



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**MAYARA DE MATOS MORAIS MONTEIRO**

**TRATAMENTO COM CANABIDIOL DA INFÂNCIA À ADOLESCÊNCIA ATENUA  
ALTERAÇÕES NEURODESENVOLVIMENTAIS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO  
NEONATAL DE CAMUNDONGOS A LIPOPOLISSACARÍDEO**

**FORTALEZA**

**2022**

**MAYARA DE MATOS MORAIS MONTEIRO**

**TRATAMENTO COM CANABIDIOL DA INFÂNCIA À ADOLESCÊNCIA ATENUA  
ALTERAÇÕES NEURODESENVOLVIMENTAIS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO  
NEONATAL DE CAMUNDONGOS A LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós- Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neuropsicofarmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

**FORTALEZA**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- M826t    Morais Monteiro, Mayara de Matos.  
          Tratamento com canabidiol da infância à adolescência atenua alterações neurodesenvolvimentais induzidas pela exposição neonatal de camundongos a lipopolissacarídeo / Mayara de Matos Morais Monteiro. – 2022.  
          81 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.  
          Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.
1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Lipopolissacarídeos. 3. Transtornos do Neurodesenvolvimento. 4. Canabidiol. I. Título.

CDD 615.1

---

**MAYARA DE MATOS MORAIS MONTEIRO**

**TRATAMENTO COM CANABIDIOL DA INFÂNCIA À ADOLESCÊNCIA ATENUA  
ALTERAÇÕES NEURODESENVOLVIMENTAIS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO  
NEONATAL DE CAMUNDONGOS A LIPOPOLISSACARÍDEO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós- Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neuropsicofarmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

Aprovada em: \_\_/ \_\_/ \_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Carmem Juracy Silveira Gottfried  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vanessa Costhek Abílio  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

---

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses.”

Rubem Alves.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que derrama graça sem merecimento em sua bondade e misericórdia infinitas. Seu sustento está presente no dia bom e ruim. Gratidão!

Aos meus familiares, que estão comigo independente das circunstâncias, em especial minha mãe, avó materna, meu tio Afonso e meus primos Eduardo e Amanda. O apoio de vocês em vários âmbitos também possibilitou a concretização desse projeto.

Aos amigos acadêmicos, que desde antes da aprovação no programa até o findar do meu mestrado tiveram participação. À Tatiane Araújo por intermediar o contato inicial com nossa orientadora e ser uma grande inspiração acadêmica e incentivadora; à Tatiana Bachur por proporcionar os meus primeiros aprendizados com pesquisa animal. Ao querido Wesley por ser um grande colaborador, disponibilizando seus alunos de iniciação científica a participarem. Aos alunos de iniciação científica Émerson, Gabrielle e Gabriel por suas contribuições e ao Vilton que muitas vezes foi meu “braço direito”, grande parceiro de pesquisa e que esteve disponível em absolutamente todos os momentos em que precisei de sua ajuda. Meu muito obrigada.

A todos os colegas do laboratório de Neuropsicofarmacologia (LNF) da UFC, especialmente Adriano, Michele Verde e Paloma, que ajudaram na viabilização de vários experimentos laboratoriais, compartilhando seus conhecimentos e vasta experiência. À Nayana Soares, Raica e Daniely pela amizade.

À professora Danielle Macêdo, tão quão importante em todo esse processo, primeiramente por sua simpatia, empatia e benignidade. Sempre com palavras positivas e de incentivo e principalmente, por compartilhar toda sua expertise como professora, pesquisadora e orientadora. Cultivo grande admiração pela pessoa e profissional que és.

Aos demais professores da Universidade Federal do Ceará, que intermediaram meu processo de aprendizagem e crescimento pessoal e profissional.

Aos membros da banca pela disponibilidade e enriquecimento com suas contribuições ao trabalho.

Aos meus amigos pessoais, importantes em momentos de incentivo e compreensão, e que reconheço que torcem verdadeiramente por mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPq) pelo apoio financeiro fornecido durante a minha pós-graduação e viabilizar a execução da minha pesquisa.

Por fim, agradeço àqueles que tenham contribuído direta ou indiretamente com a realização deste trabalho e que eventualmente eu não tenha mencionado aqui.

# **TRATAMENTO COM CANABIDIOL DA INFÂNCIA À ADOLESCÊNCIA ATENUA ALTERAÇÕES NEURODESENVOLVIMENTAIS INDUZIDAS PELA EXPOSIÇÃO NEONATAL DE CAMUNDONGOS A LIPOPOLISSACARÍDEO**

## **RESUMO**

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma deficiência do desenvolvimento definida como a ocorrência de prejuízos persistentes na preferência social, comunicação e a presença de padrões restritivos, repetitivos relacionados a comportamentos, interesses ou atividades. A fisiopatologia do TEA ainda é elusiva, mas podemos destacar a disfunção imune inata e inflamação. Nesse contexto, o lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina que ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias levando a uma inflamação sistêmica de baixo grau. O sistema endocanabinóide representa uma rede neuromoduladora e seus receptores são encontrados nos sistemas nervoso e imunológico, representando alvos farmacológicos para o tratamento de transtorno do neurodesenvolvimento, sendo o canabidiol (CBD) uma droga moduladora da transmissão canabinóide, sem efeitos psicomiméticos, que apresenta importante efeito antioxidante e anti-inflamatório. Diante disso, realizamos estudo em camundongos Swiss machos e fêmeas desafiados com LPS nos dias pós-natais (PNs) 3 (10µg/kg, ip.), 5 e 7 (50µg/kg, ip.), e posteriormente tratados com CBD (1 mg/kg, ip.) da infância à adolescência (PN 25 a 40), com o objetivo determinar o efeito do tratamento com CBD no comportamento e em alterações neuroinflamatórias. Os testes comportamentais realizados foram: enterrar esferas, preferência social, campo aberto e memória operacional (labirinto em Y) nos dias PN 25 e PN45. Após os testes comportamentais, foram realizadas análises de marcadores anti- e pró-inflamatórios, tais como atividade da arginase, níveis de nitrito, interleucina – 6 (IL-6) e TNF nas áreas cerebrais, córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e cerebelo (CE). No teste de enterrar esferas que avalia comportamento tipo repetitivo, animais de ambos os sexos apresentaram aumento neste comportamento que foi revertido pelo CBD. No teste de preferência social, as fêmeas apresentaram déficits, porém o CBD não foi capaz de reverter esse quadro. Já os resultados neuroquímicos mostraram que a exposição ao LPS em machos foi capaz de aumentar a atividade hipocampal de arginase, o que foi revertido pelo CBD. Já no hipocampo de fêmeas observamos redução dos níveis de nitrito que foi revertida pelo CBD. Os níveis de IL-6 apresentaram-se aumentados no hipocampo dos machos expostos ao LPS e tratados com CBD, bem como na mesma área cerebral as fêmeas expostas ao LPS apresentaram redução de TNF. Os resultados mostram que o tratamento com CBD entre a infância e adolescência é capaz de atenuar comportamentos relacionados ao autismo em animais machos e fêmeas, cujo mecanismo envolve principalmente modular vias anti-inflamatórias que parecem estar potencializadas nos animais submetidos a este modelo animal de autismo.

Palavras – chave: Transtorno do Espectro Autista. Lipopolissacarídeos. Transtornos do Neurodesenvolvimento. Canabidiol.

# **TREATMENT WITH CANNABIDIOL FROM CHILDHOOD TO ADOLESCENCE ATTENUATES NEURODEVELOPMENTAL CHANGES INDUCED BY NEONATAL EXPOSURE OF MICE TO LIPOPOLYSACCHARIDE**

## **ABSTRACT**

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a developmental disability defined as persistent impairments in social interaction, communication and the presence of restrictive, repetitive patterns related to behaviors, interests, or activities. The pathophysiology of ASD is still elusive, but we can highlight innate immune dysfunction and inflammation. In this context, lipopolysaccharide (LPS) is an endotoxin that activates the production of pro-inflammatory cytokines leading to low-grade systemic inflammation. The endocannabinoid system represents a neuromodulatory network, and its receptors are found in the nervous and immune systems, representing pharmacological targets for treating neurodevelopmental disorders. antioxidant and anti-inflammatory. Therefore, we conducted a study in male and female Swiss mice challenged with LPS on postnatal days (PNs) 3 (10µg/kg, IP.), 5 and 7 (50µg/kg, IP.), and subsequently treated with CBD (1 mg/kg, IP.) from childhood to adolescence (PN 25 to 40), to determine the effect of CBD treatment on behavior and neuroinflammatory changes. The behavioral tests performed were burying spheres, social interaction, open field, and working memory (Y maze) on days PN 25 and PN45. After behavioral tests, analyses of anti- and pro-inflammatory markers were performed, such as arginase activity, nitrite, interleukin-6 (IL-6), and TNF levels in brain areas, prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HC), and cerebellum (CE). In the burying spheres test that evaluates repetitive behavior, animals of both sexes showed an increase in this behavior, which was reversed by CBD. Females showed deficits in the social interaction test, but CBD could not reverse this. The neurochemical results showed that exposure to LPS in males increased hippocampal arginase activity, which was reversed by CBD. In the hippocampus of females, we observed a reduction in nitrite levels that was reversed by CBD. IL-6 levels were increased in the hippocampus of males exposed to LPS and treated with CBD, as well as in the same brain area, females exposed to LPS showed a reduction in TNF. The results show that CBD treatment between childhood and adolescence can mitigate autism-related behaviors in male and female animals, whose mechanism mainly involves modulating anti-inflammatory pathways that seem to be potentiated in animals subjected to this animal model of autism.

