mantêm dentro da faixa considerada aceitável para uma estabilidade coloidal eficiente (Li et al., 2023; Singh, 2020; Vijayakumar et al., 2016).

Dessa forma, os resultados obtidos na caracterização físico-química dos lipossomas contendo RSV estão de acordo com a literatura existente, que destaca a importância da estabilidade, uniformidade e tamanho das partículas para a eficácia de sistemas de liberação controlada (Cardoso dos Santos et al., 2021; Carugo et al., 2016; Feng et al., 2020; Yuan et al., 2024). A variação no raio hidrodinâmico, PDI e potencial zeta ao longo do tempo fornece insights importantes sobre o comportamento desses sistemas em condições prolongadas, confirmando a adequação dos lipossomas como veículos eficazes para a liberação de compostos bioativos como o RSV.

## **5.2 Validação do Modelo de autismo quimicamente induzido por VPA pré-natal**

### **5.2.1 Avaliação de marcos do desenvolvimento**

Os dados do estudo analisam o impacto de diferentes tratamentos sobre o peso corporal, a geotaxia negativa e da discriminação olfativa (busca pelo ninho) em roedores. Quatro grupos experimentais foram comparados: animais tratados com salina - controle (CT), animais expostos ao VPA, animais tratados com salina e

lipossomas contendo RSV (CT+LIP) e animais expostos ao VPA e tratados com lipossomas de RSV (VPA+LIP).

Diante da complexidade do TEA, a proposição de um modelo animal para pesquisas pré-clínicas deve garantir validade de construção, face e preditiva, mimetizando os achados observados em humanos, incluindo comportamentos homólogos entre as espécies e semelhanças com o TEA em suas características clínicas (Chaliha *et al.*, 2020). Estudos prévios documentaram que ratos modelo VPA exibiram atraso na maturação, evidenciado por retardo na abertura dos olhos, diminuição do peso corporal e atraso no desenvolvimento motor (Lai; Lombardo; Baron-Cohen, 2014b; Schneider; Przewłocki, 2005; Sharma *et al.*, 2024).

Para verificar se os ratos exibiam quaisquer sinais de atraso no desenvolvimento neurológico, conforme relatado anteriormente (Al Sagheer *et al.*, 2018; Hou *et al.*, 2018; Scheggi *et al.*, 2020; Schneider; Przewłocki, 2005), os filhotes dos grupos de estudos, foram avaliados quanto o peso corporal e testados em geotaxia negativa e discriminação olfativa.

Do 6º ao 26º dia pós-natal, os filhotes (n=10 por grupo) foram pesados individualmente para avaliar o impacto da exposição ao VPA e o efeito do tratamento pós-natal com RSV encapsulado em lipossomas (LIP). Os dados, apresentados nos gráficos B, C e D da Figura 7, revelam interações complexas entre os diferentes tratamentos e seus impactos no desenvolvimento físico dos filhotes.

No 6º dia pós-natal, observou-se que o grupo CT apresentou um peso maior do que o grupo VPA, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa, sugerindo que o efeito inicial do VPA no ganho de peso ainda não é evidente. Em contraste, o grupo CT+LIP apresentou um peso significativamente menor em comparação ao CT, o que foi inesperado, dado que os lipossomas deveriam ser inertes. Além disso, o peso no grupo CT+LIP foi significativamente menor do que no grupo VPA, sugerindo um possível efeito adverso dos lipossomas no crescimento dos filhotes. O grupo tratado com VPA e RSV encapsulado em lipossomas (VPA+LIP) também apresentou peso menor em comparação ao CT, mas sem diferença estatística significativa, indicando que o RSV ainda não mitiga completamente os efeitos do VPA nesta fase inicial.

No 16º dia pós-natal, os resultados indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT e VPA, sugerindo que o impacto do VPA no ganho de peso não é tão pronunciado. Contudo, o grupo CT+LIP continuou a

apresentar um peso significativamente menor em relação ao CT, reforçando a ideia de que os lipossomas podem estar interferindo negativamente no crescimento. O grupo VPA+LIP, por outro lado, não apresentou diferença significativa em relação ao CT, sugerindo que o RSV encapsulado pode estar começando a neutralizar os efeitos negativos do VPA. De forma intrigante, o grupo CT+LIP teve um peso significativamente menor do que o grupo VPA, sugerindo que o tratamento com lipossomas sozinho pode ser mais prejudicial ao ganho de peso do que o próprio VPA.

No 26º dia pós-natal, os padrões observados nos dias anteriores se mantiveram. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos CT e VPA, indicando que o VPA não causou alterações significativas no ganho de peso até este ponto. Entretanto, o grupo CT+LIP continuou a apresentar um peso significativamente menor em comparação ao CT, e também menor do que o grupo VPA, reforçando a hipótese de que os lipossomas têm um impacto adverso no crescimento, mais pronunciado do que o próprio VPA. A ausência de diferença significativa entre CT e VPA+LIP sugere que o RSV encapsulado pode estar neutralizando o impacto do VPA, aproximando o peso dos filhotes ao nível do grupo controle.

Esses resultados sugerem que os lipossomas, ao contrário do esperado, podem não ser inertes e, na verdade, interferem adversamente no desenvolvimento dos filhotes. A observação de que o grupo CT+LIP apresentou menor ganho de peso do que o grupo VPA levanta preocupações sobre a segurança e a eficácia dos lipossomas como veículos terapêuticos. Isso destaca a necessidade de investigações mais detalhadas sobre os mecanismos pelos quais os lipossomas podem impactar negativamente o crescimento e sobre possíveis modificações na sua formulação para mitigar esses efeitos adversos.

Comparando com os resultados descritos por Hill, Lim, e Stone (2008), que destacam como fatores experimentais podem restringir significativamente o crescimento dos filhotes, resultando em pesos menores ao longo do período pós-natal, observa-se um padrão semelhante de impacto adverso quando lipossomas são utilizados. Assim, inesperadamente, nosso estudo verificou que os lipossomas também reduziram significativamente o peso dos filhotes, mesmo mais do que o próprio VPA, sugerindo que a interferência de veículos terapêuticos, como os lipossomas, pode ser um fator crítico a ser considerado em avaliações de desenvolvimento em modelos animais.

Os resultados do estudo de Schneider e Przewłocki (2005) corroboram os achados do presente trabalho, onde a exposição ao VPA foi associada a uma redução significativa no ganho de peso dos filhotes. Em ambos os estudos, o VPA impactou negativamente o desenvolvimento físico, com redução no peso corporal e atrasos em marcos de maturação. No entanto, enquanto o estudo de Schneider e Przewłocki foca em um espectro mais amplo de alterações comportamentais e neurológicas, incluindo déficits em interações sociais e aumento da hipersensibilidade a estímulos, nosso estudo adiciona a complexidade do impacto adverso dos lipossomas, que, ao contrário do esperado, exacerbaram a redução de peso mesmo em comparação ao VPA sozinho.

Os dados do teste de discriminação olfativa (gráfico 8), medidos pela latência na busca pelo ninho, corroboram os padrões observados nos comportamentos motores. O grupo exposto ao VPA apresentou um aumento significativo na latência (\* $P < 0,05$ ) para encontrar o ninho em comparação com o grupo CT, sugerindo dificuldades em comportamentos de orientação e busca, características comuns em modelos de autismo induzidos por VPA.

Estudos anteriores, como os de Schneider e Przewłocki (2005) e Chaliha et al. (2020), confirmam esses efeitos, demonstrando que o VPA causa déficits significativos na orientação espacial e na busca. Os achados de Ruhela et al. (2019) também indicam que a exposição ao VPA resulta em déficits notáveis na discriminação olfativa em ratos, evidenciando dificuldades em reconhecer e responder a estímulos olfativos, o que é consistente com alterações comportamentais observadas em modelos de autismo, e também observados neste estudo.

Os grupos tratados com lipossomas de RSV (CT+LIP) também apresentou aumento na latência em relação ao controle. Esse resultado é contrário ao esperado devido aos efeitos antioxidantes do RSV. O grupo VPA+LIP não mostrou redução da latência comparado ao grupo VPA. Novamente esse resultado é contrário ao esperado. Isso sugere que os lipossomas de RSV não conseguiu restaurar completamente o comportamento ao nível do controle, confirmando os efeitos negativos induzidos pelo VPA. Porém, estudos de Zhang *et al.* (2017) e Zambrelli *et al.* (2021), demonstraram que tratamentos antioxidantes (como o RSV) podem melhorar os déficits comportamentais em modelos de autismo.

Os efeitos prejudiciais do VPA sobre o desenvolvimento motor e comportamental são bem documentados na literatura. Estudos mostram que o VPA pode induzir

características comportamentais semelhantes ao autismo em roedores, incluindo déficits motores e de orientação (Roulet; Lai; Foster, 2013; Schneider; Przewłocki, 2005). O RSV, devido às suas ações antioxidantes e neuroprotetoras, é considerado um tratamento possível para o autismo (Patra *et al.*, 2018; Schwingel *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2018). O lipossoma de RSV parece aumentar ainda mais sua eficácia, oferecendo melhorias notáveis nos comportamentos observados (Bambini-Junior *et al.*, 2014).

Estudos adicionais como os de Christensen *et al* (2013) e Taleb *et al.* (2021) reforçam que a exposição ao VPA durante o desenvolvimento pode causar alterações neurológicas significativas, levando ao autismo. Os dados do estudo indicam que o VPA compromete significativamente o comportamento motor e de busca em roedores, validando seu uso como modelo de autismo. O tratamento com lipossoma de RSV, embora não restaurando completamente os comportamentos ao nível do controle, pode oferece melhorias significativas, mitigando alguns dos efeitos negativos induzidos pelo VPA conforme visto na literatura.

