



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

*ÊMERSON DE OLIVEIRA FERREIRA*

ARIPRAZOL PROTEGE CAMUNDONGOS JOVENS DO COMPORTAMENTO  
AUTISTA-SÍMILE E DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS POR TRATAMENTO  
MATERNO COM ÁCIDO VALPRÓICO

**FORTALEZA**

**2021**

*ÉMERSON DE OLIVEIRA FERREIRA*

ARIPIRAZOL PROTEGE CAMUNDONGOS JOVENS DO COMPORTAMENTO  
AUTISTA-SÍMILE E DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS POR TRATAMENTO  
MATERNO COM ÁCIDO VALPRÓICO

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador (a): Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F44a Ferreira, Emerson de Oliveira.

Aripiprazol protege camundongos jovens do comportamento autista-símile e déficits de memória induzidos por tratamento materno com ácido valproico / Emerson de Oliveira Ferreira. – 2022.  
119 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

1. Autismo. 2. Aripiprazol. 3. Memória. 4. Ácido valproico. 5. Neuroproteção. I. Título.

CDD 610

---

*ÉMERSON DE OLIVEIRA FERREIRA*

ARIPIRAZOL PROTEGE CAMUNDONGOS JOVENS DO  
COMPORTAMENTO AUTISTA-SÍMILE E DÉFICITS DE MEMÓRIA  
INDUZIDOS POR TRATAMENTOMATerno COM ÁCIDO VALPRÓICO

Tese submetida à Coordenação do curso de Pós- graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador (a): Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

Tese aprovada em 26/05/2021

---

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Danielle Macedo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Alexandre Menezes Sampaio  
Unichristus

---

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

---

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais,  
Erialdo e Josélia.

## AGRADECIMENTOS

Jesus Cristo, Tu tens cumulado a minha vida de graça. A Ti a minha eterna gratidão e adoração.

Meus pais, Erialdo e Josélia, meus exemplos de luta e determinação. O sim de vocês a Deus me trouxe a vida. Obrigado pelo lar, pela a educação e por acreditarem nos meus planos. Pai, amo você. Mãe, amo você.

Meus irmãos, Erialdo e Larice, estamos juntos! Amo vocês.

Minha família e amigos, eu tenho apreço incondicional por cada um. Gratidão!

Minha estimada orientadora, Prof<sup>a</sup>. Geanne, eu agradeço pelo seu “sim”, pela sua confiança investida em mim. A senhora é especial.

Mara, Arnaldo e Kelly Rose, obrigado pela a força e companheirismo.

Aos demais colegas de laboratório, eu reconheço que de forma direta ou indireta, todos contribuíram para essa conquista. A todos, os meus sinceros agradecimentos.

*“Não a nós, Senhor, não a nós, mas ao  
Vosso nome dai glória, por amor de  
Vossa misericórdia e fidelidade.”  
Salmos 115-1.*

## RESUMO

FERREIRA, E.O. ARIPIPAZOL PROTEGE CAMUNDONGOS JOVENS DO COMPORTAMENTO AUTISTA-SÍMILE E DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS POR TRATAMENTO MATERNO COM ÁCIDO VALPRÓICO.

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits na comunicação social e comportamentos repetitivos. O aripiprazol (APZ) é um antipsicótico atípico que diminui o comportamento autista-símile induzido pelo ácido valpróico-VPA em camundongos. No presente estudo foi examinado os efeitos do tratamento materno com APZ (10 mg/kg, i.p.) em camundongos jovens expostos no período pré-natal ao VPA. Para isso, camundongos *Swiss* fêmeas (n=8) foram acasaladas com machos (n=8) em gaiolas separadas (1 casal por gaiola = 8 casais) durante o período reprodutivo (6-8 semanas de idade) e distribuídos na seguinte ordem de tratamentos: Veículo (V); V + APZ; VPA e VPA + APZ. Lavados vaginais foram coletados todas as manhãs para análise citológica, e a presença de espermatozoides foi considerada o primeiro dia de gestação (DG). No 11,5° e no 12° dias gestacionais, as fêmeas prenhes do grupo V receberam solução salina 0,9%, (i.p.) e as do grupo V+APZ, receberam soro fisiológico 0,9% + APZ (10 mg/kg), (i.p.). As fêmeas gestantes dos grupos VPA e VPA+APZ receberam VPA (500 mg/kg, i.p.) no 12,5° dia para a indução do modelo animal de autismo e o grupo VPA+APZ, duas doses preventivas de Aripiprazol (10 mg/kg, i.p.); a primeira dose no 11,5° dia e a segunda dose no 12° dia. Nesse mesmo grupo, foi administrado VPA (500 mg/kg, i.p.) no 12,5° dia. As proles provenientes dessas parturições foram analisadas em testes comportamentais relacionados ao neurodesenvolvimento, interação social, comunicação, estereotipias, memória e ansiedade. No córtex pré-frontal medial (CPFm) e hipocampo, foram avaliados a viabilidade neuronal, os níveis de dopamina, as expressões de Sinaptofisina (Syp), da Proteína Associada ao Sinaptossoma de 25kDa (SNAP-25) e da Proteína Associada ao Microtúbulo 2 (MAP-2). Além disso, foi avaliada uma possível interferência do APZ no efeito anticonvulsivante do VPA, usando o modelo de convulsão induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). O tratamento materno com APZ preveniu significativamente a perda de peso corporal, o atraso no auto-endireitamento postural e a abertura dos olhos. O APZ também evitou os déficits de interações e comunicações sociais avaliados no *juvenile play test*, no aparato de três câmaras e no teste que envolve odores (teste olfatório em paradigma discriminativo e teste do cheiro materno). Em relação a estereotipia, o APZ preveniu significativamente os animais dos comportamento repetitivo, obsessivo e ansiogênico induzidos pelo VPA. No que se refere à memória, o APZ preveniu os camundongos expostos ao VPA, dos déficits de memória de trabalho (teste do labirinto em Y) e de memória aversiva (teste da esQUIVA passiva). O APZ preveniu significativamente a morte neuronal e a diminuição dos níveis de dopamina no CPFm, e preveniu a redução da viabilidade celular e da imunorreatividade para Sinaptofisina, SNAP-25 e MAP-2 no CPFm e no hipocampo. Além disso, o APZ (10 mg/kg) não interferiu com o efeito anticonvulsivante do VPA (15 mg/kg) em animais com convulsões induzidas por PTZ. Concluimos que o tratamento com APZ em camundongos prenhes expostos ao VPA protege a prole da indução do fenótipo comportamental semelhante ao TEA e este efeito pode estar relacionado, pelo menos em parte, ao aumento da função dopaminérgica, à proteção neuronal e plasticidade sináptica no CPFm e hipocampo. O APZ pode servir

como um alvo terapêutico eficaz na prevenção do comportamento autista induzido pelo tratamento com VPA durante a gravidez.

**Palavras-chave:** Ácido valpróico (VPA). Transtorno do Espectro Autista (TEA). Aripiprazol. Neuroproteção. Memória. Plasticidade sináptica.

## ABSTRACT

FERREIRA, E.O. ARIPIRAZOLE PROTECTS JUVENILE MICE FROM AUTISTIC-SIMILAR BEHAVIOR AND MEMORY DEFICITS INDUCED BY MATERNAL TREATMENT WITH VALPROIC ACID.

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by deficits in social communication and repetitive behaviors. Aripiprazole (APZ) is an atypical antipsychotic that decreases the autistic-like behavior induced by valproic acid-VPA in mice. In the present study, the effects of maternal APZ treatment (10 mg / kg, i.p.) on young mice exposed in the prenatal period to VPA were examined. For this, female Swiss mice (n = 8) were mated with males (n = 8) in separate cages (1 couple per cage = 8 couples) during the reproductive period (6-8 weeks of age) and distributed to Vehicle (V); V + APZ; VPA and VPA + APZ. Vaginal lavages were collected every morning for cytological analysis, and the presence of sperm was considered the first day of pregnancy “gestational day” (GD). On the 11.5th and 12th gestational days, pregnant females of V group received 0.9% saline (ip) and V + APZ group received 0.9% saline + APZ (10 mg/kg), (ip). The pregnant females of the VPA and VPA + APZ groups received VPA (500 mg/kg, ip) on the 12th day for the induction of the animal model of autism and the VPA + APZ group, two preventive doses of Aripiprazole (10 mg/kg, ip); the first dose on the 11.5th day and the second dose on the 12th day. In this same group, VPA (500 mg/kg, i.p.) was administered on the 12,5th day. The offspring from these parturitions were analyzed in behavioral tests related to neurodevelopment, social interaction, communication, stereotypes, memory and anxiety. In the medial prefrontal cortex (mPFC) and hippocampus, neuronal viability, dopamine levels, expressions of Synaptophysin (Synp), 25kDa Synaptosome Associated Protein (SNAP-25) and Microtubule-Associated Protein 2 were evaluated (MAP-2). In addition, a possible interference of APZ in the anticonvulsant effect of VPA was evaluated, using the pentylenetetrazole-induced seizure model (PTZ). Maternal treatment with APZ significantly prevented body weight loss, delayed postural self-straightening and eye opening. APZ also avoided the deficits in interactions and social communications assessed in the juvenile play test, in the three-chamber apparatus and in the test involving odors (olfactory test in discriminative paradigm and maternal smell test). Regarding stereotypy, APZ significantly prevented animals from repetitive, obsessive and anxiogenic behavior induced by VPA. With regard to memory, APZ prevented mice exposed to VPA, from deficits in working memory (Y-labyrinth test) and aversive memory (passive avoidance test). APZ significantly prevented neuronal death and decreased dopamine levels in mCFP, and prevented reduced cell viability and immunoreactivity for synaptophysin, SNAP-25 and MAP-2 in mCFP and the hippocampus. In addition, APZ (10 mg / kg) did not interfere with the anticonvulsant effect of VPA (15 mg / kg) in animals with PTZ-induced seizures. We conclude that treatment with APZ in pregnant mice exposed to VPA protects the offspring from inducing the behavioral phenotype similar to TEA and this effect may be related, at least in part, to increased dopaminergic function, neuronal protection and synaptic plasticity in CPFm and hippocampus. APZ can serve as an effective therapeutic target in preventing autistic behavior induced by treatment with VPA during pregnancy.

**Keywords:** Autism spectrum disorder (ASD); valproic acid; aripiprazole; pentylenetetrazole; neuroprotection, synaptic plasticity, prefrontal cortex; hippocampus.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01.** Tradicionais áreas funcionais descritas em 1909 por Korbinian Brodmann, na espécie humana.

**Figura 02.** Representação do cérebro humano e ilustração esquemática das áreas de Brodmann (BAs) no CPF.

**Figura 03.** Representação do cérebro humano com as ilustrações de divisões funcionais comuns do CPF.

**Figura 04.** Representação do cérebro de camundongo com ilustração esquemática das subdivisões do CPF.

**Figura 05.** Representação do cérebro de camundongo com ilustração esquemática das subdivisões do CPF e do hipocampo.

**Figura 06.** Representação da formação e circuito hipocampal.

**Figura 07.** Representação da classificação filogenética cortical do cérebro.

**Figura 08.** Representação do hipocampo em humanos e roedores.

**Figura 09.** Estrutura molecular do aripiprazol.

**Figura 10.** Desenho experimental.

**Figura 11.** Arena de campo aberto para a testagem de abordagem social juvenil.

**Figura 12.** Aparato de três câmaras para o teste de abordagem social.

**Figura 13.** Câmara para o teste olfativo com um paradigma discriminativo.

**Figura 14.** Arena de teste de preferência pelo o cheiro materno.

**Figura 15.** Aparelho de esquiva passiva.

**Figura 16.** Aparato de *Y-maze*.

**Figura 17.** Labirinto em cruz elevado.

**Figura 18.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne a diminuição de peso em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 19.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne atraso no comportamento de auto-endireitamento postural em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 20.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne atraso na abertura dos olhos em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 21.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne os déficits sociais no teste de brincadeiras juvenis em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 22.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne os déficits sociais no aparato de três câmaras em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 23.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne os déficits de comunicação social no teste olfatório em paradigma discriminativo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 24.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne os déficits de comunicação social no teste da preferência pelo o cheiro materno em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 25.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o comportamento repetitivo em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 26.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o déficit de memória aversiva em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 27.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o déficit de memória de trabalho em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 28.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) alivia a ansiedade em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 30.** O tratamento materno com APZ (10 mg / kg) previne a morte celular no CPFm e no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 31.** Fotomicrografia representativa da coloração de Nissl em secções coronais do CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 32.** Fotomicrografia representativa da coloração de Nissl em secções coronais do hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 33.** Fotomicrografia representativa da imunomarcção para Syp em secções coronais do CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 34.** Fotomicrografia representativa da imunomarcção para Syp em secções coronais do hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 35.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) preveniu a redução da expressão de Syp no córtex pré-frontal medial de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 36.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) preveniu a redução da expressão de Syp na região CA1 hipocampal de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 37.** Fotomicrografia representativa da imunomarcação para SNAP-25 em sec es coronais do CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 38.** Fotomicrografia representativa da imunomarcação para SNAP-25 em sec es coronais do hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 39.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) preveniu a redução da expressão de SNAP-25 no córtex pré-frontal medial de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 40.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) preveniu a redução da expressão de SNAP-25 na região CA1 e GD do hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 41.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) preveniu a redução da expressão de MAP-2 no CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 42.** Fotomicrografia representativa da imunomarcação para MAP-2 em sec es coronais do CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

**Figura 43.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) não influenciou sobre o efeito anticonvulsivante do VPA (15 mg/kg) no modelo de convulsão induzida por PTZ em animais.

**Figura 44.** Modelo hipotético proposto para sítio de a o do APZ no modelo de autismo-símile em camundongos expostos ao VPA no período pré-natal.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**μL** - Microlitros

**μM** - Micromolar

**AMPA** - Ácido amino-3-hidroxi-5-metil-isoxasole-propiónico

**ATP** - Trifosfato de Adenosina

**APZ** - Aripiprazol

**CypD** - Cyclophilina D

**DNA** - Ácido Dextrorribonucléico

**EPM** - Erro Padrão Médio

**HTAB** - Brometo de cetiltrimetil amônio

**i.p.** - Intraperitoneal

**kg** - Kilograma

**LTP** - Potenciação de longa duração

**mg** - Miligramas

**min** - Minutos

**mL** - Mililitros

**mM** - Milimolar

**NaCl** - Cloreto de sódio

**Nm** - Nanômetro

**NMDA** - N-Metil-D-Aspartato

**PTZ** - Petilenotetrazol

**RNA<sub>m</sub>** - Ácido Ribonucléico mensageiro

**RPM** - Rotações por minuto

**s** - Segundos

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**V** - Veículo

**v.o** - Via oral

**TEA** - Transtorno do Espectro Autista

**VPA** - Ácido valpróico

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01.** Critérios de diagnóstico para Transtorno do Espectro Autista.

**Tabela 02.** Níveis de gravidade para Transtorno do Espectro Autista.

**Tabela 03.** Evidências para o uso de medicamentos no Transtorno do Espectro Autista.

**Tabela 04.** Subtipos de modelo animais geneticamente modificados e idiopáticos de TEA com os seus respectivos fenótipos comportamentais.

**Tabela 05.** Distribuição e protocolo de tratamentos dos animais.

**Tabela 06.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) não influenciou sobre o efeito anticonvulsivante do VPA (15 mg/kg) no modelo de convulsão induzida por PTZ em animais.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 Visão histórica</b> .....	18
<b>1.2 Transtorno do Espectro Autista (TEA)</b> .....	18
1.2.1 <i>Definição e caracterização</i> .....	18
1.2.2 <i>Etiologia</i> .....	19
1.2.3 <i>Epidemiologia</i> .....	20
1.2.4 <i>Sinais, sintomas e diagnóstico</i> .....	21
1.2.5 <i>Intervenção terapêutica</i> .....	24
<b>1.3 Modelos animais de TEA</b> .....	25
1.3.1 <i>Modelos animais de TEA por VPA</i> .....	26
<b>1.4 Neuropatologia do TEA</b> .....	28
1.4.1 <i>Córtex pré-frontal e TEA</i> .....	29
1.4.1.1 <i>Anatomia do CPF</i> .....	29
1.4.1.2 <i>Redução da atividade dopaminérgica no CPF em casos de TEA</i> .....	32
1.4.1.3 <i>Padrões de anormalidades neuroanatômicas de TEA no CPF</i> .....	32
1.4.2 <i>Hipocampo e TEA</i> .....	34
1.4.2.1 <i>Anatomia hipocampal</i> .....	34
1.4.2.2 <i>Padrões de anormalidades neuroanatômicas de TEA no hipocampo</i> .....	37
1.4.3 <i>Sinaptopatias, cognição e TEA</i> .....	38
1.4.3.1 <i>TEA e déficits de memória</i> .....	40
<b>1.5 Antipsicóticos atípicos e neuroproteção no TEA</b> .....	42
1.5.1 <i>Aripiprazol</i> .....	42
<b>2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	44
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	45
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	45
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	45
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	46
<b>4.1 Delineamento experimental</b> .....	46
4.1.1 <i>Local do estudo</i> .....	46
4.1.2 <i>Animais</i> .....	46
4.1.3 <i>Drogas</i> .....	46

4.1.4	<i>Protocolo experimental</i>	47
4.1.4.1	<i>Acasalamento e distribuição dos animais</i>	47
4.1.4.2	<i>Detecção do 1º dia de gestação.</i>	47
4.1.4.3	<i>Modelo de autismo induzido por VPA em camundongos e tratamento com APZ</i>	47
4.1.4.4	<i>Parturições e distribuição das proles.</i>	48
<b>4.2</b>	<b>Testes comportamentais</b>	50
4.2.1	<i>Teste de auto-endireitamento postural</i>	50
4.2.2	<i>Teste de abertura dos olhos</i>	51
4.2.3	<i>Teste de abordagem social com brincadeiras juvenis</i>	51
4.2.4	<i>Tarefa de abordagem social no aparato de três câmaras</i>	52
4.2.5	<i>Comunicação social: Paradigma discriminativo em teste olfativo</i>	53
4.2.6	<i>Comunicação social: Teste de preferência pelo o cheiro materno.</i>	54
4.2.7	<i>Comportamentos repetitivos</i>	55
4.2.8	<i>Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva.</i>	55
4.2.9	<i>Teste de Y-maze.</i>	56
4.2.10	<i>Ansiedade e atividade locomotora analisadas pelo teste do labirinto em cruz elevado</i>	57
<b>4.3</b>	<b>Medições de DA por HPLC</b>	58
<b>4.4</b>	<b>Análise de viabilidade celular</b>	58
<b>4.5</b>	<b>Imunohistoquímica para Syp, SNAP-25 e MAP-2</b>	59
<b>4.6</b>	<b>Teste de convulsão por pentilenotetrazol (PTZ)</b>	60
<b>4.7</b>	<b>Análise estatística</b>	60
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	62
5.1	<i>O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne anormalidades no neurodesenvolvimento em camundongos recém-nascidos expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	62
5.1.1	<i>Peso corporal</i>	62
5.1.2	<i>Auto-endireitamento postural</i>	62
5.1.3	<i>Abertura dos olhos</i>	63
5.2	<i>O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) evita prejuízos na interação social em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	64
5.2.1	<i>Brincadeiras juvenis</i>	64
5.2.2	<i>Aparato de três câmaras</i>	66
5.3	<i>O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) evita prejuízos na comunicação social inadequada em camundongos jovens expostos</i>	68

<i>ao VPA no período pré-natal.</i>	
5.3.1 <i>Teste olfatório em paradigma discriminativo</i>	68
5.3.2 <i>Cheiro materno</i>	69
5.4 <i>O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o comportamento repetitivo em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	70
5.5 <i>O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o déficit de memória aversiva em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	71
5.6 <i>O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o déficit de memória de trabalho em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	71
5.7 <i>O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) diminui o comportamento ansioso-símile em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	72
5.8 <i>O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne a redução de dopamina (DA) no córtex pré-frontal (CPF) de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	73
5.9 <i>O tratamento materno com aripiprazol (APZ) 10 mg/kg não interferiu no efeito anticonvulsivante do ácido valpróico (VPA) 15 mg/kg no modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos.</i>	74
5.10 <i>O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne a morte celular no CPFm e no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	76
5.11 <i>Efeito do tratamento materno com APZ (10 mg/kg) sobre a imunorreatividade para a sinaptofisina (Syp) no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	79
5.12 <i>Efeito do tratamento materno com APZ (10 mg/kg) sobre a imunorreatividade para a SNAP-25 no córtex pré-frontal medial e no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.</i>	79
5.13 <i>Efeito do tratamento materno com APZ (10 mg/kg) sobre a imunorreatividade de MAP-2 no CPFm de camundongos jovens expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).</i>	86
<b>6. DISCUSSÃO</b>	88
<b>7. CONCLUSÃO</b>	100
<b>REFERÊNCIAS</b>	101

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Visão histórica

Em 1943, o psiquiatra infantil Leo Kanner descreveu a respeito do comportamento inusitado de oito meninos e três meninas, incluindo Donald de 5 anos que aparentemente mostrava-se confortável e satisfeito quando deixado sozinho, não manifestava interesses afetivos com os pais e tratamento indiferente com os demais membros da família que os visitavam. Às vezes, vagava-se sorrindo gratuitamente, fazendo movimentos estereotipados com os dedos ou girando com grande prazer repetidamente qualquer coisa que pudesse agarrar (KANNER, 1943).

No ano de 1944, o pediatra Hans Asperger descreveu sobre quatro meninos que manifestavam falta de interesse ou interesse restrito às pessoas e objetos. No entanto, um comportamento peculiar do observado no garoto Fritz, de seis anos, que aprendeu a falar e a expressar-se muito cedo. Esse, falava “como um adulto”, desdenhava as brincadeiras em grupos de crianças e interagia destemidamente com os adultos, até com estranhos. Porém, os hábitos estereotipados também o acompanhavam (ASPERGER, 1991).

Esses achados retratam vividamente o que é agora chamado de Transtorno do Espectro Autista (TEA). O espectro é amplo, abrangendo a clássica síndrome de Kanner (originalmente intitulada distúrbios autísticos de contato afetivo) e a síndrome de Asperger (originalmente chamada de psicopatia autista da infância). A compreensão do autismo evoluiu substancialmente nos últimos 70 anos, com um crescimento exponencial da pesquisa desde meados da década de 1990, como mostra a figura 1 (LAI, LOMBARDO e BARON-COHEN, 2014).

### 1.2 Transtorno do Espectro Autista (TEA)

#### 1.2.1 Definição e caracterização

A primeira definição operacional do TEA apareceu na terceira edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-III), e foi fortemente influenciada pela conceituação de Michael Rutter, que caracterizou esse distúrbio inicialmente como um transtorno infantil de desenvolvimento social e comunicativo

prejudicado, insistência na mesmice, com início antes dos 30 meses de idade (RUTTER, 1978).

Anos mais tarde, a quarta edição do DSM (DSM-IV) e a décima revisão da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) referiu ao autismo como um Transtorno Invasivo do Desenvolvimento (TID) ou PDD, do inglês *Pervasive Developmental Disorders (PDD)*, dando ênfase ao início precoce de uma tríade de características: (I) deficiências na interação social, (II) deficiências na comunicação; e (III) comportamento restrito, repetitivo, como atividades estereotipadas. Porém, o DSM em sua última revisão (DSM-V), publicado em maio de 2013, adotou um termo mais abrangente para o autismo, classificando-o como TEA, do inglês *Autism Spectrum Disorder (ASD)*, definindo-o como um grupo de distúrbios do neurodesenvolvimento, sem definição de subtipos e não mais com uma tríade de características, mas reorganizado com uma díade, que consiste em (I) dificuldades na comunicação e interação social; e (II) comportamento restrito e repetitivo a interesses ou atividades (APA, 2013; LAI, LOMBARDO e BARON-COHEN, 2014).

Embora esses sinais façam parte do TEA, não constroem um fenótipo genuíno para o transtorno. Existe uma variância espectral do distúrbio. Por exemplo, existem indivíduos na condição TEA com deficiência intelectual (DI) grave, até autistas com quociente de inteligência (QI) normal, que apresentam habilidades independentes. Ainda, interesses obsessivos, gastroenterites, hiperatividade, alterações no sono e epilepsia, podem ser morbididades presentes no autismo (ZAFEIRIOU et al., 2007).

### 1.2.2 Etiologia

Estudos baseados em gêmeos, famílias e populações mostraram que o TEA é um dos mais hereditários de todos os transtornos psiquiátricos, com herdabilidade estimada em ~ 50%. No entanto, o conhecimento da causa genética identificada é limitado. Até o momento, os achados mais promissores reportam rearranjos cromossômicos, ou mutações pontuais (Apud VARGHESE et al., 2017).

O TEA apresenta-se como uma desordem multifatorial, com fatores de riscos genéticos e ambientais. Os fatores genéticos desempenham cerca de 80% de herdabilidade para o autismo (LICHTENSTEIN et al., 2010; RONALD e HOEKSTRA, 2011). Síndromes monogênicas como a Phelan-McDermid (PMS), síndrome do X

frágil (FXS) e esclerose tuberosa, incluem o TEA como parte de seu fenótipo comportamental (GHOSH et al., 2013). Estas, constituem cerca de 10-15% de todos casos de TEA. Na maioria dos casos, o risco genético para o autismo é poligênico, envolvendo múltiplos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*). Além de distúrbios monogênicos e SNPs, uma série de microdeleções ou microduplicações abrangendo vários genes foram relatados para aumentar o risco de TEA (HOWES et al., 2018), como por exemplo, deleções em SHANK3, 1q21, 3q29, 7q11.23, dentre outras (VORSTMAN et al., 2006).

Uma série de fatores pré-natais, perinatais e neonatais, denotam que fatores ambientais também são responsáveis pelo o desenvolvimento do TEA. Dentre os mais relatados, destacam-se prematuridade significativa, hipóxia perinatal, infecções maternas pré/perinatal, deficiência materna de vitamina D, idade paterna mais elevada, obesidade materna e exposição gestacional a substâncias teratogênicas como ao ácido valpróico (EYLES et al., 2013; MANDY e LAI, 2016; HOWES et al., 2018).

### *1.2.3 Epidemiologia*

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 1 a cada 88 nativos apresenta TEA (BARBOSA, FERNANDES, 2009), algo em torno de 0,76% crianças autistas no mundo em 2010 (BAXTER, 2015), sendo o sexo masculino o mais acometido.

Uma prevalência elevada pode ser observada quando rastreada em determinados pontos geográficos, como foi o caso da Coreia do Sul, onde as estimativas apontaram 2,64% de crianças com o TEA entre os anos de 2005 e 2009 (KIM et al., 2011). Em contrapartida, em 2011, a prevalência de TEA em crianças foi menor na Finlândia e Suécia (1%) e na Dinamarca (1,5%) em comparação com os dados apresentados pela a Coreia do Sul (ATLADOTTIR et al., 2015).

Nos EUA, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimaram que aproximadamente 0,66% das crianças com 8 anos de idade em 2002 tinham TEA (BAIO, 2012). Em 2010 e 2012 a estimativa mostrou um aumento da prevalência de autismo para 1,5% em crianças até os 10 anos de idade (CHRISTENSEN et al., 2016). Em 2014, esse percentual elevou-se para 2,2% em uma pesquisa envolvendo crianças com idades entre 3 e 17 anos (ZABLOTSKY et al., 2015).

No Brasil, os estudos que abordam a epidemiologia do TEA são escassos. O primeiro estudo de prevalência na América Latina foi realizado em 2007, constatando uma prevalência de 0,88% de casos de TEA a partir de uma população de 1.470 crianças. Em 2008, um estudo brasileiro mostrou a prevalência de 1,31 de autistas a cada 10.000 pessoas no estado de Santa Catarina, a partir das bases de dados de instituições especiais: Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), Associação de Amigos dos Autistas (AMA) e da Fundação Catarinense de Educação Especial (FCEE). As limitações das pesquisas no Brasil sobre o TEA demonstram a carência de dados epidemiológicos desta condição, por conseguinte, dados sobre esta questão contribuiriam para a elaboração de políticas públicas que contemplem essa população (Apud GUEDES e TADA, 2015).

#### *1.2.4 Sinais, sintomas e diagnóstico.*

Embora os indivíduos com TEA sejam muito diferentes uns dos outros, o transtorno é caracterizado hoje, como já mencionado, por uma tríade de características, que consiste em (I) prejuízos de interação e comunicação social e (II) comportamentos sensoriais-motores repetitivos e restritos a interesses e/ou à atividades, independentemente de raça, cultura, etnia ou grupo socioeconômico. Uma vez que, não existem biomarcadores confiáveis para detecção de traços do TEA, o seu diagnóstico deve ser feito com base no comportamento do indivíduo, à luz dos critérios do DSM-V (KHAN et al., 2012).

Os critérios de diagnóstico do DSM-V (APA, 2013) lista prejuízos sociais e comprometimento funcional em uma ordem contínua de gravidade (Tabela 01 e 02).

**Tabela 01.** Critérios de diagnóstico para Transtorno do Espectro Autista.

<i>Critérios de diagnóstico para Transtorno do Espectro Autista</i>			
<i>A. Déficits persistentes na comunicação e interação social em vários contextos, conforme manifestado atualmente ou pela análise do histórico do indivíduo.</i>			
1. Déficits de reciprocidade socioemocional, variando, por exemplo, de abordagem social anormal e falha na conversa normal, ao reduzido compartilhamento de interesses, emoções ou afeto; ao fracasso em iniciar ou responder às interações sociais.	2. Déficits em comportamentos comunicativos não verbais usados para interação social, variando, por exemplo, de comunicação verbal e não verbal mal integrada; anormalidades no contato visual e linguagem corporal ou déficits na compreensão e uso de gestos; à uma total falta de expressões faciais e comunicação não verbal.	3. Déficits no desenvolvimento, manutenção e compreensão de relacionamentos, variando, por exemplo, de dificuldades para ajustar o comportamento para se adequar a vários contextos sociais; às dificuldades em compartilhar brincadeiras imaginativas ou em fazer amigos; à ausência de interesse nos pares.	
<i>B. Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades, conforme manifestado por pelo menos dois dos seguintes, atualmente ou pela história.</i>			
1. Movimentos motores estereotipados ou repetitivos, uso de objetos ou fala (por exemplo, estereotipias motoras simples, brinquedos alinhados ou lançando objetos, ecolalia e frases idiossincráticas).	2. Insistência na mesmice, adesão inflexível a rotinas ou padrões ritualizados de comportamento verbal ou não verbal (por exemplo, angústia extrema em pequenas mudanças, dificuldades com transições, padrões de pensamento rígidos, necessidade de seguir o mesmo caminho ou comer a mesma comida todos os dias).	3. Interesses altamente restritos e fixos que são anormais em intensidade ou foco (por exemplo, forte apego ou preocupação com objetos incomuns, interesses excessivamente circunscritos ou perseverativos).	4. Hiper ou hiporreatividade à entrada sensorial ou interesse incomum em aspectos sensoriais do ambiente (por exemplo, indiferença aparente à dor / temperatura, resposta adversa a sons ou texturas específicos, cheiro ou toque excessivo de objetos, fascinação visual por luzes ou movimento).

**Fonte:** Adaptado de APA (2013).

**Tabela 02.** Níveis de gravidade para Transtorno do Espectro Autista.

<i>Níveis de gravidade para Transtorno do Espectro Autista</i>		
<i>Nível de severidade</i>	<i>Comunicação social</i>	<i>Comportamentos restritos e repetitivos</i>
<b><u>Nível 3</u></b> “Requer suporte muito substancial”	Graves déficits nas habilidades de comunicação social verbal e não verbal causam graves prejuízos no funcionamento, iniciação muito limitada de interações sociais e resposta mínima às aberturas sociais de outros. Por exemplo, uma pessoa com poucas palavras de fala inteligível que raramente inicia uma interação e, quando o faz, faz abordagens incomuns apenas para atender às necessidades e responde apenas a abordagens sociais muito diretas.	Inflexibilidade de comportamento, extrema dificuldade em lidar com a mudança ou outros comportamentos restritos/repetitivos interferem marcadamente no funcionamento em todas as esferas. Grande angústia/dificuldade em mudar o foco ou a ação.
<b><u>Nível 2</u></b> “Requer suporte substancial”	Déficits marcados nas habilidades de comunicação social verbal e não verbal; deficiências sociais aparentes mesmo com apoios no local; iniciação limitada de interações sociais; e respostas reduzidas ou anormais às aberturas sociais de outros. Por exemplo, uma pessoa que fala frases simples, cuja interação é limitada a interesses especiais estreitos e que tem uma comunicação não verbal notavelmente estranha.	A inflexibilidade de comportamento, a dificuldade de lidar com a mudança ou outros comportamentos restritos/repetitivos aparece com frequência suficiente para serem óbvios para o observador casual e interferem no funcionamento em uma variedade de contextos. Angústia e/ou dificuldade em mudar o foco ou ação.
<b><u>Nível 1</u></b> “Requer suporte”	Sem suportes, os déficits na comunicação social causam prejuízos perceptíveis. Dificuldade em iniciar interações sociais e exemplos claros de respostas atípicas ou malsucedidas a aberturas sociais de outras pessoas. Pode parecer ter diminuído o interesse nas interações sociais. Por exemplo, uma pessoa que é capaz de falar frases completas e se comunicar, mas cuja conversa de um lado para outro com os outros falha e cujas tentativas de fazer amigos são estranhas e normalmente malsucedidas.	A inflexibilidade de comportamento causa interferência significativa no funcionamento em um ou mais contextos. Dificuldade em alternar entre atividades. Problemas de organização e planejamento dificultam a independência.

**Fonte:** Adaptado de APA (2013).

### 1.2.5 Intervenção terapêutica

A farmacologia baseada em evidências no TEA está atualmente limitada ao tratamento de sinais e sintomas inespecíficos, como alterações de comportamento e diagnósticos concomitantes. É por essa razão que os especialistas reportam essa terapia como uma ferramenta complementar, restrita, e não própria para o transtorno. Porém, tem mostrado resultados benéficos, como aos do Aripiprazol (Abilify) (OWEN et al., 2009) e Risperidona (Risperdal), (KENT et al., 2013), que melhoraram a irritabilidade ou agitação em crianças e adolescentes com TEA em ensaios clínicos randomizados (Tabela 03).

O aripiprazol e a risperidona são antipsicóticos atípicos, e são os únicos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* dos EUA para o tratamento de TEA. Além de minimizar a irritabilidade, esses fármacos diminuíram a ocorrência de automutilação, comportamentos agressivos e outros comportamentos perturbadores (JESNER et al., 2007; CHING e PRINGSHEIM, 2012). A psicofarmacoterapia também pode aliviar sintomas decorrentes de co-morbidades associadas ao TEA, como transtorno de déficit de atenção/ hiperatividade (TDAH), transtornos de ansiedade, e distúrbios do sono (DOVE et al., 2012).

Alguns medicamentos normalmente usados para tratar o TDAH, incluindo metilfenidato, atomoxetina e guanfacina, são exemplos de psicotrópicos independentes que atenuam os sintomas de TDAH no TEA, que ocorrem em mais de um quarto das crianças. Embora esses medicamentos possam fornecer alguns benefícios, eles devem ser utilizados com cautela perante os efeitos adversos de potenciais graves, incluindo tremor, sedação, ganho de peso, e sintomas extrapiramidais. Em geral, instiga-se zelo dos profissionais especialistas e dos cuidadores de indivíduos com TEA e que fazem uma farmacoterapia associadas (Apud LORD et al., 2018).

**Tabela 03.** Evidências para o uso de medicamentos no Transtorno do Espectro Autista.

<i>Fármaco</i>	<i>Idade (anos) para uso conforme indicado pelo FDA dos EUA</i>	<i>Sintomas alvo</i>	<i>Efeitos adversos comuns</i>
<b>Risperidona</b>	5-16	Agitação ou irritabilidade no TEA	Aumento do apetite, sedação e ganho de peso.
<b>Aripiprazol</b>	6-17	Agitação ou irritabilidade no TEA	Náuseas e ganho de peso
<b>Atomoxetine</b>	6-15	Sintomas de TDAH	Diminuição do apetite, náuseas e irritabilidade.
<b>Metilfenidato</b>	≥6	Sintomas de TDAH	Distúrbio do sono e diminuição do apetite.
<b>Guanfacin</b>	6-12	Sintomas de TDAH	Fadiga, sedação, diminuição do pulso e da pressão arterial

**Fonte:** Adaptado de Lord et al. (2018).

### 1.3 Modelos animais de TEA.

Os modelos animais de TEA têm contribuído para o conhecimento de determinados fatores e mecanismos causadores do distúrbio, com achados a respeito do comportamento, da cognição, da neuroanatomopatologia, da função sináptica e plasticidade. Para os fins desta revisão, esse estudo concentra-se em modelos de mamíferos *in vivo* de TEA, com base em etiologias genéticas, fenotípicas (VARGHESE et al., 2017) e/ou denominadas "idiopáticas", para o qual não há causa genética conhecida e que são provavelmente influenciadas por fatores ambientais (SANDIN et al., 2014) incluindo toxinas, pesticidas, infecção e exposição pré-natal a determinadas drogas, como ao VPA. Dos modelos de TEA geneticamente modificados, destacam-se NLGN3/4, NRXN1/3, CNTNAP2, SHANK3, MECP2, duplicações em MECP2, FMR1, Deleções em 15q11-q13 e microdeleções em 15q13.3. Desses, alcança-se um fenótipo autista-símile com um espectro de comportamento que sofrem variações pra mais ou pra menos de interação social recíproca reduzida em díades, falta de preferência por novidades sociais, vocalizações ultrassônicas juvenis e adultas prejudicadas e construção reduzida de ninho, aumento de auto-limpeza, enterramento compulsivo de

objetos e circulação repetitiva. Já os modelos animais de TEA idiopático, de um modo geral, estão descritos resumidamente na tabela 04.