**Keywords:** Autistic Spectrum Disorder. Lipopolysaccharides. Neurodevelopmental Disorders. Cannabidiol.

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Critérios diagnósticos de TEA .....	19
<b>Quadro 2.</b> Resumo dos resultados comportamentais obtidos no presente estudo (PN25/PN45) .....	55
<b>Quadro 3.</b> Resumo dos resultados neuroquímicos obtidos no presente estudo (PN45) .....	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Etapas de desenvolvimento do cérebro e diferentes janelas de vulnerabilidade.....	23
<b>Figura 2.</b> Comparação relativa de idades e estágios de desenvolvimento humanos versus ratos .....	24
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da mudança de fenótipo da micróglia modulada por diferentes moléculas .....	28
<b>Figura 4.</b> Ilustração dos possíveis mecanismos de ação do Canabidiol .....	33
<b>Figura 5.</b> Resumo do protocolo experimental de forma esquemática .....	38
<b>Figura 6.</b> Teste de enterrar esferas .....	39
<b>Figura 7.</b> Teste de preferência social .....	40
<b>Figura 8.</b> Teste do labirinto em Y.....	41
<b>Figura 9.</b> Teste do campo aberto .....	41
<b>Figura 10.</b> Resultado do teste de comportamento de esconder esferas (Marble burying) em animais infantis (dia pós-natal-PN 25 - A) e ao final da adolescência (PN 45 - B) expostos ou não ao LPS com 3, 5 e 7 dias pós-natal.....	44
<b>Figura 11.</b> Resultado do teste de comportamento de esconder esferas (Marble burying) em animais adolescentes (avaliados no dia pós-natal - PN 45) machos (A) e fêmeas (B) expostos ou não ao LPS com 3, 5 e 7 dias pós-natal e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40.....	45
<b>Figura 12.</b> Resultado do percentual teste de preferência social em animais infantis (dia pós-natal-PN 25 - A) e ao final da adolescência (PN 45 - B) expostos ou não ao LPS com 3, 5 e 7 dias pós-natal.....	45
<b>Figura 13.</b> Resultado do número de contatos com a gaiola em animais infantis (dia pós-natal-PN 25) .....	46
<b>Figura 14.</b> Resultado do número de contatos com a gaiola em animais infantis (dia pós-natal-PN 45) .....	46
<b>Figura 15.</b> Resultado do número de contatos com a gaiola em animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40.....	47

<b>Figura 16.</b> Resultado do teste de avaliação da memória operacional pelo teste do Y maze em animais infantis (dia pós-natal-PN 25 - A) e ao final da adolescência (PN 45 - B) expostos ou não ao LPS com 3, 5 e 7 dias pós-natal e e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40 (C).....	47
<b>Figura 17.</b> Resultado do número crossings em animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 45 .....	48
<b>Figura 18.</b> Resultado do número de groomings em animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40 .....	49
<b>Figura 19.</b> Resultado do teste neuroquímico de atividade da arginase no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40.....	50
<b>Figura 20.</b> Resultado do teste neuroquímico de níveis de nitrito no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40.....	51
<b>Figura 21.</b> Resultado do teste neuroquímico de níveis de interleucina 6 no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40.....	52
<b>Figura 22.</b> Resultado do teste neuroquímico de níveis de TNF- $\alpha$ no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG – 2- araquidonoilglicerol

5-HT1A - 5-hidroxitriptamina

AAP/ APA - Academia americana de pediatria

ADDM – Monitoramento de deficiências de desenvolvimento e autismo

AEA – Anandamida

CBD – Canabidiol

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês *Centers for disease control and prevention*)

CE – Cerebelo

CEUA - Comissão de ética no uso de animais

CPF – Córtex pré-frontal

DSM - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

DSM – 5 – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)

EC – Sistema endocanabinóide

ECs – Endocanabinóides

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FAAH – Enzima amida hidrolase de ácido graxo

HC – Hipocampo

IL – Interleucinas

INF- Interferon

i.p. – intraperitoneal

Kg – quilograma

LPS – Lipopolissacarídeo

mg – miligrama

ml – mililitro

nm – nanômetro

NO – Óxido nítrico

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PN – Dia pós nascimento

PNs – Dias pós nascimentos

POLYI:C – Ácido poliinosinico-policitidílico

SNC – Sistema nervoso central

TEA – Transtorno do espectro autista

TNF – Fator de necrose tumoral

TOC – Transtorno obsessivo compulsivo

TLR4 - Receptor Toll-like 4

VR1 – Receptor vanilóide

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1.ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA (TEA) .....	17
1.2.CORRELAÇÃO ENTRE NEURODESENVOLVIMENTO DE HUMANOS E ROEDORES .....	22
1.3.LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) E ATIVAÇÃO IMUNE .....	25
1.4.DESAFIO IMUNE NEONATAL E REPERCURSSÕES IMUNOLÓGICAS .....	26
1.5.AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DE MODELOS ANIMAIS DE TEA.....	29
1.6.SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E CANABIDIOL (CBD) .....	30
<b>2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1.GERAL .....	35
3.2.ESPECÍFICOS .....	35
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>36</b>
4.1.ANIMAIS .....	36
4.2.SUBSTÂNCIAS.....	36
4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	37
4.4. TESTES COMPORTAMENTAIS .....	39
- TESTE DO ENTERRAR ESFERAS .....	39
- TESTE DE PREFERÊNCIA SOCIAL .....	39
- TESTE DO LABIRINTO EM Y (Y MAZE) .....	40
- TESTE DO CAMPO ABERTO .....	41
4.5. TESTES NEUROQUÍMICOS .....	42
- ATIVIDADE DA ENZIMA ARGINASE .....	42
- NÍVEIS DE NITRITO .....	42
-TESTE DE ELISA PARA DOSAGEM DAS CITOCINAS IL-6 E TGF- ALFA.....	42
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
5.1 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	44
- TESTE DO ENTERRAR ESFERAS .....	44

- TESTE DE PREFERÊNCIA SOCIAL.....	45
- TESTE DO LABIRINTO EM Y (Y MAZE) .....	47
- TESTE DO CAMPO ABERTO .....	48
5.2. TESTES NEUROQUÍMICOS .....	49
- ATIVIDADE DA ENZIMA ARGINASE .....	49
- NÍVEIS DE NITRITO .....	50
- TESTE DE CITOCINA IL-6 .....	52
- TESTE DE CITOCINA TNF-ALFA .....	53
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos do Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma deficiência do desenvolvimento que pode levar à uma série de desafios no que diz respeito à interação social, comunicação e comportamento. O DSM, Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, tem sido elementar no estabelecimento de critérios para o diagnóstico de transtornos mentais e comportamentais. Este manual em sua 5ª edição (DSM-5) define TEA como a ocorrência de prejuízos persistentes na interação social e a presença de padrões restritivos, repetitivos relacionados a comportamentos, interesses ou atividades (APA, 2013).

Indivíduos com TEA podem ter comportamentos diferentes, não havendo um padrão de alteração do desenvolvimento. Não há diferenças na aparência física dessas pessoas, mas sim mudanças sobre o modo de se comportar, na fala, comunicação, interação com outras pessoas e processo de aprendizagem, sendo variável de um ser para o outro essas inabilidades. A variação de tais habilidades, podem tornar os indivíduos com TEA, adolescentes e adultos com dificuldade de socialização e de se fazerem entender. Somado a isso, essas pessoas têm maiores facilidades de desenvolver condições psiquiátricas como depressão, ansiedade, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (CDC, 2022).

O TEA está relacionado à fatores genéticos complexos e à uma diversidade etiológica de fatores ambientais que envolvem desde aspectos pré-natais a perinatais e pós-natais (KOGAN et al., 2009). Os sintomas podem aparecer já nos primeiros meses de vida, sendo encontrados registros de aparecimento antes mesmo de um ano de idade. Porém, não há regras, já que em alguns casos aparecem após o segundo ano de vida ou mais. Comumente os sintomas surgem até os 3 anos de idade perdurando por toda a vida, podendo haver melhora com o passar dos anos (CDC, 2022).

Durante os primeiros meses de vida já podem ser observadas manifestações de sintomas como: não responder quando chamado pelo nome ou não demonstrar expressões faciais como alegria, tristeza ou raiva (até 9 meses de idade); não conseguir apontar para objetos de interesse (até os 15 meses); não conseguir imitar personagens (até 48 meses); evitar ou não manter contato visual, entre outras características. Em relação à sinais que envolvem comportamentos repetitivos ou restritivos há por exemplo: ordenar brinquedos ou objetos e se incomodar quando a ordem é alterada, repetir palavras, focar em partes de objetos, interessar-se obsessivamente,

bater as mãos, balançar o corpo ou girar em círculos repetidamente ou ter reações incomuns à cheiros, gostos ou tato. Outras características relacionadas à TEA envolvem habilidades linguísticas, de movimento e cognitivas/aprendizados atrasadas, comportamento hiperativo ou desatento, humor ou reações emocionais incomuns, ansiedade, estresse ou preocupação excessiva, alterações exacerbadas ou diminuídas de medo até problemas gastrointestinais, como constipação (CDC, 2022).