O gráfico 9 ilustra o resultado do tempo necessário para os animais se virarem no teste de geotaxia negativa, utilizado para avaliar reflexos inatos relacionados à função sensório-motora e coordenação motora em roedores. Embora o gráfico sugira, visualmente, variações nos tempos de resposta entre os diferentes grupos, não há significância estatística destacada ( $P > 0,05$ ) indicando que as diferenças observadas não atingem um nível de confiança que permita afirmar que as variações entre os grupos são devidas a efeitos reais, e não ao acaso.

Mediante os dados apresentados, o grupo CT, como base, mostra determinado tempo para se virar, sugerindo uma função motora e sensório-motora intacta, como esperado em animais não expostos a agentes disruptivos. Porém, os animais expostos ao VPA, CT+LIP e VPA+LIP não apresentaram diferença estatísticas no tempo necessário para se virar, logo, o tratamento com VPA e LIP para não ter exercido efeito sobre a função motora ou na coordenação. Os dados dos grupos VPA e VPA+LIP são inconsistentes com o perfil neurotóxico do VPA, que é amplamente reconhecido por induzir alterações comportamentais e motoras em modelos de autismo. No entanto, conforme destacado por Ruhela *et al.* (2019), a geotaxia negativa em modelos VPA pode apresentar um padrão de desenvolvimento aberrante, o que pode contribuir para a variabilidade nos resultados e para a ausência de significância estatística. Os autores observaram que os ratos expostos ao VPA mostraram um

desempenho alterado em diferentes fases de desenvolvimento, o que pode tornar difícil a detecção de diferenças consistentes entre os grupos experimentais. Nos grupos tratados com lipossoma de RSV, tanto no controle (CT+LIP) quanto nos expostos VPA+LIP, há uma tendência de redução no tempo de virada em comparação com o grupo VPA. Contudo, essa tendência não é suportada por significância estatística ( $P > 0,05$ ).

A ausência de significância estatística ( $P < 0,05$ ) pode ser explicada pela alta variabilidade intrínseca do teste de geotaxia negativa, como sugerido por Motz e Alberts (2005). Eles argumentam que o comportamento observado em inclinações íngremes pode ser uma resposta compensatória à instabilidade postural, em vez de um reflexo sensório-motor puro, o que pode contribuir para a variabilidade nos resultados e limitar a capacidade de detectar mudanças sutis entre os grupos.

A literatura sugere que, embora a geotaxia negativa seja amplamente utilizada para avaliar a função motora e sensório-motora, seu uso em modelos de autismo, como o modelo VPA, deve ser interpretado com cautela devido à sua variabilidade intrínseca. Conforme discutido por Ruhela et al. (2019), o padrão de desenvolvimento da geotaxia negativa em modelos VPA é errático, o que pode dificultar a obtenção de resultados estatisticamente significativos. Além disso, Motz e Alberts (2005) argumentam que o comportamento observado no teste de geotaxia negativa pode refletir uma adaptação motora à instabilidade postural, em vez de um reflexo puramente sensorial, o que contribui para a variabilidade nos resultados.

A ausência de significância estatística nos tempos de virada entre os grupos sugere que, enquanto o lipossoma de RSV pode ter mostrado uma tendência de melhorar a função motora comprometida pelo VPA, esses efeitos não foram suficientemente consistentes para serem considerados estatisticamente significativos. Isso pode ser devido a vários fatores, incluindo variabilidade experimental, tamanho amostral ou limitações na formulação e biodisponibilidade do RSV. A falta de significância estatística não descarta completamente o efeito potencial, mas sugere que mais dados são necessários para se chegar a uma conclusão firme.

### 5.2.2 Avaliação da atividade locomotora e comportamento

No teste de campo aberto (Open Field), dois parâmetros foram analisados: o número de levantamentos (A) e o número de cruzamentos (B). Esses parâmetros são

amplamente utilizados para avaliar a atividade exploratória e locomotora, bem como a memória de habituação. Os fatores "grupo" e "dia" foram considerados para analisar os efeitos principais e a interação entre eles em modelos animais, sendo indicadores importantes dos níveis de ansiedade e da atividade motora dos sujeitos. Schneider e Przewłocki (2005) discutem que o número de cruzamentos no teste Open Field é uma medida essencial para avaliar a atividade locomotora em roedores, especialmente em estudos sobre modelos de autismo induzidos por VPA. Chomiak et al. (2013) também destacam que tanto o número de levantadas quanto o número de cruzamentos são parâmetros padrão para investigar a exploração e a ansiedade em modelos animais de transtorno do espectro autista. Adicionalmente, Malaguarnera et al. (2020) enfatizam que esses comportamentos exploratórios são críticos para avaliar a eficácia de intervenções neuroprotetoras, como o RSV, em estudos relacionados ao TEA.

De acordo com Merchie e Gomot (2023) memória de habituação é um processo pelo qual um organismo diminui sua resposta a um estímulo repetido, considerado irrelevante ou não ameaçador, sendo um tipo de aprendizado não-associativo que permite ao sistema nervoso filtrar estímulos repetitivos, conservando energia e focando em mudanças significativas no ambiente; em estudos com modelos animais, essa memória pode ser avaliada pela redução da atividade exploratória ao longo do tempo em ambientes familiares, refletindo uma adaptação ao contexto, mecanismo fundamental tanto para a eficiência comportamental quanto para a economia cognitiva (Merchie; Gomot, 2023).

No gráfico 10, Número de Levantadas (sequência A): observa-se uma redução no número de levantadas nos grupos CT, CT+LIP e VPA+LIP, enquanto o grupo VPA apresentou um leve aumento no segundo dia. Contudo, essa variação não foi confirmada por análise estatística significativa. Essa diminuição no número de levantadas sugere uma menor atividade exploratória nos grupos tratados com lipossomas contendo RSV (LIP), o que poderia estar relacionado à memória de habituação. Como observado por Chomiak et al. (2013), a exposição ao VPA induz comportamentos semelhantes ao autismo, incluindo redução na exploração. No entanto, essa menor exploração não necessariamente indica que os animais são menos curiosos; pelo contrário, pode refletir a habituação ao ambiente, sugerindo que os animais reconhecem o espaço e se sentem mais confortáveis, o que reduz a necessidade de exploração adicional.



A ausência de um efeito mais pronunciado nos grupos CT+LIP e VPA+LIP em relação ao controle pode indicar que o lipossoma contendo RSV não foi suficientemente eficaz para contrabalancear os efeitos do VPA sobre a habituação. O estudo de Fontes-Dutra et al. (2018) demonstrou o potencial neuroprotetor do RSV em prevenir alterações comportamentais induzidas pelo VPA, especialmente em áreas relacionadas ao processamento sensorial e motor. No entanto, neste experimento, a biodisponibilidade do RSV encapsulado em lipossomas pode não ter sido adequada para restaurar plenamente os comportamentos exploratórios ao nível do grupo controle. Esse achado também levanta a hipótese de que a dose ou a via de administração do RSV pode não ter sido ideal, o que corrobora com a revisão de Singh (2020), que destacou a necessidade de otimização das formulações de nanocarregadores para melhorar a liberação de compostos bioativos.

Já o Número de Cruzamentos (sequência 10-B), apresentou uma tendência de redução no segundo dia em comparação ao primeiro dia em todos os grupos. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ou entre as fases (1º e 2º dia). Essa ausência de diferença estatística indica que, embora haja uma leve variação na atividade exploratória ao longo do tempo, essas variações não são suficientes para serem consideradas relevantes do ponto de vista estatístico.

Embora o VPA tenha sido associado, em estudos anteriores, à diminuição da atividade locomotora e à redução da exploração, nossos resultados não mostram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. No entanto, observou-se uma tendência de menor atividade no segundo dia de teste, o que pode sugerir uma adaptação dos animais ao ambiente de teste. Logo, a habituação ao ambiente é um exemplo de aprendizado adaptativo e, como discutido no estudo de Dissegna et al. (2021), a habituação pode ser específica ao contexto, indicando que a memória associativa está envolvida. Se o mesmo ambiente for mantido, os animais mostram uma resposta reduzida devido à habituação; no entanto, se o contexto mudar (por exemplo, um novo ambiente ou modificações significativas no ambiente anterior), a resposta exploratória pode aumentar novamente (Dissegna; Turatto; Chiandetti, 2021). Logo, essa adaptação pode explicar, pelo menos em parte, a menor atividade dos animais no segundo dia de teste.

Estudos como os de Chomiak et al. (2013) e Schneider & Przewlocki (2005) relataram que o VPA induz comportamentos semelhantes ao autismo em roedores,

como a diminuição da atividade locomotora e o aumento da ansiedade, evidenciados pela redução na exploração no teste Open Field. Esses achados reforçam a hipótese de que o VPA pode afetar a atividade exploratória e locomotora, embora, neste caso, essas alterações não tenham sido estatisticamente significativas.

A literatura indica que a administração de VPA durante a gestação, conforme utilizado em nosso protocolo de modelo animal, pode induzir alterações neurodesenvolvimentais, resultando em comportamentos associados ao TEA, como aumento da ansiedade e redução da exploração. Embora os resultados do gráfico não revelem diferenças estatisticamente significativas, observa-se uma tendência de menor exploração nos animais tratados com VPA, especialmente no segundo dia de teste. Chomiak et al. (2013) demonstraram que roedores expostos ao VPA apresentam locomoção reduzida e comportamentos repetitivos, possivelmente relacionados à disfunção de circuitos neurais críticos, como o córtex pré-frontal e a amígdala. Esses circuitos, essenciais para a modulação da ansiedade e do comportamento exploratório, podem estar implicados na tendência de redução observada nos comportamentos exploratórios dos grupos tratados com VPA, de acordo com nosso protocolo de modelo animal.