**Tabela 04.** Subtipos de modelo animais e idiopáticos de TEA com os seus respectivos fenótipos comportamentais.

<b>Modelos animais de TEA idiopática</b>	
<b><i>BTBR-T+ tf/J</i></b>	Baixa sociabilidade, redução das interações sociais recíprocas em díades, vocalizações aberrantes e deficiências em vários ambientes sociais, como marcação de cheiros e transmissão social da preferência alimentar; Alto nível de estereotípias ou comportamentos repetitivos, incluindo pular, cavar, cuidar de si, enterrar objetos e explorar buracos incomuns; <b><u>Co-morbidades:</u></b> rigidez cognitiva em tarefas de aprendizagem reversa, hiperatividade em campo aberto, desempenho motor prejudicado no <i>rota-rod</i> e desempenho inconsistente em testes de ansiedade.
<b><i>BALB/cByJ</i></b>	Déficits sociais, incluindo interações sociais juvenis.
<b><i>Exposição pré-natal ao VPA</i></b>	Déficits sociais, com exploração social reduzida e baixo número de vocalizações ultrassônicas; baixos níveis de brincadeira juvenil em ratos; Aumento da frequência de estereotípias motoras e enterramento repetitivo de bolas de gude, diminuição da sensibilidade à dor, aumento da ansiedade; Divergência sexual no comportamento, com os homens sendo mais afetados do que as mulheres.
<b><i>Autoanticorpos maternos</i></b>	Déficits no desenvolvimento, aumento das vocalizações ultrassônicas e aumento dos comportamentos estereotipados em camundongos.
<b><i>Ativação imune materna</i></b>	Redução das vocalizações ultrassônicas, diminuição da interação social e comportamentos repetitivos em ratos.

**Fonte:** Adaptado de Varghese et al. (2017).

### *1.3.1 Modelos animais de TEA por VPA.*

O ácido valpróico (VPA), ou ácido 2-propilpentanóico, sintetizado há mais de um século a partir do ácido valérico (LOPEZ-MUNOZ et al., 2012), é um ácido graxo de cadeia curta, amplamente utilizado como uma droga antiepiléptica de amplo espectro (PERUCCA, 2002) e estabilizador de humor (LAMBERT et al., 1975). Atua regulando

a expressão gênica por meio da remodelação da cromatina (epigenética) por inibição da atividade da histona desacetilase (HDAC) (PHIEL et al., 2001).

VPA é um potente teratogênico. Os primeiros relatos de anomalias congênitas, nos neonatos de mães expostas ao VPA durante a gravidez remonta ao início 1980, incluindo defeitos do tubo neural (ROBERT e GUIBAUD, 1982), espinha bífida, craniossinostose, fenda palatina, hipospádia, defeito do septo atrial, e polidactilia e defeitos cardíacos congênitos (JENTINK et al., 2010; JACKSON et al., 2015). O VPA também prejudicou o neurodesenvolvimento em um grupo de bebês e crianças de 9 a 60 meses, cujas mães tinha se inscrito no Registro de Epilepsia e Gravidez do Reino Unido. Dos 47 participantes, 23 tiveram atraso de desenvolvimento (Cummings et al., 2011). Além disso, a exposição no útero ao VPA está associado a risco de prejuízos cognitivos. Adab et al. (2004) relatou que crianças em idade escolar, cujas mães receberam VPA durante o pré-natal tiveram *scores* resultados significativamente inferior de quociente de inteligência (QI) verbal de comparado à crianças expostas a carbamazepina ou fenitoína.

Além dos eventos teratogênicos citados acima, percebeu-se também que o VPA é um fator de risco para o desenvolvimento de TEA. A exposição ao VPA durante o primeiro trimestre de gravidez foi originalmente associada ao autismo com base em estudos que mostraram uma alta incidência de sintomas de TEA em crianças com síndrome do valproato fetal (FVS), uma embriofetopatia induzida por VPA (DiLIBERTI et al., 1984; CLAYTON-SMITH e DONNAI, 1995). Com base nisso, Rodier et al. (1996), expôs embriões de rato ao VPA e foi o primeiro a propor um modelo animal de autismo, com validade de face (semelhança com sintomas humanos) e validade de construção (semelhança nas causas subjacentes). Desde então, roedores expostos ao VPA no período pré-natal têm sido usados extensivamente para investigar as vias moleculares ligadas ao comportamento de TEA e, mais recentemente, para testar potenciais terapêuticos para o referido transtorno (ZAKI et al., 2010; YANG et al., 2016; AL-ASKAR et al., 2017; NICOLINI e FAHNESTOCK, 2018).

A partir do primeiro modelo animal de autismo-símile (Rodier et al, 1996), pequenas variações no protocolo de administração de VPA tem sido observadas (dia exposição *in utero* ao VPA, bem como, doses e vias de administração distintas), entretanto, a validade clínica do modelo de VPA em ratos e camundongos vem sendo

alcançada. Na verdade, a exposição *in utero* ao VPA entre 350-800 mg/kg por volta do 11º-12,5º dia gestacional, parece ser a janela de tempo crítica para a indução da maioria das anormalidades anatômicas e comportamentais do tipo autista-símile em ratos e camundongos. No entanto, um limite preciso de dose para a indução de características específicas e inespecíficas de TEA, com simultânea redução das fragilidades críticas do modelo, como ampla toxicidade e conseguinte mortalidade das proles, tem sido motivo de preocupação para os pesquisadores. Nesse contexto, uma pesquisa recente relatou que o VPA administrado na dose de 500 mg/ kg por v.i. no 12.5º gestacional é menos tóxico do que a dose de 600 mg/kg em termos de sobrevivência fetal e, além de reduzir altas taxas de mortalidade fetal durante os experimentos, consegue favorecer um robusto modelo comportamental de TEA-símile em comparação com os animais controles (Apud Frave et al., 2013).

Recentes ensaios pré-clínicos de autismo tem dado ênfase a importância de estudar o comportamento de TEA em animais, com protocolos que simulem a primeira infância, uma vez que, este é um período crítico para o estabelecimento de comportamentos sociais (SPEAR, 2000; CAMPOLONGO et al., 2018), com abordagens relacionadas ao neurodesenvolvimento, como análise do peso corporal, da coordenação postural e da maturação ocular (YANG et al., 2016). Em adição, Crawley (2007) sugeriu uma bateria de testes comportamentais relevantes para a construção de um desenho experimental mais robusto para estudar o fenótipo do TEA em modelos animais, com abordagens de interação e comunicação social, incluindo testes de brincadeiras juvenis, abordagem social em aparato de três câmaras, testes com pistas sociais olfativas, análises de comportamento repetitivo, ritualístico e atividades restritas. Outros estudos, somam ainda com análises de ansiedade (WANG et al., 2018; MIRZA e SHARMA et al., 2019) e testes de memória (GONZALES et al., 2016; CHOI et al. 2019), visto que podem ser consideradas como elementos inespecíficos, mas frequentemente observados no autismo (GVOZDJÁKOVÁ et al., 2014; LAI et al., 2014).

#### 1.4 Neuropatologia do TEA

Estudos de neuropatologia do TEA em humanos identificaram anormalidades de desenvolvimento cerebral em nível cortical, hipocampal e subcortical, incluindo o cerebelo e o tronco cerebral, com manifestações de aumento de volume, desorganização

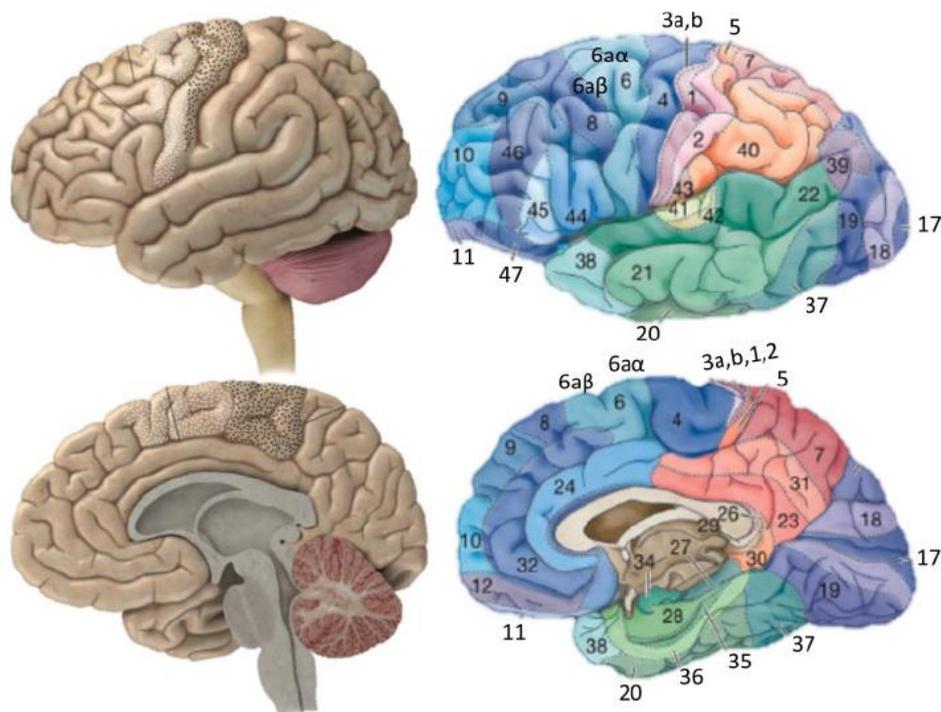
citoarquitetural, bem como, alterações na morfologia, na diferenciação, na migração e na distribuição espacial das células do sistema nervoso central (SNC) (WEGIEL et al., 2010; 2014; 2015).

#### 1.4.1 *Córtex pré-frontal e TEA*

##### 1.4.1.1 *Anatomia*

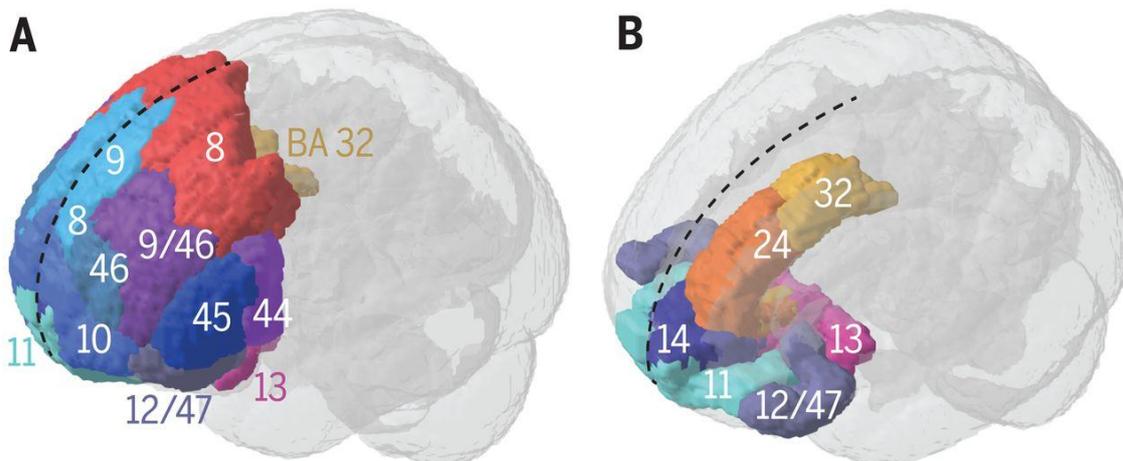
O CPF é conhecido por seu papel no controle cognitivo, uma vez que coordena o planejamento, a memória e a atividade executiva de outras áreas cerebrais individuais para os resultados comportamentais (MILLER e COHEN, 2001). A sua anatomia organiza-se seguindo o esquema cortical de Brodmann, com seus respectivos números citoarquitetônicos (Fig. 01). As áreas de Brodmann (BAs) tradicionalmente definidas para o CPF em humanos são as de BA8 a 14 e de BA44 a 47 (Fig. 2).

**Figura 01.** Tradicionais áreas funcionais descritas em 1909 por Korbinian Brodmann, 43 na espécie humana.



O pontilhado preto representa o córtex motor primário ou AB 4, e o pontilhado branco, a área pré-motora e motora suplementar, em conjunto denominadas AB 6 (Adaptado de Damiani et al., 2017).

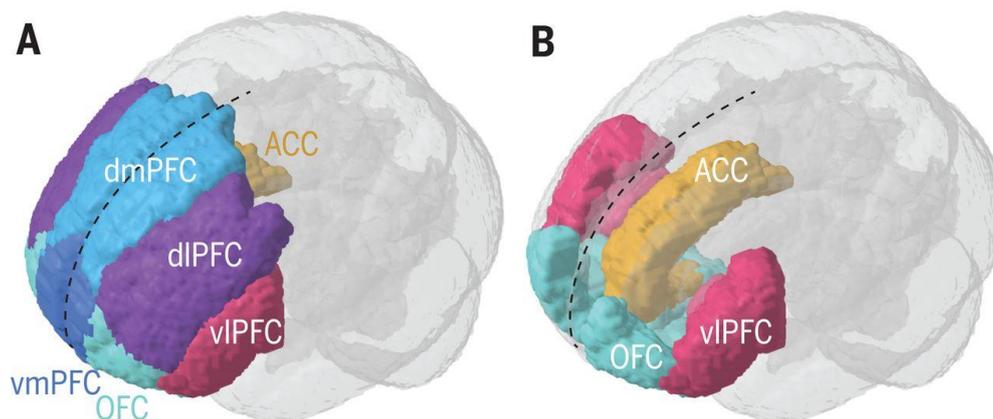
**Figura 02.** Representação do cérebro humano e ilustração esquemática das áreas de Brodmann (BA) no CPF.



(A e B) Visão frontal inclinada da representação do cérebro humano e ilustração esquemática das áreas de Brodmann (BAs) no córtex pré-frontal. (B) Ilustração esquemática de BAs mediais e ventrais no córtex pré-frontal. A linha preta tracejada indica a linha média sagital (Adaptado de CARLÉN, 2017).

O CPF possui divisões funcionais comuns, incluindo, o córtex pré-frontal dorsomedial: CPFdm; o córtex pré-frontal ventromedial: CPFvm; o córtex pré-frontal dorsolateral: CPFdl; córtex pré-frontal ventrolateral: CPFvl e o córtex frontal orbital: CFO (CARLÉN, 2017) (Fig. 03).

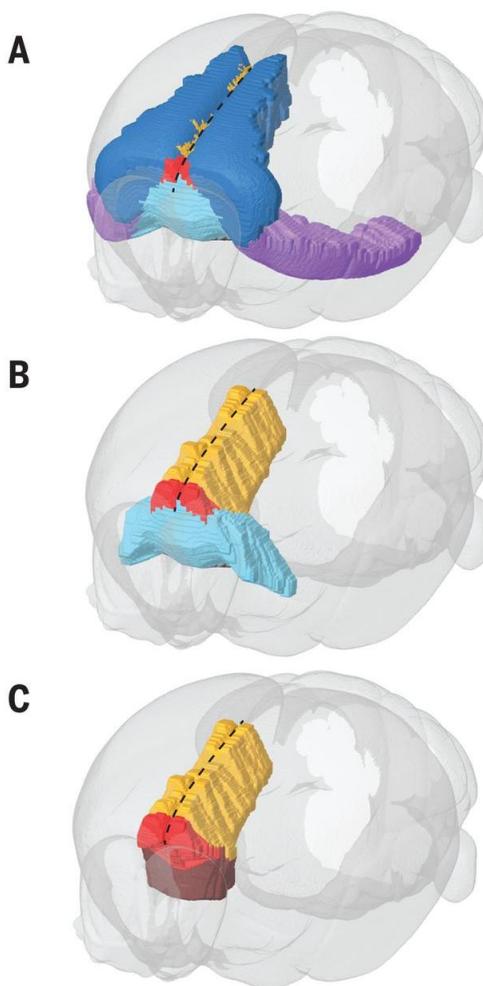
**Figura 03.** Representação do cérebro humano com as ilustrações de divisões funcionais comuns do CPF.



(A e B) Visão frontal inclinada da representação do cérebro humano com as ilustrações de divisões funcionais comuns do córtex pré-frontal (dmPFC, córtex pré-frontal dorsomedial; vmPFC, córtex pré-frontal ventromedial; dIPFC, córtex pré-frontal dorsolateral; vIPFC, córtex pré-frontal ventrolateral; OFC, córtex frontal orbital. A linha preta tracejada indica a linha média sagital). (Adaptado de CARLÉN, 2017).

Em animais, especificamente em camundongos *Mus Musculos*, o CPF é subdividido em área motora secundária (AMS); área cingulada anterior (ACA); área pré-límbica (APL); área infralímbica (AIL), área orbital (AORB); área insular agranular (AIA). Nas porções adjacentes à linha média que cruza os hemisférios, encontram-se as regiões mediais (Córtex pré-frontal medial – CPFm), e nas porções contínuas e opostas, encontram-se as regiões laterais (Córtex pré-frontal lateral – CPFl) (LEIN et al., 2007) (Fig. 04).

**Figura 04.** Representação do cérebro de camundongo com ilustração esquemática das subdivisões do CPF.



(A a C) Vista frontal inclinada da representação do cérebro de camundongo com ilustração esquemática das subdivisões do CPF. (A) Todas as áreas, (B) com ausência da área motora secundária (AMS) (azul escuro) e da área insular agranular (AIA) (roxo), (C) com ausência da AMS, da AIA e da área orbital (AORB) (azul claro). Em amarelo, área cingulada anterior (ACA); Em vermelho: área pré-límbica (APL); Em marrom: área infralímbica (AIL). A linha preta tracejada indica a região medial (linha média sagital), (Adaptado de CARLÉN, 2017).

#### *1.4.1.2 Redução da atividade dopaminérgica no CPF em casos de TEA.*

Estudos anteriores sugerem que uma hipofunção do sistema dopaminérgico no CPF está envolvida na etiologia do TEA induzido por VPA em animais. O estudo de Hara et al. (2015) demonstraram que a exposição pré-natal ao VPA diminuiu os aumentos dos níveis extracelulares de DA induzidos por metanfetamina no CPF dos respectivos filhotes estudados e que essa hipofunção dopaminérgica está associada a anormalidades comportamentais, semelhante ao fenótipo autista em camundongos tratados com VPA no período pré-natal. No ano seguinte, Hara et al. (2016) comprovaram essa hipofunção dopaminérgica no CPF de animais VPA ao descobriram que os medicamentos utilizados para tratar o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, como o metilfenidato e a atomoxetina (que aumentam a liberação de dopamina no córtex pré-frontal) aliviaram os déficits de interação social e prejuízos de memória no respectivo modelo. Esses achados sugerem que a hipofunção dopaminérgica no CPF está envolvida na etiologia do TEA-VPA e que essa via pode se tornar alvo de uma promissora estratégia terapêutica.

Em 2017, Hara e colaboradores, os mesmos autores relataram que a elevação extracelular repetida de DA no CPF promovida pelos antipsicóticos risperidona e aripiprazol garantiu um melhor desempenho social e cognitivo em animais VPA (Hara et al., 2017). No entanto, os autores buscaram investigar a prole com o TEA já estabelecido, realizando um tratamento pós-natal, em animais adultos (8 semanas de idade), não estudando o autismo desde a primeira infância. Em relação à cognição, o mesmo estudo objetivou uma abordagem comportamental que não envolvia todos os aspectos comportamentais envolvidos na doença.

#### *1.4.1.3 Padrões de anormalidades neuroanatômicas de TEA no CPF.*

Padrões de anormalidades neuroanatômicas no CPF têm sido evidenciados em humanos com TEA e vem contribuindo para o entendimento neuropatológico do transtorno. Como mostra alguns estudos, o CPF demonstrou um crescimento (ou alargamento) significativo maior em crianças com TEA com cerca de 2 a 5 anos de idade (CARPER et al., 2002; SCHUMANN et al., 2010; HAZLETT et al., 2011). Por outro lado, uma importante redução no número de neurônios têm sido reportado no CPF de autistas, como mostrado por Hashemi et al. (2017) e Ariza et al. (2018).

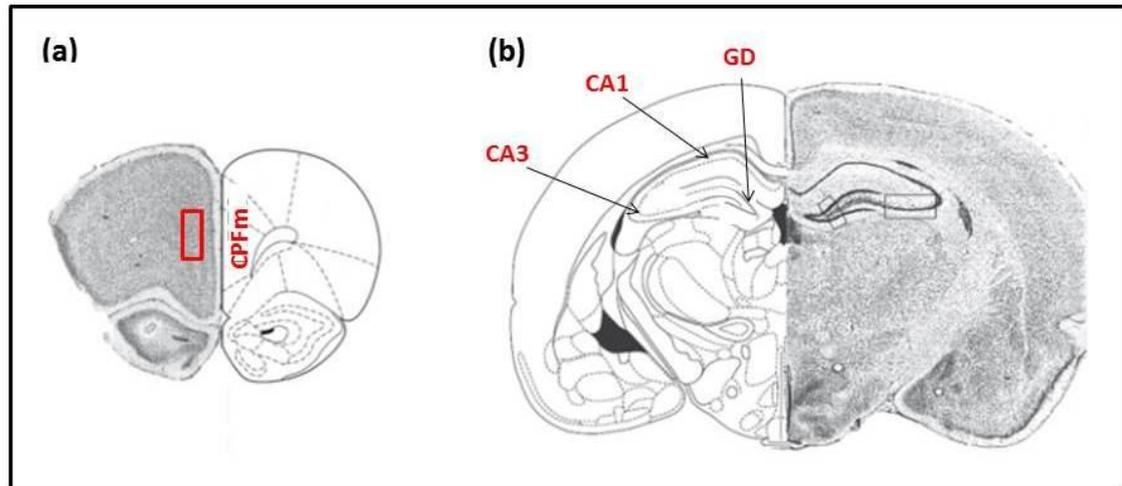
Hashemi et al. (2017), classificaram e quantificaram interneurônios a partir de três subpopulações com base na expressão de determinadas proteínas de ligação do cálcio, a parvalbumina (PV), a calbindina ou a calretinina, em tecido neocortical *post mortem* de 11 casos autistas e 10 casos controle. Os achados mostraram que o número de interneurônios-PV na área pré-frontocortical (BA) BA46, BA47 e BA9 estava significativamente reduzido nos tecidos-TEA em comparação com os controles. Ariza et al. (2018) confirmaram esses achados ao estudar de forma mais detalhada a redução de células-lustre (de *chandelier (Ch)*), um subtipo de interneurônios-PV no CPF em tecidos-TEA. Esses autores sugerem que essa mudança no número, função ou morfologia neuronal no CPF gere um desequilíbrio de excitação-inibição, produzindo oscilações das ondas gama no córtex cerebral, favorecendo ao fenótipo cognitivo observado nos indivíduos autistas.

Estudos em animais também comprovam que alterações no CPF implicam no desenvolvimento de um considerado fenótipo autista, especialmente com anormalidades na sua subárea medial (córtex pré-frontal medial – CPFm) (CODAGNONE et al., 2015; BRUMBACK et al., 2018) (Fig. 05a). Por meio de análises de imagem funcional e expressão gênica em neurônios da camada profunda do CPFm, detectou-se consistente redução em disparos do potencial de ação e alterações na exploração social em um modelo animal de TEA pela exposição pré-natal ao VPA (BRUMBACK et al., 2018).

Codagnone et al. (2015) mostraram que características comportamentais de TEA observadas em camundongos expostos ao VPA estavam relacionadas a mudanças estruturais e moleculares no CPFm desses animais. Dentre as características comportamentais, os autores documentaram atraso no neurodesenvolvimento e na maturação, dentre eles, peso corporal significativamente menor, atraso de dois dias na abertura dos olhos e pontuações inferiores em testes de natação. Quando avaliados em testes de sociabilidade, esses animais demonstram déficits sociais e exploratórios, incluindo, prejuízos na interação social em jogos e em ambientes e eventos que necessitariam de planejamentos e tomadas de decisão. Não surpreendentemente, devido a função integrativa bem conhecida do CPF, os autores associaram essas anormalidades comportamentais aos achados histopatológicos das amostras cerebrais desses animais. Por exemplo, minicolunas ou desorganização colunar, com células significativamente menores e arranjos intracolunares menos compactos, mais esparsos, gerando assim um

espaço interneuronal mais amplo, caracterizando uma significativa alteração na citoarquitetura do CPFm em roedores-VPA.

**Figura 05.** Representação do cérebro de camundongo com ilustração esquemática das subdivisões do CPF e do hipocampo.



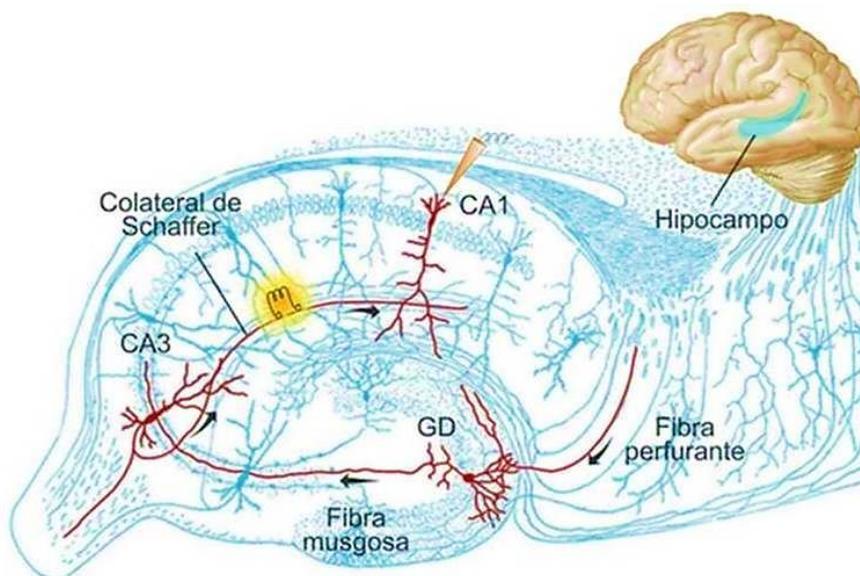
(a) Córtex pré-frontal medial destacado em vermelho. (b) Áreas hipocâmpicas CA1, CA3 e Giro denteado (GD) do cérebro de camundongo (Adaptado de CODAGNONE et al., 2015).

## 1.4.2 Hipocampo e TEA

### 1.4.2.1 Anatomia

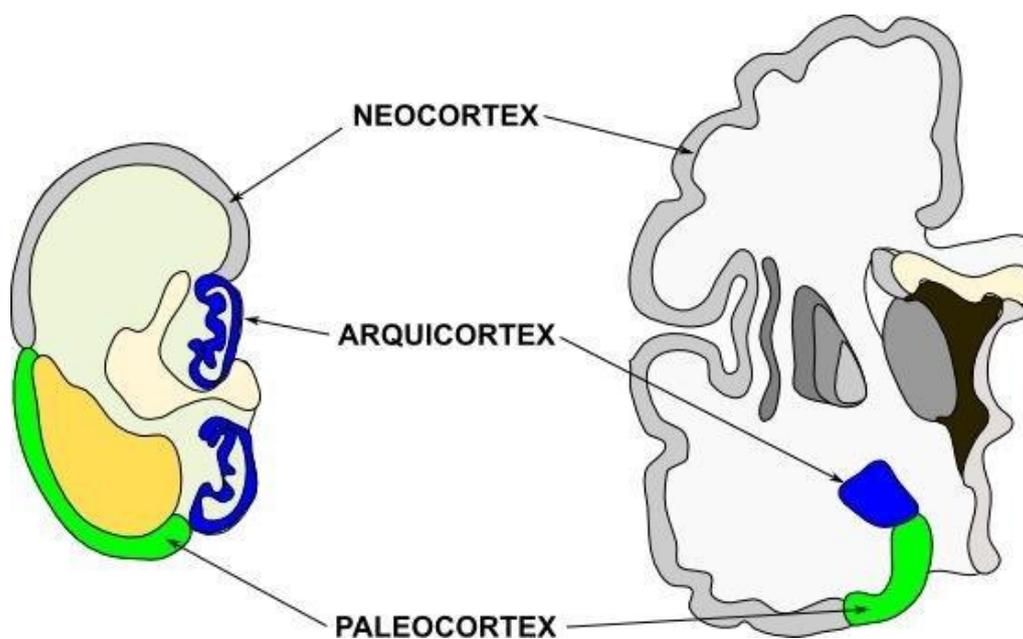
O hipocampo (Fig. 06) é uma estrutura cerebral considerada como a sede da memória e componente fundamental do sistema límbico, unidade responsável pela formação das emoções. A sua estrutura consiste em camadas de células dispostas em uma forma característica, que lhe garante curvas e dobras. Essa morfologia curvada, semelhante à um cavalo-marinho, inspirou o seu nome (do grego *hippo*, “cavalo”, e *kampos*, “monstro marinho”). Em humanos, segundo a sua classificação filogenética (Fig. 07), o hipocampo está localizado bem abaixo do neocórtex, precisamente no arquicórtex, uma porção medial do lobo temporal (KESNER et al., 2004).

**Figura 06.** Representação da formação e circuito hipocampal.



Representação das subdivisões e circuitos básicos do hipocampo. o córtex entorrinal (CE) fornece a principal entrada cortical para o hipocampo, com suas projeções consideravelmente estabelecidas por meio do caminho perfurante para a região o GD (Sinapse 1). Por sua vez, o DG projeta-se para a CA3 através da via da fibra musgosa (Sinapse 2). Em seguida, CA3 projeta-se para CA1 através da via Schaffer Collateral (SC) (Sinapse 3). Finalmente, CA1 projeta-se de volta para o CE, completando a alça (Adaptado de LENT, 2010; KNIERIM, 2015).

**Figura 07.** Representação da classificação filogenética cortical do cérebro.

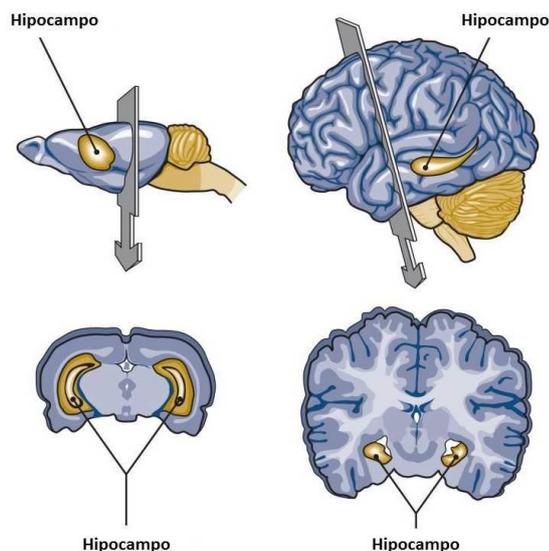


Representação das subdivisões filogenéticas do córtex: Neocórtex (cinza); Arquicórtex (azul) e Paleocórtex (verde) (Adaptado de SALATINO, 2014).

O sistema hipocampal é constituído por sub-regiões: o giro denteado (GD) e o *Corno Ammonis* (CA), o qual se subdivide em CA1, CA2, CA3 e CA4, e uma série de estruturas relacionadas, tais como: córtex entorrinal, subículo e as áreas pré e parassubiculares. O GD é constituído principalmente de uma camada de células granulares. As regiões de CA são formadas basicamente por células piramidais. As regiões CA1 e CA2 se distendem linearmente, enquanto a região CA3 forma uma curva que, em seu retorno, origina CA4, o hilo, que é circundado pelo o GD, onde esse, está separado de CA1-CA3 pelo sulco hipocampal. Ainda, GD possui subdivisões: a camada dendrítica, conhecida também como molecular, no estrato granuloso e no hilo ou estrato polimorfo, local onde podem ser encontrados inúmeros neurônios polimórficos (ANDERSEN et al., 2007).

Em roedores, o hipocampo apresenta dimensão e localização distintas (Fig. 08), partindo dos núcleos septais até o córtex temporal. Embora a dimensão e localização anatômica da formação hipocampal sejam diferentes entre humanos e roedores, os circuitos neuronais entre as regiões hipocampais são semelhantes (HILLER-STURMHÖFEL e SWARTZWELDER, 2004). Esses circuitos hipocampais (Fig. 06) funcionam por um mecanismo clássico conhecido como "alça trissináptica". Resumidamente, o córtex entorrinal (CE) fornece a principal entrada cortical para o hipocampo, com suas projeções consideravelmente estabelecidas por meio do caminho perforante para a região o GD (Sinapse 1). Por sua vez, o DG projeta-se para a CA3 através da via da fibra musgosa (Sinapse 2). Em seguida, CA3 projeta-se para CA1 através da via *Schaffer Collateral* (SC) (Sinapse 3). Finalmente, CA1 projeta-se de volta para o CE, completando a alça (KNIERIM, 2015).

**Figura 08.** Representação do hipocampo em humanos e roedores.



Diferenças de dimensões e localizações do hipocampo entre humanos e roedores (Adaptado de HILLER-STURMHÖFEL e SWARTZWELDER, 2004).

#### 1.4.2.2 Padrões de anormalidades neuroanatômicas de TEA no hipocampo.

Apesar de um conhecimento profundo do papel do hipocampo na formação da emoção, motivação e das habilidades sociais, esta região tem sido pouco explorada em pacientes autistas e os resultados são contraditórios (CODAGNONE, 2015). Por exemplo, enquanto algumas evidências mostram aumento de volume hipocampal em indivíduos com TEA (SCHUMANN et al., 2004; NICOLSON et al., 2006), outra, relata a sua diminuição (AYLWARD et al., 1999).

Schumann et al. (2004) relataram que crianças com TEA, com e sem retardo mental, manifestaram aumento de volume do hipocampo direito em comparação com crianças controles em desenvolvimento típico, mesmo depois de controlar o volume cerebral total. Crianças com autismo, mas sem retardo mental, também apresentaram um maior volume do hipocampo, porém, do esquerdo, em relação aos controles. Em contrapartida, Aylward et al. (1999) relataram volume hipocampal significativamente reduzido, quando corrigido para o volume total do cérebro nos indivíduos com TEA.

Em relação a achados histopatológicos de hipocampo humano com TEA, Raymond et al. (1996) detectaram anormalidade na morfologia neuronal das subunidades hipocampais CA1 e CA4, em dois casos de autismo infantil. Os neurônios

da subunidade CA4 estavam menores, e em ambos, CA4 e CA1, apresentaram-se com ramificação dendrítica reduzida em comparação aos controles. Kemper e Bauman (1993), identificaram aumento do empacotamento de células e redução de densidade e tamanho das células no hipocampo, subículo, e, embora em menor grau, no córtex entorrinal de cérebros de seis casos autistas.

Em modelos animais de TEA por exposição pré-natal ao VPA, as evidências de lesão hipocampal são semelhantes. Codagnone et al. (2015) mostraram evidências de desorganização celular em todas as sub-regiões hipocampais estudadas, caracterizada por um arranjo espacial atípico de neurônios, com redução de células Nissl+. Esses resultados são semelhantes aos recentemente publicados por Elnahas et al. (2020), onde os autores atribuem à essas alterações histopatológicas, o fenótipo comportamental de TEA em roedores.

#### 1.4.3 Sinaptopatias, cognição e TEA

As sinaptopatias e disfunções neuroplásticas desempenham um papel importante nos distúrbios do desenvolvimento do cérebro, como o TEA, com a participação de alterações em proteínas sinápticas, incluindo Sinaptofisina (Syp) (SUNDBERG et al., 2018), SNAP-25 (do inglês *Synaptosomal-associated protein of 25kD*) (GUERINI et al., 2011) e MAP-2 (do inglês *microtubule-associated protein-2*), sendo essa última, considerada como um possível advindo biomarcador sorológico para a triagem de crianças com autismo (ABOU-DONIA et al., 2019).