O diagnóstico de TEA baseia-se em avaliações comportamentais e dos marcos do desenvolvimento da criança, já que não existe, ainda, nenhum teste laboratorial específico, como os exames sanguíneos. Diante disso, o diagnóstico pode ser complexo, visto que os sintomas comportamentais podem ser inespecíficos, alguns deles compartilhados em diversas outras doenças. Um diagnóstico confiável é possível ocorrer aos 24 meses de vida, entretanto, quando feito por profissional experiente, é provável detectá-lo por volta 18 meses de vida (LORD et al., 2006). Quanto mais demorado esse diagnóstico, postergado até mesmo a vida adulta, mais improvável que o tratamento seja iniciado o mais precoce possível (HYMAN; LEVEY; MYERS, 2020).

Diante da complexidade do TEA e à falta de um marcador diagnóstico definitivo estabelecido, o diagnóstico baseia-se em traços comportamentais fenotípicos (KOGAN et al., 2009). No DSM-5, os critérios diagnósticos definem os sintomas principais, categorizados em 2 domínios: 1. comunicação social e interação social; 2. padrões de comportamento restritivos e repetitivos. O preenchimento dos critérios diagnósticos para TEA incluem estar presentes todos os 3 sintomas referentes ao domínio 1 (diferença afetiva social) e pelo menos 2 sintomas referentes ao domínio 2 (MANDY; CHARMAN; SKUSE, 2012). Esses domínios são mostrados no quadro a seguir (Quadro 1).

Quadro 1 – Critérios do DSM – 5 para diagnóstico de TEA

Domínios	Critérios: Déficits	Exemplos
A. Déficits persistentes na comunicação social e interação social em múltiplos contextos, manifestados pelo seguinte, atualmente ou pela história; deve ter todos os 3 sintomas neste domínio	1. Reciprocidade socioemocional	Abordagem social anormal e falha na conversa normal de vai-e-vem; compartilhamento reduzido de interesses, emoções ou afetos; falha em iniciar ou responder a interações sociais
	2. Comportamentos comunicativos não verbais usados para interação social	Comunicação verbal e não verbal mal integrada; anormalidades no contato visual e na linguagem corporal ou déficits na compreensão e uso de gestos; total falta de expressões faciais e comunicação não verbal
	3. Desenvolver, manter e compreender relacionamentos	Dificuldades em ajustar o comportamento para se adequar a vários contextos sociais; dificuldades em compartilhar brincadeiras imaginativas ou em fazer amigos; falta de interesse pelos colegas
B. Padrões de comportamento, interesses ou atividades restritos e repetitivos, manifestados por pelo menos 2 dos seguintes, atualmente ou por histórico; deve ter 2 dos 4 sintomas	1. Movimentos motores estereotipados ou repetitivos, uso de objetos ou fala	Estereotípias motoras simples, alinhando brinquedos ou lançando objetos, ecolalia, frases idiossincráticas
	2. Insistência na mesmice, adesão inflexível a rotinas ou padrões ritualizados ou comportamento verbal não verbal	Extrema angústia em pequenas mudanças, dificuldades com transições, padrões rígidos de pensamento, rituais de saudação, necessidade de seguir o mesmo caminho ou comer todos os dias
	3. Interesses altamente restritos e fixos que são anormais em intensidade ou foco	Forte apego ou preocupação com objetos incomuns, interesse excessivamente circunscrito ou perseverante
	4. Hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesses incomuns em aspectos sensoriais do ambiente	Aparente indiferença à dor/temperatura, resposta adversa a sons ou texturas específicas, cheiro ou toque excessivo de objetos, fascínio visual por luzes ou movimento

Fonte: APA, 2013.

Ainda de acordo com o DSM-5, os sintomas devem estar presentes no período inicial do desenvolvimento e acabam por causar prejuízos clinicamente significativos no funcionamento social, ocupacional ou em outras áreas importantes do funcionamento do indivíduo. O TEA pode ocorrer concomitantemente à deficiência intelectual, e para haver diagnóstico de TEA e deficiência intelectual, a comunicação social deve estar abaixo do esperado para o nível geral de desenvolvimento. As análises sobre a linguagem, as habilidades cognitivas e adaptativas e o estado sensorial são segmentos importantes do processo diagnóstico (APA, 2013).

Dados apontam que 1 em cada 44 crianças, em média, foi caracterizada com transtorno do espectro autista (TEA) aos 8 anos de idade, segundo estimativas da Rede de Monitoramento de Deficiências de Desenvolvimento e Autismo (ADDM) do CDC, em estudo realizado em 11 estados norte-americanos. Estima-se que é mais comum mais de 4 vezes entre os meninos do que entre as meninas. Não há predominância sobre grupos populacionais, ocorrendo em todos os grupos étnicos, raciais e socioeconômicos (MAENNER; SHAW; BAKIAN, 2021).

Estudo realizado no intervalo de 2009 a 2017, buscou caracterizar com que frequência as deficiências de desenvolvimento foram diagnosticadas entre crianças nos Estados Unidos e as tendências ao longo do tempo. Os resultados mostraram que cerca de 1 em cada 6 (17%) crianças de 3 a 17 anos foi diagnosticada com deficiência de desenvolvimento, conforme declarado pelos pais. As doenças estudadas incluíram autismo e outras. Esse estudo mostrou ainda que essa porcentagem aumentou ao longo dos anos. Para o autismo, mais especificamente, os diagnósticos aumentaram de 1,1% a 2,5%, quando avaliados em 2009 e 2017, respectivamente (ZABLOTSKY, et al. 2019).

O tratamento de crianças com TEA objetiva, principalmente, diminuir déficits centrais (comportamentos relacionados à comunicação e interação social, e interesses restritos ou repetitivos) (DSM-5, 2013), assim como deficiências associadas concomitantes (AMEIS, et al. 2018; LYRA, et al. 2017). Além disso, há interesse em fortalecer a independência funcional que facilitem o aprendizado e a incorporação de habilidades adaptativas; e finalmente, prevenir, minimizar ou eliminar comportamentos controversos que possam interferir em habilidades funcionais (SCHREIBMAN, et al. 2015; WONG, et al. 2015; MYERS; JOHNSON, 2007).

Os tratamentos atuais existentes consistem em tratar os sintomas, de forma a atenuá-los, buscando uma melhoria na qualidade de vida. O TEA afeta os indivíduos em proporções e

intensidades diferentes, portanto cada pessoa tem desafios únicos a serem enfrentados assim como, eventualmente, necessidades diferentes de tratamento. Estes, quando disponíveis, envolvem mais de uma abordagem, como as do tipo comportamental; do desenvolvimento; educacional; socio-relacional; psicológicas; farmacológicas e terapias integrativas, complementares e alternativas. Caso as intervenções comportamentais sejam insuficientes para enfrentar os desafios ou estejam indisponíveis no momento, o tratamento medicamentoso é considerado, sendo os medicamentos úteis na terapêutica de sintomas e/ou dos distúrbios que podem aparecer concomitantemente (HYMAN; LEVEY; MYERS, 2020).

Em casos de prescrições medicamentosas para intervenções comportamentais, os profissionais médicos devem ponderar cuidadosamente os riscos e benefícios potenciais antes de prescrevê-los. A utilização de medicamentos psicotrópicos contribui como parte de uma abordagem de tratamento mais abrangente (MYERS; JOHNSON, 2007). A utilização de medicamentos aumentou significativamente desde a publicação dos relatórios clínicos da AAP (Academia Americana de Pediatria), em 2007. Os medicamentos são utilizados principalmente para sintomas comportamentais e psiquiátricos em crianças e jovens com TEA (JOBSKI K; HOFFMANN; BACHMANN, 2017; SCHUBART; CAMACHO; LESLIE, 2014). Os estudos indicam que os antipsicóticos atípicos estão sendo bem prescritos (RIDDLE, 2016; RETTEW, et al. 2015).

As taxas de prescrição psicofarmacológica para pacientes com TEA, estão em média entre 56% e 65% (SCHUBART; CAMACHO; LESLIE, 2014; SPENCER, et al. 2013; MANDELL, et al. 2008). As estimativas indicam que um ou mais medicamentos psicotrópicos são prescritos para 1% das crianças com TEA menores de 3 anos, para 10% a 11% das crianças de 3 a 5 anos, para 38% a 46% das crianças de 6 a 11 anos e para 64 % a 67% de adolescentes de 12 a 17 anos (COURY, et al. 2012; ROSENBERG, et al. 2010). Esses dados refletem que os percentuais de uso de medicamentos psicotrópicos se elevam com o aumento da idade, com a menor capacidade cognitiva e/ou presença de deficiência intelectual e com maiores prevalências de comportamentos adversos ou diagnósticos psiquiátricos coexistentes (SPENCER, et al. 2013; MANDELL, et al. 2008; WITWER; LECAVALIER, 2005).