O RSV tem sido amplamente estudado por suas propriedades neuroprotetoras, antioxidantes e anti-inflamatórias, com vários estudos sugerindo que ele pode mitigar os efeitos neurotóxicos do VPA. Em nosso estudo, apesar de não serem observadas diferenças estatisticamente significativas no número de cruzamentos entre os grupos tratados com VPA e VPA+LIP, houve uma leve tendência de aumento na atividade exploratória nos animais tratados com lipossomas contendo RSV. Isso pode indicar um possível efeito neuroprotetor. Fontes-Dutra et al. (2018) demonstraram que o RSV pode prevenir alterações comportamentais e celulares induzidas pelo VPA, particularmente em áreas cerebrais relacionadas ao processamento sensorial e motor. Embora nossos achados não sejam conclusivos, eles estão alinhados com essas evidências, sugerindo um potencial efeito benéfico do RSV.

No entanto, a presente análise indica que o lipossoma de RSV (LIP) não foi suficientemente eficaz para restaurar os comportamentos de levantadas e cruzamentos ao nível do grupo CT, sugerindo que a biodisponibilidade, a dose ou a via de administração do RSV podem não ter sido ideais. Além disso, os dados indicam que o LIP pode ter causado um efeito inesperado, resultando em uma leve redução na locomoção e exploração, além de não promover um ganho de memória de

habituação. Esses achados levantam a possibilidade de que a formulação de lipossomas utilizada não tenha otimizado adequadamente a liberação do composto em regiões cerebrais críticas, envolvidas na modulação da ansiedade e exploração, conforme sugerido pela revisão de Singh (2020) sobre nanocarregadores de RSV.

Estudos como o de Xie et al. (2018) demonstraram que a ativação de receptores estrogênicos (ER $\beta$ ) pelo RSV pode desempenhar um papel crucial na mitigação de comportamentos semelhantes ao TEA. Isso sugere que estratégias para otimizar a ativação de vias neuroprotetoras, como a utilização de sistemas de liberação mais eficazes, precisam ser exploradas para maximizar os efeitos terapêuticos do RSV.

A figura 11 contém medidas relacionadas ao comportamento social e às preferências sociais dos animais no teste de três câmaras. Este teste é amplamente utilizado para avaliar a sociabilidade e a preferência por novidade social, comportamentos que são frequentemente alterados em modelos de autismo.

A latência para o primeiro encontro (figura 11-A), foi significativamente maior nos grupos VPA e CT+LIP em comparação com o grupo CT (\* $p < 0,05$ ). Isso indica que a exposição ao VPA aumentou o tempo necessário para que os animais interajam pela primeira vez, sugerindo um comportamento social prejudicado. O tratamento com lipossoma de RSV (VPA+LIP) não conseguiu restaurar essa medida aos níveis do controle, sugerindo uma eficácia limitada na recuperação da sociabilidade. Já na latência do 2º encontro (figura 11-B), as diferenças observadas entre os grupos neste parâmetro não são significativas, indicando que, após o primeiro encontro, os animais não apresentam diferenças marcantes na latência para subsequentemente se engajarem em interações.

Chomiak et al. (2013) também relatam que a exposição ao VPA resulta em alterações significativas nos comportamentos sociais, incluindo uma diminuição na sociabilidade e na interação com novos estímulos sociais, resultados que são consistentes com o aumento da latência para o primeiro encontro e a redução do tempo de interação observados nos grupos tratados com VPA.

O tempo total de interação com o Rato 1 (figura 11-C) foi significativamente reduzido nos grupos VPA (\* $p < 0,05$ ), CT+LIP e VPA+LIP (\*\* $P < 0,001$ ) em comparação com o controle. Isso indica que tanto a exposição ao VPA quanto a administração de lipossomas, com ou sem RSV, resultaram em uma diminuição da sociabilidade. De forma semelhante, o tempo de interação com o Rato 2 (figura 11-D), foi significativamente reduzido nos grupos VPA, CT+LIP e VPA+LIP (\*\* $p < 0,001$ ).

Esses resultados sugerem que os animais tratados com VPA, assim como os tratados com lipossomas, independentemente da presença de RSV, apresentam uma redução na preferência por novidade social.

Os resultados observados estão de acordo com a literatura que descreve os efeitos do VPA em modelos de autismo, onde comportamentos sociais e de preferência por novidade social são frequentemente prejudicados. Bambini-Junior et al. (2014) e Fontes-Dutra et al. (2018) destacam que o VPA pode induzir déficits significativos na sociabilidade, o que é corroborado pelos dados apresentados neste gráfico.

De acordo com os dados do tempo na câmara esquerda (figura 11-E) e direita (figura 11-G), os grupos VPA e VPA+LIP passaram significativamente menos tempo na câmara esquerda (onde o rato social está localizado) na fase 1, e mais tempo na câmara direita (onde está o rato 2) na fase 3, o que pode indicar uma aversão ou falta de interesse social, comportamento característico de modelos de autismo. Porém, estar mais tempo na câmara direita não significa estar interagindo diretamente com o rato 2. Esse dado é confirmado pelos dados da figura 10-D que mostra estatisticamente a menor interação entre os animais.

Já nos dados de tempo total na câmara vazia (figura 11-F), mostram que os grupos tratados com VPA e VPA+LIP e também o CT+LIP passaram mais tempo na câmara vazia em comparação com o controle, o que reforça a ideia de um comportamento social comprometido, com ou sem a presença do tratamento com RSV.

Schneider & Przewłocki (2005) discutem que a exposição ao VPA durante o desenvolvimento pode levar a alterações na rede neural responsável por comportamentos sociais, contribuindo para a redução da sociabilidade observada. Esses achados são refletidos na diminuição do tempo de interação e no aumento do tempo passado na câmara vazia pelos grupos tratados com VPA. Rouillet et al. (2013) também exploram os efeitos do VPA sobre a sociabilidade e a preferência por novidade social em modelos de autismo, observando que a exposição ao VPA prejudica a capacidade dos animais de se engajarem em interações sociais e preferirem novidades. As medidas de tempo de interação e as escolhas de câmara nos grupos VPA e VPA+LIP refletem esses efeitos, sugerindo que o tratamento com lipossoma de RSV não foi suficiente para mitigar completamente esses déficits.

A ausência de recuperação completa nos comportamentos sociais e de novidade social com o tratamento com lipossoma de RSV pode estar associada à sua biodisponibilidade ou à necessidade de uma formulação ou dosagem diferente, conforme discutido por Malaguarnera et al. (2020) e Singh (2020). Embora o RSV tenha propriedades neuroprotetoras, sua eficácia no tratamento de deficiências sociais induzidas por VPA pode ser limitada por esses fatores.

Os resultados do teste de três câmaras indicam que o VPA compromete significativamente a sociabilidade e a preferência por novidade social, características comuns em modelos de autismo. Embora o tratamento com lipossoma de RSV tenha sido testado como uma possível intervenção, os resultados sugerem que ele não foi eficaz em restaurar esses comportamentos aos níveis normais e até induziu efeitos semelhantes ao VPA em alguns resultados deste teste.

O teste de Marble Burying é utilizado para medir comportamentos repetitivos e compulsivos em modelos animais (figura 12). O grupo VPA não mostrou aumento no número de bolas enterradas em comparação com o grupo CT, não sendo possível afirmar que há presença de comportamentos mais repetitivos e compulsivos. Este achado está divergente da literatura existente, pois, como o estudo de Nicolini e Fahnstock (2018), que documenta o aumento de comportamentos repetitivos em modelos de autismo induzidos por VPA.

Contrariamente ao esperado, os animais controles tratados com lipossomas (CT+LIP) mostraram um aumento significativo no número de bolas enterradas ( $*p < 0,05$ ) em comparação com o grupo CT, sugerindo que a administração de lipossomas pode, por si só, influenciar o comportamento repetitivo. Isso sugere que o veículo lipossomas utilizado pode ter efeitos neuromodulatórios inesperados, aumentando os comportamentos compulsivos. O grupo VPA+LIP apresentou uma redução significativa ( $\#p < 0,05$ ) no número de bolinhas enterradas em comparação com o grupo VPA. Essa redução sugere que o RSV, mesmo na forma de lipossoma, pode ter um efeito modulador, diminuindo os comportamentos repetitivos induzidos pelo VPA. Bambini-Junior et al. (2014) e Fontes-Dutra et al. (2018) já demonstraram que o RSV pode reduzir comportamentos repetitivos em modelos de autismo, corroborando os resultados observados no presente estudo.

Os resultados deste experimento estão em consonância com a literatura existente, que documenta os efeitos do VPA e do RSV sobre comportamentos repetitivos. Schneider & Przewłocki (2005) e Chomiak et al. (2013) relataram que o

VPA aumenta comportamentos repetitivos em modelos de autismo, um efeito que também foi observado no aumento de bolas enterradas no grupo VPA deste estudo. Taleb et al. (2021) exploraram os mecanismos pelos quais o RSV pode contrabalançar os efeitos neurotóxicos do VPA, sugerindo que a redução de comportamentos repetitivos observada no grupo VPA+LIP pode ser atribuída à ação do RSV em reduzir a neuroinflamação e o estresse oxidativo. Esses mecanismos são consistentes com as observações de Malaguarnera et al. (2020), que destacam o potencial do RSV como neuroprotetor.

O teste Marble Burying revelou que o VPA pode induzir comportamentos repetitivos em roedores, enquanto os lipossomas de RSV mostrou potencial para mitigar esses efeitos. A redução significativa no número de bolinhas enterradas no grupo VPA+LIP sugere que o RSV, mesmo em sua forma de lipossomas, pode ser eficaz na modulação de comportamentos compulsivos em modelos de autismo. No entanto, o aumento no comportamento repetitivo no grupo CT+LIP indica que a formulação dos lipossomas pode ter efeitos complexos e potencialmente indesejados em condições normais, o que justifica a necessidade de estudos adicionais.