A Syp, também conhecida como p38, é a proteína integral mais abundante das membranas de pequenas vesículas sinápticas, atuantes nos mecanismos neuronais, gliais e neuroendócrinos. Esta proteína é considerada um marcador sináptico, por conseguinte, evidencia a densidade sináptica (THIEL, 1993), que por sua ação, estimula a neurogênese, a plasticidade e o desenvolvimento neural (KOLOS et al., 2015), resultando em propriedades significativas sobre os processos cognitivos de aprendizagem e memória (HONG, 1995). Ainda, uma significativa redução da sua expressão, tem sido encontrada em modelos de células humanas PC-TSC (do inglês *Purkinje cerebellar - Tuberous Sclerosis Complex*), uma anormalidade frequentemente presente no TEA (SUNDBERG et al., 2018). No que diz respeito as áreas cerebrais envolvidas, estudos com animais tem mostrado alteração nos níveis de Syp. Enquanto no CPFm a sua expressão estava elevada, no hipocampo, os níveis de Syp estavam

significativamente reduzidos em cérebros de ratos expostos ao VPA no período pré-natal. Em adição, foram atribuídos a esse déficit sináptico, os atrasos de neurodesenvolvimento, de atividade exploratória e de interação social observados no referido estudo (CODAGNONE et al., 2015).

A plasticidade sináptica também sofre influência de outras proteínas, dentre elas, a SNAP-25, que atua na fusão vesicular sináptica e na consequente liberação de neurotransmissores para a fenda sináptica (GEDDES et al., 1990) Por causa dos papéis biológicos variados e cruciais da SNAP-25 para as sinapses, mudanças significativas nos níveis desta proteína podem trazer severas consequências para o sistema nervoso, e conseguinte desordens do neurodesenvolvimento, como o TEA (NAJERA et al., 2019). Por exemplo, polimorfismos do gene SNAP-25 foi associado ao comportamento hiperativo de 67 crianças com autismo (GUERINI et al., 2011). Em animais, uma redução em torno de 35% na expressão de SNAP-25 no córtex frontal e no hipocampo tem sido relacionado ao fenótipo autista em um modelo animal de TEA por VPA (LENART et al., 2020).

Como mencionado, a MAP-2 tem sido considerada recentemente como um possível biomarcador sorológico para a triagem de TEA (ABOU-DONIA et al., 2019). Antigamente, a proteína MAP-2 era conhecida unicamente como uma biomolécula estrutural estática, com propriedade apenas estrutural para o citoesqueleto. Porém, as pesquisas nas últimas décadas revelaram funções dinâmicas para a MAP-2, incluindo, indução do crescimento, diferenciação e plasticidade dos neurônios, com papéis importantes nas respostas neuronais a fatores de crescimento, neurotransmissores, atividade sináptica e neurotoxinas (JOHNSON e JOPE, 1992). Com o intuito de descobrir biomarcadores para o TEA, Abou-donia et al. (2019) mostraram que, dentre uma variedade considerável de autoanticorpos, os níveis de MAP-2 foram os mais altos no soro de indivíduos com TEA. Isso pode ser uma indicação de perda da proteína MAP-2 à nível cerebral, consistente com os níveis baixos dessa proteína nas alterações neurodegenerativas (BALLOUGH et al., 1995) e semelhante aos relatórios de Kawada et al. (2016) que mostram a densidade reduzida de MAP-2 em um modelo de estresse neuronal predisponente ao TEA.

Considerando a sinaptopatologia com as presentes alterações das proteínas sinápticas, Syp, SNAP-25 e MAP-2, é plausível especular que a modulação desses processos pode resultar em novas estratégias terapêuticas (ABOU-DONIA et al., 2019).

#### *1.4.3.1 TEA e déficits de memória*

A memória pode ser considerada como um processo cognitivo onde armazenamos, codificamos e recuperamos informações de experiências, eventos, fatos e habilidades particulares. Assim, a memória fundamenta o ser humano, pois o que lembramos determina em grande parte quem somos. Sem memória, somos capazes de realizar apenas reflexos simples e comportamentos estereotipados (ROBERTSON, 2002). O SNC adquire informações constantemente através do aprendizado e demais acontecimentos da vida, no qual o organismo e seus sentidos são expostos. Entretanto, apenas uma pequena parte dessas informações é retida de forma duradoura. Existe um processo de seleção para o armazenamento da informação na memória e a sua duração é determinada pelo impacto emocional, grau de atenção e importância dessa informação no processo de sua aquisição. A memória é estudada num processo constituído de fases, respeitando a uma sequência de eventos que corresponde à aquisição, consolidação e evocação da informação (IZQUIERDO, 2002).

A aquisição é a primeira fase do processamento da memória, onde toda a informação é adquirida através dos sistemas sensoriais. Após a aquisição, se dá o processo de consolidação, a informação é consolidada “armazenada”. A última fase do processo de memória é a evocação, onde toda a informação armazenada pode ser acessada “evocada”, constituindo o ato de lembrar (ABEL e LATTAL, 2001).

A memória é dividida em dois tipos, memória declarativa e não-declarativa. A memória declarativa é uma memória explícita. É uma memória usada para recordação de fatos e eventos, como, datas importantes, fatos históricos marcantes, nomes de pessoas e lugares. A memória declarativa é ainda dividida em episódica e semântica. A episódica está relacionada com o tempo. A semântica envolve o significado de palavras. A memória declarativa é armazenada no diencéfalo e no lobo temporal. A memória não-declarativa é uma memória implícita ou de procedimento. Está relacionada com a memória para o desenvolvimento de habilidades, como o ato de escrever, de mastigar, de amarrar o cadarço, de dirigir e ainda a habilidade de identificar um estímulo como um resultado de uma exposição prévia (LENT, 2005). As regiões envolvidas nesse tipo

de memória incluem amígdala, o cerebelo e os núcleos da base (SQUIRE e KANDEL, 2003; IZQUIERDO, 2002).

A memória declarativa pode ser classificada ainda como memória recente (curto prazo) e memória de longo prazo ou remota. A memória recente está relacionada a lembranças de eventos que ocorrem minutos e horas antes da evocação. A memória de longo prazo se refere a eventos do passado distante. Um aspecto da memória de curto prazo é a memória operacional (*working memory*), um arquivamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura (SQUIRE e ZOLA-MORGAN, 1996). A memória de curta duração pode ser perdida ou convertida em longa duração (GOLDMAN-RAKIC, 1992). As áreas cerebrais responsáveis pela memória de trabalho são o córtex pré-frontal, córtex orbitofrontal e suas conexões com o córtex temporal e parietal, hipocampo e amígdala (IZQUIERDO et al., 1998).

Argumenta-se que o perfil de memória no TEA envolve danos seletivos à memória episódica, que é formada pelo o CPF e hipocampo (SHALOM, 2003). Alguns trabalhos têm demonstrado déficits na aquisição e retenção da memória em modelos animais de TEA, avaliados nos testes de esQUIVA passiva e no teste de *Y-maze*, com forte relação entre esses déficits de memória e lesões pré-frontocorticais e hipocampais (HOU et al., 2018; ZAMBERLETTI et al., 2019; ISHOLA et al., 2020; SOLMAZ et al., 2020).

Por meio de uma resposta potencializada de medo no teste de esQUIVA passiva inibitória, pode-se mensurar a memória de curta e longa duração de animais. É uma tarefa que investiga a memória a partir de respostas de alerta e ansiedade associada a um estímulo aversivo, e que essas, dependem parcialmente da amígdala, do hipocampo e do septo medial (IZQUIERDO et al., 1992, 1993a). O *Y-maze* é uma tarefa comportamental utilizada para analisar a memória de trabalho em roedores por meio da avaliação de alterações espontâneas em um labirinto formado de três braços, dispondo aos animais nele testados a escolherem o “novo”. Geralmente, os animais preferem explorar um novo braço do labirinto em vez de permanecer ou visitar o braço anteriormente explorado. As áreas cerebrais envolvidas nessa tarefa incluem, o córtex frontal, occipital e parietal (SQUIRE e ZOLA-MORGAN, 1996).

A morte celular no córtex, e hipocampo pode levar a severos déficits de memória (GU et al., 2010). Um estudo de Codagnone et al. (2015), mostrou que animais

submetidos ao modelo de TEA por VPA apresentaram graves déficits de memória de curta e longa duração e estes déficits estavam parcialmente relacionados com a morte celular e uma citoarquitetura colunar atípica no CPFm e no hipocampo, particularmente em CA3 e na camada granular do giro dentado.

### 1.5 Antipsicóticos atípicos e neuroproteção no TEA.

Os antipsicóticos são classificados em típicos e atípicos. De modo geral, o principal alvo cerebral de todos os antipsicóticos é o receptor D2 de DA, porém, com comportamento molecular e efeitos distintos. Os antipsicóticos tradicionais ou típicos, ao se ligarem fortemente ao receptor D2, induzem sinais e sintomas extrapiramidais (SEP), além de elevarem a prolactina sérica, efeitos colaterais que reduzem a adesão terapêutica. Em contrapartida, os antipsicóticos atípicos quando administrados em dosagens dentro da faixa clinicamente eficaz, têm mostrado neuroproteção ao ocupar temporariamente os receptores D2 e então se dissociar rapidamente para permitir a neurotransmissão normal da DA. Isso mantém os níveis de prolactina normais, poupa a cognição e elimina o SEP. Dessa forma, por não causarem os efeitos clínicos adversos típicos, são bem mais tolerados (SEEMAN, 2002).

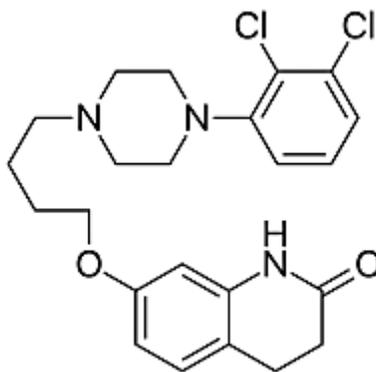
Os antipsicóticos atípicos fazem parte atualmente do protocolo terapêutico farmacológico para o TEA, principalmente nas intervenções em crianças e adolescentes com autismo (SHARMA et al., 2018). Os comumente prescritos para pacientes com TEA são aripiprazol (APZ), risperidona, ziprasidona, quetiapina, e, em menor ocasião, olanzapina. Dentre esses, o APZ tem mostrado resultados altamente promissores na terapia do autismo (POSEY, 2008).

#### *1.5.1 Aripiprazol*

O APZ é um antipsicótico atípico e primeiramente foi considerado apenas como um simples agonista parcial do receptor dopaminérgico D2. No entanto, dados atuais mostram que isso é controverso. Na verdade, o APZ pode se comportar como um agonista, agonista parcial ou antagonista da via dopaminérgica, e essa variação depende de vários fatores (SHAPIRO et al., 2003; TADORI et al., 2009; KOENER et al., 2012; ANZALONE et al., 2012), como variações de densidade do receptor, dos níveis de reserva do receptor (TADORI et al., 2009), do ambiente circundante de DA, que difere nas várias regiões do cérebro (KOENER et al., 2012) e do tônus dopaminérgico local.

Por exemplo, em baixa concentração de DA, o APZ pode se comportar como um agonista. Ao contrário, em elevada concentração dopaminérgica, o APZ pode se comportar como um antagonista em autoreceptores do tipo D2 em terminais dopaminérgicos pré-sinápticos. O APZ é eficaz na estimulação dos receptores D2 pré-sinápticos, desde que os níveis de dopamina permaneçam baixos. No entanto, como o APZ é um agonista parcial, ele estimula os autoreceptores D2 com baixa atividade em comparação com a DA (MA et al., 2014). Em contrapartida, quando ocorrem altas taxas de exocitose dopaminérgica, o APZ passa a se comportar como um antagonista devido à sua menor eficácia em desempenhar o papel ativo dos receptores D2 em comparação com a DA (ANZALONE et al., 2012).

**Figura 09.** Estrutura molecular do aripiprazol.



Hara et al. (2017), mostraram que a elevação repetida de DA extracelular no CPF de animais VPA pode ser responsável por melhorar o comprometimento da interação social e déficits de memória de reconhecimento em animais tratados com APZ. Porém, os autores buscaram investigar a prole com TEA já estabelecido, realizando um tratamento pós-natal em animais com 8 semanas de idade. Em relação à cognição, o mesmo estudo limitou-se à interação social e análise de memória.

Dois ensaios clínicos randomizados duplo-cegos avaliaram a eficácia e segurança do APZ em crianças com TEA. O primeiro estudo incluiu 218 crianças e adolescentes autistas. Esses pacientes foram randomizados para receber uma das três doses diferentes de aripiprazol (5, 10 ou 15 mg/d) ou placebo por oito semanas. Todas as três doses reduziram significativamente a irritabilidade desses indivíduos em comparação com o placebo. O segundo estudo envolveu 98 crianças e adolescentes (com idades entre 6–17 anos) com diagnóstico de TEA que também exibiram

comportamentos agressivos ou autolesivos. Os pacientes receberam uma dose flexível de aripiprazol (dose média de 8,6 mg/d) ou placebo. O aripiprazol foi eficaz na redução da irritabilidade já na primeira semana e manteve seu efeito até o final do ensaio (OWEN et al., 2009). Esses ensaios levaram à aprovação do APZ pelo o FDA como o segundo medicamento antipsicótico para tratar irritabilidade em crianças e adolescentes com transtorno autista de 6 a 17 anos (BLANKENSHIP et al., 2010), porém, os mecanismos envolvidos para esses efeitos neuroprotetores no TEA não são totalmente conhecidos.

## **2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

Estudos baseados em gêmeos, famílias e populações mostraram que o TEA é um dos mais hereditários de todos os transtornos psiquiátricos, com herdabilidade estimada em ~ 50%. O dano sináptico e plástico desempenha um papel importante na patogênese do TEA, constituindo-se um alvo significativo para a prevenção e tratamento. Terapias com moduladores sinápticos têm mostrado serem eficazes na redução de danos sobre o neurodesenvolvimento, atrasos de interação social e déficits de memória, no entanto, os estudos que abordam a essa intervenção em modelos de TEA experimental são escassos.

Assim se faz necessária a busca por substâncias com as respectivas propriedades. Apesar de muitos estudos buscarem drogas neuroprotetoras para o autismo, poucos têm mostrado realmente efetivos. O presente estudo visa investigar se o APZ, por suas ações sinaptoplásticas possa vir a ser uma estratégia terapêutica no tratamento do TEA.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar o efeito do aripiprazol sobre o desenvolvimento do fenótipo autista, déficits de memória e dano sinaptoplástico em camundongos submetidos ao modelo de TEA induzido por ácido valpróico.

### **3.2 Objetivos específicos**

Estudar o efeito do aripiprazol sobre o desenvolvimento do fenótipo autista, déficits de memória e dano sinaptoplástico em camundongos submetidos ao modelo de TEA induzido por ácido valpróico, avaliando os seguintes aspectos:

- i. Alterações sensório-motoras, comunicação, interação social, ansiedade e déficits de memória;
- ii. Viabilidade neuronal através da coloração de cresil violeta no CPFm e hipocampo dos animais VPA.
- iii. Sinaptoplasticidade por meio das expressões de Syp, SNAP-25 e MAP-2 no CPFm e hipocampo dos animais VPA.
- iv. Influência do APZ sobre o efeito anticonvulsivante do VPA.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Delineamento experimental**

#### *4.1.1 Local do estudo*

O presente estudo foi realizado nas salas de experimentação do Biotério Setorial Prof. Eduardo Torres, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF), Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e no Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC), do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), FAMED, UFC.

#### *4.1.2 Animais*

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos e fêmeas, adultos jovens, com idade reprodutiva (6-8 semanas), pesando entre 30 e 40 g, oriundos do Biotério Central do Campus do Pici da UFC e transferidos para o Biotério Setorial Prof. Eduardo Torres do DFF, da FAMED, UFC. Os animais foram alojados em gaiolas para roedores, forradas com maravalha e mantidos à temperatura de 25 ° C, sob um ciclo de 12 h de claro/escuro e com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos do presente estudo seguiram as normas expedidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC sob o nº 2830290719.

#### *4.1.3 Drogas*

Aripiprazol, 10 mg (Sandoz®, Brasil); ácido valpróico, 100 mg (Tocris Bioscience, EUA); pentilenotetrazole 100 g (Sigma-Aldrich, EUA); cetamina 5% (Vetanarcol®, König, Argentina) e xilazina 2% (Kensol®, König, Argentina). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### *4.1.4 Protocolo experimental*

##### *4.1.4.1 Acasalamento e distribuição dos animais.*

Camundongos *Swiss* fêmeas (n=8) foram acasaladas com machos (n=8) em gaiolas separadas (1 casal por gaiola = 8 casais) durante o período reprodutivo (6-8 semanas de idade), distribuídos na seguinte ordem de tratamentos, como mostra a tabela 05.

**Tabela 05.** Distribuição e protocolo de tratamentos dos animais

<i>Casal</i>	<i>Grupo</i>	<i>Tratamento</i>
01 e 02	<b>Veículo (V)</b>	Soro fisiológico 0,9%
03 e 04	<b>V + APZ</b>	Soro fisiológico 0,9% + Aripiprazol (10 mg/kg, i.p.)
05 e 06	<b>VPA</b>	Ácido valpróico (500 mg/kg, i.p.)
07 e 08	<b>VPA + APZ</b>	Ácido valpróico (500 mg/kg, i.p.) + Aripiprazol (10 mg/kg, i.p.)

#### 4.1.4.2 Detecção do 1º dia de gestação.

O esfregaço vaginal foi coletado todas as manhãs para análise citológica, e a presença de espermatozoides foi considerada o primeiro dia de gestação (DG).

#### 4.1.4.3 Modelo de autismo induzido por VPA em camundongos e tratamento com APZ (FAVRE et al., 2013).

No 11,5º e no 12º dias gestacionais, as fêmeas prenhes do grupo V receberam solução salina 0,9% por via intraperitoneal (i.p.) e as do grupo V+APZ, receberam soro fisiológico 0,9% + APZ (10 mg/kg), (i.p.). As fêmeas gestantes dos grupos VPA e VPA+APZ receberam VPA (500 mg/kg, i.p.) no 12,5º dia para a indução do modelo animal de autismo e o grupo VPA+APZ, duas doses preventivas de Aripiprazol (10 mg/kg, i.p.); a primeira dose no 11,5º dia e a segunda dose no 12º dia. Nesse mesmo grupo, foi administrado VPA (500 mg/kg, i.p.) no 12,5º dia. Todas as doses foram administradas no volume de 10 mL/kg. A dose do APZ (10 mg/kg) foi estabelecida com base nos seus efeitos protetores em modelo de convulsão induzida por PTZ (MOEZI et al., 2015). A escolha da dose para VPA de 500 mg/kg para esse estudo foi estabelecida com base nas indicações de Favre et al. (2013), que ao compararem doses de

administrações de VPA para indução de TEA-símile em modelo animal, constataram que o VPA administrado na dose de 500 mg/ kg por v.i. no 12.5º gestacional é menos tóxico em comparação a dose de 600 mg/kg. Essa toxicidade apresentou-se principalmente por altas taxas de mortalidade fetal durante os experimentos. Contrariamente, o VPA administrado na dose de 500 mg/kg, além de prevenir a morte neonatal, consegue favorecer um robusto modelo comportamental de TEA-símile (Apud Frave et al., 2013).

#### *4.1.4.4 Parturições e distribuição das proles.*

Visando obter um “n” significativo a partir das proles, foram asseguradas duas parturições uniformes em relação ao tempo dos animais. Os camundongos machos e fêmeas genitores foram separados após o primeiro dia de gestação (com a obtenção respectiva das proles de 1ª gestação) e induzidos a cruzarem novamente 50 dias após o primeiro cruzamento (obtenção das proles de 2ª gestação).

O dia do parto foi considerado o dia 0 pós-natal (PN0). No PN21, os filhotes foram desmamados e alojados em gaiolas separadas segundo a origem de cada prole (V, V+APZ, VPA e VPA+APZ).

As proles foram estudadas da seguinte forma:

#### ***Proles da 1ª gestação:***

**Protocolo 1:** Durante PN1-PN12, uma primeira corte de filhotes (n = 8) foram *pesados* diariamente e submetidos ao (I) *Teste de auto-endireitamento postural* e verificação da (II) *Abertura dos olhos* (PN1-PN16); Em PN21, foram testados em uma primeira tarefa de interação social: (III) *Teste de brincadeiras juvenis*. Ao final do protocolo, os animais foram eutanasiados (decapitação) e seus cérebros foram dissecados. O córtex pré-frontal dessas amostras foram processados para a determinação de monoaminas por HPLC (Fig. 10A).

**Protocolo 2:** Uma segunda corte de filhotes (n=8) foram testados numa segunda tarefa de interação social: (I) *Teste em aparato de três câmaras*, em PN28 e em PN29 e PN30, foram avaliados no teste de (II) *Esquiva passiva* e no (III) *Paradigma discriminativo de*

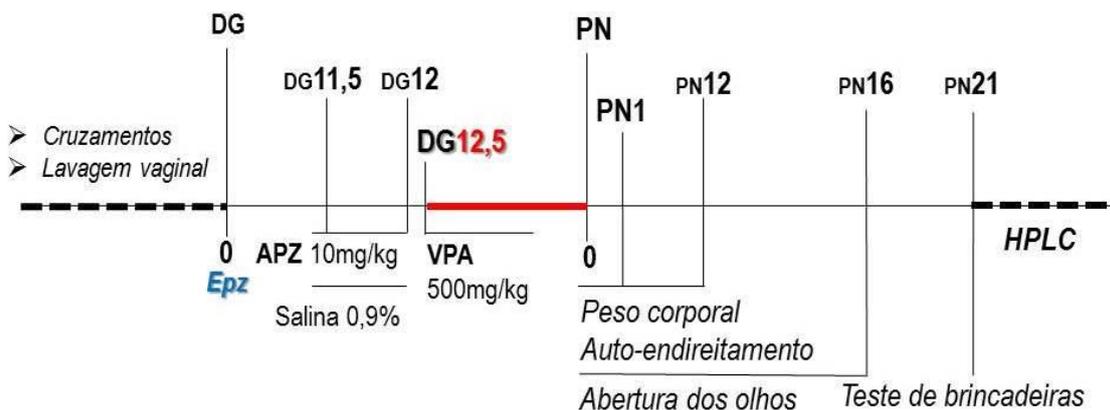
*teste olfatório*. Logo após os animais foram eutanasiados e seus respectivos cérebros foram dissecados e submetidos para análises histológicas (Fig. 10B).

### Proles da 2ª gestação

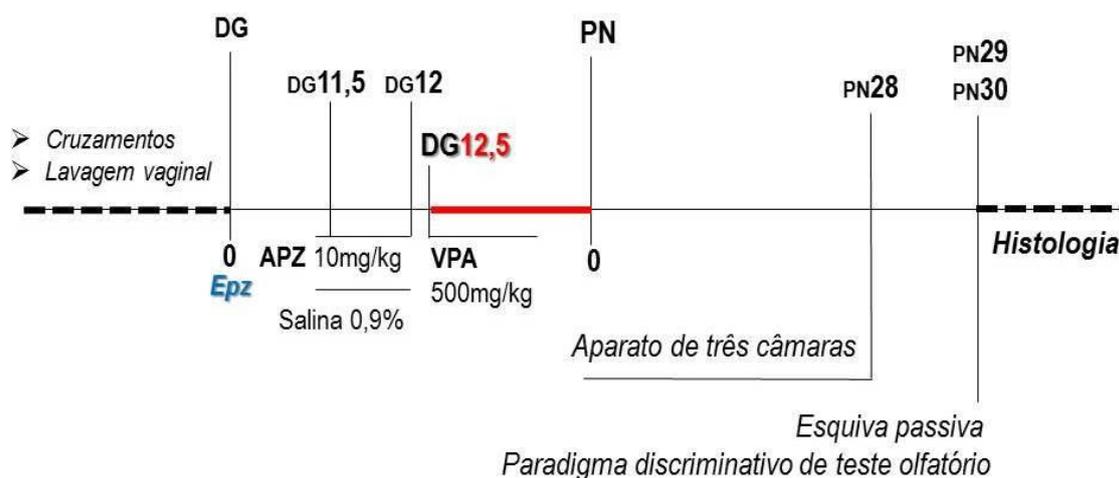
**Protocolo 3:** Uma terceira corte de filhotes (n=8) foram avaliados no (I) *teste de preferência ao cheiro materno* em PN14 no (II) *Y-maze* em PN21. Ainda, PN28, esses animais foram submetidos aos testes de atividade locomotora e ansiedade no (III) *Labirinto em cruz elevado*. Em seguida, os animais foram eutanasiados e seus respectivos cérebros foram dissecados e submetidos para análises de imunohistoquímica (Syp, SNAP-25 e MAP-2) (Fig. 10C).

**Figura 10.** Desenho experimental.

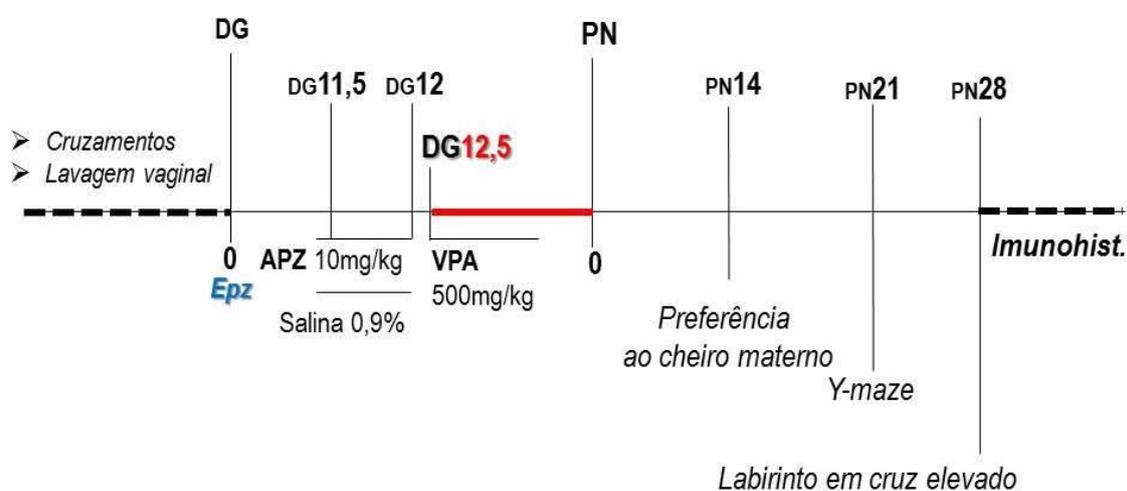
A



B



C



A: Protocolo 1; B: Protocolo 2; C: Protocolo 3; **DG** – Dia Gestacional e **PN** – Dia Pós-Natal; n=8.

## 4.2 Testes comportamentais

### 4.2.1 Teste de auto-endireitamento postural

Como descrito por Yang et al. (2016), os animais foram pesados diariamente e submetidos ao teste de auto-endireitamento postural entre PN01-PN12. Cada animal foi suavemente imobilizado em decúbito dorsal com as quatro patas estendidas para fora e em seguida, liberadas. O tempo de auto-endireitamento postural foi registrado pela latência referente ao momento em que o animal teve as patas livres até colocar suas quatro patas na superfície. Uma pontuação máxima de 30 s foi estabelecida para os animais que falharam na tarefa e todo o experimento foi realizado por um experimentador cego aos grupos experimentais.

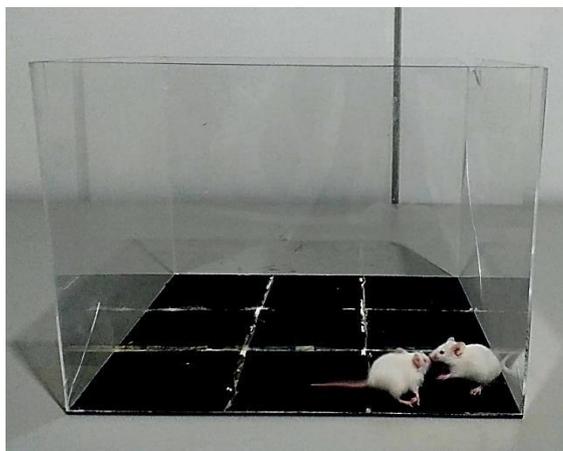
### 4.2.2 Teste de abertura dos olhos

Os camundongos foram observados diariamente para determinar se seus olhos estavam abertos (ROULLET et. 2010; YANG et al. 2016). Para cada olho aberto, 1 ponto foi marcado. As pontuações variaram de 0 a 2 para cada animal e os registros foram realizados de forma cega para os grupos.

#### 4.2.3 *Teste de abordagem social com brincadeiras juvenis*

Com base em Campolongo et al., (2018) avaliamos a sociabilidade de camundongos no período de desmame (PN21) no teste de brincadeiras juvenis (Fig. 11). Os camundongos foram marcados e organizados em pares de filhotes não irmãos, do mesmo tratamento e com pesos equivalentes ou com diferenças de até 1g no PN20. No PN21 os animais foram transferidos das prateleiras climatizadas para a sala de análise comportamental 30 minutos antes do início dos testes. Para o experimento, (1) *Habituação*: Cada animal foi colocado na arena de teste (piso: 30 cm × 30 cm de PVC preto; paredes: fórmica preta de 30 cm de altura) por 10 minutos e removido por 30 segundos. Depois, (2) *Teste*: Os dois filhotes foram colocados de volta na arena e deixados livres para interagir socialmente por 30 minutos. Foram avaliadas as solicitações lúdicas (número de eventos de rastreamento); os comportamentos investigativos (número de eventos de cheirar na região anogenital e nariz a nariz); os comportamentos afiliativos (tempo que cada animal ficou sentado lado a lado); e os comportamentos não sociais (tempo que cada animal passou sentado sozinho). O teste foi realizado por um experimentador cego aos grupos experimentais.

**Figura 11.** Arena de campo aberto para a testagem de abordagem social juvenil.



**Fonte:** Laboratório de Neurociências e Comportamento – LNC.

#### 4.2.4 *Tarefa de abordagem social no aparato de três câmaras*

Tarefas de abordagem social foram realizadas de acordo com Crawley (2007). Este teste foi realizado em um aparelho de três câmaras (Fig. 12), projetado para medir a tendência dos ratos de se aproximar de outro animal e realizar interações sociais. Inicialmente, os animais foram submetidos a uma sessão de habituação: cada camundongo foi colocado no aparelho da câmara central (gaiola de policarbonato transparente,  $60 \times 30 \times 25$  cm) por 10 min. Em seguida, o animal era contido no centro do aparelho, enquanto um copo vazio para lápis de arame invertido era colocado em uma das câmaras laterais (objeto novo). Simultaneamente, um camundongo de idade semelhante, que não teve contato prévio com o animal de teste, foi colocado dentro de um copo de lápis de arame invertido vazio na outra câmara lateral (novo estranho). A partir daí as portas transparentes entre as câmaras foram abertas, iniciando o teste de interação social que duraria 10 min. Os seguintes dados foram registrados: (a) entradas dos camundongos sujeitos em cada câmara, (b) o tempo que o animal de teste passou em cada câmara e (c) o tempo que o animal de teste passou cheirando dentro de 1 cm do copo de lápis de arame invertido com o animal estranho dentro e o tempo gasto farejando o objeto novo. Como o estranho está preso dentro de uma pequena gaiola de malha, uma abordagem social foi iniciada apenas pelo animal em questão. A pequena gaiola de malha permite contato visual, auditivo, olfativo e algum contato tátil entre o animal em questão e o animal estranho. A tarefa de abordagem social mede a sociabilidade, a tendência do animal em questão de passar o tempo com um estranho da mesma espécie, em comparação com o tempo gasto nas outras duas câmaras, o *sniffing* mede a natureza social da abordagem, semelhante à ansiedade e o número de entradas em cada câmara mede comportamentos de atividade exploratória

**Figura 12.** Aparato de três câmaras para o teste de abordagem social.



**Fonte:** Laboratório de Neurociências e Comportamento – LNC.

#### 4.2.5. Comunicação social: Paradigma discriminativo em teste olfativo.

Adaptado de Ryan et al. (2010), avaliamos a comunicação social de camundongos no período da adolescência (PD30) no olfato por meio de um teste de paradigma discriminativo de sensibilidade (Fig. 13). No PD30 os animais foram transferidos para a sala de análise comportamental 30 minutos antes do início dos testes. Cada animal foi colocado na arena de teste (30 x 60 x 15 cm) com maravalha limpas por 30 minutos (habituação). Em seguida, iniciou-se o teste olfativo: Quatro cotonetes de 15 cm (Cotonets®-Johnson & Johnson) foram embebidos em (I) estímulos não sociais de água; (II) estímulos não sociais de essência de morango (Arcólor®-Brasil); (III) estímulos sociais de um animal estranho (o cotonete foi passado em "zig-zague" profundamente em uma gaiola suja de um animal estranho do mesmo sexo e espécie e (IV) estímulos sociais de um animal familiar (o cotonete foi passado em "zig-zague" profundamente em sua própria gaiola suja com animais familiares do mesmo sexo e espécie; cada cotonete foi fixado verticalmente com uma distância de 5 cm entre eles, em uma haste fixada horizontalmente no topo da arena. Foram registrados em 2 minutos, o tempo que o camundongo passou realizando qualquer investigação olfativa com cotonete (com o nariz aproximadamente 2 cm da ponta do cotonete) e o número de eventos, como saltos, contrabando e arranhões verticais. O teste foi realizado por um experimentador cego aos grupos experimentais.

**Figura 13.** Câmara para o teste olfativo com um paradigma discriminativo.



**Fonte:** Laboratório de Neurociências e Comportamento – LNC.

#### 4.2.6 Comunicação social: Teste de preferência pelo o cheiro materno.

O teste de preferência pelo o cheiro materno (Fig. 14) foi realizado de acordo com Kane et al. (2012). Os animais foram testados em um aparato de policarbonato transparente (20 × 30 × 15 cm), dividido espacialmente em três câmaras e preenchido na seguinte ordem: (I) o terço direito da câmara conteve material (maravalha suja) de uma gaiola de um animal estranho, (II) o terço central com maravalha limpa e o (III) terço esquerdo da gaiola com material (maravalha suja) da gaiola da mãe do animal teste. Para evitar possíveis interferências, a posição das raspas (estranho e mãe) foi alternada entre os intervalos. Os filhotes foram submetidos a três sessões de teste de 1 min cada, com intervalos de 10 s. Na primeira sessão, os animais foram colocados no centro das raspas limpas e voltados para a parede posterior do aparato; na segunda, os filhotes foram colocados no centro das raspas limpas e voltados para as raspas da gaiola da mãe; e na terceira sessão, os animais foram colocados no centro das raspas limpas, voltados para as raspas da gaiola do animal estranho. O tempo gasto em cada seção foi registrado e o resultado foi expresso pela média dos três testes. O animal foi considerado dentro de uma seção quando todas as quatro patas tocavam a câmara inteira. Os testes foram avaliados por um investigador cego para os grupos.

**Figura 14.** Arena de teste de preferência pelo o cheiro materno.



**Fonte:** Laboratório de Neurociências e Comportamento – LNC.

#### 4.2.7 Comportamentos repetitivos

A análise do comportamento repetitivo foi feita de acordo com Ryan et al. (2010). Foi avaliado o comportamento estereotipado em ratos adolescentes (PN21) registrados durante “Testes de brincadeira juvenil” e (PN30) “Teste olfativo”. Os parâmetros registrados foram o número de saltos, o número de lançamentos para trás e o número de ataques de rastejar na vertical. Os saltos foram definidos como os ratos empinando nas patas traseiras em ângulos ou ao longo das paredes da arena, com quatro patas fora do chão, quicando repetidamente, muitas vezes como uma “britadeira”. Lançamento para trás foi definido como uma cambalhota rápida para trás. O arranhar na vertical foi representado pelo comportamento do animal em raspar a parede verticalmente, como "correr na parede". Os resultados foram expressos a partir do número de saltos e inversões, enquanto o *scrabbling* ereto foi registrado por ataques (mais de um segundo). O teste foi realizado por um experimentador cego aos grupos experimentais.

#### 4.2.8 Avaliação da Memória Aversiva – Teste da Esquiva Passiva.

O teste de esquiva passiva (Gold, 1986) foi realizado em PN29 e PN30. Esse, é baseado na tendência natural do animal de explorar além da plataforma e envolve o aprendizado de evitar o choque, um componente aversivo que constitui uma resposta condicionada.