Sintomas gastrointestinais e problemas de alimentação, são mais usualmente relatados em crianças e adolescentes com TEA do que naqueles com desenvolvimento típico ou atraso no desenvolvimento (BUIE; CAMPBELL; FUCHS, 2010; IBRAHIM, et al. 2009). A alimentação seletiva é frequente em crianças com TEA (CHAIDEZ; HANSEN; HERTZ-

PICCIOTTO, 2014) e uma dieta restrita pode influenciar os sintomas gastrointestinais, como a alteração da microbiota intestinal (HYMAN; LEVY; MYERS, 2020).

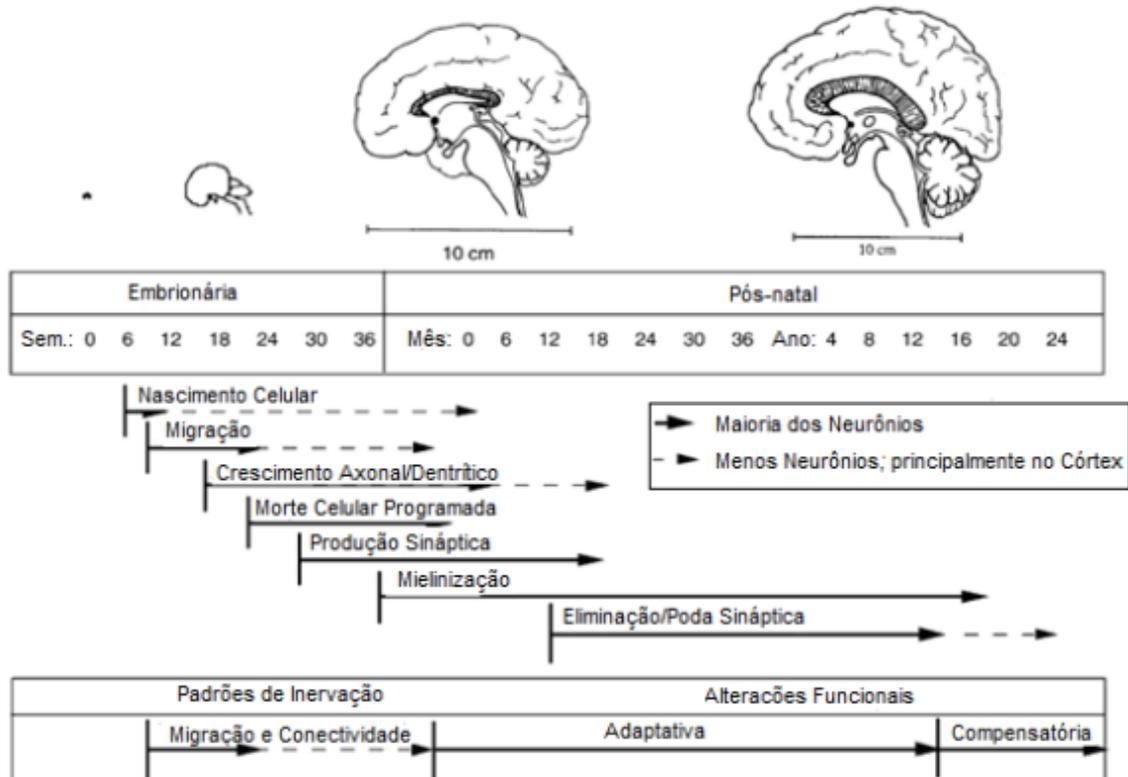
A fisiopatologia de TEA envolve diversos fatores causais, sendo um deles a disfunção imune inata e inflamação (ASHWOOD, et al. 2009; JYONOUCHI, et al. 2008; PARDO; VARGAS, 2005). A produção de citocinas pró – inflamatórias pode ser identificada em excesso nos pacientes com o transtorno, verificada após desafio com endotoxina bacteriana (JYONOUCHI; SUN; ITOKAZU, 2002).

## **1.2 Correlação entre neurodesenvolvimento de humanos e roedores**

A compreensão das psicopatologias em geral, em relação à surgimento, curso e gravidade, envolvem desvendar os mecanismos sobre o desenvolvimento cerebral incluindo as janelas de oportunidade em que há brechas à vulnerabilidade (LIGHTMAN; INSEL; INGRAM, 2002).

O desenvolvimento encefálico ocorre em vários estágios, ilustrado em ordem cronológica por uma linha do tempo, como observado na figura a seguir (Figura 1) (ANDERSEN, 2003). As regiões do córtex, hipocampo e cerebelo, desenvolvem-se tardiamente, conferindo diferentes períodos de vulnerabilidade (GOLDMAN-RAKIC; BROWN, 1982; JACOBSON, 1991; KALSBECK *et al.*, 1988).

Figura 1 - Etapas de desenvolvimento encefálico e diferentes janelas de vulnerabilidade.



São exibidas as fases do neurodesenvolvimento (parte em cima) e as diferentes janelas de vulnerabilidade (embaixo). Os danos que ocorrem no início da vida serão incorporados em padrões de inervação, enquanto aquelas ocorridas após o período pré-puberal levarão a mudanças funcionais com maior capacidade adaptativa. Fonte: Adaptado de ANDERSEN, 2003.

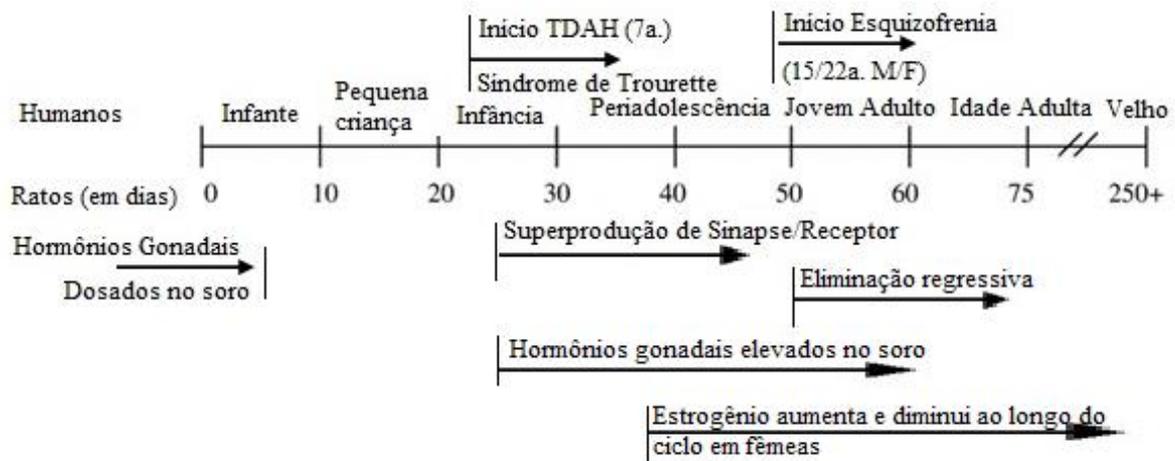
Durante o desenvolvimento cerebral pré-natal, mediante completa inervação inicial, ocorre apoptose (morte celular programada) de aproximadamente 50% dos neurônios, decorrendo essa eliminação na fase imediatamente anterior ao nascimento (JACOBSON, 1973; LANDMESSER, 1980). Ao longo desse período, ocorrem rearranjos morfológicos críticos provavelmente para aumentar a eficiência da transmissão sináptica (CHANGEAUX; DANCHIN, 1976; INNOCENTI, 1981; PURVES; LICHTMAN, 1980). Em um segundo momento, na periadolescência, novamente há uma superprodução e eliminação neuronal (ANDERSEN, 2003).

Por outro lado, durante o desenvolvimento cerebral pós-natal, mais especificamente na periadolescência, momento em que pela segunda vez acontecem os rearranjos neuronais, há um excesso acentuado de sinapses e receptores seguidos por uma poda (pruning) ou eliminação competitiva (ANDERSEN, 2001).

A fase chamada de periadolescência, em roedores corresponde aos dias, aproximadamente, 35 a 50 após o nascimento (SPEAR, 2000). Mudanças neuroanatômicas, neuroquímicas e comportamentais, que decorrem durante este intervalo de tempo em roedores são similares àquelas vistas em humanos adolescentes (ADRIANI et al., 2003).

A figura a seguir, exibe a comparação de idades e estágios de períodos de desenvolvimento humano versus ratos.

Figura 2 - Comparação relativa de idades e estágios de desenvolvimento humano versus rato.



Após uma superprodução de sinapses e receptores na periadolescência, segue-se com eliminação ou poda que diminui com o passar do tempo até idade adulta. Fonte: Adaptado de ANDERSEN, 2001.

Durante a fase da adolescência, o remodelamento sináptico ou a conectividade aprimorada relacionam-se diretamente com a maturação do comportamento motor, cognição e afeto (ANDERSEN, 2003).

Modelos animais que utilizam infecções pré-natais ou neonatais objetivam simular infecções virais e bacterianas que ocorrem durante a gestação ou logo após o nascimento, por meio da exposição à LPS, vírus influenza e ácido poliinosínico-policitidílico (PolyI:C), administrados por vias intravenosa, subcutânea, intraperitoneal e intranasal em roedores (BOKSA, 2010).