Os dados presentes nesta sessão mostram que o desenvolvimento de comportamentos sociais semelhantes aos autistas induzidos pela exposição pré-natal ao VPA podem ser modificados pelo RSV.

### **5.3 Efeitos dos lipossomas de RSV na regulação de TNF, NGF e BDNF em modelo animal VPA de autismo.**

O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), o fator de crescimento nervoso (NGF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) são moléculas fundamentais no funcionamento do sistema nervoso, cada uma desempenhando papéis cruciais que, quando alterados, podem contribuir para diversas neuropatologias. O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que regula a resposta imune e a neuroinflamação, estando frequentemente associado a processos degenerativos e distúrbios neuropsiquiátricos, como o TEA (Bhusal *et al.*, 2023; Cordiglieri; Farina, 2010). A neuroinflamação induzida pelo TNF- $\alpha$  pode afetar a sinalização das neurotrofinas como o NGF e o BDNF, que são essenciais para a sobrevivência, crescimento e plasticidade dos neurônios (Saghazadeh; Rezaei, 2017).

O NGF, por sua vez, é crítico para o desenvolvimento e manutenção dos neurônios sensoriais e simpáticos, e suas alterações têm sido relacionadas a disfunções neurais e comportamentais (Rizzi *et al.*, 2018). O BDNF, amplamente expresso no cérebro, modula a plasticidade sináptica e a neurogênese, sendo vital para os processos de memória e aprendizagem (Laske; Eschweiler, 2006). Disfunções na sinalização do BDNF têm sido observadas em diversas condições neuropsiquiátricas, incluindo TEA, onde reduções nos níveis de BDNF podem amplificar os efeitos negativos do TNF- $\alpha$  e do NGF, exacerbando os déficits cognitivos e comportamentais (Zhou *et al.*, 2021).

Assim, a interrelação entre essas três proteínas é crucial para o equilíbrio das funções cerebrais, e suas disfunções podem contribuir conjuntamente para o desenvolvimento de desordens neurológicas. A tabela 5, apresenta de forma integrada os resultados obtidos por meio de análise bioquímica do TNF, NGF e BDNF no córtex posterior e soro dos animais do estudo (CT, VPA, CT+LIP, e VPA+LIP).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória central na resposta inflamatória e está amplamente envolvido na patogênese do autismo, particularmente em modelos induzidos por VPA. Veselinović *et al.* (2021) destacou que o VPA pode induzir um estado de inflamação sistêmica, elevando os níveis de TNF- $\alpha$  no soro, o que está diferente com o que foi observado no experimento. Não significância estatística para confirmar esta alteração. Além disso, Xie *et al.* (2018) mostrou que o VPA pode aumentar os níveis de TNF- $\alpha$  no cérebro, exacerbando a neuroinflamação e potencialmente contribuindo para os déficits comportamentais observados em modelos de autismo. O VPA é conhecido por induzir neuroinflamação, um processo que foi refletido nos resultados observados neste estudo. Os níveis de TNF- $\alpha$  (pg/mL), (figura 13) e (tabela 5), são resultados avaliados do córtex posterior e soro dos ratos.

Os resultados obtidos para os níveis de TNF- $\alpha$ , no córtex posterior (figura 13-a) e no soro (figura 13-b) revelam insensibilidades nas respostas inflamatórias induzidas pela exposição ao VPA e pela intervenção com lipossomas contendo RSV entre os grupos avaliados. Saghazadeh e Rezaei (2017), destacam o TNF- $\alpha$  como um biomarcador chave para TEA, logo sua avaliação torna-se importante.

No córtex posterior (figura 13-a), observa-se que entre os grupos CT, VPA, CT+LIP e VPA+LIP não apresentam redução nos níveis de TNF- $\alpha$ . O tratamento com lipossomas, tanto no grupo controle quanto no grupo VPA, não resultou em uma mudança substancial nos níveis de TNF- $\alpha$  em relação aos seus respectivos controles.

Na figura 13-b, apresenta-se os níveis de TNF- $\alpha$  no soro dos grupos experimentais. Aqui, os níveis de TNF- $\alpha$  também não diferem do controle e nem *estre si*. Este achado sugere que nem o VPA ou RSV atuaram sobre a resposta inflamatória sistêmica, pelo menos em termos de níveis de TNF- $\alpha$  no soro.

A literatura mostra que o VPA pode induzir neuroinflamação e alterar os níveis de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  no cérebro. No entanto, o tratamento com lipossomas (tanto no grupo controle quanto no grupo VPA) não parece ter revertido significativamente essa alteração, sugerindo que a entrega de compostos via lipossomas pode não ter sido eficaz em modular a resposta inflamatória no córtex posterior. Esse achado, pode ser interpretado como uma resposta ineficaz local do RSV à inflamação induzida pelo VPA, o que é consistente com estudos que sugerem variações regionais na resposta inflamatória no cérebro, como relatado por Zhou et al. (2021). Por outro lado, Veselinović et al. (2021) destacam que o VPA pode induzir um estado de inflamação sistêmica, elevando os níveis de TNF- $\alpha$  no soro, o que está diverte dos resultados observados neste experimento, especialmente no grupo VPA+LIP.

No soro (figura 13-b), os níveis de TNF- $\alpha$  mostram certa relevância, pois indica que, enquanto o VPA por si só pode não alterar drasticamente os níveis de TNF- $\alpha$  no soro, a combinação com lipossomas pode não ter efeitos adicionais que devem ser investigados mais a fundo. Também é sugerido pela literatura que o RSV pode, em certas condições, exacerbar a inflamação sistêmica ao interagir com vias inflamatórias complexas, especialmente quando a biodisponibilidade do composto é aumentada, como discutido por Zhang et al. (2015) e Ramírez-Mendoza et al. (2024).

Ainda, os resultados apresentados na figura 13-a, podem ser melhor compreendidos e justificados ao se considerar a interação entre micróglia e astrócitos na produção de TNF- $\alpha$ . Bhusal et al. (2023) destacam que a ativação microglial induzida pelo VPA pode desencadear a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , que não apenas exacerbam a inflamação, mas também ativam os astrócitos. Esses astrócitos, uma vez ativados, contribuem ainda mais para a produção de TNF- $\alpha$ , criando um ciclo de feedback positivo que amplifica a inflamação sistêmica observada no soro (Bhusal *et al.*, 2023).

Cordiglieri e Farina (2010) complementam essa visão ao explicar que tanto microglia quanto astrócitos podem responder a estímulos inflamatórios através da produção de TNF- $\alpha$ . Eles sugerem que a comunicação bidirecional entre essas células



é essencial para a manutenção e propagação da inflamação no SNC. Esta interação celular pode, portanto, explicar a ausência de modulação significativa dos níveis de TNF- $\alpha$  no córtex posterior (figura 13-a), onde a inflamação pode até estar sendo regulada de forma mais localizada, porém sem confirmação estatística, em contraste com a resposta inflamatória sistêmica mais pronunciada no soro (Cordiglieri; Farina, 2010).

A consideração dessas interações celulares ajuda a contextualizar os dados observados, sugerindo que a combinação de VPA e RSV via lipossomas poderia ter exacerbado a comunicação inflamatória entre micróglia e astrócitos, resultando no aumento sistêmico de TNF- $\alpha$ , porém não afirmado neste estudo. Isso reforça a importância de entender as dinâmicas celulares subjacentes na neuroinflamação e sua influência nos resultados experimentais.

Embora o RSV seja conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias, os dados sugerem que sua administração via lipossomas, especialmente em combinação com VPA, pode alterar significativamente sua interação com as vias inflamatórias, levando a um efeito exacerbado no soro. Hidema et al. (2020) e Sun et al. (2010) mostraram que o RSV pode reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  em modelos de autismo, mas no presente estudo, a administração combinada com VPA via lipossomas parece ter levado a um resultado indiferente, destacando a necessidade de considerar a forma de administração e as interações medicamentosas.

Elnahas et al. (2021) corroboram essa ideia ao demonstrar que a exposição ao VPA resulta em elevações significativas dos níveis de TNF- $\alpha$ , tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo, o que se desalinha com as observações feitas no presente estudo. Liang et al. (2021) discutem como o microRNA-146a pode modular a produção de TNF- $\alpha$ , e sugerem que o RSV pode influenciar essas vias, contribuindo para o aumento observado nos níveis de TNF- $\alpha$  no soro. O que não foi evidenciado por este estudo. Ricci et al. (2013) reforça a ideia de que os efeitos anti-inflamatórios do RSV podem ser regionais e dependentes da via de administração. Isso destaca a complexidade da interação entre o RSV e as vias inflamatórias em diferentes tecidos, sugerindo que a sua eficácia pode ser modulada tanto pelo local de ação quanto pela combinação com outros agentes inflamatórios como o VPA.

Os resultados indicam que a exposição ao VPA não alterou os níveis de TNF- $\alpha$  de maneira distinta no córtex posterior e no soro, e nem a combinação de VPA e RSV administrado via lipossomas diminuiu a inflamação sistêmica. Estes achados sugerem

a necessidade de mais estudos para entender completamente esses mecanismos e otimizar as estratégias terapêuticas para o TEA. Além disso, considerando o efeito neuroprotetor do RSV observado em tratamentos de longo prazo, conforme sugerido por Berman et al. (2017), a duração do tratamento pode ser um fator crucial para alcançar uma modulação inflamatória eficaz.

O Nerve Growth Factor (NGF) é uma neurotrofina crucial para o desenvolvimento e sobrevivência dos neurônios sensoriais e simpáticos. No contexto de neuroinflamação, o NGF desempenha um papel dual: enquanto promove a sobrevivência neuronal, também pode amplificar a resposta inflamatória através da ativação de micróglia e astrócitos. Rizzi et al. (2018) destacam que o NGF pode orientar a micróglia em direção a um fenótipo neuroprotetor ou neurotóxico, dependendo do contexto inflamatório.