O aparelho (Fig. 15) consiste de uma caixa de acrílico (48x22x22), com o piso constituído por uma plataforma e uma grade eletrificada (Figura 12). O animal foi colocado na plataforma e deixado para ambientação no aparelho durante um 1 minuto, e depois retirado. Após 30 segundos, o animal foi colocado novamente na plataforma. O animal ao descer da plataforma recebeu um choque de 0,5 mA, durante 1 segundo, com o tempo de latência para entrar sendo registrado, até um máximo de 5 minutos (treino). Retirou-se o animal e após 15 minutos este foi colocado novamente na plataforma e registrou-se a latência de descida (avaliação da memória recente). A retenção do aprendizado (avaliação da memória tardia) foi testada após 24 h, quando o animal foi colocado na plataforma e o tempo de latência para a descida da plataforma foi registrada, nessa etapa o animal não recebeu o choque.

**Figura 15.** Aparelho de esquiva passiva.



**Fonte:** Aparelho de Esquiva Passiva (Fonte: Insight LTDA).

#### 4.2.9 *Teste de Y-maze.*

Em PN21, a memória de trabalho foi avaliada registrando o comportamento de alternância espontânea no labirinto em Y (Kraeuter et al. 2018). O labirinto (Fig. 16) foi construído em policarbonato transparente com três braços idênticos (40 x 15 x 4,5 cm) posicionados em ângulos iguais. Os animais foram colocados na extremidade de um braço e autorizados a se moverem livremente pelo labirinto durante uma sessão de 8 minutos. A série de entradas do braço foi registrada visualmente e as entradas em cada braço foram consideradas completas quando as patas traseiras dos animais foram completamente colocadas dentro do braço. A capacidade de alternar exige que os ratos lembrem quais braços já foram visitados. Cada experiência foi pontuada; a porcentagem de alternância espontânea foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\text{Alternações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de acertos}}{\text{Número total de entradas} - 2} \times 100$$

O comportamento de alternância é definido como o número de entradas consecutivas em cada um dos três braços sem repetição, e as alternâncias máximas são o número total de entradas de braço menos dois.

**Figura 16.** Aparato de *Y-maze*.

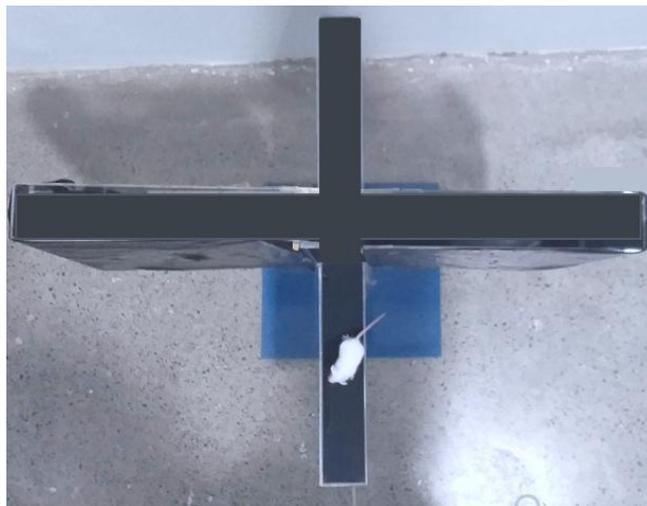


**Fonte:** Laboratório de Neurociências e Comportamento – LNC.

#### 4.2.10 *Ansiedade e atividade locomotora analisadas pelo teste do labirinto em cruz elevado*

O teste foi baseado no modelo descrito por Eissa et al. (2018), no teste do labirinto em cruz elevado (Fig. 17), com os animais no PN28. O teste foi realizado em um aparelho de acrílico composto por quatro braços elevados a 40 cm do chão. Dois braços abertos e opostos (40cmx5cm), ligados centralmente (5cmx5cm) por dois outros braços fechados do mesmo tamanho, fechados com paredes de acrílico fechadas com material preto (20cm). Cada animal foi colocado no centro do aparelho de frente para um braço aberto e observado por 5 minutos. Registramos (1) O tempo que o animal passou nos braços abertos e fechados e (2) O número de entradas em cada braço. O animal era considerado como estando no braço quando colocava a cabeça e as patas dianteiras naquele local. O labirinto foi limpo após cada teste com álcool 20% para evitar interferências como o odor de outros animais. Além disso, as entradas totais em cada braço foram usadas para medir a atividade locomotora. O teste foi realizado por um experimentador cego aos grupos experimentais.

**Figura 17.** Labirinto em cruz elevado.



**Fonte:** Laboratório de Neurociências e Comportamento – LNC.

### **4.3 Análise dos níveis de dopamina por HPLC**

Os níveis de dopamina (DA) no córtex pré-frontal (CPF) foi determinado por HPLC. Os tecidos foram homogeneizados em HClO<sub>4</sub> a 10% e centrifugados a 4 °C (20.817 x g, 15 min). O sobrenadante foi filtrado (0,2 µm, Millipore) e as amostras (20 µL) foram injetadas em uma coluna de HPLC (C18, 5 µm, 250 × 4,6 mm). A fase móvel foi constituída de ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo EDTA 0,02 mM, com ácido octanossulfônico de sódio 0,69 mM (SOS) como o reagente de emparelhamento iônico, 4% v/v de acetonitrila e 1,7% v/v tetra-hidrofurano. As concentrações de DA foram determinadas por comparação com o padrão de DA e os resultados foram expressos como ng/g de tecido.

### **4.4 Análise de viabilidade celular**

Os cérebros dos camundongos foram dissecados e fixados por imersão em fixador por 48 horas. Os cérebros de quatro ratos por grupo foram submersos no plano coronal em parafina de acordo com técnicas padrão. Três campos (5 µm) de cada seção foram selecionados aleatoriamente ao longo de cada um dos níveis coronais: córtex pré-frontal (começando em Bregma 1,94 mm) e hipocampo dorsal (começando em Bregma -1,70 mm) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson. Para a análise de viabilidade celular, foi realizada a coloração de Nissl: seções do cérebro foram montadas em lâminas com gelatina a 5%, deixadas para secar e, em seguida, incubadas em solução

tamponada com acetato de violeta de cresil 0,5% por 10 min. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool etílico (50%, 70% e 100%), imersas em xilol e montadas com meio de montagem Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). As lâminas foram observadas em microscópio (Nikon E200 Ellipse) com aumento de 40x. O número de células Nissl+ foi contado seguindo alguns parâmetros: As células foram consideradas Nissl+ quando o citoplasma foi corado com violeta cresil, associado a padrões de normalidade morfológica celular, como formato celular redondo ou oval e núcleo centralizado. Para uma análise qualitativa, padrões de anormalidades foram considerados, incluindo arranjo espacial dos neurônios (espaço intercelular) e a presença de células Nissl- (células com ausência de coloração violeta no citoplasma, associada a alterações morfológicas graves, como núcleos celulares encolhidos acompanhados de núcleos picnóticos.

#### **4.5 Imunohistoquímica para Syp, SNAP-25 e MAP-2**

Os cérebros dos camundongos foram dissecados e fixados por imersão em fixador por 48 horas. Os cérebros de quatro ratos por grupo foram submersos no plano coronal em parafina de acordo com técnicas padrão. Três campos (5  $\mu$ m) de cada seção foram selecionados aleatoriamente ao longo de cada um dos níveis coronais: córtex pré-frontal (começando em Bregma 1,94 mm) e hipocampo dorsal (começando em Bregma -1,70 mm) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson. As seções do CPFm e hipocampo foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7,4) por 5 min. Em seguida, as seções foram incubadas com PBS suplementado com 10% de metanol e 1,05% de peróxido de hidrogênio por 40 min em temperatura ambiente (TA) para bloquear a atividade semelhante à peroxidase endógena. As seções foram lavadas 3 vezes por 10 min com PBS e incubadas em solução de bloqueio (soro de cabra 10% normal em PBS suplementado com Triton X-100) por 2 h em temperatura ambiente. As seções foram então incubadas com os anticorpos primários (anti-Syp - rato, 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), anti-SNAP-25 - coelho, 1:500 ou MAP-2, 1:200 (Sigma -Aldrich , Missouri, EUA) diluída em uma solução de bloqueio durante a noite a 4 ° C. As seções foram então lavadas três vezes por 10 min em PBS e subsequentemente incubadas com conjugado de avidina-biotina-peroxidase de rábano (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology) por 30 min Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho de cabra biotilado, diluído 1: 500 em solução bloqueadora e a cor foi revelada utilizando DAB (3,3'-

diaminobenzidina) como cromógeno. Os cortes foram visualizados em um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200, 40x, Nikon, Melville, EUA). Três campos de cada seção foram selecionados aleatoriamente ao longo das áreas e a densidade óptica foi medida. As células foram consideradas marcadas positivamente quando uma cor marrom foi observada.

#### **4.6 Teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ)**

Para descartar possível interferência do APZ sobre o efeito anticonvulsivante do VPA, investigamos a associação do APZ com o VPA em animais com convulsões induzidas por PTZ em camundongos de acordo com o protocolo de Keshavarz et al. (2016). Um grupo independente de animais foi dividido em quatro subgrupos (n = 8): V (veículo-solução salina 0,9%, i.p.); VPA (ácido valpróico 15 mg/kg, i.p.; menor dose recomendada, geralmente usada para tratar epilepsia em crianças (15 mg/kg/dia), (Apud PERUCCA, 2002)); APZ (aripirazol 10 mg / kg, i.p.) e VPA + APZ (ácido valpróico 15 mg / kg + aripirazol 10 mg / kg), administrados 30 min antes da indução de convulsão por PTZ. Para a indução das crises convulsivas, todos os animais receberam uma injeção (i.p.) de PTZ (80 mg/kg) e foram observados por 30 min (Todas as doses foram administradas num volume de 10 mg/mL). Os parâmetros registrados foram (1) latência para o primeiro evento de convulsão, (2) *scores* de comportamentais de convulsão e (3) % de morte. Os scores comportamentais foram categorizados de acordo com uma escala de Racing modificada (Mao et al. 2019) da seguinte forma: (0) nenhuma resposta, (1) comportamento imóvel, (2) rigidez, (3) cabeça com movimentos circulatorios, (4) elevação periódica e queda (5) elevação e queda ininterruptas e (6) convulsões e solavancos tônico-clônicos. O teste foi realizado por um experimentador cego aos grupos experimentais.

#### **4.7 Análise estatística**

Utilizando o software GraphPad Prism 6.01 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA), todos os resultados foram submetidos à análise estatística. Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade D'Agostino e Pearson para a verificação de distribuição dos dados. Para os dados de distribuição normal, foram realizados os testes paramétricos: Análise de variância (ANOVA) de duas vias e de medidas repetidas seguida de teste de Bonferroni como *post-hoc* (peso corporal, auto-endireitamento postural e o teste de abertura dos olhos); ANOVA de uma ou duas vias

seguida de teste Bonferroni como *post-hoc* para as análises dos testes sociais, olfatórios, de estereotipias, e de ansiedade.

Testes não paramétricos também foram associados ao estudo a partir da identificação de dados com distribuição não normal, como, Kruskal-Wallis seguido de teste *post-hoc* de Dunn para os testes de convulsão e dos níveis de DA. Ainda, foram realizadas ANOVA de uma ou duas vias, seguida de teste Bonferroni como *post-hoc* para as análises de memória, histológicas e de imunohistoquímica.

Os dados foram expressos como média  $\pm$  e o S.E.M (erro padrão da média), com exceção dos testes de abertura dos olhos e dos escores de convulsão, que foram apresentados como mediana. Em todas as análises, o critério de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

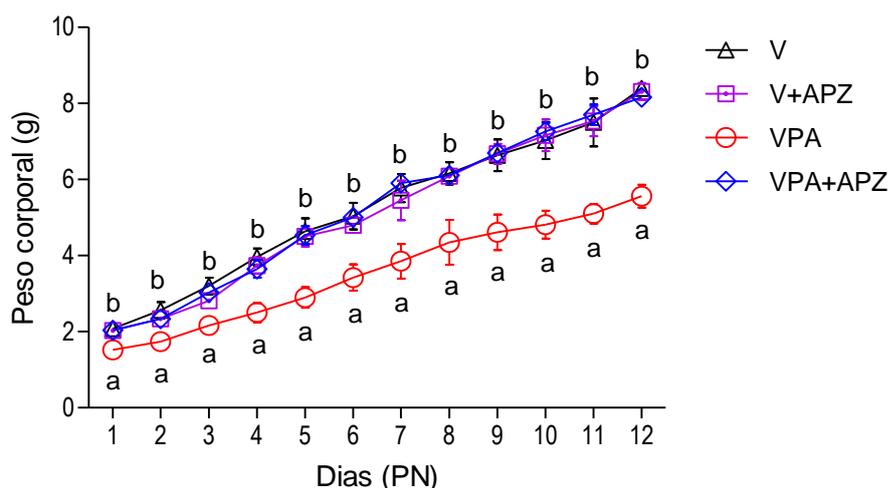
## **5. RESULTADOS**

### 5.1 O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne anormalidades no neurodesenvolvimento em camundongos recém-nascidos expostos ao VPA no período pré-natal.

#### 5.1.1 Peso corporal

O peso corporal de todos os animais foi observado diariamente, de PN1 a PN12. Os animais expostos ao VPA no período pré-natal mostraram uma diminuição significativa no peso corporal em comparação com o grupo veículo (V) em PN1 ( $p < 0,01$ ) e PN2-PN12 ( $p < 0,001$ ), e o tratamento com APZ evitou significativamente essa diminuição de peso em todos os dias de observação (Fig. 18).

**Figura 18.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne a diminuição de peso em camundongos recém-nascidos expostos ao VPA no período pré-natal.



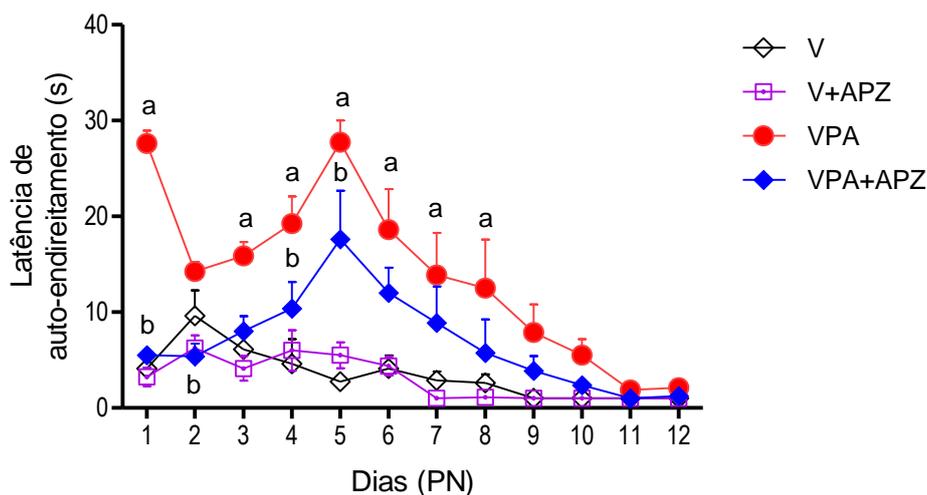
As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripirazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram avaliados no presente teste a partir do dia 1 pós-natal (PN1). Os dados estão expressos como média  $\pm$  S.E.M.  $p < 0,01$ , a vs veículo (PN1),  $p < 0,001$ , a vs veículo (PN2-PN12);  $p < 0,01$ , b vs VPA (PN1),  $p < 0,001$ , b vs VPA (PN2-12), ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni, (n=8).

#### 5.1.2 Auto-endireitamento postural

A capacidade de auto-endireitamento postural de todos os animais foi observada diariamente, de PN1 a PN12. Um atraso significativo do ato de auto endireitar-se foi observado na prole de VPA em comparação com o grupo V em PN1 ( $p < 0,001$ ), PN3 ( $p < 0,05$ ), PN4-PN6 ( $p < 0,001$ ), PN7 ( $p < 0,01$ ) e PN8 ( $p < 0,05$ ) (Fig. 19). Esses resultados

indicam atraso de neurodesenvolvimento. O tratamento com APZ durante a gravidez preveniu contra o referido atraso na prole de VPA em comparação com os animais tratados apenas com veículo em PN1 ( $p < 0,001$ ), PN2, PN4 ( $p < 0,05$ ) e PN5 ( $p < 0,01$ ).

**Figura 19.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne atraso no comportamento de auto-endireitamento postural em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

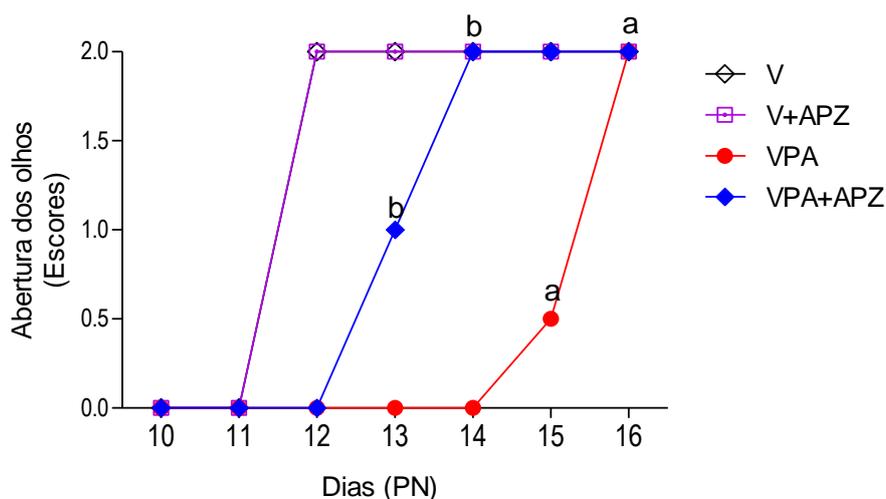


As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripirazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram avaliados no presente teste a partir do dia 1 pós-natal (PN1). Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M.  $p < 0,01$  ( $n=8$ ), PN1,  $p < 0,05$ , PN3,  $p < 0,001$ , PN4 - PN6,  $p < 0,01$ , PN7 e  $p < 0,05$ , PN8, <sup>a</sup>VPA vs veículo;  $p < 0,001$ , PN1,  $p < 0,05$  PN2 e PN4,  $p < 0,01$ , PN5; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

### 5.1.3 Abertura dos olhos

O teste de abertura dos olhos foi realizado de PN1 a PN16. Os animais tratados com VPA abriram os olhos com um atraso significativo em comparação com o tempo levados pelos os animais do grupo V ( $p < 0,001$ ), indicando também prejuízos sobre o neurodesenvolvimento. O tratamento com APZ preveniu significativamente os prejuízos observados em comparação ao grupo tratado apenas com VPA ( $p < 0,001$ ) (Fig. 20).

**Figura 20.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne atraso na abertura dos olhos em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.



As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram avaliados no presente teste a partir do dia 10 pós-natal (PN10). Os dados expressam a mediana,  $p < 0.001$  ( $n=8$ ), PN12-PN15, <sup>a</sup>VPA vs V;  $p < 0.001$ , PD13-PD15, <sup>b</sup> VPA+APZ vs VPA (ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

## 5.2 O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) evita prejuízos na interação social em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

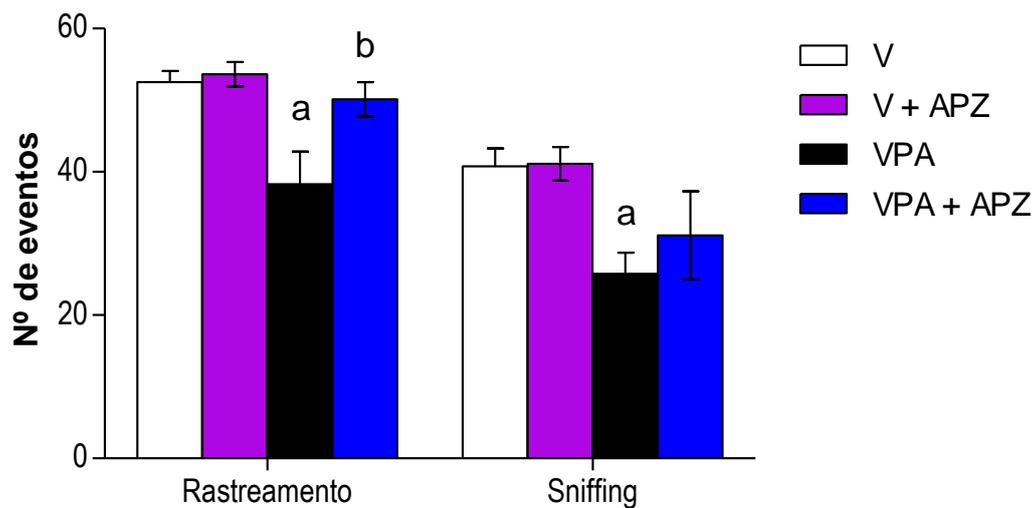
### 5.2.1 Brincadeiras juvenis (Juvenile play test)

O teste de brincadeiras juvenis foi realizado em PN21. Os filhotes VPA mostraram uma redução significativa no número de rastreamento ( $N^{\circ}$  de eventos, V:  $52.50 \pm 1.57$ ; V+APZ:  $53.63 \pm 1.71$ ; VPA:  $43.25 \pm 2.31$ ,  $p < 0.05$ ), no número de sniffing anogenital ( $N^{\circ}$  de eventos, V:  $40.75 \pm 2.51$ ; V+APZ:  $41.13 \pm 2.37$ ; VPA:  $25.75 \pm 2.96$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 21A), no tempo que cada animal passou sentado um ao lado do outro (Tempo (s), V:  $475.3 \pm 37.41$ ; V+APZ:  $399.4 \pm 54.72$ ; VPA:  $370.8 \pm 38.70$ ,  $p < 0.05$ ) e um aumento significativo no tempo isolamento ou realizando self-grooming (Tempo (s), V:  $263.5 \pm 34.63$ ; V+APZ:  $356.0 \pm 30.91$ ; VPA:  $567.0 \pm 55.53$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 21B) comparado ao animais V. Esses resultados sugerem prejuízos na interação social. O tratamento com APZ preveniu os animais desses prejuízos, uma vez que os animais desse grupo tiveram um maior número de rastreamento ( $N^{\circ}$  de eventos, VPA+APZ:  $52.00 \pm 1.77$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2a) e um maior número de sniffing anogenital ( $N^{\circ}$  de eventos, VPA+APZ:  $37.25 \pm 2.38$ ,  $p < 0.05$ ), (Fig. 21A). Ainda, os animais VPA+APZ mostraram um aumento significativo no tempo que esses passaram sentado lado a lado (Tempo (s), VPA+APZ:  $480.0 \pm 37.26$ ,  $p < 0.05$ ) e uma redução significativa

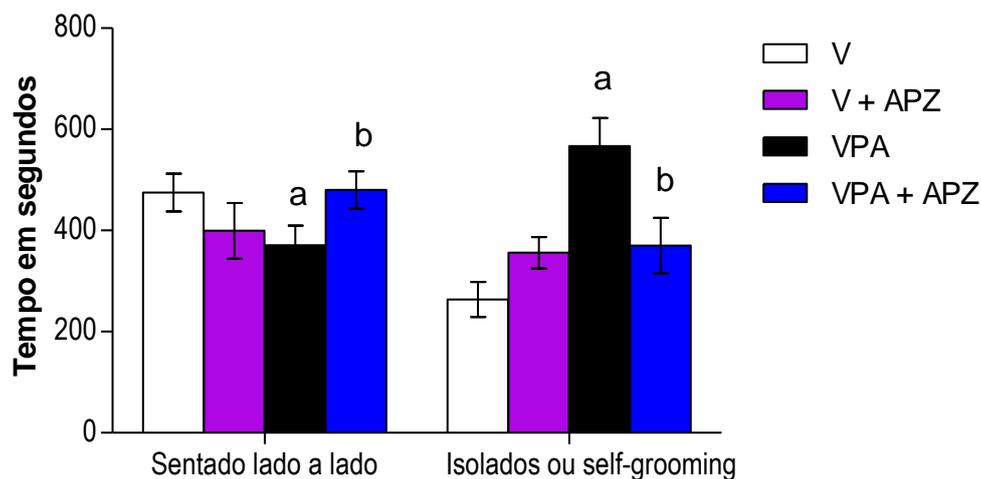
no tempo que esses passaram isolados ou realizando self-grooming comparado ao animais VPA (Tempo (s), VPA+APZ:  $370.4 \pm 54.45$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 21B). Esses dados sugerem uma possível neuroproteção do aripiprazol sobre os déficits de interação social em animais VPA.

**Figura 21.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne os déficits sociais no *juvenile play test* em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

A



B



As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram estudados no presente teste em PN21. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), A= Nº de eventos: <sup>a</sup>VPA vs V,  $p < 0.01$ ; <sup>b</sup> VPA+APZ vs VPA,  $p < 0.05$ ; B= Tempo em segundos: <sup>a</sup>VPA vs V,  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup> VPA+APZ vs VPA,  $p < 0.01$ ; (ANOVA de duas vias, seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

### 5.2.2 Aparato de três câmaras

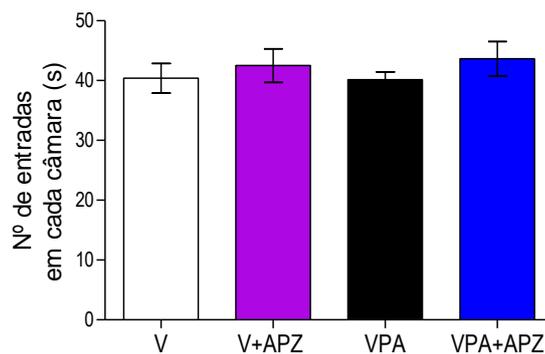
No teste de interação social no aparato de três câmaras, realizado no PN28, não foram observadas diferenças significativas no número de entradas em cada câmara (atividade locomotora) entre os grupos (V:  $40.38 \pm 2.47$ ; V + APZ:  $42.50 \pm 2.81$ ; VPA:  $40.13 \pm 1.30$ ; VPA + APZ :  $43.63 \pm 2.87$ ) (Fig. 22A).

Os animais tratados com VPA passaram um tempo significativamente menor na câmara com o animal estranho (tempo (s), V:  $283.5 \pm 6.15$  s; V + APZ:  $288.5 \pm 5.31$ ; VPA:  $120.6 \pm 18.61$ ,  $p < 0.001$ ) e um tempo mais longo na câmara com o copo de arame vazio e invertido (tempo (s), V:  $210.6 \pm 14.80$ ; V + APZ:  $221.8 \pm 11.17$ ; VPA:  $389.0 \pm 21.18$ ,  $p < 0.001$ ) em comparação com os animais V (Fig. 22B), indicando déficits de interação social. O tratamento com APZ protegeu os animais desses déficits, estes, passaram mais tempo na câmara com o animal estranho (tempo (s), VPA + APZ:  $259.5 \pm 16.81$ ,  $p < 0.001$ ) e um menor tempo na câmara com o copo vazio em comparação com os animais VPA (tempo (s), VPA + APZ:  $250.4 \pm 16.60$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 22B) mostrando os possíveis efeitos benéficos do APZ sobre a sociabilidade de camundongos VPA.

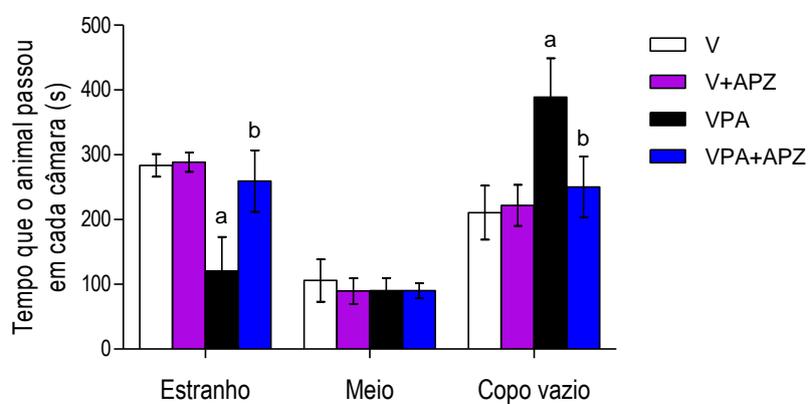
Ainda, os animais VPA mostraram um tempo de *sniffing* significativamente reduzido em comparação com os animais V (tempo (s), V:  $84.38 \pm 6.19$ ; V + APZ:  $89.38 \pm 5.79$ ; VPA:  $52.75 \pm 6.77$ ,  $p < 0.001$ ). Diferentemente, os animais do grupo VPA + APZ demonstraram um tempo de *sniffing* significativamente maior em comparação com o grupo VPA (tempo (s), VPA + APZ:  $72.50 \pm 4.66$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 22C). Esses dados contribuem para mostrar o efeito neuroprotetor do APZ sobre a interação social de animais VPA. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos no *sniffing time* realizados na câmara apenas com o copo vazio (V:  $39.88 \pm 2.28$ ; V + APZ:  $44.38 \pm 2.20$ ; VPA:  $41.75 \pm 4.51$ ; VPA + APZ:  $52.00 \pm 3.98$ ) (Fig. 22C).

**Figura 22.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne os déficits sociais no aparato de três câmaras em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

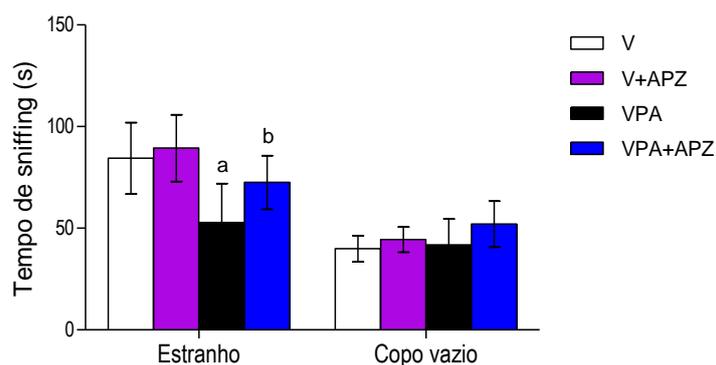
A



B



C



As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripirazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram estudados no presente teste em PN28. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), A = Nº de entradas em cada câmara; B = Tempo que o animal passou em cada câmara (s): <sup>a</sup>VPA vs V,  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA,  $p < 0.001$ ; C = Tempo de sniffing (s): <sup>a</sup>VPA vs V,  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA,  $p < 0.001$  (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

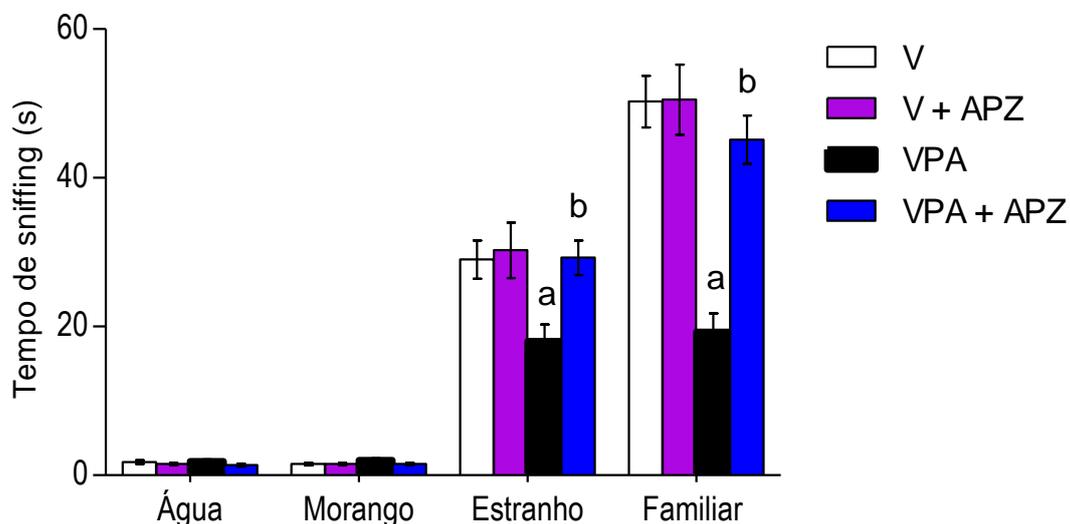
### 5.3 O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) evita prejuízos na comunicação social

***inadequada em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.***

**5.3.1 Teste olfatório em paradigma discriminativo**

O teste olfatório em paradigma discriminativo foi realizado em PN30. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos durante as análises dos odores sociais (água e essência de morango). Em contraste, o grupo VPA mostrou uma redução significativa no tempo de *sniffing* nos odores sociais (familiar e estranho) (Tempo (s), estranho: V:  $29.00 \pm 2.57$ ; V+APZ:  $30.25 \pm 3.72$ ; VPA:  $18.00 \pm 2.25$ ,  $p < 0.01$ ; Tempo (s), familiar: V:  $50.25 \pm 3.48$ ; V+APZ:  $50.50 \pm 4.71$ ; VPA:  $19.25 \pm 2.52$ ,  $p < 0.001$ ) comparado ao grupo controle (Fig. 23). Esses resultados sugerem prejuízos na comunicação olfativa social desses animais. O tratamento durante a gravidez com APZ preveniu significativamente a redução no tempo de *sniffing* (Tempo (s), estranho: VPA+APZ:  $29.25 \pm 2.32$ ,  $p < 0.01$ ; Tempo (s), familiar: VPA+APZ:  $45.13 \pm 3.23$ ,  $p < 0.001$ ), indicando que possivelmente o APZ melhorou a comunicação olfativa social de animais VPA.

**Figura 23.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne os déficits de comunicação social no teste olfatório em paradigma discriminativo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

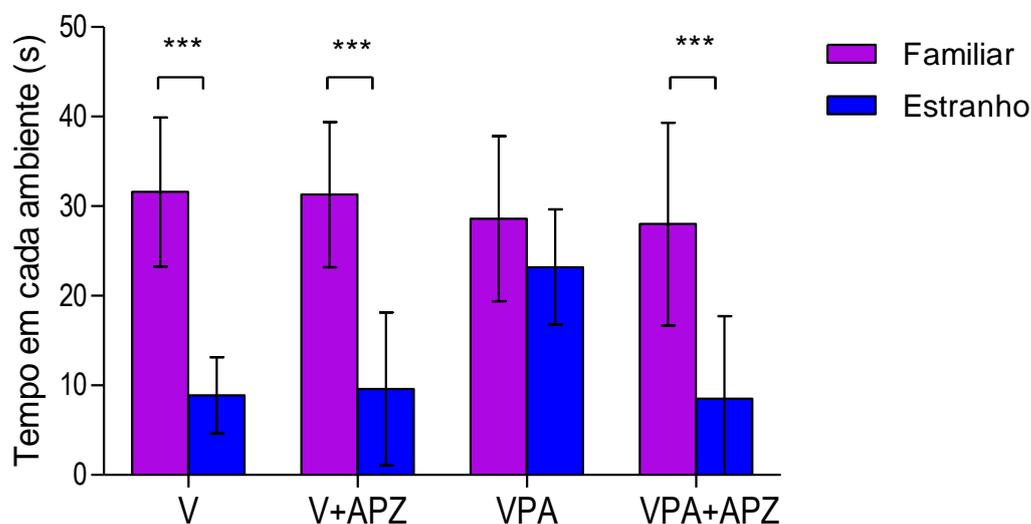


As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram estudados no presente teste em PN30. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8); <sup>a</sup>VPA vs V, Estranho:  $p < 0.01$ ; Familiar:  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup> VPA+APZ vs VPA, Estranho:  $p < 0.01$ ; Familiar:  $p < 0.001$  (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

### 5.3.2 Cheiro materno

Em PN14 foi realizado o teste da preferência pelo o cheiro materno. O grupo V explorou o ambiente familiar em um tempo significativamente maior em relação ao ambiente de odor estranho (Tempo (s); Familiar: V:  $30.89 \pm 2.83$ ; Estranho: V:  $9.11 \pm 1.48$ ,  $p < 0.001$ ). Em contraste, no grupo VPA, os animais não apresentaram diferença no tempo passado entre esses respectivos ambientes (Tempo (s); Familiar: VPA:  $28.60 \pm 2.91$ ; Estranho: VPA:  $23.20 \pm 2.03$ ). Esses resultados também indicam prejuízos na comunicação olfativa social desses animais. Geralmente, animais VPA não mostram interesse ou não conseguem distinguir entre odores familiares e estranhos. O tratamento materno com APZ fez com que os animais passassem um tempo significativamente maior no ambiente familiar, quase similar ao grupo controle (Time (s), Familiar: VPA+APZ:  $24.25 \pm 4.02$ ; Estranho: VPA+APZ:  $7.77 \pm 3.16$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 24). Mais uma vez, o APZ melhorou a comunicação olfativa social de animais VPA.