O fator genético e programação inicial do sistema imune ainda no útero e logo após o nascimento são capazes de determinar a quantidade de insultos ambientais competentes em

proteger a vida do indivíduo. Tendo em vista que essa proteção é importante para a saúde em geral e ao processamento neural, a comunicação difusa e dinâmica que ocorre entre os sistemas imunológico e nervoso é a responsável por essa defesa. Assim, o sistema imunológico tem capacidade de exercer impactos profundos no desenvolvimento e cognição cerebral, e mudanças na sinalização imunológica podem, em diferentes contextos, proporcionar efeitos homeostáticos, benéficos e prejudiciais (ESTES; MCALLISTER, 2015).

### **1.3 Lipopolissacarídeo (LPS) e ativação imune**

O lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina bacteriana, corresponde à parte da parede celular externa de bactérias do tipo gram-negativas (PARRACHO, et al. 2005). O LPS constitui o maior fator de virulência dessas bactérias e é capaz de desencadear uma série de reações sistêmicas que envolvem desde respostas neuroendócrinas e metabólicas a comportamentais, devido à ativação imunológica inata (BISWAS; LOPEZ-COLLAZO, 2009).

A estrutura química do LPS é dividida em porções que compreendem o lipídeo A, o antígeno O e o núcleo carbônico. Ao lipídeo A é atribuída atividade endotóxica e propriedades pró – inflamatórias, enquanto o núcleo carbônico é a parte capaz de ser identificada pelos anticorpos (STEIMLE; AUTENRIETH; FRICK, 2016; CAROFF *et al.*, 2002).

Quando a ativação imune induzida por LPS acontece no início de vida dos seres há interferência na programação do desenvolvimento cerebral, influenciando, conseqüentemente, o comportamento destes durante a vida adulta. Ademais, a importância disso consiste em que o sistema imunológico interfere de forma significativa no desenvolvimento cerebral (YANG et al., 2016).

No momento em que é administrado de forma sistêmica nos seres vivos o LPS se liga a receptores próprios do tipo receptor toll-like 4 (TLR4), que reconhecem infecções microbianas primariamente. Logo após, inicia-se a cascata de ativação de vias de sinalização intracelular até finalmente a resposta pró-inflamatória ser estabelecida. Algumas moléculas participam como mediadoras nesse processo, são elas a proteína sérica ligadora de LPS (LBP), proteína CD14 e a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) (LAIRD et al., 2009). Essas moléculas participam como co-ativadoras, mediando a transferência do LPS ao receptor TLR4 (CRUZ-MACHADO, 2010).

Através desses mecanismos de ativação imune por intermédio de TLR4, o LPS é capaz de induzir a síntese e secreção de uma ampla gama de citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e óxido nítrico (NO), assim como radicais livres (WATTS, 2008).

A exposição aguda à endotoxina apontou ser fator causador de neuroinflamação crônica, funcionando como ativador inflamatório sistêmico (QIN, et al. 2007). Indícios na literatura apontam para uma endotoxemia sutil, porém definitiva, de baixo grau em pacientes com autismo grave. Os achados sugerem a endotoxina bacteriana como potencial ativador pró – inflamatório sistêmico neste distúrbio do neurodesenvolvimento, muito embora, esses autores citem que seja necessária cautela nas interpretações, já que elas foram baseadas apenas em medições dos níveis séricos dos pacientes estudados (EMANUELE, et al. 2010).

Tem sido demonstrado ainda que a disbiose intestinal está relacionada ao autismo (PARRACHO, et al. 2005) e que pessoas com autismo grave apresentam níveis séricos de endotoxina significativamente maiores do que pessoas saudáveis (EMANUELE, et al. 2010). A translocação bacteriana, onde bactérias migram do intestino para a circulação periférica, caracteriza a principal fonte de endotoxina sérica em humanos (ERRIDGE, et al. 2007), fazendo com que a exposição de roedores ao LPS também simule a situação de disbiose intestinal.

#### **1.4 Desafio imune neonatal e repercussões imunológicas**

A exposição aos patógenos leva à ativação do sistema imune, mostrando que, no cérebro, há estímulo de astrócitos e micróglia, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e expressão modificada de genes de suscetibilidade ao TEA, somado a expressão desregulada de genes associados ao sistema imune (inflamação e ativação glial) (CUSTÓDIO et al., 2017; VARGAS et al., 2005).

No cérebro, as citocinas exercem papel relevante no desenvolvimento sináptico, e os componentes comuns do sistema imune, como proteínas do complemento e complexos de histocompatibilidade (MHC), são cruciais para a poda sináptica, a plasticidade neuronal e a padronização de circuitos neurais em cérebros normais (GARAY; MCALLISTER, 2010)

O dia neonatal em que os animais são expostos ao LPS pode ser decisivo no desenvolvimento das alterações previstas no modelo, tendo em vista que correspondem à

períodos neurodesenvolvimentais distintos. O estabelecimento da barreira hematoencefálica e o desenvolvimento do sistema imune ainda está ocorrendo até o PN 3, ao passo que nos dias seguintes, PNs 5-10, o sistema imunológico já está se fundamentando, promovendo incremento da densidade axonal e dendrítica (ANDERSEN, 2003; RAMENGGHI; FUMAGALLI; SUPRAMANIAM, 2018; SEMPLE et al., 2013).

Algumas células do sistema nervoso podem atuar como efetoras antimicrobianas e imunorreguladoras, as quais são chamadas células microgliais. A micróglia é caracterizada por uma população celular de diferentes fenótipos que produzem diversas moléculas efetoras em resposta à estímulos externos, com o objetivo de defesa contra agentes microbianos, comunicação celular e modulação da resposta inflamatória. Desta forma, a micróglia pode desempenhar efeitos benéficos ou prejudiciais (GRAEBER; STREIT, 2010; MURRAY; WYNN, 2011; RATH et al., 2014).

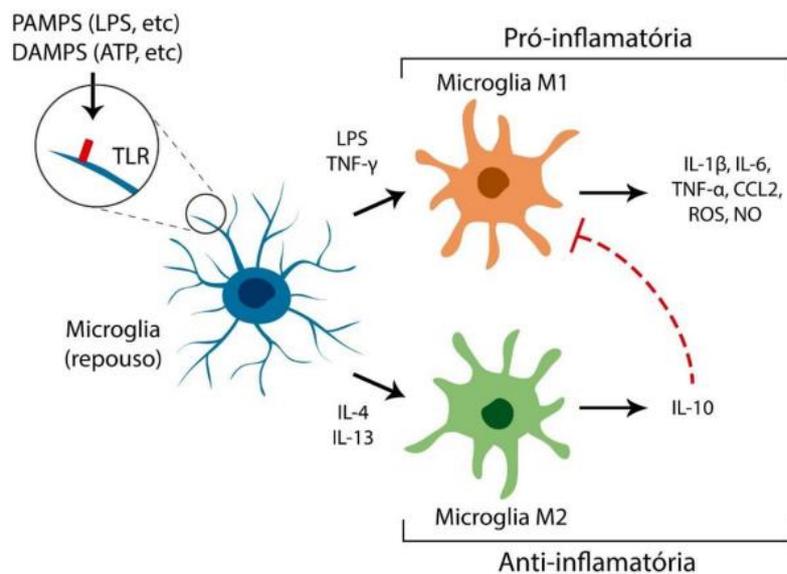
Uma vez ativadas, as células da micróglia, podem exibir fenótipos dos tipos perfil M1 ou M2, os quais desempenham funções significativas no controle entre promoção ou supressão da inflamação (HERBOMEL; THISSE; THISSE, 1999; PERDIGUERO; GEISSMANN, 2016). O perfil M1 quando ativado é capaz de originar citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (NO) que podem ser responsáveis por alterações na rede neural no SNC. Por outro lado, o perfil M2 mais ativo expressa citocinas e receptores envolvidos em ações anti-inflamatórias na tentativa de restauração da homeostase (SAIJO; GLASS, 2011).

O estado clássico de reatividade inicial, M1, de característica pró – inflamatória e consequências neurodegenerativas (HAROON; MILLER; SANACORA, 2017) pode ser ativado por PAMPs, como o LPS, fazendo com que citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  e ROS sejam liberadas, onde há início da resposta inflamatória através desses mediadores (BAL-PRICE; BROWN, 2001; HAROON; MILLER; SANACORA, 2017). O perfil M2, diferentemente, por reatividade alternativa está implicado com a atenuação da inflamação e tentativa de reparo tecidual através da liberação de citocinas como IL-4, IL-10 (CHERRY; OLSCHOWKA; O'BANION, 2014; RANSOHOFF, 2016) e arginase 1, sendo essa última capaz de reduzir níveis de NO e conseqüentemente oxidação e inflamação (RATH et al., 2014). Considerando a natureza dinâmica da micróglia é possível considerar esses estados de reatividade microglial oscilantes a depender do contexto (HAROON; MILLER; SANACORA, 2017).

A identificação de qual perfil microglial está mais exacerbado assim como os possíveis fatores influenciadores pode auxiliar na elucidação da fisiopatologia de algumas doenças, eventuais prevenções e tratamentos. A figura a seguir (Figura 3) mostra uma ilustração de como a micróglia pode ser influenciada e alternar-se entre os dois perfis.

Citocinas dão pistas sobre a gravidade de TEA e podem ser apontadas como possíveis biomarcadores e seus níveis plasmáticos correlacionados, supostamente, com a magnitude dos sintomas (de acordo com o teste CARS – Childhood Autism Rating Scale ou Escala de classificação infantil de autismo), podendo conferir caráter preditivo de diferentes fenótipos de TEA (XIE et al., 2017; INGA JACOME et al., 2016).