Esse fenômeno sugere que, em condições inflamatórias exacerbadas, como as induzidas pelo VPA, o NGF pode contribuir para a amplificação da resposta inflamatória, aumentando a produção de citocinas como o TNF- $\alpha$ . Este aspecto é relevante para os resultados observados, onde a alteração dos níveis de TNF- $\alpha$  no pode estar associado a uma regulação inadequada do NGF, que, ao invés de promover uma neuroproteção eficaz, pode estar exacerbando a inflamação sistêmica.

O Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) é outra neurotrofina fundamental, conhecida por seu papel no desenvolvimento neuronal, plasticidade sináptica e cognição. No entanto, o BDNF também está envolvido na resposta inflamatória. Saghazadeh e Rezaei (2017) relatam que níveis alterados de BDNF estão associados à patogênese do autismo, e que o BDNF pode modular a produção de TNF- $\alpha$  e outras citocinas pró-inflamatórias. Em particular, o BDNF pode atuar como um modulador da inflamação, atenuando ou exacerbando a resposta inflamatória dependendo do contexto e dos níveis de expressão.

A figura 14 (e tabela 5) demonstram os níveis de NGF em três regiões cerebrais: córtex (a), cerebelo (b) e hipocampo (c). Conforme Zhou et al. (2021) a exposição ao VPA pode ter efeitos regionais diferenciados na neuroinflamação, influenciando a expressão de neurotrofinas e citocinas em áreas específicas do cérebro, como o córtex, cerebelo e hipocampo. Os níveis de NGF no córtex (figura 14-a) não apresentam grandes diferenças entre os grupos, demonstrando que nem o VPA e nem o RSV alteram seus níveis nesta região.

No Cerebelo (figura 14-b), o grupo VPA e os grupo VPA+LIP apresentam níveis significativamente mais baixos de NGF (\* $p < 0,01$ ) em comparação com o CT. Isso sugere que a exposição ao VPA, tanto isoladamente quanto combinada com lipossomas, pode reduzir a expressão de NGF no cerebelo, uma região crítica para a coordenação motora e outras funções neurológicas.

No Hipocampo (figura 14-c), os níveis de NGF nesta área cerebral não apresenta diferenças estatísticas entre os grupos avaliados. Novamente demonstrando que nem o VPA e nem o RSV alteram seus níveis nesta região.

Os dados sugerem que a exposição ao VPA pode reduzir os níveis de NGF, particularmente no cerebelo, o que pode estar associado a comprometimentos funcionais nessa região do cérebro. Rizzi et al. (2018) discutem como o NGF pode orientar a micróglia e outras células inflamatórias em direção a um fenótipo neurotóxico em situações de estresse, como o induzido pelo VPA, exacerbando a neuroinflamação.

A desregulação dos níveis de NGF observada no cerebelo, pode exacerbar a neuroinflamação e potencialmente influenciar o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , mas isso não foi observado nos gráficos anteriores.

A figura 15 (e tabela 4) apresentam os níveis de BDNF em três regiões cerebrais: córtex posterior (a), cerebelo (b) e hipocampo (c). Os níveis de BDNF no córtex posterior (figura 15-a) são mais elevados no grupo VPA (\* $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo CT. Já o grupo VPA+LIP apresenta uma diminuição de BDNF (## $p < 0,001$ ) comparado com o grupo VPA. Isso sugere que a administração de lipossomas com VPA (VPA+LIP) pode ter um efeito negativo na modulação dos níveis de BDNF nessa região, o que pode ser prejudicial para a plasticidade sináptica e a função neuronal. Já do contrário, o VPA isolado parece induzir o aumento de BDNF como observado no grupo VPA. Assim a compreensão deste fenômeno deve ser mais estudada.

No cerebelo (figura 15-b) , observa-se uma tendência de redução significativa dos níveis de BDNF no grupo VPA ( $p = 0,09$ ) em comparação com o grupo CT, e contrariamente o tratamento com VPA+LIP mostrou uma tendência de aumento do BDNF em relação ao VPA isolado ( $p = 0,09$ ), mas estas diferenças não são estatisticamente significativas. Isso sugere que o VPA pode ter um efeito modulador nos níveis de BDNF no cerebelo, mas a combinação com lipossomas pode atenuar esse efeito, embora a variação não seja grande.

Já hipocampo, os níveis de BDNF não apresentam diferenças estatísticas significativas demonstrando que nem o VPA e nem o RSV alteram seus níveis nesta região.

O BDNF é uma neurotrofina essencial para a sobrevivência neuronal, plasticidade sináptica e função cognitiva. A desregulação do BDNF, como observada nos diferentes gráficos, pode estar associada a disfunções neurológicas em modelos de autismo induzidos por VPA. Saghazadeh e Rezaei (2017) relatam que o BDNF frequentemente apresenta níveis alterados em condições de neuroinflamação, como as induzidas pelo VPA. A redução de BDNF no cerebelo dos animais tratados com VPA+LIP, como observado no gráfico (b), pode estar relacionada a déficits motores e de coordenação, áreas amplamente afetadas no TEA. Este achado é consistente com a literatura que sugere que intervenções que aumentam os níveis de BDNF podem ter efeitos neuroprotetores em contextos de neuroinflamação.

Lin e Beal (2006) e Shaito et al. (2023) discutem como o estresse oxidativo e a neuroinflamação podem modular negativamente os níveis de BDNF. O VPA, conhecido por aumentar o estresse oxidativo, pode ser responsável pela redução do BDNF no cerebelo e hipocampo, conforme observado nos gráficos da figura 15 a e b. Além disso, a interação entre micróglia e astrócitos, que são ativados em resposta ao VPA, pode exacerbar essa redução, conforme discutido por Bhusal et al. (2023) e Cordiglieri e Farina (2010). A atenuação parcial da redução de BDNF pelo tratamento com lipossomas (VPA+LIP) pode indicar que esses sistemas de entrega foram incapazes de melhorar a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica e protegendo contra a neuroinflamação e o estresse oxidativo induzidos pelo VPA. O que contrariamente é visto quando os níveis de BDNF aumentam no grupo VPA isolado.

A diminuição dos níveis de BDNF no córtex posterior após o tratamento com lipossomas é particularmente relevante, pois sugere que a modulação de BDNF poderia aumentar os efeitos do VPA em modelos de autismo. Laske e Eschweiler (2006) e Skaper (2012) destacam o potencial do BDNF como alvo terapêutico em distúrbios neuropsiquiátricos. A capacidade dos lipossomas de aumentar os níveis de BDNF pode representar uma abordagem promissora para restaurar a plasticidade sináptica e a função neuronal em áreas críticas do cérebro.

Hidema et al. (2020), Sun et al. (2010) e Santos-Terra et al. (2022) demonstram que o RSV pode ter efeitos moduladores sobre a neuroinflamação, influenciando diretamente a expressão de TNF- $\alpha$  e neurotrofinas como NGF e BDNF.

Os resultados apresentados sugerem que a modulação dos níveis de BDNF, especialmente através do uso de lipossomas, pode contrabalançar os efeitos negativos do VPA, ou agrava-los, principalmente no córtex posterior. No entanto, a variação observada entre diferentes regiões cerebrais indica que a eficácia dessa modulação pode ser específica do tecido e influenciada por fatores como a biodisponibilidade e as interações com citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , que já foi discutido.

A correlação entre BDNF, NGF e TNF- $\alpha$  sugere que o VPA causa uma desregulação geral dessas moléculas, promovendo um ambiente neuroinflamatório que prejudica a neuroproteção e a função neuronal: **1)** o aumento de TNF- $\alpha$  observado no soro do grupo VPA+LIP pode estar associado à redução dos níveis de BDNF no cerebelo e hipocampo, conforme sugerido por Lin e Beal (2006). O BDNF, quando reduzido, pode diminuir a capacidade do cérebro de resistir à neuroinflamação, exacerbando a resposta inflamatória mediada por TNF- $\alpha$ .; **2)** a redução de NGF no cerebelo e hipocampo, associada ao aumento de TNF- $\alpha$  no soro, pode indicar uma relação onde a diminuição de neurotrofinas como NGF favorece a ativação microglial e astrócítica, levando a uma maior produção de TNF- $\alpha$ . Rizzi et al. (2018) sugerem que a desregulação de NGF pode contribuir para um ciclo de feedback positivo que exacerba a neuroinflamação.

O tratamento com lipossomas parece ter efeitos moduladores positivos no córtex posterior, onde os níveis de BDNF são aumentados, mas esses efeitos não se estendem uniformemente a todas as regiões cerebrais ou aos níveis de TNF- $\alpha$ . Isso sugere que a eficácia dos lipossomas pode ser regionalmente específica e que suas interações com VPA precisam ser mais bem compreendidas para otimizar os resultados terapêuticos.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo investigou a eficácia do RSV acoplado a nanopartículas de lipossomas como uma intervenção terapêutica em um modelo animal de Transtorno do Espectro Autista (TEA) induzido por exposição pré-natal ao VPA. Os resultados evidenciam que o VPA induziu comportamentos típicos de TEA, como déficits na interação social; aumento da ansiedade e comportamentos repetitivos, bem como alterações neuroinflamatórias e na expressão de neurotrofinas, corroborando sua validade como modelo de autismo.

A intervenção com lipossomas de RSV mostrou potencial terapêutico em mitigar alguns dos efeitos adversos induzidos pelo VPA. Observou-se uma tendência de melhora em parâmetros comportamentais, como a redução dos comportamentos repetitivos e uma modulação parcial dos déficits sociais. Bioquimicamente, o tratamento influenciou a expressão de neurotrofinas como BDNF, especialmente no córtex posterior, sugerindo uma possível recuperação da plasticidade sináptica nesta região.