**Figura 24.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne os déficits de comunicação social no teste da preferência pelo o cheiro materno em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

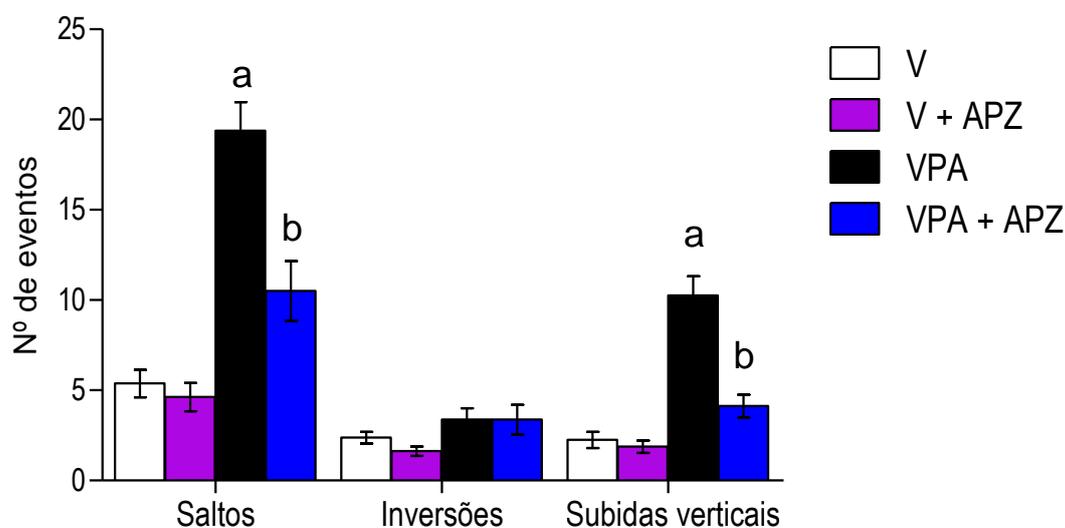


As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram estudados no presente teste em PN14. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8); \*\*\*  $p < 0.001$  (ANOVA de duas vias seguida de teste de *post-hoc* de Bonferroni).

#### 5.4 O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o comportamento repetitivo em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

A análise de comportamento repetitivo foi realizada em PN21 e PN30. No grupo VPA, os animais apresentaram um aumento significativo no número de saltos (Nº de eventos, V:  $5,37 \pm 0,75$ ; V + APZ:  $4,62 \pm 0,77$ ; VPA:  $19,38 \pm 1,60$ ,  $p < 0,001$ ) (Fig. 25), e subidas verticais (Nº de eventos, V:  $2,25 \pm 0,45$ ; V + APZ:  $1,87 \pm 0,35$ ; VPA:  $10,25 \pm 1,08$ ,  $p < 0,001$ ) em comparação com o grupo tratado com V. Esses dados elucidam comportamentos estereotipados, repetitivos e restritos. Nenhuma diferença significativa foi encontrada no número de inversões entre os grupos. Em relação ao tratamento materno com APZ, a prole repetiu em menor quantidade os saltos (Nº de eventos, VPA + APZ:  $10,50 \pm 1,65$ ,  $p < 0,001$ ) e as subidas verticais (Nº de eventos, VPA + APZ:  $4,12 \pm 0,63$ ,  $p < 0,001$ ) indicando que o APZ preveniu os animais VPA do comportamento repetitivo.

**Figura 25.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o comportamento repetitivo em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

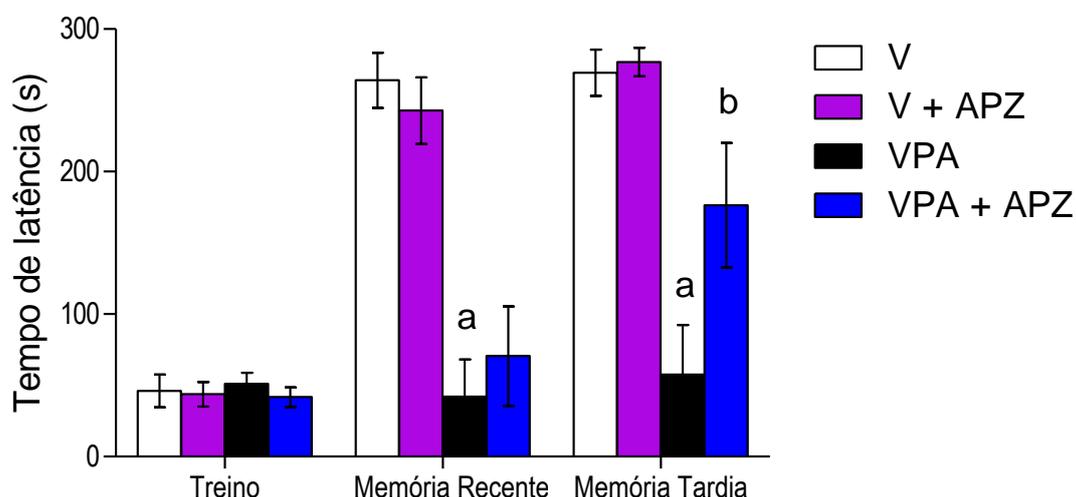


As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mg/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram estudados no presente teste em PN21 e PN30. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V Saltos e subidas:  $p < 0,001$ ; <sup>b</sup> VPA+APZ vs VPA Saltos e subidas:  $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

### 5.5 O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o déficit de memória aversiva em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

Os animais VPA apresentaram déficits significativos de memória aversiva recente e tardia, em PN29 e PN30, comparados aos animais do grupo V (Latência - Memória Recente: V:  $264.0 \pm 19.27$ ; V + APZ:  $242.8 \pm 23.37$ ; VPA:  $42.13 \pm 25.99$ ,  $p < 0,001$ ). Latência - Memória tardia: V:  $269.4 \pm 16.13$ ; V + APZ:  $276.9 \pm 10.06$ ; VPA:  $57.50 \pm 34.90$ ,  $p < 0,001$ ). O tratamento materno com o APZ não impediu os déficits na memória recente, porém, preveniu os déficits na memória tardia (VPA + APZ:  $176.4 \pm 43.84$ ,  $p < 0,001$ ), (Fig. 26).

**Figura 26.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o déficit de memória aversiva em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

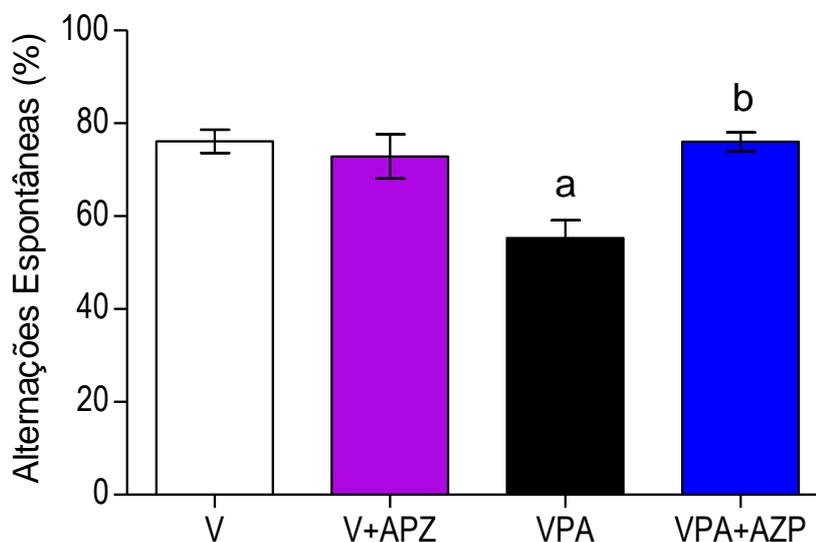


As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mg/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram estudados no presente teste em PN29 e PN30. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0,001$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA:  $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

### 5.6 O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o déficit de memória de trabalho em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

Em PN21, os filhotes foram submetidos ao teste de Y-Maze, e os resultados mostraram uma significativa redução das alterações espontâneas nos filhotes VPA, indicando déficit na memória de trabalho. O tratamento materno com APZ preveniu significativamente o déficit observado (% de alterações espontâneas, V:  $76.13 \pm 2.47$ ; V + APZ:  $72.88 \pm 4.73$ ; VPA:  $55.25 \pm 3.89$ ; VPA + APZ:  $76.20 \pm 2.07$ ,  $p < 0,01$ ) (Fig. 27).

**Figura 27.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne o déficit de memória de trabalho em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.



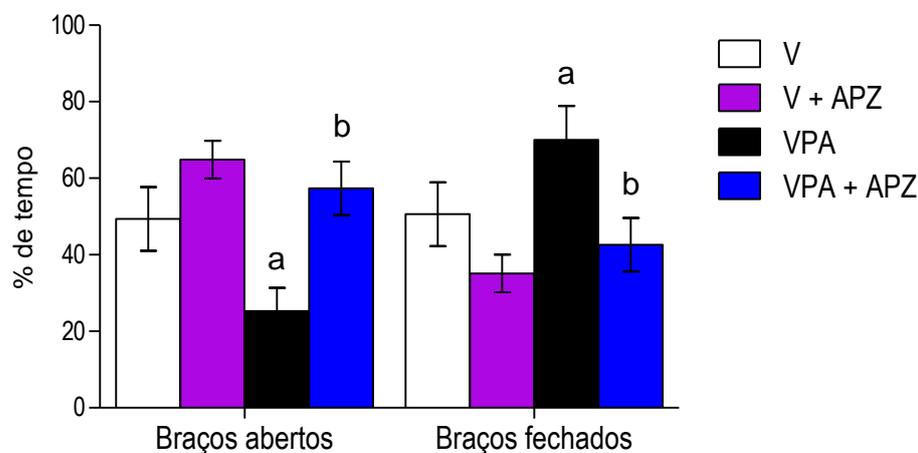
As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripirazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram estudados no presente teste em PN21. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0.01$ ; <sup>b</sup> VPA+APZ vs VPA:  $p < 0.01$  (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

### **5.7 O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) diminui o comportamento ansioso-símile em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.**

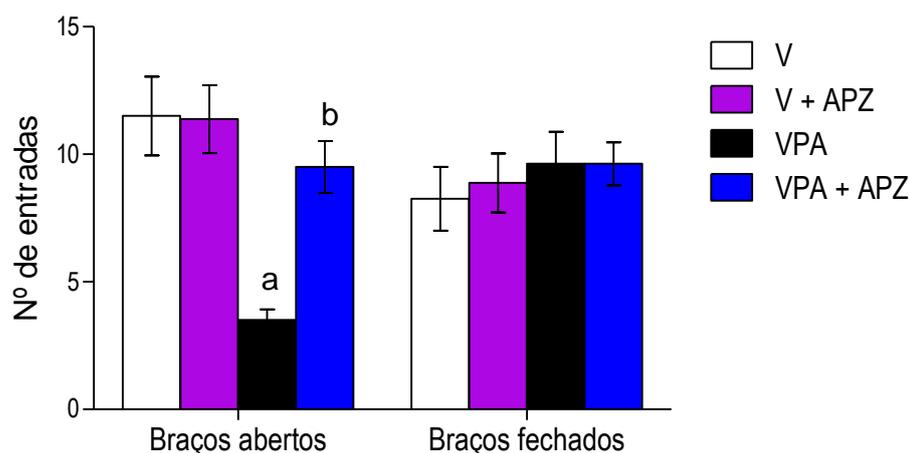
Em PN28, os filhotes foram submetidos aos testes de ansiedade e atividade locomotora. Os animais expostos ao VPA passaram um tempo significativamente menor nos braços abertos (Tempo (s), V:  $54.71 \pm 7.39$ ; V+APZ:  $64.88 \pm 4.88$ ; VPA:  $26.00 \pm 6.79$ ,  $p < 0.05$ ) e um tempo significativamente maior nos braços fechados (Tempo (s), V:  $45.29 \pm 7.39$ ; V+APZ:  $35.13 \pm 4.88$ ; VPA:  $76.00 \pm 7.49$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 28A). Ainda, apresentaram um número significativamente reduzido de entradas nos braços abertos (Nº de entradas, V:  $11.50 \pm 1.54$ ; V+APZ:  $11.38 \pm 1.33$ ; VPA:  $3.50 \pm 0.42$ ,  $p < 0.001$ ) comparado aos animais V (Fig. 28B). Esses achados sustentam uma clássica elucidação de um comportamento ansioso-símile. Os animais tratados com APZ mostraram uma diminuição desse comportamento comparado aos animais VPA, passando um tempo de permanência significativamente maior nos braços abertos (Tempo (s), VPA+APZ:  $57.38 \pm 6.96$ ,  $p < 0.05$ ), um tempo significativamente menor nos braços fechados (Time (s), VPA+APZ:  $42.63 \pm 6.96$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 28A) e um aumento no número de entradas nos braços abertos (Número de eventos, VPA+APZ:  $9.50 \pm 1.01$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 28B). Essas informações indicam um efeito neuroprotetor ansiolítico do APZ em animais VPA.

**Figura 28.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) diminui o comportamento ansioso-símil em camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

A



B

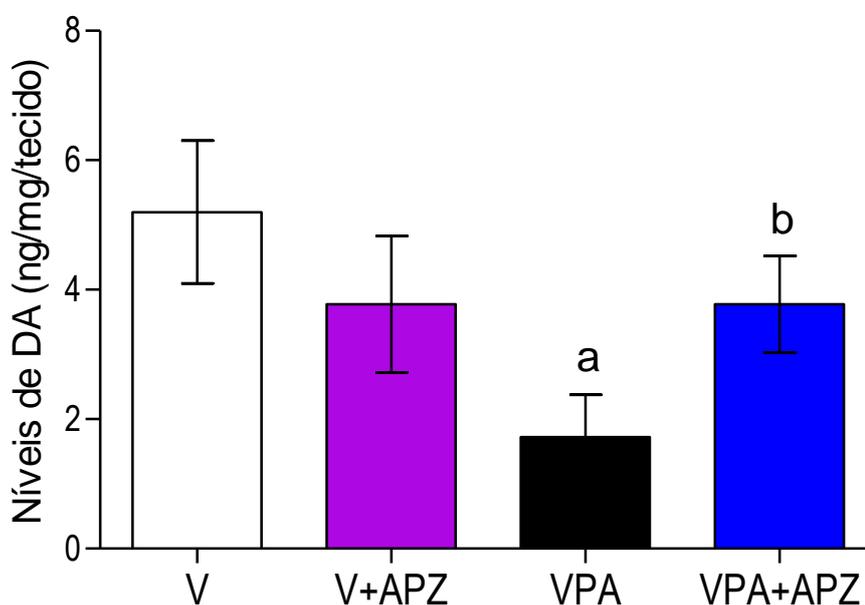


As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles, os filhotes foram estudados no presente teste em PN28. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA:  $p < 0.01$  (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

### 5.8 O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne a redução de dopamina (DA) no córtex pré-frontal (CPF) de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.

Os animais tratados com VPA mostraram uma diminuição significativa nos níveis extracelulares de DA no CPF em comparação com o grupo V (DA (ng/mg de tecido), V:  $5,2 \pm 1,10$ ; V + APZ:  $3,7 \pm 1,05$ ; VPA:  $1,72 \pm 0,64$ ,  $p < 0,05$ ). O tratamento com APZ preveniu significativamente a diminuição nos níveis de DA no CPF (DA (ng/mg de tecido), VPA+APZ:  $3,7 \pm 0,74$ ,  $p < 0,05$ ), (Fig. 29).

**Figura 29.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne a redução de dopamina (DA) no córtex pré-frontal (CPF) de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.



As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mg/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles e dos respectivos testes comportamentais, os filhotes foram eutanasiados e seus cérebros dissecados para análises de DA no CPF. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> VPA+APZ vs VPA:  $p < 0.01$  (ANOVA de uma via, Kruskal-Wallis seguida de teste *post-hoc* de Dunn).

### 5.9 O tratamento materno com aripiprazol (APZ) 10 mg/kg não interferiu no efeito anticonvulsivante do ácido valpróico (VPA) 15 mg/kg no modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos.

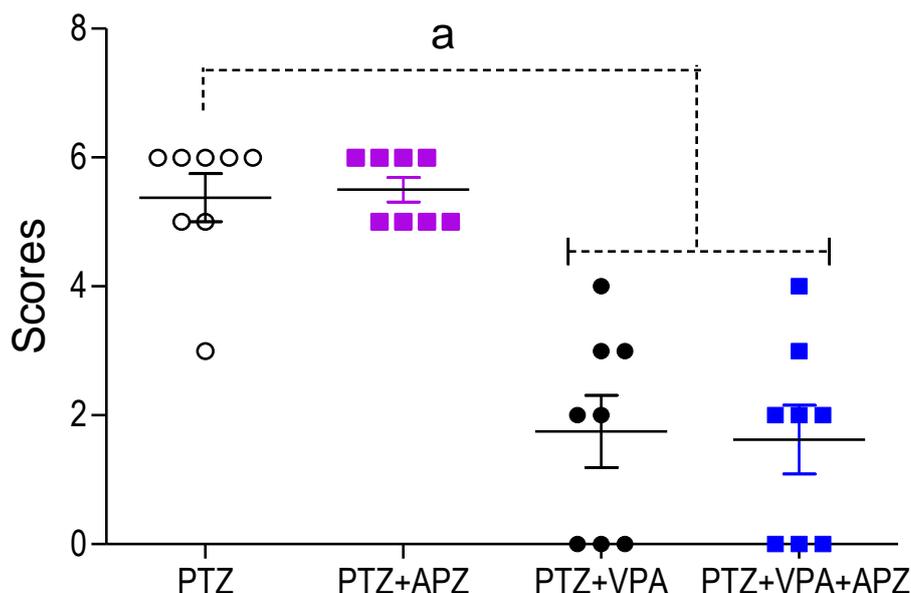
Os animais PTZ exibiram uma redução significativa na latência para a primeira convulsão, o tratamento com ácido valpróico (VPA) aumentou significativamente essa latência (Latência (s), PTZ:  $34.44 \pm 3.17$ ; PTZ+APZ:  $39.44 \pm 2.65$ ; PTZ+VPA:  $323.0 \pm 45.44$ ,  $p < 0.001$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos PTZ+VPA e PTZ+VPA+APZ na latência para a primeira convulsão (Latência (s), PTZ+VPA+APZ:  $277.3 \pm 21.76$ ,  $p < 0.001$ ), (Tabela 06). O percentual de morte dos animais injetados com PTZ foi de 100, nenhum animal tratado com VPA ou VPA + APZ morreu quando foram induzidos à convulsão com PTZ (Tabela 06). Em relação aos *scores* de convulsão, os animais PTZ+VPA e PTZ+VPA+APZ apresentaram uma mediana significativamente menor comparada aos animais PTZ (escores de convulsão — mediana (min-max), PTZ: 6.00 (3.00-6.00); PTZ+APZ: 5.50 (5.00-6.00); PTZ+VPA: 2.00 (0.00-4.00); PTZ+VPA+APZ: 2.00 (0.00-4.00),  $p < 0.01$  (Fig. 30). Os dados demonstram que o APZ não interfere no efeito anticonvulsivante do VPA.

**Tabela 06.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) não influenciou sobre o efeito anticonvulsivante do VPA (15 mg/kg) no modelo de convulsão induzida por PTZ em animais.

<i>Grupos de tratamentos</i>	<i>Média da latência para 1<sup>a</sup> convulsão (s)</i>	<i>% de morte</i>
PTZ	34	100
PTZ + APZ	39	100
PTZ+VPA	815 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
PTZ + VPA + APZ	784 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8): PTZ (veículo-solução salina 0,9% + petilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.); PTZ+APZ (petilenotetrazol (80 mg/kg, i.p. + aripiprazol 10 mg / kg, i.p.); PTZ + VPA (petilenotetrazol (80 mg/kg, i.p. + ácido valpróico 15 mg /kg, i.p.) e PTZ + VPA + APZ (petilenotetrazol (80 mg/kg, i.p. + ácido valpróico 15 mg /kg, i.p. + aripiprazol 10 mg / kg, i.p.). Após a injeção de PTZ, todos os animais foram observados por 30 min. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V: p<0.001; (ANOVA de uma via, Kruskal-Wallis seguida de teste post-hoc de Dunn).

**Figura 30.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) não influenciou sobre o efeito anticonvulsivante do VPA (15 mg/kg) no modelo de convulsão induzida por PTZ em animais.

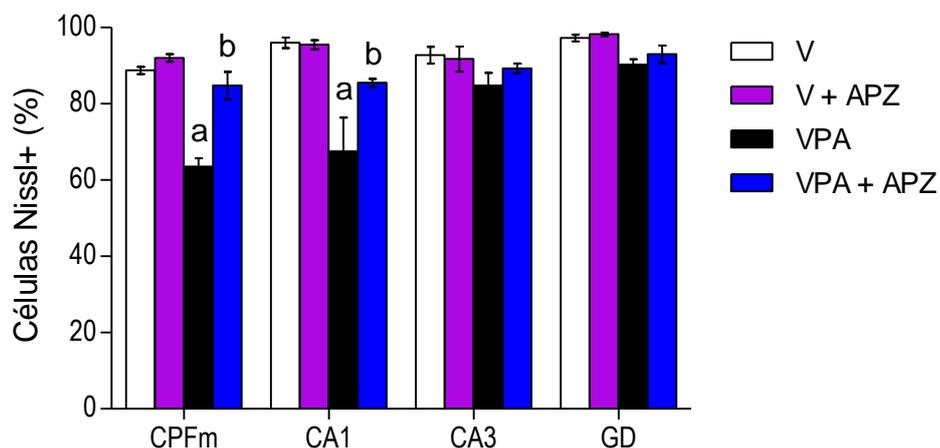


Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8): PTZ (veículo-solução salina 0,9% + petilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.); PTZ+APZ (petilenotetrazol (80 mg/kg, i.p. + aripiprazol 10 mg / kg, i.p.); PTZ + VPA (petilenotetrazol (80 mg/kg, i.p. + ácido valpróico 15 mg /kg, i.p.) e PTZ + VPA + APZ (petilenotetrazol (80 mg/kg, i.p. + ácido valpróico 15 mg /kg, i.p. + aripiprazol 10 mg / kg, i.p.). Após a injeção de PTZ, todos os animais foram observados por 30 min. Os dados expressam a mediana, (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V: p<0.001; (ANOVA de uma via, Kruskal-Wallis seguida de teste post-hoc de Dunn).

**5.10 O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) previne a morte celular no CPFm e no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.**

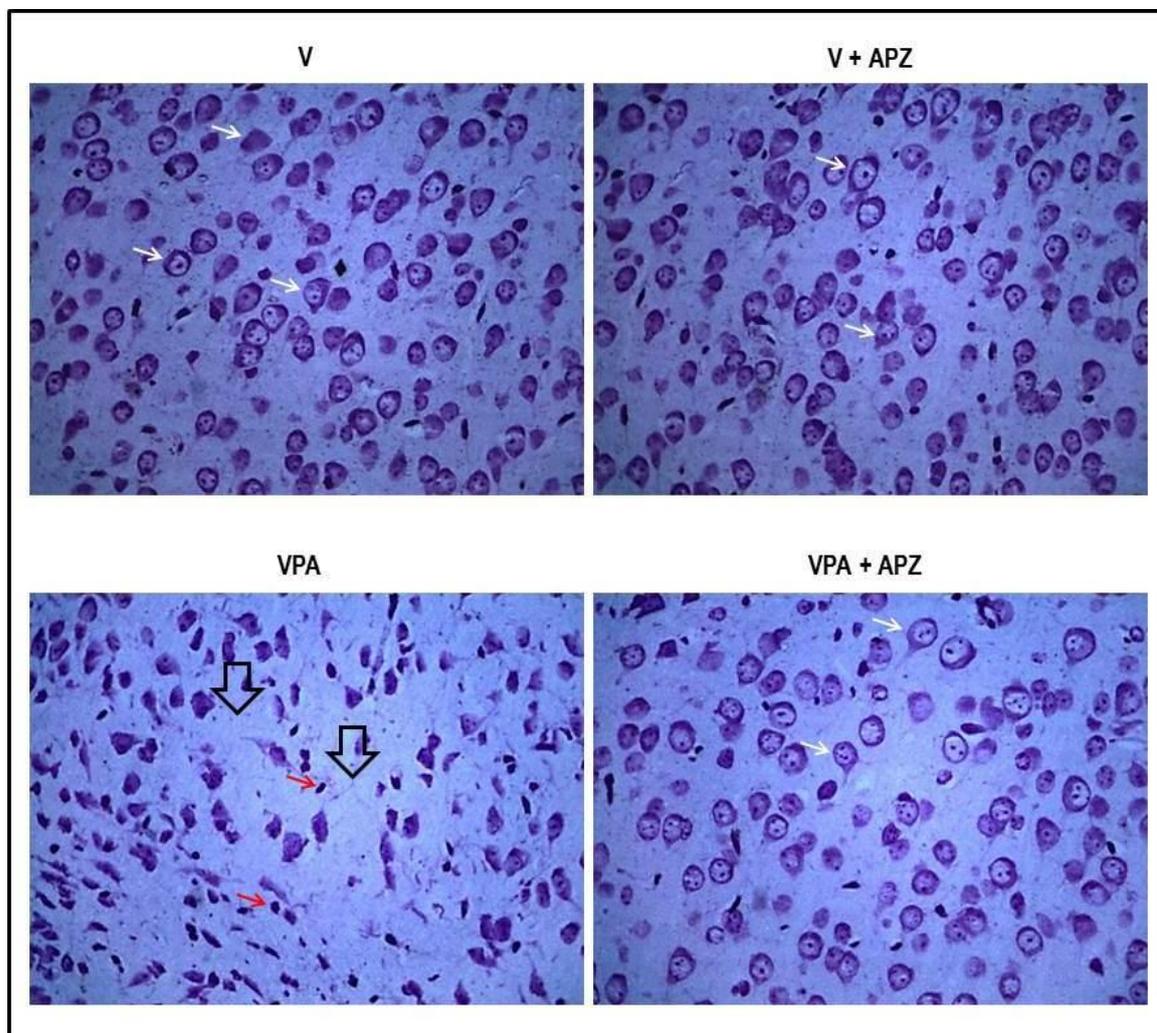
Células Nissl+ foram observadas no CPFm e nas regiões hipocampais CA1, CA3 e GD do grupo V (% de células Nissl+ - mPFC:  $88.75 \pm 0.94$ ; CA1:  $96.00 \pm 1.41$ ; CA3:  $92.75 \pm 2.21$ ; DG:  $97.25 \pm 0.85$ ). Nos animais VPA foram encontrados um arranjo espacial atípico dos neurônios, heterogeneidade nas características morfológicas, como formas e tamanhos irregulares, largo espaço intercelular, seguido por uma significativa diminuição de células Nissl+ (redução da viabilidade celular) no CPFm e na região CA1 (% Nissl+ - mPFC:  $63.50 \pm 2.17$ ,  $p < 0.001$ ; CA1:  $59.33 \pm 4.80$ ,  $p < 0.001$ ), mas não em CA3 e DG (% of Nissl+ cells - CA3:  $84.75 \pm 3.35$ ; DG:  $90.25 \pm 1.43$ ) comparado com os animais controle. Nos animais que receberam o tratamento materno com APZ, a morfologia e a % viabilidade celular foram preservadas significativamente em ambas as áreas, CPFm (VPA+APZ:  $85.50 \pm 3.63$ ,  $p < 0.001$ ) e em CA1 (VPA+APZ:  $85.50 \pm 1.04$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 30, 31 e 32).

**Figura 31.** O tratamento materno com APZ (10 mg / kg) previne a morte celular no CPFm e no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.



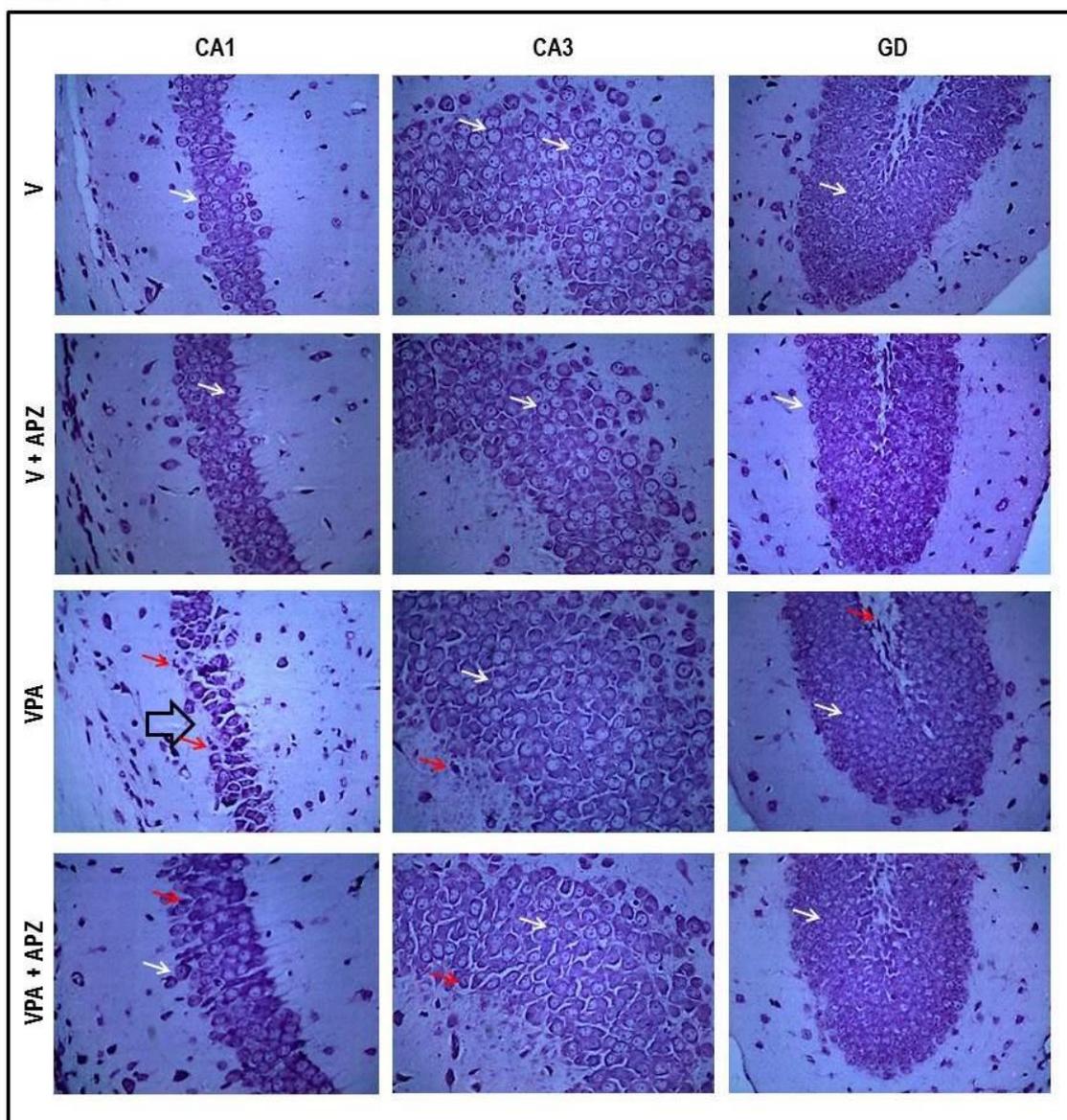
As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles e dos respectivos testes comportamentais, os filhotes foram eutanasiados e seus cérebros dissecados para análise da viabilidade celular no CPFm e no hipocampo. Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA:  $p < 0.001$  (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

**Figura 32.** Fotomicrografia representativa da coloração de Nissl em secções coronais do CPFm de camundongos jovens expostos no período pré-natal ao ácido valpróico (VPA) e tratados com aripiprazol (APZ)



Aumento de 400x representando o efeito do APZ sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de Nissl no CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal. Pode-se perceber a escassez de células Nissl+ (seta vazada) com conseguinte desorganização na citoarquitetura e picnose (setas vermelhas) no grupo VPA. No grupo APZ + VPA, pode-se observar a ação protetora (setas brancas indicando a integridade da coloração de Nissl nas células neurais) do APZ 10 mg/kg , (n=4/grupo).

**Figura 33.** Fotomicrografia representativa da coloração de Nissl em secções coronais do hipocampo de camundongos jovens expostos no período pré-natal ao ácido valpróico (VPA) e tratados com aripiprazol (APZ).



Aumento de 400x representando o efeito do APZ sobre a viabilidade celular evidenciada pela coloração de Nissl no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal. Pode-se perceber a escassez de células Nissl+ (seta vazada) com conseguinte desorganização citoarquitetural e picnose (setas vermelhas) na região CA1 do grupo VPA. No grupo APZ + VPA, pode-se observar a ação protetora (setas brancas indicando a integridade da coloração de Nissl nas células neurais) do APZ 10 mg/kg, (n=4/grupo).

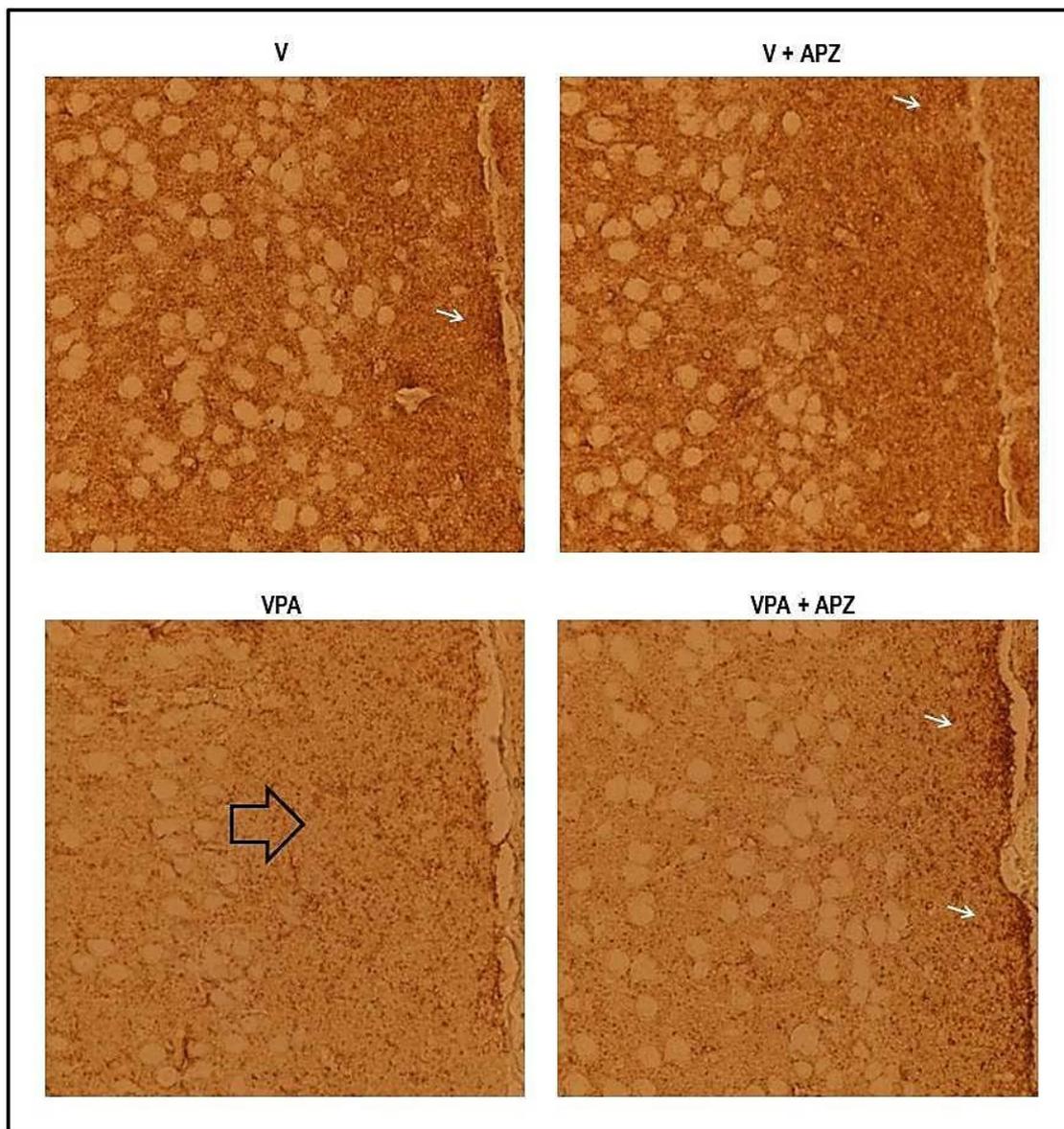
***5.11 Efeito do tratamento materno com APZ (10 mg/kg) sobre a imunorreatividade para a sinaptofisina (Syp) no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.***

Foi observada uma diminuição significativa na imunorreatividade para a Syp no CPFm e na região CA1 hipocampal dos camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal, comparada aos animais veículo (D.O.; % da média dos controles: CPFm, V:  $100.0 \pm 0.00$ ; V + APZ:  $88.2 \pm 0.47$ ; VPA:  $45.50$ ;  $p < 0.001$ ; CA1 hipocampal, V:  $100.0 \pm 0.00$ ; V + APZ:  $92.0 \pm 1.47$ ; VPA:  $50.75 \pm 8.10$ ;  $p < 0.001$ ). O tratamento materno com APZ preveniu significativamente essa redução (D.O.; % da média dos controles: CPFm, VPA + APZ:  $59.50 \pm 3.88$ ; CA1 hipocampal, VPA + APZ:  $64.50 \pm 3.42$ ). Não foram observadas diferenças significativas nas regiões CA3 e GD (Fig. 33, 34, 35 e 36).