Figura 3 - Representação esquemática da mudança de fenótipo da micróglia modulada por diferentes moléculas.



Após ativação microglial há liberação de citocinas diferentes a depender do perfil, o que acarreta mecanismos fisiológicos próprios. Fonte: BRAGA; CARDOSO; TOKADA, 2019

A micróglia fagocita detritos e patógenos, proporciona funções essenciais para a homeostase do SNC (LENZ; NELSON, 2018; BUTOVSKY; WEINER, 2018; SAIJO; GLASS, 2011) e regula conexões neuronais englobando estruturas sinápticas excessivas através da clássica cascata do complemento (STEVENS et al., 2007). As conexões cerebrais iniciais requerem um controle rígido desses processos e, portanto, a micróglia interfere fortemente no

desenvolvimento do SNC (SHIGEMOTO-MOGAMI et al., 2014; BIALAS; STEVENS, 2013; PAOLICELLI et al., 2011).

Alterações de densidade sináptica já foram identificadas em tecido cerebral post-mortem (HUTSLER; ZHANG, 2010) de indivíduos e em modelos de camundongos com TEA (WANG et al., 2017; TANG et al., 2014; COMERY et al., 1997). Infere-se que essas alterações são presumivelmente devidas a déficits na poda sináptica microglial durante o desenvolvimento cerebral (HANSEL, 2019). De fato, postula-se que a micróglia provavelmente interfira na progressão do TEA por meio da desregulação da poda sináptica (LENZ; NELSON, 2018; DI MARCO et al., 2016).

### **1.5 Avaliação comportamental de Modelos Animais de TEA**

Investigações a fim de levantar hipóteses sobre como a exposição pré-natal a danos de natureza toxicológica ou imunológica podem influenciar no aparecimento de transtornos do neurodesenvolvimento são feitas com animais, como ratos, camundongos e macacos (HEO et al., 2011; MALKOVA et al., 2010; BAUMAN et al., 2008). Através de modelos experimentais animais que empregam ensaios comportamentais para sintomas específicos é possível dimensionar quais os mecanismos biológicos subjacentes às principais características do transtorno do espectro autista, sendo excelentes ferramentas de pesquisa translacional (CRAWLEY, 2012).

Partindo do pressuposto que o diagnóstico de TEA leva em consideração o perfil comportamental, ensaios que avaliem interação social e comportamentos repetitivos em camundongos, são úteis para testar hipóteses sobre as causas do autismo (CRAWLEY, 2012). Manifestações comportamentais podem ser observadas em animais como abordagem social, comunicação olfativa, interações sociais recíprocas, estereotipias motoras como andar em círculos e saltos verticais, vocalizações ultrassônicas, comportamentos repetitivos como autolimpeza e escavação, sendo estas utilizadas frequentemente para fenotipagem de modelos de ratos e camundongos para TEA e outros transtornos do neurodesenvolvimento (CRAWLEY, 2007).

Testes animais que expressam comportamentos relevantes para sintomas associados ao TEA foram adaptados da literatura de neurociência comportamental, envolvendo habilidades

cognitivas, disfunções motoras, hiperatividade, marcos do neurodesenvolvimento e tendências do tipo ansiedade, por exemplo (CRAWLEY, 2007).

A elucidação da etiologia e patogênese de qualquer doença humana é de extrema importância e a busca de alternativas que contemplem esse objetivo elevam os modelos animais experimentais ao patamar empírico para o delineamento desses elementos ainda incompreendidos. Os vários testes neurocomportamentais validados na literatura servem para demonstrar que nos modelos animais há reprodutibilidade de padrões comportamentais que simulam os comportamentos de crianças com TEA (ERGAZ; WEINSTEIN-FUDIM; ORNOY, 2016).

Como dito anteriormente, a literatura contempla como testes comportamentais mais confiáveis os que são realizados em ratos e camundongos, independente de serem modelos genéticos ou não de TEA. Entretanto esses testes não garantem a reprodução fidedigna de um transtorno restrito à humanos, como o TEA (ERGAZ; WEINSTEIN-FUDIM; ORNOY, 2016). Diante disso, ainda não é factível dizer que um modelo animal é capaz de prever com absoluta confiabilidade as características do TEA (RICCERI; MICHETTI; SCATTONI, 2016).

### **1.6 Sistema endocanabinóide e Canabidiol (CBD)**

Os endocanabinóides (ECs) são substâncias provenientes do ácido aracdônico, sendo a anandamida (AEA) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) os principais, com produção a partir de precursores fosfolipídicos na membrana celular pós-sináptica, em circunstâncias específicas. Os endocanabinóides passam a constituir o sistema endocanabinóide (EC) quando associados aos seus respectivos receptores e enzimas metabólicas. O sistema endocanabinóide representa uma rede neuromoduladora de vias de sinalização lipídica (DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2015; DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2010)

Os principais efeitos dos ECs são exercidos por meio de interações destes a seus receptores canabinóides, os quais são acoplados à proteína G dos tipos 1 e 2, CB1 e CB2, respectivamente. Além desses receptores, os ECs são capazes de se ligar com outros receptores que não dos tipos CB1 e CB2, como receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) (DI MARZO; DE PETROCELLIS, 2010), receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR)- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  (PISTIS; MELIS, 2010), bem como o receptor acoplado à proteína G

GPR55 (MORICONI et al., 2010). Receptores dos canabinóides endógenos são encontrados nos sistemas nervoso e imunológico, no tecido conjuntivo de órgãos internos, e nas glândulas (MC PARTLAN et al., 2014).

O receptor canabinóide 1 (CB1) pode ser encontrado em células não neuronais, mas é encontrado, sobretudo, no sistema nervoso central (SNC) e em elevadas concentrações em regiões como hipocampo, gânglios da base, amígdala basolateral, hipotálamo e cerebelo, os quais regulam funções importantes como supressão do medo, memória, postura, apetite e respostas motoras (ARAN et al., 2019 ; MC PARTLAN et al., 2014). Já o receptor canabinóide tipo 2 (CB2) aparece associado à alguns eventos imunológicos podendo desempenhar ações importantes no SNC (ARAN et al., 2019; BRIDGEMANAN; ABAZIA, 2017). Desta forma, o sistema EC representa um elo entre o sistema imunológico e o SNC (CABRAL et al., 2015) e os receptores CB2 por estarem localizados principalmente nas células do sistema imune agem como moduladores imunológicos (CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2009).

Evidências sugerem que modificações na funcionalidade do sistema endocanabinóide contribuem para a patogênese de diversos distúrbios neurológicos e psiquiátricos IANNOTTI; DI MARZO; PETROSINO, 2016; RUBINO; ZAMBERLETTI; PAROLARO, 2015; PACHER; KUNOS, 2013). Os ECs são capazes de regular as transmissões sinápticas e tais achados são decorrentes do papel neuromodulador que esse sistema desempenha em aspectos comportamentais (social e emocional), os quais tem relação direta e relevante com o TEA, como por exemplo interações sociais, sensação de recompensa, função cognitiva, motivação e regulação emocional (MECHOULAM; PARKER, 2013)

Congruente com o exposto anteriormente, análises post mortem de cérebros de indivíduos com autismo mostraram expressão reduzida de receptor CB1 (BARON-COHEN, 2004; PURCELL et al., 2001), fortalecendo a ideia entre a relação de TEA e possíveis disfunções no sistema EC.

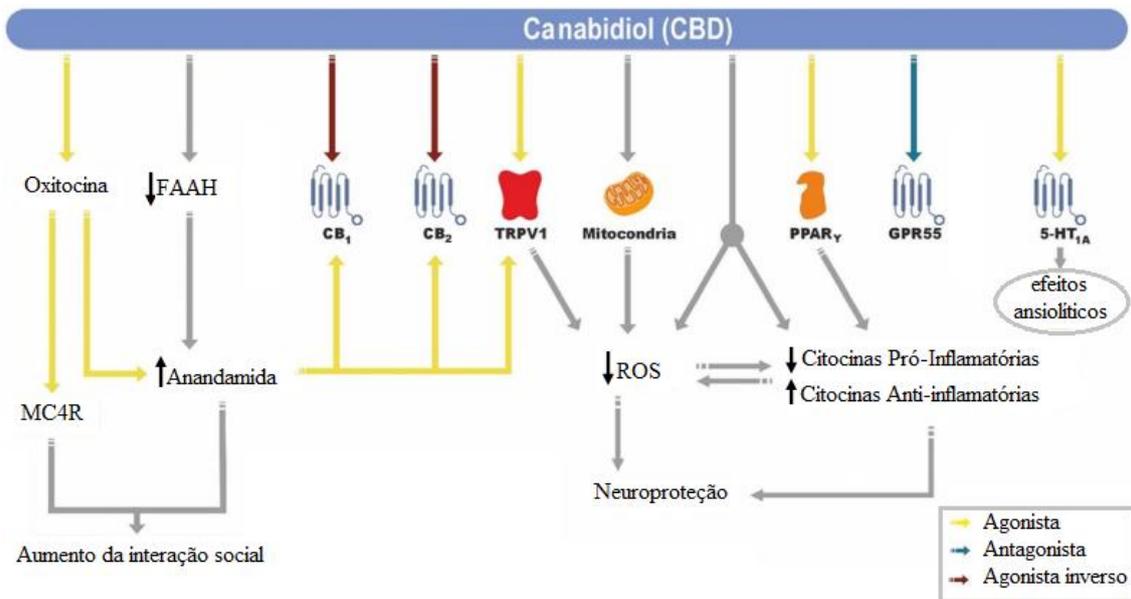
Apesar de etiopatogenia do TEA ainda não ter sido elucidada, os estudos corroboram que fatores genéticos, perinatais e ambientais estão implicados. Evidências sugerem que há envolvimento do sistema de neurotransmissão endógeno (como o serotoninérgico e GABA) e do sistema endocanabinóide, o qual regula funções que estão tipicamente desequilibradas no TEA, como questões emocionais e interações sociais (FUSAR-POLI et al., 2020).