No entanto, o estudo também revelou limitações da intervenção. A eficácia dos lipossomas de RSV não foi uniforme entre as diferentes regiões cerebrais, e em alguns casos, o tratamento não conseguiu restaurar os comportamentos ao nível do controle. Além disso, os níveis de TNF- $\alpha$  no soro foram tendenciosamente alterados pela combinação de VPA com lipossomas de RSV, sugerindo uma interação complexa entre o composto e as vias inflamatórias que precisa ser mais bem compreendida.

Esses achados destacam a necessidade de otimizar a formulação, biodisponibilidade e administração dos lipossomas de RSV para maximizar seus efeitos terapêuticos. Estudos futuros deverão explorar essas variáveis em maior detalhe, além de investigar a viabilidade de sua aplicação em estudos clínicos. Em suma, este estudo fornece evidências iniciais de que os lipossomas de RSV pode representar uma estratégia promissora no manejo dos sintomas do TEA, mas que ainda requer desenvolvimento e validação adicionais.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGEED, Heidi Mohamed *et al.* Nanoparticles in nanomedicine: a comprehensive updated review on current status, challenges and emerging opportunities. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 414–436, 2021.
- AHMAD, Sheikh F. *et al.* Resveratrol attenuates pro-inflammatory cytokines and activation of JAK1-STAT3 in BTBR T+ Itpr3tf/J autistic mice. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 829, p. 70–78, 2018.
- AJAYI, Ayodeji Folorunsho; AKHIGBE, Roland Eghoghosoa. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. **Fertility Research and Practice**, [s. l.], v. 6, p. 5, 2020.
- AL SAGHEER, Tareq *et al.* Motor Impairments Correlate with Social Deficits and Restricted Neuronal Loss in an Environmental Model of Autism. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 871–882, 2018.
- ALLEN, Theresa M.; CULLIS, Pieter R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 65, n. 1, *Advanced Drug Delivery: Perspectives and Prospects*, p. 36–48, 2013.
- ÁLVAREZ, J. Víctor *et al.* Proteomic Analysis in Morquio A Cells Treated with Immobilized Enzymatic Replacement Therapy on Nanostructured Lipid Systems. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 18, p. 4610, 2019.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5th. ed. Arlington: VA: American Psychiatric Association, 2013.
- ANGOA-PÉREZ, Mariana *et al.* Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, [s. l.], n. 82, p. 50978, 2013.
- ANSELMO, Aaron C.; MITRAGOTRI, Samir. Nanoparticles in the clinic. **Bioengineering & Translational Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 10–29, 2016.
- ANSHU, Kumari *et al.* Altered attentional processing in male and female rats in a prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. **Autism Research: Official Journal of the International Society for Autism Research**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1929–1944, 2017.
- ARCHER, Trevor *et al.* Marble burying and spontaneous motor activity in mice: interactions over days and the effect of diazepam. **Scandinavian Journal of Psychology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 242–249, 1987.
- AWASHRA, Mohammad; MŁYNARZ, Piotr. The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an in vitro metabolomic perspective. **Nanoscale Advances**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 2674–2723, 2023.
- BAIO, Jon *et al.* Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United

States, 2014. **Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C.: 2002)**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 1–23, 2018.

BAMBINI-JUNIOR, Victorio *et al.* Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 583, p. 176–181, 2014.

BARENHOLZ, Yechezkel. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, [s. l.], v. 160, n. 2, p. 117–134, 2012.

BARIBEAU, Danielle; ANAGNOSTOU, Evdokia. Novel treatments for autism spectrum disorder based on genomics and systems biology. **Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 230, p. 107939, 2022.

BELHADJ, Assia *et al.* Methyl Jasmonate Induces Defense Responses in Grapevine and Triggers Protection against *Erysiphe necator*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 54, n. 24, p. 9119–9125, 2006.

BERMAN, Adi Y. *et al.* The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. **npj Precision Oncology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–9, 2017.

BETANCUR, Catalina. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. **Brain Research**, [s. l.], v. 1380, p. 42–77, 2011.

BHANDARI, Ranjana; KUHAD, Anurag. Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 103, p. 8–23, 2017.

BHATT, Priyanka *et al.* Liposomes encapsulating native and cyclodextrin enclosed paclitaxel: Enhanced loading efficiency and its pharmacokinetic evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 536, n. 1, p. 95–107, 2018.

BHUSAL, Anup *et al.* Bidirectional Communication Between Microglia and Astrocytes in Neuroinflammation. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 2020–2029, 2023.

BOSSU, Jean-Louis; ROUX, Sébastien. Les modèles animaux d'étude de l'autisme - Le modèle « valproate ». **médecine/sciences**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 236–243, 2019.

BOVE, Maria *et al.* Amygdalar neurotransmission alterations in the BTBR mice model of idiopathic autism. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 193, 2024.

BRONSON, F. H.; WHITTEN, W. K. Oestrus-Accelerating Pheromone Of Mice: Assay, Androgen-Dependency And Presence In Bladder Urine. **Reproduction**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 131–134, 1968.

BURNS, Jennifer *et al.* Plant foods and herbal sources of resveratrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 3337–3340, 2002.



CARDOSO DOS SANTOS, Marinalva *et al.* Physico-chemical interactions of a new *rod-coil-rod* polymer with liposomal system: Approaches to applications in tryptophan-related therapies. **Chemistry and Physics of Lipids**, [s. l.], v. 235, p. 105027, 2021.

CARUGO, Dario *et al.* Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, p. 25876, 2016.

CDC. **Basics About Autism Spectrum Disorder (ASD) | NCBDDD | CDC**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/facts.html>. Acesso em: 16 maio 2021.

CHALIHA, Devahuti *et al.* A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. **Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 12–48, 2020.

CHATURVEDI, Sachin *et al.* Current analytical approaches for characterizing nanoparticle sizes in pharmaceutical research. **Journal of Nanoparticle Research**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 19, 2024.

CHOMIAK, Taylor; TURNER, Nathanael; HU, Bin. What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid. **Pathology Research International**, [s. l.], v. 2013, p. 712758, 2013.

CHRISTENSEN, Jakob *et al.* Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. **JAMA**, [s. l.], v. 309, n. 16, p. 1696–1703, 2013.

CORA, Michelle C.; KOOISTRA, Linda; TRAVLOS, Greg. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 776–793, 2015.

CORDIGLIERI, Chiara; FARINA, Cinthia. Astrocytes Exert and Control Immune Responses in the Brain. **Current Immunology Reviews**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 150–159, 2010.

CORRELL, Christoph U. *et al.* Efficacy and acceptability of pharmacological, psychosocial, and brain stimulation interventions in children and adolescents with mental disorders: an umbrella review. **World Psychiatry**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 244–275, 2021.

COTTART, Charles-Henry *et al.* Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 7–16, 2010.

CRAWLEY, Jacqueline N. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 248–258, 2004.

DAL BÓ, Alexandre G. *et al.* Self-Assembly of Amphiphilic Glycoconjugates into Lectin-Adhesive Nanoparticles. **Langmuir**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 1418–1426, 2012.

DE CASTRO, Carlos E. *et al.* Sweetness Reduces Cytotoxicity and Enables Faster Cellular Uptake of Sub-30 nm Amphiphilic Nanoparticles. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, [s. l.], v. 35, n. 24, p. 8060–8067, 2019.

DECKMANN, Iohanna *et al.* Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. **Neuroimmunomodulation**, [s. l.], v. 25, n. 5–6, p. 285–299, 2018.

DISSEGNA, Andrea; TURATTO, Massimo; CHIANDETTI, Cinzia. Context-Specific Habituation: A Review. **Animals**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1767, 2021.

DOS SANTOS, Marinalva Cardoso *et al.* Elucidando interações lectina/fosfatidilcolina de *Bauhinia variegata* em lipossomas contendo lectina. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 519, p. 232–241, 2018.

ELLEGOOD, Jacob; CRAWLEY, Jacqueline N. Behavioral and Neuroanatomical Phenotypes in Mouse Models of Autism. **Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 521–533, 2015.

ELNAHAS, Esraa M. *et al.* Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: A behavioral and neurobiological study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 108, p. 110185, 2021.

FENG, Simin *et al.* Co-encapsulation of resveratrol and epigallocatechin gallate in low methoxyl pectin-coated liposomes with great stability in orange juice. **International Journal of Food Science & Technology**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 1872–1880, 2020.

FEUSER, Paulo Emilio *et al.* Co-encapsulation of sodium diethyldithiocarbamate (DETC) and zinc phthalocyanine (ZnPc) in liposomes promotes increases phototoxic activity against (MDA-MB 231) human breast cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 197, p. 111434, 2021.

FONTES-DUTRA, Mellanie *et al.* Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, [s. l.], v. 10, p. 9, 2018.

FRASCH, Martin G. *et al.* Autism Spectrum Disorder: A Neuro-Immunometabolic Hypothesis of the Developmental Origins. **Biology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 914, 2023.

GALVEZ-CONTRERAS, Alma Y. *et al.* Alterations of Growth Factors in Autism and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 8, 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/psychiatry/articles/10.3389/fpsy.2017.00126/full>. Acesso em: 18 jul. 2024.

GE, Xuemei *et al.* Advances of Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) and Their Application in Drug Delivery. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 55, 2019.

GENOVESE, Ann; BUTLER, Merlin G. Clinical Assessment, Genetics, and Treatment Approaches in Autism Spectrum Disorder (ASD). **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 13, p. 4726, 2020.

GLOWINSKI, Jacques; AXELROD, Julius; IVERSEN, Leslie L. Regional Studies of Catecholamines in the Rat Brain. Iv. Effects of Drugs on the Disposition and Metabolism of H<sup>3</sup>-Norepinephrine and H<sup>3</sup>-Dopamine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 153, n. 1, p. 30–41, 1966.

GREGORY, Estelle H.; PFAFF, Donald W. Development of olfactory-guided behavior in infant rats. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 573–576, 1971.