***5.12 Efeito do tratamento materno com APZ (10 mg/kg) sobre a imunorreatividade para a SNAP-25 no córtex pré-frontal medial e no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.***

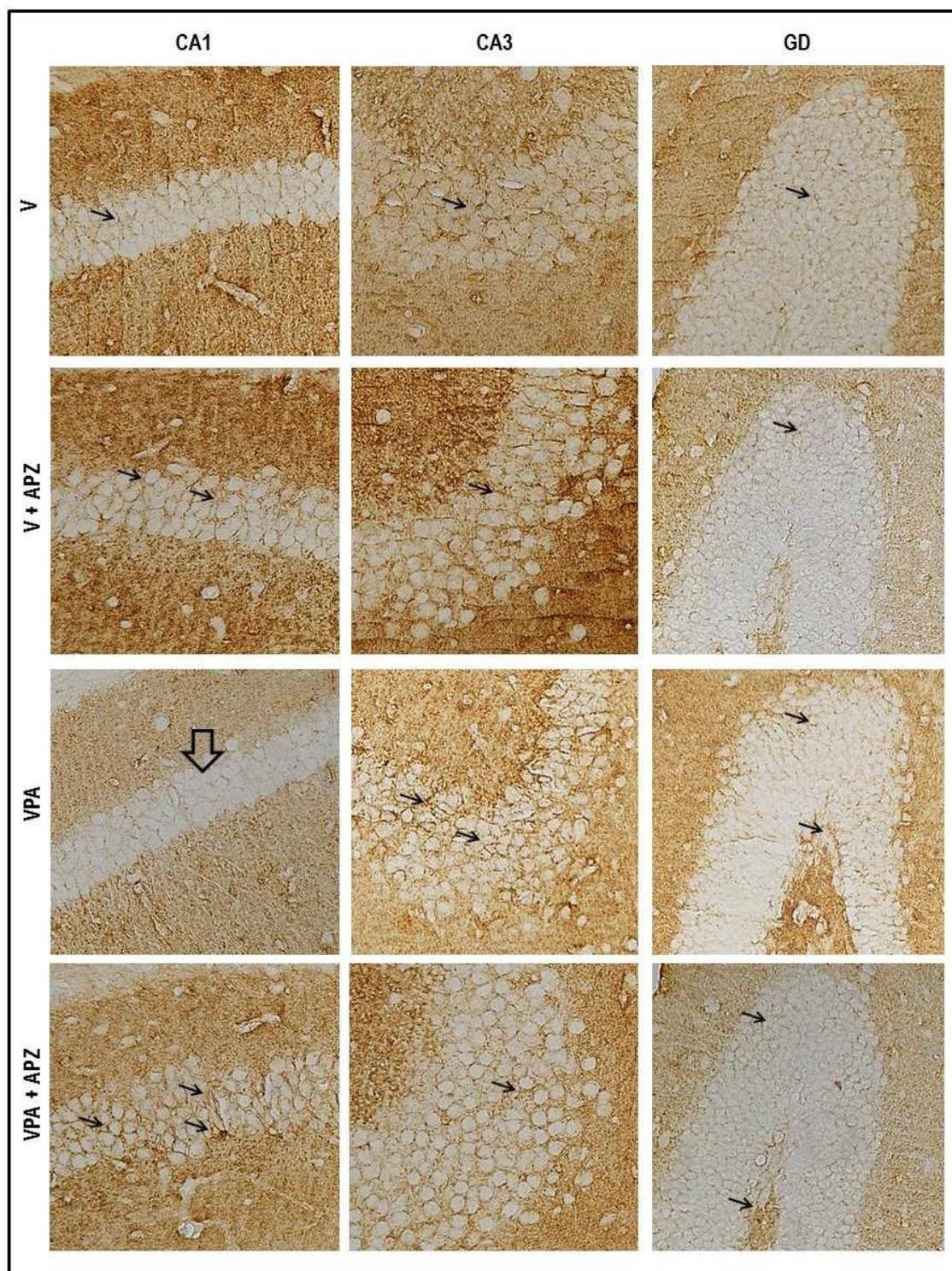
Os animais expostos ao VPA no período pré-natal apresentaram uma redução significativa na expressão de SNAP-25 no CPFm e nas áreas hipocampais CA1 e GD comparada aos animais V (D.O.; % da média dos controles: CPFm, V:  $100.0 \pm 0.00$ ; V + APZ:  $83.0 \pm 1.91$ ; VPA:  $37.0 \pm 4.12$ ;  $p < 0.001$ ; CA1, V:  $100.0 \pm 0.00$ ; V + APZ:  $92.0 \pm 1.20$ ; VPA:  $45.50 \pm 1.84$ ;  $p < 0.001$ ); GD V:  $100.0 \pm 0.00$ ; V + APZ:  $91.25 \pm 1.93$ ; VPA:  $50.75 \pm 4.93$ ;  $p < 0.001$ ). O tratamento materno com APZ preveniu significativamente essa redução (D.O.; % da média dos controles: CPFm, VPA + APZ:  $60.50 \pm 6.66$ ; CA1, VPA + APZ:  $62.00 \pm 3.02$ ; GD, VPA + APZ:  $56.75 \pm 1.03$ ). Não foram observadas diferenças significativas na região CA3 (Fig. 37, 38, 39 e 40).

**Figura 34.** Fotomicrografia representativa da imunomarcção para sinaptofisina (SYP) em secções coronais do CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).



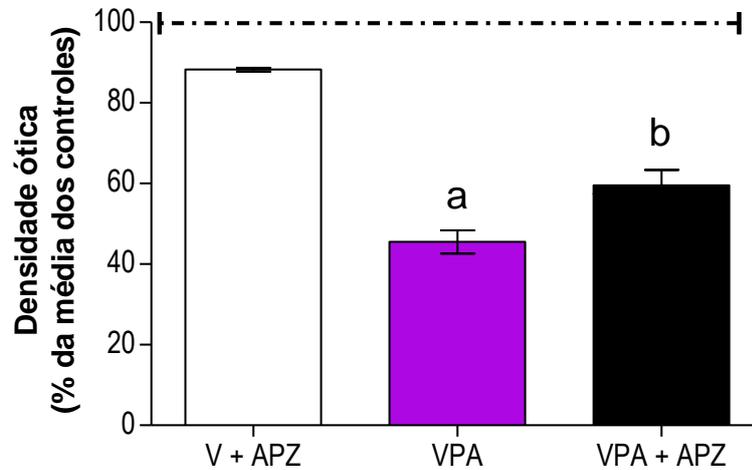
Aumento de 200x representando o efeito do APZ sobre a expressão de Syp evidenciada pela a densidade ótica da coloração marrom no CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal. Pode-se perceber a diminuição dessa densidade no grupo VPA (seta vazada). No grupo APZ + VPA, pode-se observar a ação protetora (setas brancas) do APZ 10 mg/kg, (n=4/grupo).

**Figura 35.** Fotomicrografia representativa da imunomarcção para sinaptofisina (SYP) em secções coronais do hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).



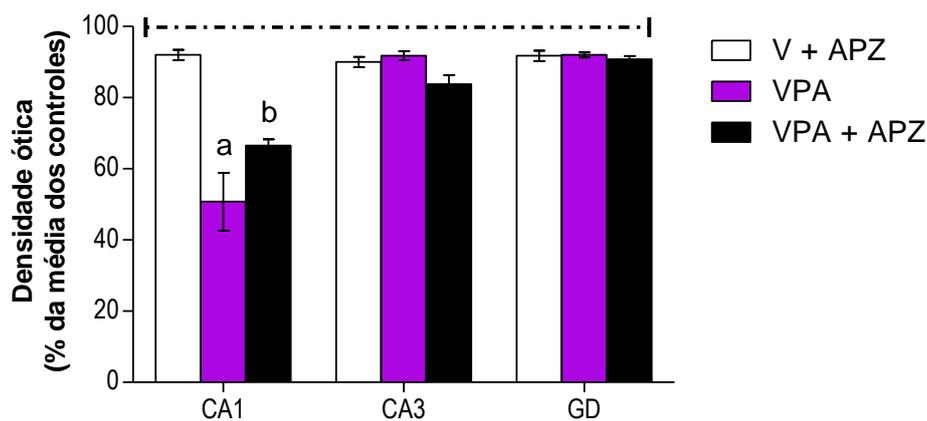
Aumento de 400x representando o efeito do APZ sobre a expressão de Syp evidenciada pela a densidade ótica da coloração marrom no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal. Pode-se perceber a diminuição dessa densidade na região CA1 (seta vazada) do grupo VPA. No grupo APZ + VPA, pode-se observar a ação protetora (setas pretas na região CA1) do APZ 10 mg/kg , (n=4/grupo).

**Figura 36.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) preveniu a redução na imunorreatividade para sinaptofisina (Syp) no CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.



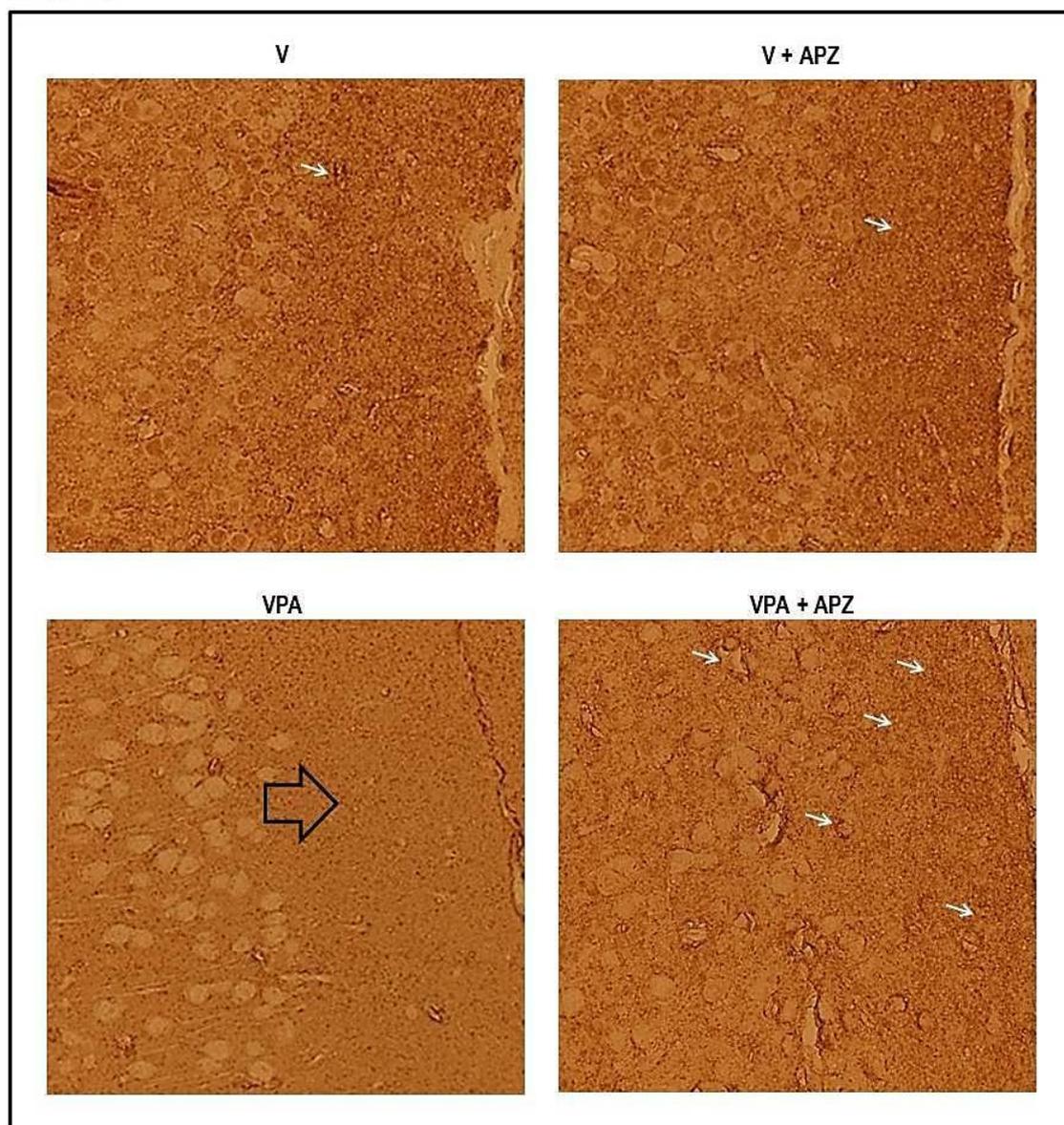
As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles e dos respectivos testes comportamentais, os filhotes foram eutanasiados e seus cérebros dissecados para análise da imunorreatividade para sinaptofisina (Syp) no CPFm de animais VPA. A linha pontilhada expressa 100% da densidade ótica dos controles (V). Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA:  $p < 0.001$  (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

**Figura 37.** O tratamento materno com APZ (10 mg / kg) preveniu a redução da imunorreatividade para sinaptofisina (SYP) na região CA1 hipocampal de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal.



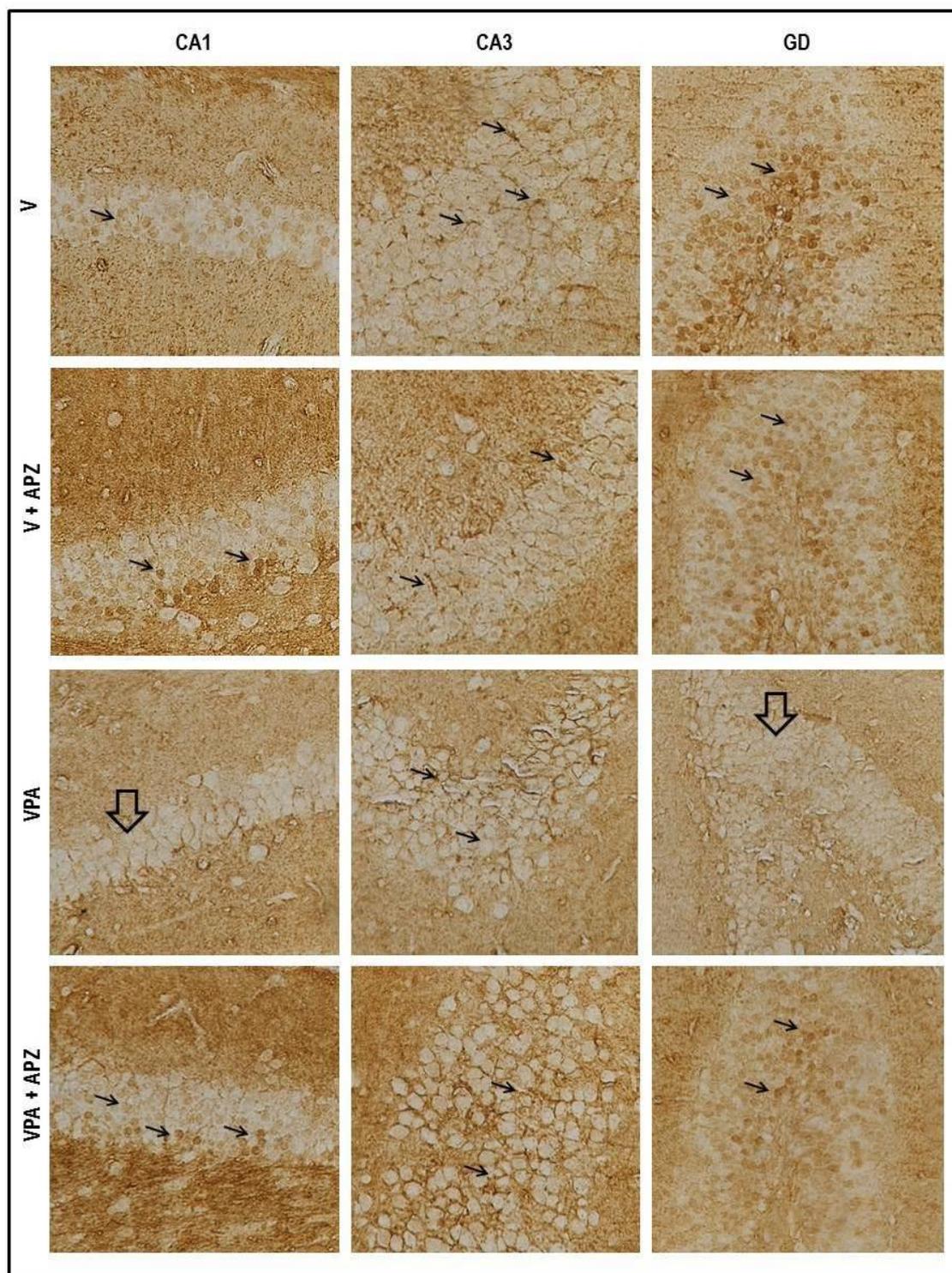
As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles e dos respectivos testes comportamentais, os filhotes foram eutanasiados e seus cérebros dissecados para análise da imunorreatividade para sinaptofisina (Syp) no hipocampo de animais VPA. A linha pontilhada expressa 100% da densidade ótica dos controles (V). Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA:  $p < 0.001$  (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

**Figura 38.** Fotomicrografia representativa da imunomarcação para SNAP-25 em secções coronais do CPFm de camundongos jovens expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).



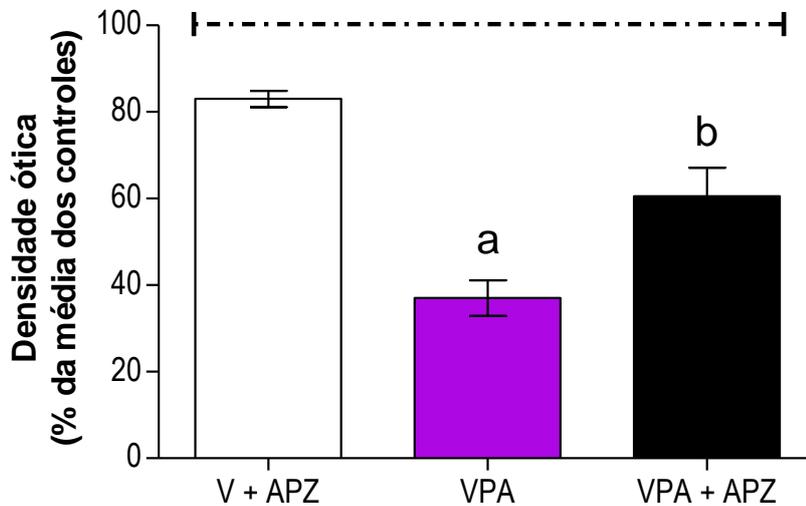
Aumento de 200x representando o efeito do APZ sobre a expressão de SNAP-25 evidenciada pela a densidade ótica da coloração marrom no CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal. Pode-se perceber a diminuição na densidade no grupo VPA (seta vazada). No grupo APZ + VPA, pode-se observar a ação protetora (setas brancas) do APZ 10 mg/kg, (n=4/grupo).

**Figura 39.** Fotomicrografia representativa da imunomarcação para SNAP-25 em secções coronais do hipocampo de camundongos jovens expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).



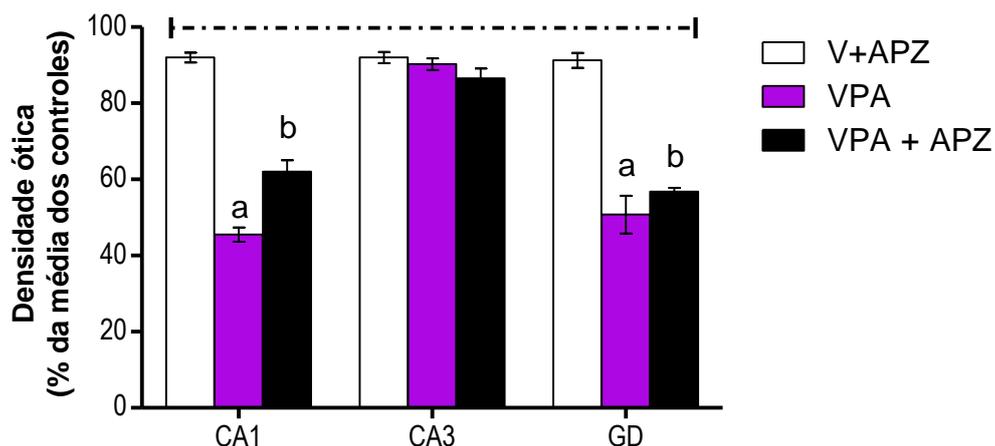
Aumento de 400x representando o efeito do APZ sobre a expressão de SNAP-25 evidenciada pela densidade ótica da coloração marrom no hipocampo de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal. Pode-se perceber uma diminuição dessa densidade na região CA1 e no GD (setas vazadas) no grupo VPA. No grupo APZ + VPA, pode-se observar a ação protetora (setas pretas) do APZ 10 mg/kg, (n=4/grupo).

**Figura 40.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) preveniu a redução da expressão de SNAP-25 no CPFm de camundongos jovens expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).



As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles e dos respectivos testes comportamentais, os filhotes foram eutanasiados e seus cérebros dissecados para análise da imunorreatividade para SNAP-25 no CPFm de animais VPA. A linha pontilhada expressa 100% da densidade ótica dos controles (V). Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA:  $p < 0.001$  (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

**Figura 41.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) preveniu a redução da expressão de SNAP-25 na região CA1 e GD do hipocampo de camundongos jovens expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).

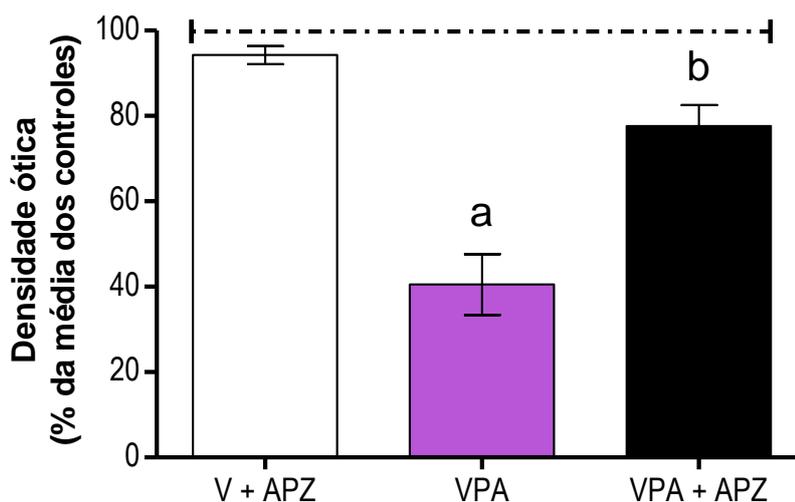


As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mk/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles e dos respectivos testes comportamentais, os filhotes foram eutanasiados e seus cérebros dissecados para análise da imunorreatividade para SNAP-25 no hipocampo de animais VPA. A linha pontilhada expressa 100% da densidade ótica dos controles (V). Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA:  $p < 0.001$  (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

**5.13 Efeito do tratamento materno com APZ (10 mg/kg) sobre a imunorreatividade de MAP-2 no CPFm de camundongos jovens expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).**

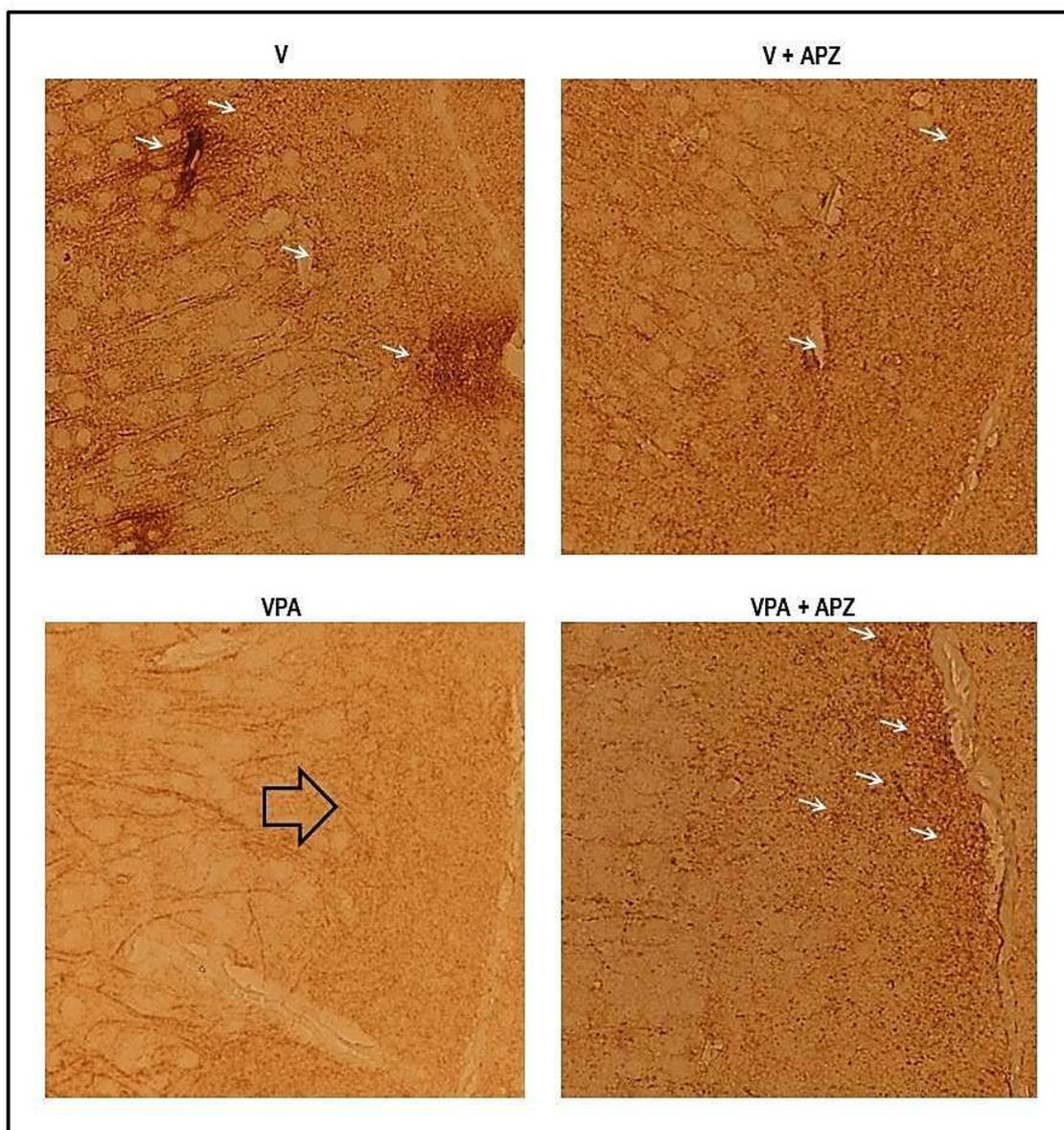
Os animais expostos ao VPA no período pré-natal apresentaram uma redução significativa na expressão de MAP-2 no CPFm, comparada aos animais V (D.O.; % da média dos controles: CPFm, V:  $100.0 \pm 0.00$ ; V + APZ:  $94.2 \pm 2.13$ ; VPA:  $40.5 \pm 7.08$ ;  $p < 0.001$ ). O tratamento materno com APZ preveniu significativamente essa redução (D.O.; % da média dos controles: CPFm, VPA + APZ:  $77.6 \pm 4.91$ ;  $p < 0.001$ ) (Fig. 41 e 42).

**Figura 42.** O tratamento materno com APZ (10 mg/kg) preveniu a redução da expressão de MAP-2 no CPFm de camundongos jovens expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).



As mães foram tratadas nos dias 11,5 e 12 com aripiprazol (APZ-10mg/kg, i.p.) e no dia 12,5 com ácido valpróico (VPA-500mg/kg, i.p.). Após o nascimento das proles e dos respectivos testes comportamentais, os filhotes foram eutanasiados e seus cérebros dissecados para análise da imunorreatividade para MAP-2 no CPFm de animais VPA. A linha pontilhada expressa 100% da densidade ótica dos controles (V). Os dados expressam a média  $\pm$  S.E.M., (n=8), <sup>a</sup>VPA vs V:  $p < 0.001$ ; <sup>b</sup>VPA+APZ vs VPA:  $p < 0.001$  (ANOVA de uma via seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

**Figura 43.** Fotomicrografia representativa da imunomarcaco para MAP-2 em secoes coronais do CPFm de camundongos jovens expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (APZ).



Aumento de 200x representando o efeito do APZ sobre a expressão de MAP-2 evidenciada pela densidade tica da colorao marrom no CPFm de camundongos jovens expostos ao VPA no período pré-natal. Pode-se perceber a diminuio dessa densidade no grupo VPA (seta vazada). No lado direito inferior, pode-se ver a ao protetora do APZ (setas brancas) no tratado com APZ na dose de 10 mg/kg (VPA+APZ 10), (n=4/grupo).

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que o tratamento materno com aripiprazol (APZ) na dose de 10 mg/kg em camundongos expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal, um modelo experimental de TEA, previne anormalidades de desenvolvimento precoce e prejuízos nas interações sociais em camundongos jovens. Além disso, o APZ também previne estereotípias, aumenta os níveis extracelulares de DA, previne a morte celular, eleva as expressões de Syp e SNAP-25 no córtex pré-frontal medial (CPFm) e no hipocampo e previne a redução de MAP-2 no CPFm. Ainda, o APZ não interferiu no efeito anticonvulsivante do VPA.

Hara et al. (2017) demonstraram que o tratamento crônico com APZ melhorou o comprometimento na interação social e os déficits de memória de reconhecimento e ainda, restaurou os níveis de DA no CPF em animais submetidos ao modelo de transtorno do espectro autista induzido por ácido valpróico (TEA-VPA). No entanto, neste estudo, os autores investigaram a ação do APZ a partir de um tratamento pós-natal, na fase adulta das proles (8 semanas), quando o comportamento autista-símile nos animais já se encontra estabelecido. No nosso estudo, investigamos o efeito do APZ na prevenção do aparecimento dos sintomas do TEA, fazendo um tratamento com APZ antes da injeção do VPA nas fêmeas grávidas. É importante relatar que, apesar das indicações de possíveis efeitos teratogênicos do APZ em animais, em nosso estudo o APZ foi administrado apenas duas vezes em camundongos prenhes, e nenhuma toxicidade foi observada, enquanto o desenvolvimento de efeitos de toxicidade do APZ foi demonstrado por Iqbal et al., (2005) apenas em altas doses (10-30 mg/dia) e durante tratamentos maternos crônicos, vale ressaltar que em 2008 o *Food and Drug Administration (FDA)* dos EUA aprovou o aripiprazol (Abilify®) para o tratamento da irritabilidade no TEA (FDA, 2008).

Crianças autistas apresentam atrasos no desenvolvimento neurológico nos primeiros estágios da vida. Teitelbaum et al. (1998) mostraram distúrbios relacionados ao movimento em dezessete crianças autistas, recém-nascidos ou na idade 4-6 meses. Os distúrbios foram revelados em alguns ou todos os marcos do desenvolvimento, incluindo endireitar, sentar, engatinhar e andar. Os autores concluíram que os distúrbios do movimento desempenham um papel intrínseco no fenômeno do TEA, que estão

presentes no nascimento e ajudam no diagnóstico logo nos primeiros meses de vida das crianças com TEA.

Os distúrbios do neurodesenvolvimento estão frequentemente presentes no TEA, e esses efeitos também podem ser reproduzidos em animais tratados com VPA (YANG et al. 2016; AL-ASKAR et al. 2017). No presente estudo os filhotes tratados com VPA apresentaram peso corporal significativamente menor, tiveram latência elevada para o reflexo de auto-endireitamento e exibiram abertura ocular tardia em comparação com os filhotes do grupo controle. Esses resultados estão em concordância com outros estudos, Schneider e Przewlocki (2005) mostraram que ratos VPA apresentam atraso de maturação neurológica, menor peso corporal, retardo de desenvolvimento motor e integração atenuada de uma série coordenada de reflexos. Resultados semelhantes foram encontrados por Yang et al. (2016), que mostraram que os filhotes VPA apresentaram peso corporal significativamente reduzido, atraso na abertura dos olhos e aumento na latência de auto-endireitamento. Este último achado pode ser explicado por achados que demonstram perda neuronal severa em neurônios somatossensoriais e motores, bem como no tronco cerebral e cerebelo de animais tratados com VPA (INGRAM et al.1996). Mostramos que o tratamento materno com APZ preveniu o atraso do neurodesenvolvimento causado pela exposição pré-natal ao VPA e especulamos que esse efeito neuroprotetor pode estar relacionado à ação do APZ na ativação do sistema dopaminérgico no CPF como mostrado por Hara et al. (2017), e a outros mecanismos neuronais. Por exemplo, apesar dos achados de Hernández-Hernández et al. (2018) não estarem relacionados com o APZ, eles revelam que a regulação positiva da plasticidade sináptica no CPF estão associadas a melhora de anormalidades cognitivas e comportamentais em animais, e essa regulação sináptica positiva foi alcançada significativamente pelo o APZ como mostrado por Seo et al. (2015) no córtex frontal de rato em um modelo animal de estresse por imobilização.

Os transtornos de interação social estão frequentemente presentes no TEA e esses efeitos também podem ser reproduzidos em animais VPA (YANG et al., 2016; AL-ASKAR et al., 2017). Neste estudo, investigamos a interação social por meio de dois testes: (1) Brincadeiras (*Juvenile play*) e (2) Abordagem social com camundongo estranho. O teste de Brincadeiras, quando realizado na fase infanto-juvenil, permite avaliar a interação social camundongos a partir de sinais recíprocos em um período crítico para o estabelecimento de comportamentos sociais, que geralmente começa no

PN21 (CAMPOLONGO et al., 2018) e dura toda a adolescência (PN21 a PN42) (SPEAR, 2000). O teste de abordagem social com um camundongo estranho permite estudar a sensibilidade e interação do animal-sujeito a partir de uma tarefa não recíproca, uma vez que o animal-estranho está preso em uma gaiola e impossibilitado de corresponder as brincadeiras (NADLER et al. 2004), e esse teste tem sido amplamente utilizado para elucidar deficiências sociais induzidas pelo VPA (BAMBINI-JUNIOR et al. 2011; MELANCIA et al. 2018). Corroborando com os achados de Gonzales et al. (2016) e Campolongo et al. (2018), nossos resultados mostraram falhas semelhantes na interação social adequada nos animais VPA em comparação com animais controle ambos os testes acima mencionados. O tratamento materno com APZ protegeu destes comprometimentos de sociabilidade, e esse resultado estão de acordo com Hara et al. (2017), que usaram o APZ, porém, com um tratamento pós-natal. Esses benefícios foram possivelmente alcançados, pelo menos em parte, pelas propriedades do APZ em aumentar a DA no CPF de animais VPA como observado nesse trabalho, uma vez que a redução da atividade da DA nessa área foi relacionada ao comprometimento cognitivo em um modelo animal de autismo-símile por VPA (HARA et al, 2017), e em pacientes com TEA (ERNST et al., 1997).

O TEA causa atraso de linguagem e das habilidades de comunicação (DOUSSARD-ROOSEVELT et al. 2003). Embora os roedores não usem a fala para se comunicar, eles podem fornecer pistas sociais e afetivas por meio de sinais olfativos, permitindo ao pesquisador analisar o comportamento social a partir do interesse dos animais pelos odores (YANG et al. 2016). Observamos déficits de odor social no grupo VPA em ambos os testes olfativos, e esses resultados estão de acordo com relatórios anteriores, mostrando que os animais tratados com VPA não distinguem um cheiro familiar de um cheiro estranho. O desinteresse pelo o cheiro materno, ou pelo o odor de sua própria gaiola, pode ser considerado um atraso na comunicação social (ROULLET et al. 2010; YANG et al. 2016). Somos os primeiros a mostrar que o tratamento materno com APZ impediu que animais jovens nascidos de mães expostas ao VPA durante a gravidez apresentassem comunicação social cognitiva prejudicada. Faure et al. (2019) relataram que o APZ não interfere na comunicação social de camundongos expostos ao MK-801, antagonista do receptor NMDA, um modelo de esquizofrenia. Neste caso, é importante considerar a diferença entre os modelos. Faure et al. (2019) avaliaram a comunicação social pelo teste de vocalização ultrassônica, enquanto nós a avaliamos

por testes olfativos sociais. Os testes de vocalização têm limitações, pois podem não levar em conta o reconhecimento de odores familiares e estranhos (YANG et al. 2016). Os sintomas de TEA que refletem déficits emocionais e/ou comportamentais, como retraimento social e déficits de comunicação, têm sido um desafio para o tratamento farmacológico.