O canabidiol (CBD) é um dos componentes mais estudados da planta *Cannabis sativa* em razão de ser um dos constituintes principais e exibir atividade que abrange diversos alvos, como ações neuroprotetoras e antiinflamatórias, e outras como antipsicóticas, ansiolíticas e hipnóticas (ZUARDI, 2008). Pode ser administrado nos organismos sob a forma medicamentosa e ligar-se aos receptores canabinóides, portando-se como um ligante externo (BLESSING *et al.*, 2015; SAITO; WOTJAK; MOREIRA, 2010).

Diferentes mecanismos de ação já foram citados como vias para os efeitos do CBD, porém ainda não há uma clara elucidação sobre esse tema. Vários grupos de estudos pelo mundo têm buscado trazer clareza a respeito de como esses mecanismos acontecem repercutindo sobre o amplo espectro de ação desse composto (PISANTI *et al.*, 2017; ZUARDI, 2008).

Algumas vias já foram referenciadas ao uso do CBD, como estimulante dos receptores vanilóides (VR1) com ação similar à capsaicina (agonista do VR1), dessensibilizando os receptores VR1 e culminando em efeito analgésico e anti-inflamatório (BISOGNO *et al.*, 2001); antagonista dos agonistas CB1 e CB2 (THOMAS *et al.*, 2007); atividade agonista nos receptores 5-hidroxitriptamina 1 (5-HT1A) e bloqueador da recaptação de anandamida e também inibidor de sua hidrólise enzimática (RUSSO; BURNETT; HALL; PARKER, 2005), conforme ilustrado na figura a seguir (Figura 4).

Figura 4 – Ilustração dos possíveis mecanismos de ação do Canabidiol (CBD).



FAAH, amida hidrolase de ácido graxo; CB, receptor canabinóide; TRPV1, receptor de potencial transitório vanilóide subfamília 1; PPAR-γ, receptor-gama ativado por proliferador de peroxissoma; GPR, receptor acoplado à proteína G; GPR55, receptor 55 acoplado à proteína G; 5-HT<sub>1A</sub>, receptor de serotonina 5HT; MC4R, receptor de melanocortina 4; ROS, espécies reativas de oxigênio. Fonte: Adaptado de BILGE; EKICI, 2021.

Os registros sobre ações gerais do CBD incluem ainda atividade antioxidante, o que sugere relação com provável efeito neuroprotetor e menor recaptação de adenosina, o que pode resultar na diminuição da resposta inflamatória (HAMPSON et al., 1998).

Recentemente, o uso do CBD já foi aprovado para duas situações, a Síndrome de Dravet e Síndrome de Lennox- Gastaut, que são síndromes epiléticas associadas ao TEA. O CBD com altos níveis de purificação (aprovado em 2018 como Epidiolex® nos Estados Unidos e há pouco tempo também pela Agência Europeia de Medicamentos) expressiu eficácia com um perfil de segurança aceitável em pacientes com essas duas síndromes (DEVINSKY et al., 2019; LATTANZI et al., 2018).

Apesar dos vários indícios na literatura sobre os benefícios dos ligantes canabinóides e seus resultados promissores, a real compreensão do sistema endocanabinóide no TEA ainda é incerta, e o uso de canabinóides, em especial o CBD para crianças e adolescentes com TEA ainda permanece controverso (POLEG et al., 2019; BOU KHALIL, 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Considerando que o transtorno do espectro autista tem como base os problemas sociais e de comunicação e os comportamentos repetitivos e restritivos, que podem variar nos indivíduos e acarretar níveis de gravidade diferentes, a necessidade iminente de melhorar a qualidade de vida desses indivíduos implica em uma convivência em sociedade menos afetada.

A prevalência aumenta a cada ano, com maiores índices no sexo masculino, e indicadores mostram que diagnósticos corretos aumentaram, assim como também estão acontecendo mais precocemente. Diante disso, há uma série de desafios que precisam ser vencidos para melhorar o prognóstico desses indivíduos, e um dos grandes passos é iniciar o tratamento o mais breve possível, o que, conseqüentemente depende também de um diagnóstico precoce. O acompanhamento terapêutico repercute em maior qualidade de vida.

A grande variabilidade de TEA entre crianças com características étnicas, raciais e geográficas distintas fortalece a ideia de que as causas exatas do transtorno ainda são indefinidas. Portanto, um tratamento que venha a melhorar os aspectos do TEA pode ser bem-vindo de maneira global. À medida que a neurobiologia do TEA é melhor compreendida novos alvos farmacológicos têm sido reaproveitados de medicamentos já utilizados para outros fins, com a finalidade de controlar sintomas centrais e gerenciar melhor os sintomas concomitantes.

Não existem ainda medicamentos específicos para o TEA e que tratem os principais sintomas da maneira adequada, alguns medicamentos tratam os sintomas concomitantes que podem ajudar esses indivíduos a viverem melhor. Pretende-se com o conhecimento do TEA o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos, que não tratem apenas os sintomas, mas sim que modifiquem e melhorem o curso da doença e expressem sucesso terapêutico. Busca-se por alternativas mais robustas de tratamento, que evidenciem aplicabilidade em ambos os sexos, o que torna assim o sistema endocanabinóide um sistema biológico de crescente interesse para o TEA, principalmente o CBD, por ser um composto não psicomimético que vem sendo mais amplamente estudado nos últimos anos e mostra-se promissor.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o efeito do tratamento com canabidiol (CBD) da infância à adolescência no comportamento e em alterações neuroinflamatórias em camundongos machos e fêmeas que foram submetidos a desafio imune neonatal com lipopolissacarídeo (LPS).

#### **3.2 Específicos**

- Identificar alterações comportamentais de camundongos machos e fêmeas submetidos ao desafio imune neonatal sob três exposições com LPS comparados a controles (desafiados com salina) e tratados com CBD, através dos seguintes parâmetros:

- ✓ Movimentos relacionados a estereotipias;
- ✓ Capacidade de preferência social;
- ✓ Memória operacional;
- ✓ Atividade locomotora e movimentos de grooming.

- Avaliar alterações anti-inflamatória (atividade da Arginase), pró-oxidantes (Nitrito) e pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) nas áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo) de camundongos machos e fêmeas adolescentes submetidos ou não à desafio imune neonatal com LPS e posteriormente à CBD.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas (pesando de 20 a 30 g) provenientes do Biotério Central da UFC, onde foram mantidos durante todo período de testes. Os animais foram submetidos ao acasalamento, sendo formados 4 casais que serviram de matrizes para o fornecimento de filhotes que foram utilizados nos ensaios. Os casais foram mantidos juntos por 15 dias em caixas de polipropileno condicionando um casal por caixa, para obtenção de filhotes. Após esse prazo, as fêmeas foram separadas dos machos e monitoradas até o dia do parto, contando o dia do nascimento dos filhotes como dia pós-nascimento 0 (PN0). Esse processo de procriação foi repetido cinco vezes, onde os animais progenitores eram randomizados aleatoriamente a cada ninhada, a fim de fornecer a quantidade de filhotes para compor a amostra total de animais a serem testados. Tendo em vista que muitas vezes havia perda de filhotes por ninhada, houve a necessidade de repetição da procriação.

Após o nascimento, os filhotes permaneceram com as mães até o desmame, que se deu com 21 dias de nascidos. Nesta idade os animais foram separados por sexo e colocados em caixas com no máximo 04 animais. Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ), com alimentos e água ad libitum em um ciclo claro/escuro de 12/12 h.

O estudo foi aprovado pela Comissão do Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) protocolado sob o CEUA nº 8263091118. Todos os princípios éticos de pesquisa animal foram seguidos em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

### **4.2 Substâncias**

O LPS utilizado foi obtido por extração fenólica a partir da bactéria *Escherichia coli*, sorotipo 055: B5 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A solução salina, usada tanto para fazer a solução de LPS, como para o tratamento do grupo controle, foi a solução aquosa de NaCl a 0,9%. A dose de LPS administrada nos animais dos grupos experimentais foi de 10µg/kg animal por via intraperitoneal (i.p) no dia PN3, enquanto nos dias subsequentes de administração (PN5 e PN7) a dose de LPS administrada foi de 50µg/kg animal (WALKER et al., 2009; MACRAE et al., 2015; THISHKINA et al., 2016). A diferença entre as doses administradas nos PN3 e

PN5/7 foi necessária para evitar a perda de filhotes no PN3 após exposição ao LPS, portanto optamos por adequar uma dose menor no primeiro dia de exposição. Diferentemente do que apontam alguns estudos na literatura onde houve apenas 2 exposições ao LPS, optamos nesse estudo por estender o período de exposição para 3 dias, a fim de verificar como o organismo animal se comportaria assim como também simular uma exposição humana gestacional materna à uma infecção por bactéria gram-negativa, no qual a mesma normalmente perdura por 5 - 7 dias, em média. Os volumes de LPS e solução salina utilizados nos animais foram os mesmos.