HIDEMA, Shizu *et al.* Single administration of resveratrol improves social behavior in adult mouse models of autism spectrum disorder. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s. l.], v. 84, n. 11, p. 2207–2214, 2020.

HILL, Joanna M.; LIM, Maria A.; STONE, Madeleine M. Developmental Milestones in the Newborn Mouse. *In*: GOZES, Illana (org.). **Neuropeptide Techniques**. Totowa, NJ: Humana Press, 2008. p. 131–149. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-099-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-099-1_10). Acesso em: 13 ago. 2024.

HORQUINI BARBOSA, Everton *et al.* Assessments of Motor Abnormalities on the Grid-Walking and Foot-Fault Tests From Undernutrition in Wistar Rats. **Journal of Motor Behavior**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 5–12, 2016.

HOU, Qianling *et al.* A Developmental Study of Abnormal Behaviors and Altered GABAergic Signaling in the VPA-Treated Rat Model of Autism. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 12, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/behavioral-neuroscience/articles/10.3389/fnbeh.2018.00182/full>. Acesso em: 6 ago. 2024.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, p. 677–736, 2001.

HUGHES, H. K.; MORENO, R. J.; ASHWOOD, P. Innate Immune Dysfunction and Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder (ASD). **Focus (American Psychiatric Publishing)**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 229–241, 2024.

HYMAN, Susan L. *et al.* Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. **Pediatrics**, [s. l.], v. 145, n. 1, p. e20193447, 2020.

KAIDANOVICH-BEILIN, Oksana *et al.* Assessment of Social Interaction Behaviors. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, [s. l.], n. 48, p. 2473, 2011.

KANÁSOVÁ, Mária; NESMĚRÁK, Karel. Systematic review of liposomes' characterization methods. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, [s. l.], v. 148, n. 9, p. 1581–1593, 2017.

KASHYAP, Mahendra Pratap *et al.* Drug Targets in Neurotrophin Signaling in the Central and Peripheral Nervous System. **Molecular neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 6939–6955, 2018.

KAUR, Arshpreet *et al.* Resveratrol: A Vital Therapeutic Agent with Multiple Health Benefits. **Drug Research**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 5–17, 2022.

KIM, Ki Chan *et al.* Clinical and Neurobiological Relevance of Current Animal Models of Autism Spectrum Disorders. **Biomolecules & Therapeutics**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 207–243, 2016.

KOLB, Hartmuth C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. Barry. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 2004–2021, 2001.

KOMADA, Munekazu; NISHIMURA, Yuhei. Epigenetics and Neuroinflammation Associated With Neurodevelopmental Disorders: A Microglial Perspective. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 10, p. 852752, 2022.

KOYAMA, Ryuta; IKEGAYA, Yuji. Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders. **Neuroscience Research**, [s. l.], v. 100, p. 1–5, 2015.

KROETZ, Thais *et al.* Proton transfer in fluorescent secondary amines: synthesis, photophysics, theoretical calculation and preparation of photoactive phosphatidylcholine-based liposomes. **Photochemical & Photobiological Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 1171–1184, 2019.

LAI, Meng-Chuan; LOMBARDO, Michael V.; BARON-COHEN, Simon. Autism. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 383, n. 9920, p. 896–910, 2014a.

LAI, Meng-Chuan; LOMBARDO, Michael V.; BARON-COHEN, Simon. Autism. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 383, n. 9920, p. 896–910, 2014b.

LASKE, C.; ESCHWEILER, G. W. Brain-derived neurotrophic factor. **Der Nervenarzt**, [s. l.], v. 77, n. 5, p. 523–537, 2006.

LI, Yayong *et al.* Nano-Resveratrol Liposome: Physicochemical Stability, In Vitro Release, and Cytotoxicity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 195, n. 10, p. 5950–5965, 2023.

LIANG, Chunmei *et al.* MicroRNA-146a switches microglial phenotypes to resist the pathological processes and cognitive degradation of Alzheimer's disease. **Theranostics**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 4103–4121, 2021.

LIMA GIACOBBO, Bruno *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor in Brain Disorders: Focus on Neuroinflammation. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 3295–3312, 2019.

LIN, Michael T.; BEAL, M. Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, [s. l.], v. 443, n. 7113, p. 787–795, 2006.

LORD, Catherine *et al.* Autism spectrum disorder. **Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10146, p. 508–520, 2018.

LUCACI, Alexander G. *et al.* The evolution of BDNF is defined by strict purifying selection and prodomain spatial coevolution, but what does it mean for human brain disease?. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 258, 2022.

MABUNGA, Darine Froy N. *et al.* Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. **Experimental Neurobiology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 285–300, 2015.

MAENNER, Matthew J. 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**, [s. l.], v. 70, 2021. Disponível em: [https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/ss/ss7011a1.htm?s\\_cid=ss7011a1\\_w](https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/ss/ss7011a1.htm?s_cid=ss7011a1_w). Acesso em: 16 jun. 2022.

MALAGUARNERA, Michele; KHAN, Haroon; CAULI, Omar. Resveratrol in Autism Spectrum Disorders: Behavioral and Molecular Effects. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 188, 2020.

MARCHLEWSKA-KOJ, Anna *et al.* Stimulation of Estrus in Female Mice by Male Urinary Proteins. **Journal of Chemical Ecology**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 2355–2366, 2000.

MASI, Anne *et al.* An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. **Neuroscience Bulletin**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 183–193, 2017.

MCLEAN, Ashleigh C. *et al.* Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, [s. l.], n. 67, p. 4389, 2012.

MERCHIE, Annabelle; GOMOT, Marie. Habituation, Adaptation and Prediction Processes in Neurodevelopmental Disorders: A Comprehensive Review. **Brain Sciences**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1110, 2023.

MICHELETTO, Yasmine Miguel Serafini *et al.* Investigação da autoassociação entre o novo glicosurfactante *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminil-PEG-docosanato e fosfatidilcolina de soja em vesículas. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 467, p. 166–172, 2015.

MIJAJLOVIC, M. *et al.* Microfluidic hydrodynamic focusing based synthesis of POPC liposomes for model biological systems. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, [s. l.], v. 104, p. 276–281, 2013.

MORGAN, John T. *et al.* Stereological study of amygdala glial populations in adolescents and adults with autism spectrum disorder. **PloS One**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. e110356, 2014.

MORGAN, Michael J.; LIU, Zheng-gang. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. **Cell Research**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 103–115, 2011.

MOTTRON, Laurent; BZDOK, Danilo. Autism spectrum heterogeneity: fact or artifact?. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 25, n. 12, p. 3178–3185, 2020.

MOTZ, Benjamin A.; ALBERTS, Jeffrey R. The validity and utility of geotaxis in young rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 529–533, 2005.

NICOLINI, Chiara; FAHNESTOCK, Margaret. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 299, n. Pt A, p. 217–227, 2018.

NIMMERJAHN, Axel; KIRCHHOFF, Frank; HELMCHEN, Fritjof. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 308, n. 5726, p. 1314–1318, 2005.

NUMAKAWA, Tadahiro; KAJIHARA, Ryutaro. Involvement of brain-derived neurotrophic factor signaling in the pathogenesis of stress-related brain diseases. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 16, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/molecular-neuroscience/articles/10.3389/fnmol.2023.1247422/full>. Acesso em: 18 jul. 2024.

PATRA, Jayanta Kumar *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 16, p. 71, 2018.

PEER, Dan *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, [s. l.], v. 2, n. 12, p. 751–760, 2007.

POSAR, Annio; VISCONTI, Paola. Autism in 2016: the need for answers. **Jornal De Pediatria**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 111–119, 2017.

POSAR, Annio; VISCONTI, Paola. Autism Spectrum Disorder in 2023: A Challenge Still Open. **Turkish Archives of Pediatrics**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 566–571, 2023.

RAMÍREZ-MENDOZA, Abraham Alberto *et al.* Nitrooxidative Stress and Neuroinflammation Caused by Air Pollutants Are Associated with the Biological Markers of Neurodegenerative Diseases. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 326, 2024.

RANDOLPH-GIPS, Mary; SRINIVASAN, Pramila. Modeling autism: a systems biology approach. **Journal of Clinical Bioinformatics**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 17, 2012.

RICCI, S. *et al.* Altered Cytokine and BDNF Levels in Autism Spectrum Disorder. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 491–501, 2013.

RIZZI, Caterina *et al.* NGF steers microglia toward a neuroprotective phenotype. **Glia**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 1395–1416, 2018.

ROBERT, Hannah *et al.* Rodent Estrous Cycle Monitoring utilizing Vaginal Lavage: No Such Thing As a Normal Cycle. **Journal of visualized experiments: JoVE**, [s. l.], n. 174, p. 10.3791/62884, 2021.

ROULLET, Florence I.; LAI, Jonathan K. Y.; FOSTER, Jane A. In utero exposure to valproic acid and autism--a current review of clinical and animal studies. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], v. 36, p. 47–56, 2013.

ROUSSIN, Léa *et al.* Role of the Gut Microbiota in the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder: Clinical and Preclinical Evidence. **Microorganisms**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1369, 2020.

RUHELA, Rakesh K *et al.* Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. **Annals of Neurosciences**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 25–31, 2019.

SAGHAZADEH, Amene; REZAEI, Nima. Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Autism: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 1018–1029, 2017.

SANCHACK, Kristian E.; THOMAS, Craig A. Autism Spectrum Disorder: Primary Care Principles. **American Family Physician**, [s. l.], v. 94, n. 12, p. 972-979A, 2016.

SANTOS-TERRA, Júlio *et al.* Resveratrol Prevents Cytoarchitectural and Interneuronal Alterations in the Valproic Acid Rat Model of Autism. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 4075, 2022.

SARDJONO, Teguh Wahyu *et al.* The Use of Natural Phenomenon in Obtaining Pregnant Rats and Mice as Experimental Animals with The Same Gestational Ages. **Journal of Tropical Life Science**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 229–235, 2019.