Além dos déficits de sociais e de comunicação, os indivíduos com TEA manifestam estereotipias ou comportamento repetitivo. Incluindo, movimentos persistentes, obsessivos e fixos, e são cruciais para o diagnóstico adicional do autismo. Eles estão classicamente associados a co-morbidades, como ansiedade e tiques que começam antes dos 3 anos de idade e progridem até a idade adulta (KATHERINE, 2018). Ryan et al. (2010) observaram esse comportamento repetitivo em animais VPA, assim como observado no nosso estudo. O tratamento materno com APZ diminuiu significativamente as estereotipias observadas nos animais VPA, corroborando com os estudos de Rizzo et al. (2018), que mostraram que o APZ reduziu a frequência e a latência de tiques motores, como, estereotipias composta de lambe a pata, esfregar a pata sobre a cabeça, lambe e esfregar o lado do corpo, a região ano-genital e a cauda, locomoção vertical para cima ou para baixo em uma superfície vertical usando apenas as patas dianteiras e o comportamento de escalada, neste caso, em um modelo animal jovem de síndrome de Tourette e de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade comórbido. Kitanaka et al. (2015) também mostraram que APZ aliviou significativamente a estereotipia induzida por metanfetamina em camundongos e ambos os estudos os autores especulam que a inibição do sistema dopaminérgico na via corticoestriatal pode ser, pelo menos em parte, a via responsável por esse benefício, uma vez que APZ bloqueia receptores dopaminérgicos D2 nesta via (HARA et al., 2017). Em humanos, as evidências sugerem que o APZ pode ser eficaz como uma intervenção de tratamento de curto prazo contra irritabilidade, hiperatividade e estereotipias em crianças e adolescentes com TEA (HIRSCH e PRINGSHEIM, 2016).

Indivíduos com autismo apresentam condições clínicas concomitantes ao TEA, como ansiedade e déficits de memória (GVOZDJÁKOVÁ et al., 2014; LAI et al., 2014). Semelhante aos achados de Mirza e Sharma et al. (2019), mostramos que os animais VPA apresentaram um comportamento ansioso e o APZ foi capaz de promover um efeito ansiolítico, o que corrobora com Biojone et al. (2011), que utilizando um modelo de medo condicionado, observaram propriedades ansiolítica e antipânico do

APZ. Segundo os autores, uma explicação potencial para essas propriedades anti-aversivas é a propriedade agonística parcial nos receptores D2 da dopamina. Por exemplo, enquanto os antagonistas do receptor D2 induzem estados aversivos, a ativação deste receptor com um agonista D2 na Área Tegmental Ventral (ATV) é capaz de diminuir a expressão do susto potencializado pelo medo. Embora não seja um agonista completo, o aripiprazol pode manter um "tônus dopaminérgico" nesta estrutura quando os níveis de DA estão baixos (ver adiante). Além disso, dado que a ATV projeta vias dopaminérgicas também para o complexo amigdalóide, onde a liberação de dopamina está envolvida na expressão de reações emocionais condicionadas, a ativação de receptores D2 nessa área pelo aripiprazol podem reduzir os níveis de dopamina na amígdala e ser responsável pelos efeitos ansiolíticos observados (Apud BIOJONE et al., 2011). Além da participação do sistema dopaminérgico, mecanismos relacionados à serotonina também pode explicar os efeitos anti-aversivos do APZ. Graeff et al., 1996 mostrou que o APZ pode bloquear diretamente receptores 5HT2 na amígdala ou realizar agonismo parcial em receptores 5HT1A de serotonina localizados no núcleo dorsal da rafe. O bloqueio desses receptores resulta em efeitos ansiolíticos, possivelmente, pelo o aumento na produção de serotonina nessas referidas áreas. Em consonância com esta visão, é razoável especular que os nossos resultados de anti-ansiedade-símile em animais VPA podem acontecer por via mesolímbica-dependente a partir de uma conseguinte atenuação da mesma, bem como, mediada por via serotoninérgica via bloqueio dos receptores 5HT2 e 5HT1A.

Campbell e colaboradores mostraram que crianças e adolescentes com autismo idiopático têm um déficit na memória de trabalho (CAMPBELL et al. 2010). Nosso trabalho mostrou uma diminuição significativa na memória de trabalho em camundongos jovens expostos ao VPA durante o período pré-natal, corroborando com os resultados mostrados por Gonzales et al. (2016). Além disso, mostramos que o tratamento com APZ protegeu os animais contra estes déficits de memória de trabalho. Choi et al. (2019) mostraram que o tratamento com APZ durante a adolescência melhora a função cognitiva em camundongos normais no início da idade adulta, particularmente a memória operacional espacial. A esses resultados, os autores associaram a participação dos diferentes mecanismos de ação do APZ. Eles perceberam que o APZ propiciou níveis de receptores D2 significativamente mais baixos no CPFm e no hipocampo em comparação com ratos controles, e atribuíram à esse evento o fato

do APZ aumentar a liberação de dopamina nessas respectivas áreas e causar por conseguinte a ocupação e supressão desses receptores. Hipoteticamente, essas alterações dos níveis de D2 no CPFm e no hipocampo fomentam a hipótese de que essas vias podem se relacionar ao maior desempenho cognitivo dos ratos tratados com APZ, uma vez que, a atividade dopaminérgica nessas áreas cerebrais é conhecida por contribuir conjuntamente para a integridade da memória operacional espacial (SPELLMAN et al., 2015). Ainda, um estudo PET recente relacionou um agonismo parcial de receptores do tipo D2 e D3 no estriado pelo o APZ ao aumento do desempenho em tarefas de memória operacional em pacientes com esquizofrenia (SHIN et al., 2018).

Além dos déficits na memória de trabalho, mostramos também que camundongos jovens expostos ao VPA durante o período pré-natal apresentam prejuízos na memória aversiva na tarefa de esQUIVA inibitória, e esses dados são semelhantes aos de Melancia et al. (2018). A tarefa de esQUIVA inibitória é fortemente dependente do hipocampo e do núcleo basolateral da amígdala (ROSSATO et al., 2006). Embora Picada et al. (2011) ter mostrado anteriormente que o APZ melhora o desempenho cognitivo na memória aversiva de animais, o nosso estudo é pioneiro ao mostrar o mesmo efeito do APZ, porém, em animais expostos ao VPA no período pré-natal. Picada et al. (2011) sugeriram que os efeitos benéficos do APZ sobre a memória aversiva podem estar relacionados a capacidade do APZ de modular os receptores 5-HT1A e 5-HT2A da serotonina, que desempenhem papéis importantes nas funções de memória aversiva (MISHRA e GOEL, 2019).

A exposição pré-natal ao VPA causa hipofunção do sistema dopaminérgico no CPF de animais e isso pode resultar em danos cognitivos severos (HARA et al., 2015; 2016; 2017). Nossos resultados são similares ao tratamento pós-natal com APZ mostrado por Hara et al. (2017), bem como outras publicações que reportam o aumento de DA após o tratamento com APZ em modelos animais distintos (ZOCCHI et al., 2005; BORTOLOZZI et al., 2007). Embora exista essa similaridade, o nosso trabalho inova ao mostrar que o efeito benéfico do APZ (elevando a DA) sobre a hipofunção dopaminérgica no CPF causada pela a exposição ao VPA também é observado durante um tratamento pré-natal.

Para discutirmos o possível mecanismo de ação do APZ no aumento dos níveis de DA no CPF, é necessário considerar as suas ações sobre o sistema dopaminérgico. O

APZ tem sido considerado um simples agonista parcial do receptor D2, porém, isso é controverso. A ação funcional do APZ nos receptores D2 pode se comportar de maneira diferente, variando entre agonista, agonista parcial ou antagonista. Essas variações parecem depender da densidade do receptor, dos níveis de reserva do receptor (TADORI et al., 2009), do ambiente circundante de DA, que difere nas várias regiões do cérebro (KOENER et al., 2012) e do tônus dopaminérgico local. Por exemplo, em baixa concentração de DA, o APZ pode se comportar como um agonista. Ao contrário, em elevada concentração dopaminérgica, o APZ pode se comportar como um antagonista em autoreceptores do tipo D2 em terminais dopaminérgicos pré-sinápticos. O APZ é eficaz na estimulação dos receptores D2 pré-sinápticos, desde que os níveis de dopamina permaneçam baixos. No entanto, como o APZ é um agonista parcial, ele estimula os autoreceptores D2 com baixa atividade em comparação com a DA (MA et al., 2014). Em contrapartida, quando ocorrem altas taxas de exocitose dopaminérgica, o APZ passa a se comportar como um antagonista devido à sua menor eficácia em desempenhar o papel ativo dos receptores D2 em comparação com a DA (ANZALONE et al., 2012). Diante disso, é razoável construir uma hipótese sobre como o APZ aumenta a DA no CPF de animais VPA. O APZ chega em um ambiente basal (baixa concentração dopaminérgica) promovido por VPA no CPF e livremente faz agonismo parcial de D2 pré-sináptico e receptores de reserva, o que resulta no bloqueio da síntese de DA. No entanto, como o agonismo é parcial, a síntese de DA não é bloqueada inteiramente. Nesse ambiente, a DA recém sintetizada não consegue realizar agonismo completo porque D2 pré-sináptico e receptores de reserva estão ocupados por APZ. Por sua vez, o APZ se comporta como um antagonista D2 pré-sináptico na presença de DA elevada, tendo como produto uma síntese contínua de DA e sua conseguinte elevação no meio extracelular. Porém, novos estudos são necessários para a real compreensão desse mecanismo e do seu resultado.

Além das variações nas propriedades do APZ como agonista, agonista parcial e antagonista do receptor D2, o APZ também é conhecido por ter alta afinidade para muitos receptores da proteína G, como os receptores de serotonina (SHAPIRO et al., 2003). Por exemplo, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> e 5-HT<sub>2A</sub> (BORTOLOZZI et al., 2007). Estudos anteriores sugerem que o sistema serotoninérgico, especialmente a ativação do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, está envolvida no aumento dos níveis extracelulares de DA no CPF mediado pela ação de antipsicóticos atípicos (ICHIKAWA et al., 2001; 2002; 2005).

Esses achados sugerem que os níveis dopaminérgicos no CPF podem ser influenciados pelas propriedades agonistas e antagonistas da APZ via autoreceptores D2 e sistema serotoninérgico, principalmente pela ativação de 5-HT1A.

Para descartar possível interferência do APZ nas propriedades anticonvulsivantes do VPA, visto que este é usado como terapia em alguns casos de epilepsia (SHAIKH et al., 2018) investigamos o tratamento associado do APZ e VPA em um modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos. Nossos resultados mostraram que o tratamento com VPA reduziu o início da primeira convulsão e a latência de morte e diminuiu os escores de convulsão em animais tratados com PTZ, enquanto o APZ não interferiu nestas ações do VPA. Estes resultados mostram que o APZ não interfere nas propriedades anticonvulsivantes do VPA. Alguns estudos relataram benefícios com a terapia combinada APZ-VPA, por exemplo, para o tratamento de episódios maníacos agudos (JEONG et al. 2012; YATHAM et al. 2013).

Mudanças morfofuncionais e perda da integridade celular têm sido implicadas no fenótipo comportamental e cognitivo do TEA. É evidente que, devido à sua ação integrativa bem conhecida, anormalidades no CPF têm sido intimamente relacionadas a déficits na interação e comunicação social, estereótipos, distúrbios motores e ansiedade (COURCHESNE e PIERCE, 2005), bem como alterações no hipocampo predispõe ao comprometimento grave da memória (RING et al. 2019). No presente estudo, mostramos mudanças morfológicas significativas e morte celular no CPFm e em CA1 do hipocampo de camundongos jovens expostos durante o período pré-natal ao VPA. Codagnone et al. (2015) evidenciaram uma citoarquitetura colunar alterada atípica no hipocampo, em diferentes regiões, particularmente no CA3 e na camada granular do giro dentado, ambas as regiões apresentaram um arranjo espacial desorganizado em animais VPA e essas alterações foram acompanhadas de microgliose e astrogliose tanto no CPFm, quanto no hipocampo. Mostramos que o tratamento materno com APZ preveniu significativamente a perda celular observada em animais VPA, particularmente nas regiões do CPFm e CA1 hipocampal. Esse achado pode explicar, pelo menos em parte, a proteção do APZ sobre os prejuízos de neurodesenvolvimento e comportamentais encontrados nesse trabalho. Outros autores já demonstraram um efeito neuroprotetor do APZ usando outros modelos, Cosi et al. (2005) mostraram que o APZ (10 mg/kg) diminuiu o dano cerebral na lesão induzida pelo ácido caínico em camundongos, possivelmente pela ativação do receptor 5-HT (1A).

Foi sugerido que as alterações sinápticas em várias áreas do cérebro contribuem para a fisiopatologia do TEA, porém, esses relatos são escassos e os resultados controversos (CODAGNONE et al., 2015; GASSOWSKA-DOBROWOLSKA et al., 2020). Codagnone et al. (2015), buscaram no CPFm e no hipocampo de ratos expostos ao modelo de TEA por VPA mudanças sinápticas precoce de Syn, coincidentes no tempo com as alterações comportamentais. Depois de confirmar o atraso do crescimento e da maturação em ratos VPA, descobriram uma elevada expressão de Syn no CPFm, no entanto, uma significativa redução de sua expressão em todos os subcampos do hipocampo dos referidos animais. Resultados similares foram encontrados também para a expressão de SNAP-25, como reportado por Gassowska-dobrowolska et al. (2020). Eles encontraram uma diminuição significativa de cerca de 20% no nível de SNAP-25 no hipocampo da prole de VPA, apesar da sua expressão ter se mostrado inalterada na região cortical. Essas anormalidades sinápticas indicam que, sob condições de exposição pré-natal ao VPA, podem ocorrer danos à função sináptica, resultando no comprometimento da plasticidade sináptica e da neurotransmissão. Estes achados podem indicar que um dano primário na sinaptogênese seja o responsável pelo comprometimento no neurodesenvolvimento, da função social e cognitiva observada nos animais VPA, e pode ser um dos mecanismos subjacentes a patologia de TEA e a muitos outros transtornos neuropsiquiátricos e disfunções cognitivas (ZHAN e KONG, 2011). Os nossos resultados em nível sináptico diverge dos achados acima. Enquanto Codagnone et al., 2015 e Gassowska-dobrowolska et al., 2020 mostraram aumento nas expressões de Syp e SNAP-25 no CPFm de animais VPA, nós encontramos uma significativa redução. Diante disso, é importante relevar a diferença entre as espécies animais estudadas e as metodologias empregadas nas respectivas pesquisas. Enquanto trabalhamos com camundongos Swiss machos, administramos o VPA no 12,5º dia de gestação e trabalhamos com anticorpos anti-Syn da Santa Cruz Biotechnology na diluição 1:500, Codagnone et al., 2015 utilizaram ratos machos Wistar, administraram o VPA no 11,5º dia gestacional, e trabalharam com anticorpos anti-Syn da Chemicom Inc na diluição 1:1000. Em relação aos achados do hipocampo, existe concordância dos nossos resultados no que se refere às reduções nas expressões de Syp e SNAP-25 hipocampais para com os dados hipocampais de Codagnone et al. (2015) e Gassowska-dobrowolska et al. (2020). Porém, faz-se necessária a realização de mais estudos, pois, sobre o tema, a literatura encontra-se escassa.

No nosso estudo o APZ protegeu os animais VPA do dano sináptico e somos os primeiros a mostrar esses resultados. Seo et al. (2015) mostraram que o tratamento com APZ atenuou significativamente a diminuição dos níveis de Syp no córtex frontal de ratos submetidos ao estresse de imobilização. Park et al. (2013) evidenciaram que o APZ promove a regulação positiva de Syp nas culturas neuronais do hipocampo privadas do suplemento B27 (este suplemento melhora a sobrevivência neuronal de longo prazo, a funcionalidade e a maturação dos neurônios primários de roedores). Esses autores também demonstraram que o APZ aumentou os níveis de PSD-95, uma proteína de densidade pós-sináptica que desempenha um papel crítico na regulação do tamanho e forma da coluna dendrítica, maturação sináptica, fortalecimento, plasticidade e estabilização de sinapses impulsionada pela atividade (EHRlich et al., 2007; HAN e KIM, 2008). Polimorfismos de SNAP-25 são responsáveis pela hiperatividade e por baixos escores cognitivos em humanos com TEA. Esses achados também podem ser observados em animais, associados com déficits sociais (BRAIDA et al., 2015). Em nosso estudo, o tratamento com APZ preveniu a redução do SNAP-25 no CPFm de animais tratados com VPA e essas propriedades sinaptogênicas do APZ já foram reportadas em modelos animais de mania (ABRIAL et al., 2014). Assim, propomos que o APZ pode atuar como um regulador chave das proteínas sinápticas, particularmente Syp e SNAP-25, e esses achados podem contribuir para explicar a neuroproteção do APZ nos déficits de comportamento e memória observados em nosso estudo.

A MAP-2 é uma proteína envolvida na montagem de microtúbulos, ramificação de dendritos e sinaptogênese (CACERES et al., 1992). Mukaetova-Ladinska et al. (2004) relataram uma redução generalizada da expressão de MAP2 em neurônios e dendritos no córtex pré-frontal dorsolateral de dois pacientes adultos com diagnóstico clínico de TEA. Mostramos que camundongos expostos durante o período pré-natal ao VPA têm a proteína MAP-2 diminuída, nossos achados corroboram com os de Barón-Mendonza et al (2018) que demonstraram que o nível da proteína MAP2 estava reduzida no córtex pré-frontal em camundongos *autistic-like-C58/J*. O tratamento com APZ protegeu contra a diminuição da MAP-2 induzida pelo VPA, mostrando que o APZ é eficaz em prevenir alterações na neuroplasticidade induzidas pelo VPA. Não há relatos na literatura que mostrem o efeito de APZ na expressão de MAP2, no entanto, outros antipsicóticos atípicos, como risperidona e olanzapina, aumentam a expressão de mRNA de MAP2 nas subáreas do hipocampo, como, no giro dentado e no córtex

retrosplenial de ratos (LAW et al., 2004). Portanto, é possível que além da ação sobre o sistema dopaminérgico, outro mecanismo envolvido na proteção do APZ contra os danos comportamentais e cognitivos induzidos pelo VPA envolva uma melhora na sinaptogênese.

Quase todos os antipsicóticos foram associados a um risco de indução de convulsão e crise epiléptica (UMBRICHT e KANE, 1996). Com o intuito de descartar uma possível interferência do APZ sobre o efeito anticonvulsivante do VPA, estudamos o comportamento da associação dessas respectivas drogas em animais induzidos ao modelo de convulsão por PTZ e constatamos que o efeito anticonvulsivante do VPA permaneceu inalterado. Coincidentemente, o APZ é um antipsicótico atípico e o risco de convulsões com a sua administração é relatado como o mais baixo entre os agentes atípicos, assim relata Moezi et al. (2015) que mostraram os efeitos anticonvulsivantes do APZ em modelos animais de convulsão por PTZ e ECT (de *Electroconvulsive therapy*). Apesar de não termos visualizado os mesmos efeitos anticonvulsivantes do APZ quando administrado isoladamente, vimos que ele não interferiu no efeito anticonvulsivante do VPA. Essa divergência de resultados pode se dar pela diferença de metodologia. Enquanto o nosso trabalho realizou um tratamento agudo (uma única dose de APZ 30 min antes da injeção de PTZ), Moezi et al. (2015) realizaram um tratamento subcrônico (os camundongos receberam o APZ por 6 dias e, em seguida, no sétimo dia o APZ foi injetado 60 min antes do PTZ (i.p.)). Foi indicado que os níveis de óxido nítrico (ON) aumentam significativamente em todas as regiões do cérebro após a ocorrência de crises convulsivas agudas induzidas por PTZ. Considerando que existe interação entre a produção de ON com a partir da ativação das vias dopaminérgicas e serotoninérgicas, e ambas podem ser estimuladas pelo o APZ, os mesmos autores, Moezi et al. (2015), ao estudarem a interação do APZ com o ON, especulam que a sua ação anticonvulsivante possa ser dar por via semelhante à dos inibidores de óxido nítrico sintase (NOS), (L-NAME - um inibidor não seletivo de NOS, cloridrato de aminoguanidina – um inibidor seletivo de iNOS e nitronidazol - inibidor seletivo de nNOS) que, no mesmo estudo, mostraram também reduzir significativamente os quadros convulsivos em animais-PTZ.

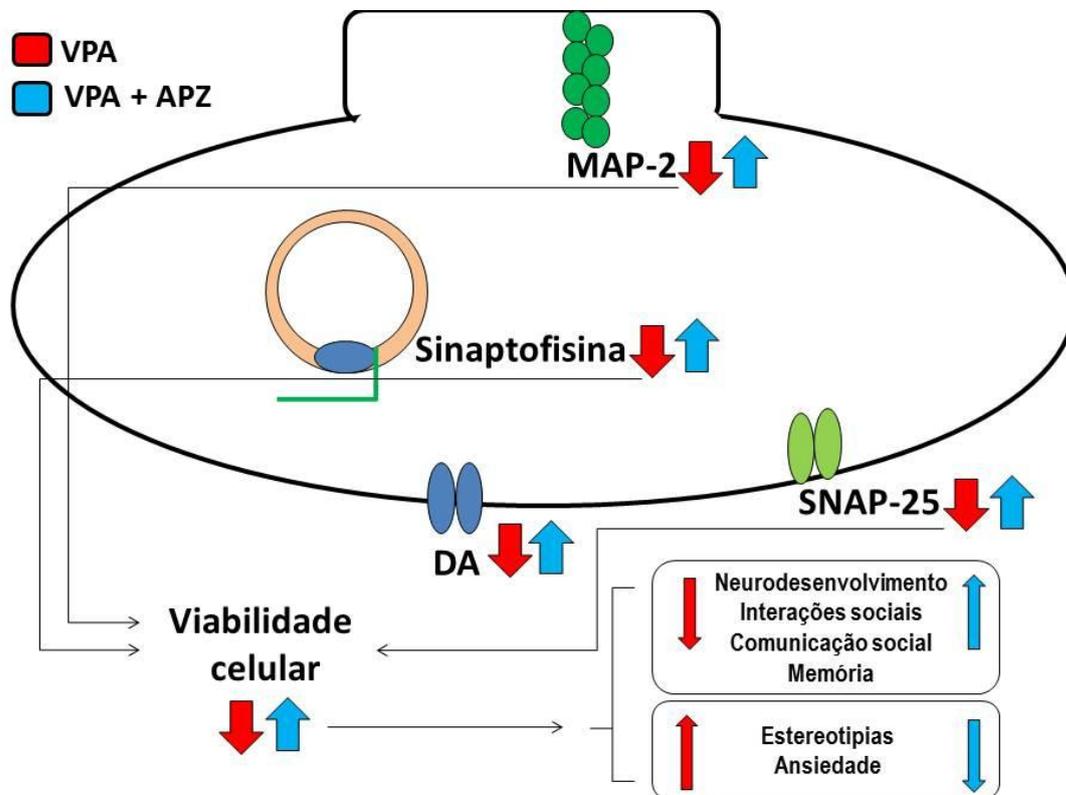
Neste trabalho, foi demonstrado um modelo animal de TEA-símile induzido pela administração de VPA. A partir desse, camundongos recém-nascidos expostos ao VPA durante o período pré-natal (12,5º dia embrionário), apresentaram déficits ao longo do

neurodesenvolvimento, caracterizados por perda de peso corporal, problemas de auto-endireitamento postural e atrasos na abertura dos olhos. Durante a juventude, animais na mesma condição, demonstraram comportamentos característicos de interação social prejudicada em testes sociais recíprocos e não-recíprocos. Além disso, revelaram deficiência de comunicação olfativa em testes de comunicação social-símile a partir de odores coespecíficos. Em adição, foi observado nesses animais um comportamento estereotipado e ansioso associado a danos sobre a memória. Todos esses danos comportamentais, aconteceram, provavelmente, devido a lesões sinápticas e de viabilidade celular no CPFm e no hipocampo, alcançados pelos efeitos teratogênicos do VPA. Os nossos resultados em conjunto demonstram a capacidade neuroprotetora do tratamento materno sub-crônico com APZ frente ao presente modelo animal. O tratamento com o APZ reduziu a lesão neuronal, e protegeu animais-VPA contra alterações comportamentais, cognitivas e de ansiedade. As investigações sobre os possíveis mecanismos protetores do APZ no presente trabalho lançam uma luz sobre uma atividade dopaminérgica restaurada, associada a efeitos sinaptogênicos e sinaptoplásticos.

Com uma ótica diferente, esse trabalho também inova por demonstrar que o APZ não interfere nas propriedades anticonvulsivantes do VPA, o que seria benéfico em condições de uma necessária terapia associada. Porém, não investigamos os possíveis mecanismos de ação para esse efeito. Considerando dados anteriores, trazemos como hipótese que esse pode ser resultado de um sinergismo do APZ sobre o VPA por reduzir ON via estimulação dos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos como mostrado por Moezi et al. (2015). No entanto, mais estudos são necessários.

Com estes resultados, pode-se concluir que os efeitos benéficos do APZ sobre a irritabilidade e hiperatividade já observados em humanos com TEA pode se dá por via dopaminérgica e que, na ocasião de efeitos benéficos desse composto sobre os demais sinais e sintomas do fenótipo autista em humanos, o mecanismo se dá, pelo menos em partes, por vias neuro e sinaptotróficas. Porém, não podemos descartar outras vias, como as da inflamação, apoptose e estresse oxidativo, uma vez que, apesar não termos estudado esses mecanismos no nosso trabalho, o APZ tem mostrado efeitos neuroprotetores também por ações anti-inflamatórias (YOO et al., 2018), antiapoptóticas e antioxidantes (ZHAO et al., 2019).

**Figura 44.** Modelo hipotético proposto para sítio de ação do APZ no modelo de autismo-símile em camundongos expostos ao VPA no período pré-natal.



O modelo de autismo-símile em camundongos expostos ao VPA no período pré-natal promove a redução dos níveis extracelulares de DA, da imunorreatividade de Sinaptofisina, SNAP-25 e MAP-2, que consequentemente levam a perturbações da viabilidade celular no córtex pré-frontal medial e nas regiões CA1 e giro denteado dos respectivos animais (setas vermelhas), o que promove danos comportamentais e cognitivos. Esses déficits de comportamento mostram-se prevenidos nos animais oriundos das mães que receberam o tratamento materno com APZ, após esse tratamento impedir as alterações sinaptogênicas e sinaptoplásticas (setas azuis).

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo mostrou que o tratamento materno com APZ atenuou anormalidades de desenvolvimento precoce, interações sociais inadequadas, comunicação social e comprometimento cognitivo. Ainda, restaurou os níveis dopaminérgicos, impediu a morte celular e preveniu os danos sinaptoplásticos sobre as expressões de Syp, SNAP-25 e MAP-2 no CPFm e hipocampo de animais submetidos ao modelo animal de TEA por VPA. Ainda, o APZ não interferiu no efeito anticonvulsivante do VPA.

É razoável considerar que estes efeitos neuroprotetores do APZ podem estar relacionados, pelo menos em parte, à função dopaminérgica restaurada e aos efeitos sinaptogênicos e neuroplásticos nas determinadas áreas cerebrais. No entanto, são necessários mais experimentos para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes ao efeito protetor do aripiprazol.

## REFERÊNCIAS

- ABOU-DONIA, M.B.; SULIMAN, H.B.; SINISCALCO, D.; et al. De novo Blood Biomarkers in Autism: Autoantibodies against Neuronal and Glial Proteins. **Behav Sci (Basel)**. v. 9(5), p. 47, 2019.
- ABRIAL, E.; BÉTOURNÉ, A.; ETIÉVANT, A.; et al. Protein kinase C inhibition rescues manic-like behaviors and hippocampal cell proliferation deficits in the sleep deprivation model of mania. **Int J Neuropsychopharmacol**. v. 18(2), 2014.
- ADAB, N.; KINI, U.; VINTEN, J.; et al.; The longer term outcome of children born to mothers with epilepsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. v. 75, p. 1575–83, 2004.
- AHN, Y., NAROUS, M., TOBIAS, R.; et al. The ketogenic diet modifies social and metabolic alterations identified in the prenatal valproic acid model of autism spectrum disorder. **Dev Neurosci**. v. 36(5), p. 371-80, 2014.
- AJURIAGUERRA, J. **Las Psicosis Infantiles In: Manual de Psiquiatria Infantil**. 4ª Ed. Barcelona: Toray-Masson, p. 673-731, 1977.
- AL-ASKAR, M.; BHAT, R.S.; SELIM, M., et al., Postnatal treatment using curcumin supplements to amend the damage in VPA-induced rodent models of autism. **BMC Complement Altern Med**. v. 17(1), p. 259. 2017.
- APA - AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-V)**. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.
- ANDERSEN, P.; et al. **The Hippocampus Book** - New York, Oxford University Press. 2007.
- ANZALONE, A.; LIZARDI-ORTIZ, J.E.; RAMOS, M., et al., Dual control of dopamine synthesis and release by presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. **J Neurosci**. v. 32, p. 9023–9034, 2012.
- ARIZA, J.; ROGERS, H.; HASHEMI, E.; et al. The Number of Chandelier and Basket Cells Are Differentially Decreased in Prefrontal Cortex in Autism. **Cereb Cortex**. v. 28(2), p. 411-420, 2018.
- ASPERGER, H. ‘Autistic psychopathy’ in childhood. In: Frith U, ed. Autism and Asperger syndrome. **Cambridge, UK: Cambridge University Press**. p. 37–92, 1991.
- ATLADOTTIR, H.O.; et al., The increasing prevalence of reported diagnoses of childhood psychiatric disorders: a descriptive multinational comparison. **Eur Child Adolesc Psychiatry**. v. 24(2), p. 173–83, 2015.
- AYLWARD, E.H.; MINSHEW, N.J.; GOLDSTEIN, G.; et al. Volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. **Neurology**. v. 10, 53(9), p. 2145-50, 1999.

BAIO, J.; WIGGINS, L.; CHRISTENSEN, D.L., et al., Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years — autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2014. **MMWR Surv Summ.** v. 67, p. 1-23, 2018.

BAIO, J., Prevalence of autism spectrum disorders--autism and developmental disabilities monitoring network, 14 sites, United States, 2008. **MMWR Surveill Summ.** v. 56(1), p. 12–28, 2012.

BALLOUGH, G.P.; MARTIN, L.J.; CANN, F.J.; et al. Microtubule-associated protein 2 (MAP-2): a sensitive marker of seizure-related brain damage. **J Neurosci Methods.** v. 61(1-2), p. 23-32. 1995.

BAMBINI-JUNIOR, V.; ZANATTA, G.; DELLA, FNG., et al., Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neurosci Lett** v. 583, p. 176-81. 2014.

BAMBINI-JUNIOR, V.; RODRIGUES, L.; BEHR, GA., et al., Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. **Brain Res.** v. 23, p. 1408:8-16. 2011.

BARBOSA, M.R.P.; FERNANDES, F.D.M. Qualidade de vida dos cuidadores de crianças com transtorno do espectro autístico. **Rev. soc. bras. fonoaudiol. [online].** p. 482-486, 2009.

BARÓN-MENDOZA, I.; GARCÍA, O.; CALVO-OCHOA, E., et al., Alterations in neuronal cytoskeletal and astrocytic proteins content in the brain of the autistic-like mouse strain C58/J. **Neurosci Lett.** v. 24, p. 682:32-38. 2018.

BARTRAM, L.A.; LOZANO, J.; COURY, D.L. Aripiprazole for treating irritability associated with autism spectrum disorders. **E Op Pharmacother.** v. 20, p. 1421-1427. 2019.

BAXTER, A.J. et al. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. **Psychol Med.** v. 45(3), p. 601–13, 2015.

BIOJONE, C.; CASAROTTO, P.C.; RESSTEL, L.B.; et al. Anti-aversive effects of the atypical antipsychotic, aripiprazole, in animal models of anxiety. **J Psychopharmacol.** p. 801-7, 2011.

BJØRK, M.; RIEDEL, B.; SPIGSET, O., et al., Association of folic acid supplementation during pregnancy with the risk of 70. autistic traits in children exposed to antiepileptic drugs in utero. **JAMA Neurol.** v. 75, p. 160. 2018.

BORTOLOZZI, A.; DÍAZ-MATAIX, L.; TOTH, M., In vivo actions of aripiprazole on serotonergic and dopaminergic systems in rodent brain. **Psychoph (Berl).** v. 191, p. 745-58. 2007.

BRAIDA, D.; GUERINI, F.R.; PONZONI, L.; et al. Association between SNAP-25 gene polymorphisms and cognition in autism: functional consequences and potential therapeutic strategies. **Transl Psychiatry.** v. 27, p. 5:e500, 2015.

BRUMBACK, A.C.; ELLWOOD, I.T.; KJAERBY, C.; et al. Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. **Mol Psychiatry**. v. 23(10), p. 2078-2089, 2018.

BURRIS, K.D.; MOLSKI, T.F.; XU, C., Aripiprazole, a novel antipsychotic, is a high-affinity partial agonist at human dopamine D2 receptors. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 302, p. 381-389, 2002.

CACERES, A.; MAUTINO, J.; KOSIK, K.S. Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. **Neuron**. v. 9, p 607-618, 1992.

CAI, Y.; ZHONG, H.; LI, X.; et al. The Liver X Receptor Agonist TO901317 Ameliorates Behavioral Deficits in Two Mouse Models of Autism. **Front Cell Neurosci**. v. 14, p. 213, 2019.

CAMPBELL, L.E.; AZUMA, R.; AMBERY, F., et al., Executive functions and memory abilities in children with 22q11.2 deletion syndrome. **Aust N Z J Psychiatry**. v. 44, p. 364-371, 2010.

CAMPOLONGO, M.; KAZLAUSKAS, N.; FALASCO, G.; et al. Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. **Mol Autism**. v. 14, 36-39, 2018.

CARLÉN, M. What constitutes the prefrontal cortex? **Science**. v. 27; 358(6362), p. 478-482. 2017.

CARPER, R.A.; MOSES, P.; TIGUE ZD.; et al. Cerebral lobes in autism: early hyperplasia and abnormal age effects. **Neuroimage**. v.16(4), p. 1038-1051, 2002.

CHADDAD, A.; DESROSIERS, C.; HASSAN, L.; et al. Hippocampus and amygdala radiomic biomarkers for the study of autism spectrum disorder. **BMC Neurosci**. v. 18(1), p. 52. 2017.

CHING, H.; PRINGSHEIM, T. Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD). **Cochrane Database Syst Rev**. v. (5):CD009043, 2012.

CHOI, H.J.; IM, S.J.; PARK, H.R., et al., “Long-term Effects of Aripiprazole Treatment during Adolescence on Cognitive Function and Dopamine D2 Receptor Expression in Neurodevelopmentally Normal Rats.” **Clinical psychopharmacology and neuroscience : the official scientific journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology** v. 17, p. 400-408. 2019.

CHRISTENSEN, D.L.; et al., Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. **MMWR Surveill Summ**, v. 65(3), p. 1–23, 2016.

CLAYTON-SMITH, J., DONNAI, D. Fetal valproate syndrome. **J. Med. Genet**. v. 32, p. 724–727, 1995.

- CODAGNONE, M.G.; PODESTÁ, M.F.; UCCELLI, N.A.; et al. Differential Local Connectivity and Neuroinflammation Profiles in the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Valproic Acid Rat Model of Autism. **Dev Neurosci.** v. 37(3), p. 215-231, 2015.
- COSI, C.; WAGET, A.; ROLLET, K.; et al. Clozapine, ziprasidone and aripiprazole but not haloperidol protect against kainic acid-induced lesion of the striatum in mice, in vivo: role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. **Brain Res.** v. 1043(1-2), p. 32-41, 2005.
- COURCHESNE, E., PIERCE, K. Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: local over-connectivity but long-distance disconnection. **Curr Opin Neurobiol.** v. 15, p. 225–320, 2005.
- CRAWLEY, J.N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. **B Pathol.** v. 4, p. 448-459. 2007.
- CUMMINGS, C.; STEWART, M.; STEVENSON, M.; et al. Neurodevelopment of children exposed in utero to lamotrigine, sodium valproate and carbamazepine. **Arch Dis Child.** v. 96, p. 643–647, 2011.
- DAMIANI, D.; NASCIMENTO, A.; PEREIRA, L. Funções corticais cerebrais – o legado de Brodmann no século XXI. **Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia: Brazilian Neurosurgery.** 2017.
- DILIBERTI, J.H.; FARNDON, P.A.; DENNIS, N.R.; et al. The fetal valproate syndrome. **Am. J. Med. Genet.** v. 19, p. 473–481, 1984.
- DOUSSARD-ROOSEVELT, J.A.; JOE, C.M.; BAZHENOVA, O.V., et al., Mother-child interaction in autistic and nonautistic children: characteristics of maternal approach behaviors and child social responses. **Dev Psychopathol.** v. 15, p. 277–295, 2003.
- DOVE, D.; WARREN, Z.; MCPHEETERS, M.L.; et al. Medications for adolescents and young adults with autism spectrum disorders: a systematic review. **Pediatrics.** v. 130(4), p. 717–726, 2012.
- DURAND, C.M.; BETANCUR, C.; BOECKERS, T.M.; et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. **Nat Genet.** v. 39, p. 25–27, 2007.
- EHRlich, I.; KLEIN, M.; RUMPEL, S., PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 104, p. 4176–4181. 2007.
- EISSA, N.; JAYAPRAKASH, P.; AZIMULLAH, S.; et al. Histamine H<sub>3</sub>R antagonist DL77 attenuates autistic behaviors in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. **Sci Rep.** v. 30;8(1), p. 13077, 2018.
- ELNAHAS, E.M.; ABUELEZZ, S.A.; MOHAMAD, M.I.; et al. Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: A behavioral and neurobiological study. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 22, p. 110185, 2020.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res.** v. 31, p. 47-59, 1988.

ERNST, M.; ZAMETKIN, A.J.; MATOCHIK, J.A. et al. Low medial pre-frontal dopaminergic activity in autistic children. **Lancet**. v. 350, p. 638–639, 1997.

EYLES, D.W.; BURNE, T.H.; MCGRATH, J.J. Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. **Front Neuroendocrinol**. v. 34, p. 47–64, 2013.

FAVRE, M.R., BARKAT, T.R., LAMENDOLA, D., et al., General developmental health in the VPA-rat model of autism. **Front Behav Neurosci**. v. 7, p. 88. 2013.

FAURE, A.; NOSJEAN, A.; PITTARAS, E., et al., Dissociated features of social cognition altered in mouse models of schizophrenia: Focus on social dominance and acoustic communication. **Neuroph**. v. 159, p. 107334, 2018.

FAURE, A.; NOSJEAN, A.; PITTARAS, E. et al. Dissociated features of social cognition altered in mouse models of schizophrenia: Focus on social dominance and acoustic communication. **Neuropharmacology**. v. 15, p. 159:107334, 2019.

FDA, 2008. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2003/21436se1-001\\_abilify\\_lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2003/21436se1-001_abilify_lbl.pdf) (acessado em 13/04/2021).

FOMBONNE, E. The epidemiology of autism: A review. **Psychol Med**. v. 29, p. 769–786. 1999.

GASSOWSKA-DOBROWOLSKA, M.; CIEŚLIK, M.; CZAPSKI, G.A., et al., Prenatal Exposure to Valproic Acid Affects Microglia and Synaptic Ultrastructure in a Brain-Region-Specific Manner in Young-Adult Male Rats: Relevance to Autism Spectrum Disorders. **Int J Mol Sci**. v. 21(10), p. 3576. 2020.

GEDDES, J.W.; WILSON, M.C.; MILLER, F.D.; et al. Molecular markers of reactive plasticity. **Adv Exp Med Biol**. v. 268, p. 425-432, 1990.

GENTILE, S. Risks of neurobehavioral teratogenicity associated with prenatal exposure to valproate monotherapy: a systematic review with regulatory repercussions. **C Spectrums**. v. 4, p. 305–15, 2014.

GHOSH, A.; MICHALON, A.; LINDEMANN, L.; et al. Drug discovery for autism spectrum disorder: Challenges and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**. v. 12, p. 777–790, 2013.

GOLD, P.E. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. **Behav. Neural Biol**. v. 46, p. 87–98, 1986.

GONZALES, E.L.; JANG, J.H.; MABUNGA, D.F., et al., Supplementation of Korean Red Ginseng improves behavior deviations in animal models of autism. **Food Nutr Res**. v. 60, p. 29245. 2016.

GRAEFF, F.G.; GUIMARAES, F.S.; DE ANDRADE, T.G. et al. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav**. 54: 129–141. 1996.

GRECUCCI, A.; RUBICONDO, D.; SIUGZDAITE, R., et al., Uncovering the Social Deficits in the Autistic Brain. A Source-Based Morphometric Study. **F Neurosci.** v. 10, p. 388. 2016.

GUEDES, N.P.S.; TADA, I.N.C. A Produção Científica Brasileira sobre Autismo na Psicologia e na Educação. **Psicologia: Teoria e Pesquisa.** v. 31, p. 303-309, 2015.

GUERINI, F.R.; BOLOGNESI, E.; CHIAPPEDI, M.; et al. SNAP-25 single nucleotide polymorphisms are associated with hyperactivity in autism spectrum disorders. **Pharmacol Res.** v. 64(3), p. 283-288, 2011.

GVOZDJÁKOVÁ, A.; KUCHARSKÁ, J.; OSTATNÍKOVÁ, D.; et al. Ubiquinol improves symptoms in children with autism. **Oxid Med Cell Longev.** 798957, 2014

HAN, K.; KIM, E. Synaptic adhesion molecules and PSD-95. **Prog Neurobiol** v. 84, p. 263–283. 2008.

HARA, Y.; TAKUMA, K.; TAKANO, E., et al., Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model. **Behav Brain Res.** v. 289, p. 39-47, 2015.

HARA, Y.; AGO, Y.; TARUTA, A., et al., Improvement by methylphenidate and atomoxetine of social interaction deficits and recognition memory impairment in a mouse model of valproic acid induced autism. **A Res.** v. 9, p. 926–939. 2016.

HARA, Y.; AGO, Y.; TARUTA, A., et al., Risperidone and aripiprazole alleviate prenatal valproic acid-induced abnormalities in behaviors and dendritic spine density in mice. **Psychopharmacology (Berl).** v. 234(21), p. 3217-3228. 2017.

HASHEMI, E.; ARIZA, J.; ROGERS, H.; et al. The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Prefrontal Cortex in Autism. **Cereb Cortex.** v. 27(3), p. 1931-1943, 2017.

HAZLETT, H.C.; POE, M.D.; GERIG, G.; et al. Early brain overgrowth in autism associated with an increase in cortical surface area before age 2 years. **Arch Gen Psychiatry.** v. 68(5), p. 467-476, 2011.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.M.; HERNANDEZ, C.K.; VÁZQUEZ-ROQUE, R.A., DÍAZ, A. et al. The neuropeptide-12 improves recognition memory and neuronal plasticity of the limbic system in old rats. **Synapse.** v. 72(8), p. e22036. 2018.

HILLER-STURMHÖFEL, S.; SWARTZWELDER, H.S. Alcohol's Effects on the Adolescent Brain: What Can Be Learned From Animal Models. **Alcohol Res Health.** v. 28(4), p. 213-221, 2004.

HIRSCH, L.E.; PRINGSHEIM, T. Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD). **C Dat Syst Rev.** v. 6, p. CD009043. 2016.

HODGES, H.; FEALKO, C.; SOARES, N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. **Transl Pediatr.** v. 9(Suppl 1), p. S55-S65, 2020.

HOLLANDER, E.; BARTZ, J.; CHAPLIN, W., et al., Oxytocin increases retention of social cognition in autism. **Biol Psychiatry**. v. 61, p. 498–503, 2007.

HONG A. [The neural basis of learning and memory declines in aged rats]. **Chinese**. v. 26(3), p. 240-242, 1995.

HORNIG, M.; BRESNAHAN, M.A.; CHE, X., et al., Prenatal fever and autism risk. **Mol Psychiatry**. v. 23(3), p. 759-766, 2017.

HOU, Q.; WANG, Y.; LI, Y.; et al. A Developmental Study of Abnormal Behaviors and Altered GABAergic Signaling in the VPA-Treated Rat Model of Autism. **Front Behav Neurosci**. v. 21;12, p. 182. 2018.

HOWES, O.D.; ROGDAKI, M.; FINDON, J.L.; et al. Autism spectrum disorder: Consensus guidelines on assessment, treatment and research from the British Association for Psychopharmacology. **J Psychopharmacol**. v. 32(1), p. 3-29, 2018.

HUANG, F.; CHEN, X.; JIANG, X., Betaine ameliorates prenatal valproic-acid-induced autism-like behavioral abnormalities in mice by promoting homocysteine metabolism. **P Clin Neurosci**. v. 6, p. 317-322, 2019.

HUANG, S.C.; TSAI, S.J.; YANG, H.J. Aripiprazole improves social interaction in Taiwanese children with pervasive developmental disorder. **C Gun Med J**. v. 33, p. 211-5, 2010.

HUO, X.; REYES, T.M.; HEIJNEN, C.J., et al., Cisplatin treatment induces attention deficits and impairs synaptic integrity in the prefrontal cortex in mice. **Sci Rep**. v.8(1), p. 17400, 2018.

ICHIKAWA, J.; CHUNG, Y.C.; DAI, J., et al., Valproic acid potentiates both typical and atypical antipsychotic-induced prefrontal cortical dopamine release. **B Res**. v. 1052, p. 56-62. 2005.

ICHIKAWA, J.; ISHII, H.; BONACCORSO, S., 5-HT<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. **J Neurochem**. v. 76, p. 1521–1531. 2001.

ICHIKAWA, J.; LI, Z.; DAI, J., Atypical antipsychotic drugs, quetiapine, iloperidone, and melperone, preferentially increase dopamine and acetylcholine release in rat medial prefrontal cortex: role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonism. **B Res**. v. 956, p. 349-357, 2002.

INGRAM, J.L.; PECKHAM, S.M.; TISDALE, B., Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. **Neurotoxicol Teratol**. v. 22(3), p. 319-24. 2000.

INGRAM, J.L.; CROOG, V.J.; TISDALE B. et al., Valproic acid treatment in rats reproduces the cerebellar anomalies associated with autism, **Teratology**. v. 53, p. 86. 1996.

- IQBAL, M.M.; ANEJA, A.; RAHMAN, A., et al., The potential risks of commonly prescribed antipsychotics: during pregnancy and lactation. **Psychiatry (Edgmont)**. v. 2(8), p. 36-44. 2005.
- IQUBAL, A.; SHARMA, S.; NAJMI, A.K.; et al. Nerolidol ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, neuroinflammation and cognitive dysfunction: Plausible role of Nrf2 and NF- $\kappa$ B. **Life Sci**. v. 236, p. 116867. 2019.
- ISHOLA, I.O.; BALOGUN, A.O.; ADEYEMI, O.O. Novel potential of metformin on valproic acid-induced autism spectrum disorder in rats: involvement of antioxidant defence system. **Fundam Clin Pharmacol**. v. 34(6), p. 650-661, 2020.
- JACKSON, A.; BROMLEY, R.; MORROW, J.; et al. In utero exposure to valproate increases the risk of isolated cleft palate. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**. v. 101(3), p. 207-211, 2016.
- JENTINK, J.; LOANE, M.A.; DOLK, H.; et al. Valproic acid monotherapy in pregnancy and major congenital malformations. **N Engl J Med**. v. 362, p. 2185–2193. 2010.
- JEONG, H.G.; LEE, M.S.; KO, Y.H., Combination treatment with aripiprazole and valproic acid for acute mania: an 8-week, single-blind, randomized controlled trial. **C Neur**. v. 3, p. 97-102, 2012.
- JESNER, O.S.; AREF-ADIB, M.; COREN, E. Risperidone for autism spectrum disorder. **Cochrane Database Syst Rev**. v. (1), CD005040. 2007.
- JIANG, H.Y.; XU, L.L.; SHAO, L., et al., Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta- analysis. **Brain Behav Immun**. v. 58, p. 165–172. 2016.
- JOHNSON, G.V.; JOPE, R.S. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. **J Neurosci Res**. v. 33(4), p. 505-512, 1992.
- KANE, M.J.; ANGOA-PEREZ, M.; BRIGGS, D.I., Mice genetically depleted of brain serotonin display social impairments, communication deficits and repetitive behaviors: possible relevance to autism. **P one**. v. 7, p. e48975, 2012.
- KANNER L. Autistic disturbances of affective contact. **Nerv Child**. v. 2, 217–250, 1943.
- KARLSSON, M.F.; GALAZKA, M.A.; GILLBERG, C., et al., Social scene perception in autism spectrum disorder: An eye-tracking and pupillometric study. **J Clin Exp Neuropsychol**. v. 30, p. 1-9, 2019.
- KATHERINE, M. Stereotypic Movement Disorders. **Semin Pediatr Neurol**. p. 25, p. 19-24. 2018.
- KAWADA, K.; IEKUMO, T.; KANEKO, M.; et al. [ER Stress-induced Aberrant Neuronal Maturation and Neurodevelopmental Disorders]. v. 136(6), p. 811-815, 2016.

- KENT, J.M.; KUSHNER, S.; NING, X.; et al. Risperidone dosing in children and adolescents with autistic disorder: a double-blind, placebo-controlled study. **J Autism Dev Disord.** v. 43, p. 1773–1783, 2013.
- KESHAVARZ, M.; FOTOUHI, M.; RASTI, A. Dantrolene: A Selective Ryanodine Receptor Antagonist, Protects Against Pentylentetrazole-Induced Seizure in Mice. **A Med Iran.** v. 54, p. 555-561, 2016.
- KESNER, R.P.; LEE, I.; GILBERT, P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. **Rev Neurosci.** v. 15, p. 333-351, 2004.
- KHAN, N.Z.; GALLO, L.A.; ARGHIR, A.; et al. Autism and the grand challenges in global mental health. **Autism Res.** v. 5(3), 156-159, 2012.
- KIM, K.C.; KIM, P.; GO, H.S., et al., Male-specific alteration in excitatory postsynaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. **J Neurochem.** v. 124, p. 832–843. 2013.
- KIM, Y.S.; et al., Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. **Am J Psychiatry.** v. 168(9), p. 904–912, 2011.
- KITANAKA, N.; KITANAKA, J.; HALL, F.S., et al., Pretreatment or Posttreatment with Aripiprazole Attenuates Methamphetamine-induced Stereotyped Behavior in Mice. **J Exp Neurosci.** v. 10;9(Suppl 1), p. 1-10. 2015.
- KNIERIM, J.J. The hippocampus. **Curr Biol.** v. 7;25(23), p. 1116-1121, 2015.
- KOENER, B.; FOCANT, M.C.; BOSIER, B., et al., Increasing the density of the D2L receptor and manipulating the receptor environment are required to evidence the partial agonist properties of aripiprazole. **P Neur Biol Psychiatry.** v. 36, p. 60–70, 2012.
- KOLOS, Y.A.; GRIGORIYEV, I.P.; KORZHEVSKYI, D.E. [A synaptic marker synaptophysin]. **Morfologiya.** v. 147(1), p. 78-82, 2015.
- KOSAKA, H.; MUNESUE, T.; ISHITOBI, M., et al Long-term oxytocin administration improves social behaviors in a girl with autistic disorder. **BMC Psychiatry.** v. 12, p. 110. 2012.
- KRAEUTER, A.K.; GUEST, P.C.; SARNYAI, Z. Neuropsychiatric Sequelae of Early Nutritional Modifications: A Beginner's Guide to Behavioral Analysis. **M Mol Biol.** v. 1735, p. 403-420, 2018.
- LAI, M.C.; LOMBARDO, M.V.; BARON-COHEN, S. Autism. **Lancet.** v. 8;383(9920), p. 896-910, 2014.
- LAMBERT, P.A.; CARRAZ, G.; BORSELLI, S.; BOUCHARDY, M. Dipropylacetamide in the treatment of manic-depressive psychosis. **Encéphale.** v. 1, p. 25–31, 1975.
- LAW, A.J.; HUTCHINSON, L.J.; BURNET, P.W.; et al. Antipsychotics increase microtubule-associated protein 2 mRNA but not spinophilin mRNA in rat hippocampus and cortex. **J Neurosci Res.** v. 76(3), p. 376-382, 2004.

LEIN, E.S.; HAWRYLYCZ, M.J.; AO, N.; et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. **Nature**. v. 445(7124), p. 168-176, 2007.

LENART, J.; BRATEK, E.; LAZAREWICZ, J.W.; et al. Changes in the Expression of SNAP-25 Protein in the Brain of Juvenile Rats in Two Models of Autism. **J Mol Neurosci**. v. 70(9), p. 1313-1320, 2020.

LICHTENSTEIN, P.; CARLSTROM, E.; RASTAM, M.; et al. The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. **Am J Psychiatry**. v. 167, p. 1357–1363, 2010.

LOPEZ-MUNOZ, F.; BAUMEISTER, A.A.; HAWKINS, M.F.; et al. The role of serendipity in the discovery of the clinical effects of psychotropic drugs: beyond of the myth. **Actas Esp Psiquiatr**. v. 40, p. 34–42, 2012.

LORD, C.; ELSABBAGH, M.; BAIRD, G.; et al. Autism spectrum disorder. **Lancet**. v. 392(10146), p. 508-520, 2018.

LUCCHINA, L.; DEPINO, A.M. Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. **Autism Res**. v. 7, p. 273–289, 2014.

LUKAS, M.; NEUMANN, I.D. Oxytocin and vasopressin in rodent behaviors related to social dysfunctions in autism spectrum disorders. **Behav. Br Res**. v. 251, p. 85–94, 2013.

MA, G.F.; RAIVIO, N.; SABRIÀ, J., et al., Agonist and antagonist effects of aripiprazole on D<sub>2</sub>-like receptors controlling rat brain dopamine synthesis depend on the dopaminergic tone. **Int J Neuropsychopharmacol**. p. 18(4), p. pyu046. 2014.

MACARI, S.; MILGRAMM, A.; REED, J.; et al. Context-Specific Dyadic Attention Vulnerabilities During the First Year in Infants Later Developing Autism Spectrum Disorder. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**. v. 60(1), p. 166-175, 2020.

MANDY, W.; LAI, M.C. Annual Research Review: The role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. **J Child Psychol Psychiatry**. v. 57, p. 271–292, 2016.

MAO, X.Y.; ZHOU, H.H.; JIN, W.L. Ferroptosis Induction in Pentylentetrazole Kindling and Pilocarpine-Induced Epileptic Seizures in Mice. **F Neurosci**. v. 13, p. 721, 2019.

MATSUO, K.; YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. 5-aminolevulinic acid inhibits oxidative stress and ameliorates autistic-like behaviors in prenatal valproic acid-exposed rats. **Neuropharmacology**. v. 168, p. 107975, 2020.

MELANCIA, F.; SCHIAVI, S.; SERVADIO, M. Sex-specific autistic endophenotypes induced by prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling. **British journal of pharmacology**. v. 175(18), p. 3699–3712, 2018.

MILLER, A.H.; HAROON, E.; FELGER, J.C. Immunology of Behavior-Exploring the Role of the Immune System in Brain Health and Illness. **Neuropsychopharmacol**. v. 42, p. 1–4, 2017.

MILLER, E.K.; COHEN, J.D. An integrative theory of prefrontal cortex function. **Annu Rev Neurosci.** v. 24, p. 167-202, 2001.

MIRZA, R.; SHARMA, B. Beneficial effects of pioglitazone, a selective peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist in prenatal valproic acid-induced behavioral and biochemical autistic like features in Wistar rats. **I. J. Dev Neurosci.** v. 76, p. 6-16. 2019.

MIRZA, R.; SHARMA, B. Benefits of Fenofibrate in prenatal valproic acid-induced autism spectrum disorder related phenotype in rats. **Brain Res Bull.** p. 36-46. 2019.

MISHRA, A.; GOEL, R.K. Modulatory Effect of Serotonergic System in Pentylentetrazole-Induced Seizures and Associated Memory Deficit: Role of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A/2C</sub>. **J Epilepsy Res.** v. 9(2), p. 119-125, 2019.

MOEZI, L., HOSSEINI, M., OVEISI, S., et al., The Effects of Sub-Chronic Treatment with Aripiprazole on Pentylentetrazole- and Electroshock-Induced Seizures in Mice: The Role of Nitric Oxide. **Pharmacology.** v. 95(5-6), p. 264–270. 2015.

MOY, S.S.; NADLER, J.J.; YOUNG, N.B., et al. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of ten inbred strains. **B Br Res.** v. 176, p. 4–20, 2007.

MUKAETOVA-LADINSKA, E.B.; ARNOLD, H.; JAROS, E.; et al. Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral prefrontal cortex in adult autistic individuals. **Neuropathol Appl Neurobiol.** v. 30(6), p. 615-623, 2004.

NADLER, J.J.; MOY, S.S.; DOLD, G., et al., Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. **Genes Brain Behav.** v. 3(5), p. 303-14. 2004.

NAJERA, K.; FAGAN, B.M.; THOMPSON, P.M. SNAP-25 in Major Psychiatric Disorders: A Review. **Neuroscience.** v. 10;420, p. 79-85, 2019.

NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Exp Neurol.** v. 299(Pt A), p. 217-227, 2018.

NICOLSON, R.; DEVITO, T.J.; VIDAL, C.N.; et al. Detection and mapping of hippocampal abnormalities in autism. **Psychiatry Res.** v. 22; 148(1), p. 11-21, 2006.

OLAJIDE, O.J.; FATOYE, J.O.; IDOWU, O.F., et al., Reversal of behavioral decline and neuropathology by a complex vitamin supplement involves modulation of key neurochemical stressors. **Env. Toxicol Pharmacol.** v. 62, p. 120-131. 2018.

OMOTOSO, G.O.; OLAJIDE, O.J.; GBADAMOSI, I.T.; et al. Kolaviron Protects the Prefrontal Cortex and Hippocampus against Histomorphological and Neurobehavioural Changes in Cuprizone Model of Multiple Sclerosis. **Malays J Med Sci.** v. 25(2), p. 50-63, 2018.

ORNOY, A.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; ERGAZ, Z., et al., Prevention or Amelioration of Autism-Like Symptoms in Animal Models: Will it Bring Us Closer to Treating Human ASD? **I J Mol Sci.** v. 20, p. 1074. 2019.

OWEN, R.; SIKICH, L.; MARCUS, R.N.; et al. Aripiprazole in the treatment of irritability in children and adolescents with autistic disorder. **Pediatrics**. v. 124, p. 1533–1540, 2009.

PARK, S.W.; LEE, C.H.; CHO, H.Y.; et al. Effects of antipsychotic drugs on the expression of synaptic proteins and dendritic outgrowth in hippocampal neuronal cultures. **Synapse**. v. 67(5), p. 224-234, 2013.

PERUCCA, E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. **CNS Drugs**. v. 16, p. 695–714, 2002.

PHIEL, C.J.; ZHANG, F.; HUANG, E.Y.; et al. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 36734–36741. 2001.

PICADA, J. N.; DOS SANTOS, B.; CELSO, F. et al., Neurobehavioral and genotoxic parameters of antipsychotic agent aripiprazole in mice. *Acta pharmacologica Sinica*, 32(10), 1225–1232, 2011.

POSEY, D. J.; STIGLER, K. A.; ERICKSON, C. A.; et al. Antipsychotics in the treatment of autism. **The Journal of Clinical Investigat.** v. 118(1), p. 6–14, 2008.

QUAAK, I.; BROUNS, M.R.; VAN DE BOR, M., et al., The dynamics of autism spectrum disorders: How neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. *Int J Environ Res Public Health* v. 10, p. 3384–3408, 2013.

RASALAM, A.D.; HAILEY, H.; WILLIAMS, J.H.G., et al., Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. **Dev Med Child Neurol**. v. 47, p. 551-5, 2005.

RAYMOND, G.V.; BAUMAN, M.L.; KEMPER, T.L. Hippocampus in autism: a Golgi analysis. **Acta Neuropathol.** v. 91(1), p. 117-119, 1996.

RAZA, S.; HIMMLER, B.T.; HIMMLER, S.M.; et al. Effects of prenatal exposure to valproic acid on the development of juvenile-typical social play in rats. **Behav Pharmacol.** v. 26(8 Spec No), p. 707-719, 2015.

REICHOW, B.; DOEHRING, P.; CICCETTI, D.V.; et al. **Evidence-based practices and treatments for children with autism**. Springer Science & Business Media, 2010.

RING, M.; BOWLER, D.M.; GAIGG, S.B. A Physiological Marker of Recognition Memory in Adults with Autism Spectrum Disorder? - The Pupil Old/New Effect. **Autism Res.** v. 13(4), p. 627-640, 2019.

RIZZO, F.; NESPOLI, E.; ABAEI, A.; et al. Aripiprazole Selectively Reduces Motor Tics in a Young Animal Model for Tourette's Syndrome and Comorbid Attention Deficit and Hyperactivity Disorder. **Front Neurol.** v. 13;9, p. 59. 2018.

ROBERT, E.; GUIBAUD, P. Maternal valproic acid and congenital neural tube defects. **Lancet.** v. 2, p. 937, 1982.

ROBERTSON LT. Memory and the brain. **J Dent Educ.** v. 66(1), p. 30-42, 2002.

RODIER, P.M.; INGRAM, J.L.; TISDALE, B., et al., Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. **J Comp Neurol.** v. 370(2), p. 247-61. 1996.

RONALD, A.; HOEKSTRA, R.A. Autism spectrum disorders and autistic traits: A decade of new twin studies. **Am J Med Gen B Neuropsychiatr Genet.** v. 156, p. 255–274, 2011.

ROSSATO, J.I.; ZINN, C.G.; FURINI, C., et al., A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. **An Acad Bras Cienc.** v. 78(3), p. 515-23. 2006.

ROULLET, F.I.; WOLLASTON, L.; DECATANZARO, D., Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valp. acid. **Neurosc.** v. 170, p. 514–22, 2010.

RUTTER M. Diagnosis and definition of childhood autism. **J Autism Child Schizophr.** v. 8(2), p. 139-161, 1978.

RYAN, B.C.; YOUNGB, N.B.; CRAWLEY, J.N.; et al. Social Deficits, Stereotypy, and Early Emergence of Repetitive Behavior in the C58/J Inbred Mouse Strain. **Behav Brain Res.** v. 17; 208(1), p. 178, 2010.

RYUA, T.; PARKB, H.J.; KIMC, H., et al. Improved memory and reduced anxiety in  $\delta$ -catenin transgenic mice. **Experimental Neurology.** v. 318, p. 22–31, 2019.

SALAŁ, K.; FURGAŁA, A.; SALAŁ, R. Interventional and preventive effects of aripiprazole and ceftriaxone used alone or in combination on oxaliplatin-induced tactile and cold allodynia in mice. **Biomed Pharmacother.** v. 111, p. 882-890, 2019.

SALATINO, DANTE. **PSYCHE - Structure and Function.** 2014.

SANDIN, S.; LICHTENSTEIN, P.; KUJA-HALKOLA, R.; et al. The familial risk of autism. **JAMA.** v. 311, p. 1770–1777, 2014.

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

SCHNEIDER, T.; ROMAN, A.; BASTA-KAIM, A, et al., Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. **Psychoneuroendocrinology.** 33(6), p. 728-40. 2008.

SCHUMANN, C.M.; BLOSS, C.S.; BARNES, C.C.; et al. Longitudinal magnetic resonance imaging study of cortical development through early childhood in autism. **J Neurosci.** v. 24; 30(12), p. 4419-4427, 2010.

SCHUMANN, C.M.; HAMSTRA, J.; GOODLIN-JONES, B.L.; et al. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. **J Neurosci.** v. 14; 24(28), p. 6392-6401, 2004

SEEMAN, P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. **Can J Psychiatry**. v. 47(1):27-38. 2002.

SEO, M.K.; LEE, C.H.; CHO, H.Y.; et al. Effects of antipsychotic drugs on the expression of synapse-associated proteins in the frontal cortex of rats subjected to immobilization stress. **Psychiatry Res**. v. 229(3), p. 968-974, 2015.

SHAIKH, AS.; LIU, H.; LI, Y., et al., Therapeutic drug monitoring of valproic acid. **Pak J Pharm Sci**. v. 31(4(Special)), p. 1773-1776. 2018.

SHALOM D. B. Memory in autism: review and synthesis. **Cortex**. v. 39(4-5), p. 1129-1138, 2003.

SHAPIRO, D.A.; RENOCK, S.; ARRINGTON, E., et al., Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. **Neuropsychopharmacol**. v. 28, p. 1400–1411, 2003.

SHARMA, S.R.; GONDA, X.; TARAZI, F.I. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. **Pharmacol Ther**. v. 190:91-104. 2018.

SHIN, S.; KIM, S.; SEO, S., et al. The relationship between dopamine receptor blockade and cognitive performance in schizophrenia: a [11C]-raclopride PET study with aripiprazole. **Transl Psychiatry**. v. 24, p. 8(1):87, 2018.

SMITH, I.C.; REICHOW, B.; VOLKMAR, F.R. The Effects of DSM-5 Criteria on Number of Individuals Diagnosed with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review. **J Autism Dev Disord**. v. 45(8): p. 2541–2552, 2015.

SOBIŚ, J.; RYKACZEWSKA-CZERWIŃSKA, M.; ŚWIĘTOCHOWSKA, E., et al., Therapeutic effect of aripiprazole in chronic schizophrenia is accompanied by anti-inflammatory activity. **Pharmacol Rep**. v. 67(2), p. 353-9, 2015.

SOLMAZ, V.; ERDOĞAN, M.A.; ALNAK, A.; et al. Erythropoietin shows gender dependent positive effects on social deficits, learning/memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the lipopolysaccharide induced rat model of autism. **Neuropeptides**. v. 83, p.102073, 2020.

SPEAR LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci Biobehav Rev**. v. 24, p. 417–463, 2000.

SPELLMAN, T., RIGOTTI, M., AHMARI, S.E., et al. Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory. *Nature*. v. 18; p. 522(7556):309-14.2015.

STALLER, J.A. Aripiprazole in an Adult with Asperger Disorder. **Annals of Pharmacoth**. v. 37, p. 1628–1631, 2003.

STAPEL, B.; SIEVE, I.; FALK, C.S., et al., Second generation atypical antipsychotics olanzapine and aripiprazole reduce expression and secretion of inflammatory cytokines in human immune cells. **J Psychiatr Res**. v. 105, p. 95-102, 2018.

SUNDBERG, M.; TOCHITSKY, I.; BUCHHOLZ, D.E.; et al. Purkinje cells derived from TSC patients display hypoexcitability and synaptic deficits associated with

reduced FMRP levels and reversed by rapamycin. **Mol Psychiatry**. v. 23(11), p. 2167-2183, 2018.

TADORI, Y.; FORBES, R.A.; MCQUADE, R.D., et al., Receptor reserve-dependent properties of antipsychotics at human dopamine D2 receptors. **E J Pharmacol**. v. 607, p. 35–40, 2009.

TEITELBAUM, P.; TEITELBAUM, O.; NYE, J., et al., Movement analysis in infancy may be useful for early diagnosis of autism. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 95(23), p. 13982-7, 1998.

TETREAULT, N.A.; HAKEEM, A.Y.; JIANG, S., et al., Microglia in the cerebral cortex in autism. **J Autism Dev Disord** 42:2569–84. 2012.

THIEL G. Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. **Brain Pathol**. v. 3(1), p. 87-95, 1993.

TSUTIYA, A.; WATANABE, H.; NAKANO, Y.; et al. Deletion of collapsin response mediator protein 4 results in abnormal layer thickness and elongation of mitral cell apical dendrites in the neonatal olfactory bulb. **J Anat**. v. 228(5), p. 792-804, 2016.

UMBRICHT D, KANE JM: Medical complications of new antipsychotic drugs. **Schizophr Bull**. 22, p. 475–483, 1996.

VARGAS, D.L.; NASCIMBENE, C.; KRISHNAN, C., et al., Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. **Ann Neurol**. v. 57, p. 67–81, 2005.

VARGHESE, M.; KESHAV, N.; JACOT-DESCOMBES, S.; et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. **Acta Neuropathol**. v. 134(4), p. 537-566, 2017.

VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; CHRISTIAN, S.L.; COOK, E.H. et al., Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. **Ann Rev Genom Hum Genet**. v. 5, p. 379-405, 2004.

VORSTMAN, J.; STAAL, W.; VAN DAALLEN, E.; et al. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. **Mol Psychiatry**. v. 11: 1, p. 18–28, 2006.

WANG, C.; GENG, H.; LIU, W. et al., Prenatal, perinatal, and postnatal factors associated with autism: A meta-analysis *Medicine*. **Baltimore**. v. 96, p. e6696, 2017.

WANG, R.; HAUSKNECHT, K.; SHEN, R.Y; et al. Potentiation of Glutamatergic Synaptic Transmission Onto Dorsal Raphe Serotonergic Neurons in the Valproic Acid Model of Autism. **Front. Pharmacol**. v. 16;9, p. 1185, 2018.

WEGIEL, J.; FLORY, M.; KUCHNA, I.; et al. Brain-region-specific alterations of the trajectories of neuronal volume growth throughout the lifespan in autism. **Acta Neuropathol Commun**. v. 10; 2: p. 28, 2014.

WEGIEL, J.; FLORY, M.; KUCHNA, I.; et al. Neuronal nucleus and cytoplasm volume deficit in children with autism and volume increase in adolescents and adults. **Acta Neuropathol Commun.** v. 17, p. 2. 2015.

WEGIEL, J.; KUCHNA, I.; NOWICKI, K.; et al. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. **Acta Neuropathol.** v. 119(6), 755-770, 2010.

WU, S.; DING, Y.; WU, F., et al., Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: A systematic review and meta-analysis. **N B R.** v. 55, p. 322–332, 2015.

YANG, E.J.; AHN, S.; LEE, K., et al., Early Behavioral Abnormalities and Perinatal Alterations of PTEN/AKT Pathway in Valproic Acid Autism Model Mice. **PLOS ONE.** v. 11(6), p. e0157202. 2016.

YATHAM, L.N.; FOUNTOULAKIS, K.N.; RAHMAN, Z., et al., Efficacy of aripiprazole versus placebo as adjuncts to lithium or valproate in relapse prevention of manic or mixed episodes in bipolar I patients stratified by index manic or mixed episode. **J Affec Disord.** v. 147, p. 365-72, 2013.

YOO, S.; KIM, M.Y.; CHO, J.Y. Syk and Src-targeted anti-inflammatory activity of aripiprazole, an atypical antipsychotic. **Biochem Pharmacol.** v. 148, p. 1-12. 2018.

ZABLOTSKY, B.; et al., Estimated Prevalence of Autism and Other Developmental Disabilities Following Questionnaire Changes in the 2014 National Health Interview Survey. **Natl Health Stat Report.** v. (87), p. 1–20, 2015.

ZAFEIRIOU, D.I.; VERVERI, A.; VARGIAMI, E. Childhood autism and associated comorbidities. **Brain Dev.** v. 29(5), 257-272, 2007.

ZAKI, S.A.; PHULSUNDAR, A.; SHANBAG, P., et al., Fetal valproate syndrome in a 2-month-old male infant. **A of Saud medic.** v. 30, p. 233–235, 2010.

ZAMBERLETTI, E.; GABAGLIO, M.; WOOLLEY-ROBERTS, M.; et al. Cannabidiol Treatment Ameliorates Autism-Like Behaviors and Restores Hippocampal Endocannabinoid System and Glia Alterations Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rats. **Front Cell Neurosci.** v. 9;13, p. 367, 2019.

ZHAN, Y.; KONG, X. Synaptic Dysfunction Attributes to Autism Spectrum Disorder. **N. Am. J. Med. Sci.** v. 4, p. 112–115. 2011.

ZHANG, Y.; XIANG, Z.; JIA, Y.; et al., The Notch signaling pathway inhibitor Dapt alleviates autism-like behavior, autophagy and dendritic spine density abnormalities in a valproic acid-induced animal model of autism. **P Neuropsych Biol Psychiatry.** v. 94, p. 109644, 2019.

ZHAO QL, ITO H, KONDO T, et al. Antipsychotic drugs scavenge radiation-induced hydroxyl radicals and intracellular ROS formation, and protect apoptosis in human lymphoma U937 cells. **Free Radic Res.** v. 53(3), p. 304-312. 2019.

ZOCCHI, A.; FABBRI, D.; HEIDBREder, C.A. Aripiprazole increases dopamine but not noradrenaline and serotonin levels in the mouse prefrontal cortex. **N Lett.** v. 387, p. 157–161. 2005.