SCHEGGI, Simona *et al.* Targeting PPAR $\alpha$  in the rat valproic acid model of autism: focus on social motivational impairment and sex-related differences. **Molecular Autism**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 62, 2020.

SCHLICKMANN, Eloise; FORTUNATO, Jucélia Jeremias. O uso de ácido valproico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 151–159, 2013.

SCHNEIDER, Tomasz; PRZEWŁOCKI, Ryszard. Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005.

SCHWINGEL, Gustavo Brum *et al.* Preventive effects of resveratrol against early-life impairments in the animal model of autism induced by valproic acid. **IBRO neuroscience reports**, [s. l.], v. 15, p. 242–251, 2023.

SEARLES QUICK, Veronica B.; WANG, Belinda; STATE, Matthew W. Leveraging large genomic datasets to illuminate the pathobiology of autism spectrum disorders. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 55–69, 2021.

SHAITO, Abdullah *et al.* Resveratrol-Mediated Regulation of Mitochondria Biogenesis-associated Pathways in Neurodegenerative Diseases: Molecular Insights and Potential Therapeutic Applications. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 1184–1201, 2023.

SHANG, Li; NIENHAUS, Karin; NIENHAUS, Gerd Ulrich. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 12, p. 5, 2014.

SHARMA, Amit Raj *et al.* “Comparative evaluation of different chemical agents induced Autism Spectrum Disorder in experimental Wistar rats”. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 458, p. 114728, 2024.

SHAW, Kelly A. Early Identification of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 4 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. **MMWR. Surveillance Summaries**, [s. l.], v. 70, 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/ss/ss7010a1.htm>. Acesso em: 16 jun. 2022.

SHAYGANFARD, Mehran. Molecular and biological functions of resveratrol in psychiatric disorders: a review of recent evidence. **Cell & Bioscience**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 128, 2020.

SINGH, Gurinder. Resveratrol: Nanocarrier-Based Delivery Systems to Enhance its Therapeutic Potential. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 15, n. 28, p. 2801–2817, 2020.

SKAPER, Stephen D. Neurotrophic Factors: An Overview. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 1727, p. 1–17, 2018.

SKAPER, Stephen D. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 846, p. 1–12, 2012.

SPANEDDA, Maria Vittoria *et al.* Click Chemistry for Liposome Surface Modification. *In*: D'SOUZA, Gerard G.M.; ZHANG, Hongwei (org.). **Liposomes: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2023. p. 173–189. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2954-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2954-3_15). Acesso em: 23 set. 2024.

STERVBO, Ulrik; VANG, Ole; BONNESEN, Christine. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 101, n. 2, p. 449–457, 2007.

STETEFELD, Jörg; MCKENNA, Sean A.; PATEL, Trushar R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016.

SUN, Albert Y. *et al.* Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 41, n. 2–3, p. 375–383, 2010.

SUPEKAR, Kaustubh *et al.* Deep learning identifies robust gender differences in functional brain organization and their dissociable links to clinical symptoms in autism. **The British Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 220, n. 4, p. 202–209, 2022.

TAKUMA, K. *et al.* Developmental disorders and prefrontal cortical pathology. **Journal of Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 128, n. 3, p. S60, 2015.

TAKUMI, Toru *et al.* Behavioral neuroscience of autism. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 110, p. 60–76, 2020.

TALANTSEVA, Oksana I. *et al.* The global prevalence of autism spectrum disorder: A three-level meta-analysis. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 14, p. 1071181, 2023.

TALEB, Abdoh *et al.* Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in autism and its implications for pharmacological treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 137, p. 111322, 2021.



TARTAGLIONE, Anna Maria *et al.* Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 159, p. 107477, 2019.

THAN, Uyen Thi Trang *et al.* Inflammatory mediators drive neuroinflammation in autism spectrum disorder and cerebral palsy. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 22587, 2023.

TIBERI, Alexia *et al.* Reduced levels of NGF shift astrocytes toward a neurotoxic phenotype. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 11, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2023.1165125/full>. Acesso em: 24 jul. 2024.

TORDJMAN, S. *et al.* Repint of “Reframing autism as a behavioral syndrome and not a specific mental disorder: Implications of genetic and phenotypic heterogeneity”. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 89, p. 132–150, 2018.

TOSCANO, Chrystiane V. A. *et al.* Neuroinflammation in autism spectrum disorders: Exercise as a “pharmacological” tool. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 129, p. 63–74, 2021.

USUI, Noriyoshi; KOBAYASHI, Hikaru; SHIMADA, Shoichi. Neuroinflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 5487, 2023.

VESELINOVIĆ, Aleksandra *et al.* Neuroinflammation in Autism and Supplementation Based on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: A Narrative Review. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, [s. l.], v. 57, n. 9, p. 893, 2021.

VESTERGAARD, Martin; INGMER, Hanne. Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 716–723, 2019.

VIJAYAKUMAR, Mahalingam Rajamanickam *et al.* Farmacocinética, biodistribuição, citotoxicidade *in vitro* e biocompatibilidade de lipossomas de trans resveratrol revestidos com vitamina E TPGS. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 145, p. 479–491, 2016.

VORSTMAN, Jacob A. S. *et al.* Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 362–376, 2017.

WANG, Yan *et al.* An LC-MS Method for Analyzing Total Resveratrol in Grape Juice, Cranberry Juice, and in Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 431–435, 2002.

WHITTEN, W. K. Modification Of The Oestrous Cycle Of The Mouse By External Stimuli Associated With The Male. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 307–313, 1958.

WÖLFL, Simon; ZALA, Sarah M.; PENN, Dustin J. Male scent but not courtship vocalizations induce estrus in wild female house mice. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 259, p. 114053, 2023.

WULTZ, B. *et al.* The spontaneously hypertensive rat as an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate on exploratory behavior. **Behavioral and Neural Biology**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 88–102, 1990.

XIE, Weiguo *et al.* Resveratrol ameliorates prenatal progestin exposure-induced autism-like behavior through ER $\beta$  activation. **Molecular Autism**, [s. l.], v. 9, p. 43, 2018.

XIONG, Sha *et al.* Enhancement of oral bioavailability and anti-Parkinsonian efficacy of resveratrol through a nanocrystal formulation. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 518–528, 2020.

XIONG, Yue; CHEN, Jianhui; LI, Yingbo. Microglia and astrocytes underlie neuroinflammation and synaptic susceptibility in autism spectrum disorder. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 17, p. 1125428, 2023.

YENKOYAN, Konstantin *et al.* Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 331, p. 92–101, 2017.

YUAN, Dan *et al.* Opportunities and challenges in enhancing the bioavailability and bioactivity of dietary flavonoids: A novel delivery system perspective. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 430, p. 137115, 2024.

ZAMBRELLI, Elena *et al.* Effects of Supplementation With Antioxidant Agents on Sleep in Autism Spectrum Disorder: A Review. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 12, p. 689277, 2021.

ZEIDAN, Jinan *et al.* Global prevalence of autism: A systematic review update. **Autism Research**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 778–790, 2022.

ZHANG, Yinghua *et al.* N-acetylcysteine ameliorates repetitive/stereotypic behavior due to its antioxidant properties without activation of the canonical Wnt pathway in a valproic acid-induced rat model of autism. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 2233–2240, 2017.

ZHANG, Pan *et al.* Neuron-specific transcriptomic signatures indicate neuroinflammation and altered neuronal activity in ASD temporal cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 120, n. 10, p. e2206758120, 2023.

ZHANG, Li-Nan *et al.* Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. **Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 161–165, 2015.

ZHANG, Feng *et al.* Resveratrol Produces Neurotrophic Effects on Cultured Dopaminergic Neurons through Prompting Astroglial BDNF and GDNF Release. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, [s. l.], v. 2012, p. 937605, 2012.

ZHOU, Jian. *et al.* Resveratrol Improves Mitochondrial Biogenesis Function and Activates PGC-1 $\alpha$  Pathway in a Preclinical Model of Early Brain Injury Following

Subarachnoid Hemorrhage. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 8, p. 620683, 2021.

ZYOUNG, Sa'ed H. *et al.* Gut microbiota and autism spectrum disorders: where do we stand?. **Gut Pathogens**, [s. l.], v. 15, p. 50, 2023.

## **ANEXOS**



**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 **27/02/2024**.

<b>Título do projeto</b>	Investigação do potencial terapêutico de lipossomas carregados com resveratrol no tratamento do transtorno do espectro autista.
<b>Project title</b>	Investigation of the therapeutic potential of liposomes loaded with resveratrol in the treatment of autism spectrum disorder.
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	07/2023
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	<b>Cinara Ludvig Gonçalves</b>
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Adele Martinez de Luca, Camila Jacoby Klein, Flávia da Silva Darós, Gustavo Zanette Fernandes, José Marcelo Botacin Campos, Maiara de Aguiar da Costa, Maria Carolina Marciano Campos de Souza, Nathan de Souza Colonetti, Rosiane Ronchi Nascimento Costa, Simone Lespinnasse Araujo, Sofia Januário Bolan, Gizela Judith da Silva do Nascimento Neto, Victória Linden de Rezende, Germano Lapa Viana, Giseli da Silva, Maria Julia Ferro, Rafaela Roque Caetano.
<b>Finalidade</b>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	15/03/2023 a 15/11/2024
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico / <i>Wistar</i>
<b>Idade/Peso</b>	60 dias / 250 – 300g
<b>Número de animais</b>	Masculino 15 + Feminino 15
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico / <i>Wistar</i>
<b>Idade/Peso</b>	1 dia / 10g
<b>Número de animais</b>	Masculino 40
<b>Total</b>	70
<b>Procedência</b>	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma-SC, 27 de fevereiro de 2024.

  
 Josiane Budni Coordenadora da CEUA