O Canabidiol (CBD) utilizado foi o Pure Cannabidiol (STI-Pharm/THC-Pharm, Frankfurt, Germany) obtido por doação pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM) com sede na Faculdade de Medicina da USP-RP, na concentração de 99.6% puro. O CBD foi diluído em veículo (*TWEEN* 80 1% + salina) para uma dose de 1mg/kg de peso e administrado com um volume de 0,1ml/10g de peso por via intraperitoneal (i.p). Conforme passados os dias de administração e a variação do peso do animal, a dose administrada também era ajustada.

### 4.3 Protocolo Experimental

Nos dias pós – nascimento 3, 5 e 7 (PN3, PN5 e PN7 - correspondentes ao último trimestre da gestação humana), os filhotes de camundongos foram tratados da seguinte forma:

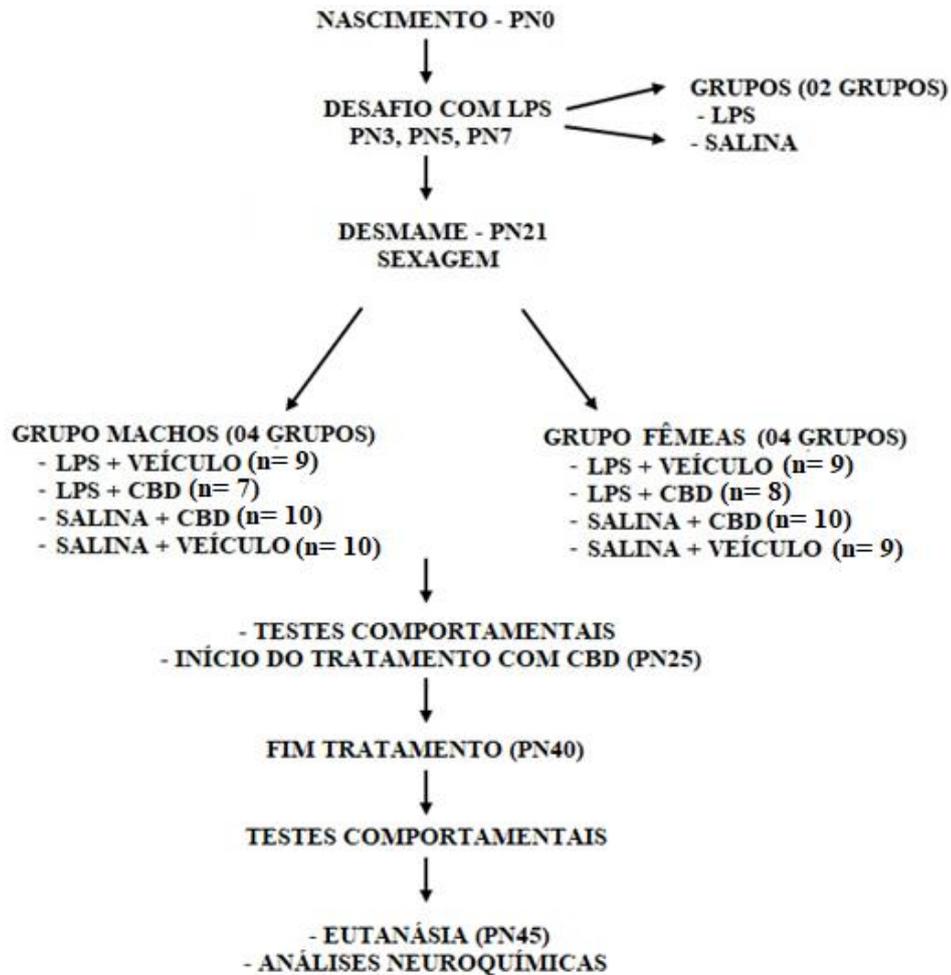
- Grupos LPS: no PN3 foi usado 10 $\mu$ g/kg de LPS de *E. coli*, enquanto nos dias PN5 e PN7 usamos 50  $\mu$ g/kg de LPS de *E. coli*.
- Grupos controle: 20  $\mu$ l/5 g de peso corporal via intraperitoneal (ip) de solução salina nos dias PN3,5,7.

A separação materna para a manipulação dos filhotes foi muito breve, com duração de no máximo 5 minutos. Imediatamente após a administração, os filhotes foram devolvidos ao contato materno, permanecendo juntos até o desmame, ou seja, até 21 dias de nascidos. Após o desmame, foram separados por sexo e distribuídos em 08 grupos (04 grupos de machos e 04 grupos de fêmeas) e avaliados de forma comportamental entre os dias PN 23 e PN25.

No dia PN25 iniciou-se o tratamento com CBD (na dose de 1mg/kg de peso), perdurando até o PN40. Novamente havia grupos tratados e grupos controles. Após o fim do tratamento (PN40), os grupos experimentais foram novamente submetidos a testes comportamentais nos dias subsequentes (variando do PN43 a PN 44) e finalmente eutanasiados por decapitação em guilhotina no PN45 para avaliação neuroquímica das áreas cerebrais. Estas

áreas quando coletadas eram imediatamente armazenadas em eppendorfs sob baterias de gelo e subsequentemente em freezer mantido sob temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios químicos.

Figura 5 - Resumo do protocolo experimental de forma esquemática



PN, dia pós – nascimento; LPS, lipopolissacarídeo; CBD, canabidiol; n, número de animais por grupo. Considerado o dia do nascimento do animal como o PN0, e subsequentemente os intervalos de dias seguintes 3, 5 e 7, onde nesses últimos houve a administração de LPS em um grupo e salina no grupo controle. Os animais ficaram sob os cuidados maternos até o dia do desmame (PN21) em que foram distribuídos e agrupados. Os testes comportamentais seguiram entre os PN23 e PN25, enquanto o início do tratamento com CBD deu-se no PN25, perdurando até o PN40. Seguiu-se com os testes comportamentais nos PN43 e PN44, para finalmente serem eutanasiados no PN45 e coletadas as áreas cerebrais para análises feitas posteriormente. Fonte: Próprio autor.

#### 4.4 Testes Comportamentais

##### - Teste de enterrar esferas

O teste de esconder esferas avalia movimentos repetitivos e foi realizado em uma caixa de polietileno (40 X 34 X 16 cm), contendo o fundo coberto com uma camada de 5 cm de maravalha. Nesta caixa foram distribuídas uniformemente na periferia, 20 esferas de vidro (15 mm de diâmetro). Para realização do teste, os camundongos foram colocados individualmente no centro da caixa, a grade de proteção foi colocada na superfície para evitar a saída dos animais. Após 30 minutos o animal foi removido e o número de esferas cobertas por maravalha foi determinado. As esferas consideradas escondidas foram aquelas que estavam totalmente cobertas ou aquelas que possuíam pelo menos 2/3 da sua superfície coberta por maravalha. As caixas com maravalha foram trocadas a cada animal testado e as esferas lavadas com álcool 10%, para que não houvesse interferência do cheiro dos animais retirados anteriormente (HAYASHI et al., 2010).

Figura 6 – Teste de enterrar esferas



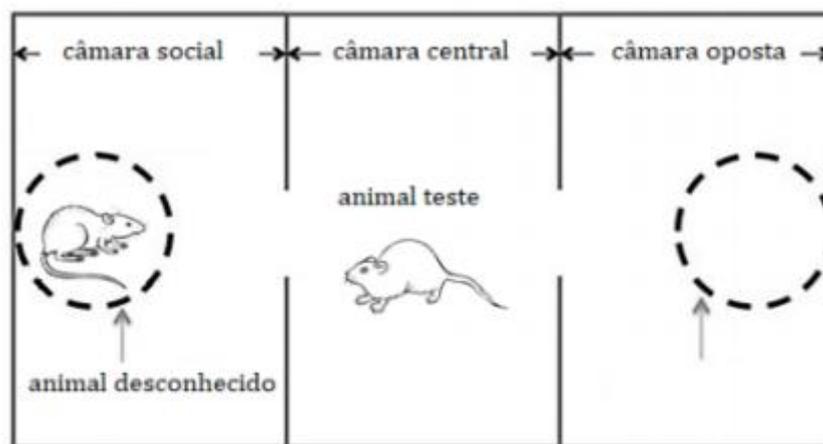
Fonte: Próprio autor.

##### - Teste de Preferência Social

Esse teste avalia o tempo gasto em cada uma das câmaras e o tempo que o animal interage com o outro, desconhecido. O aparato do teste consiste em uma caixa de acrílico 60 x 40 cm dividida em 3 câmaras através de pequenas aberturas (6 x 6 cm). Nas câmaras das

extremidades havia uma gaiola de ferro, uma com um animal desconhecido e do mesmo sexo (câmara social) e outra vazia (câmara oposta). Os animais teste foram colocados na câmara central e tiveram seu comportamento avaliado por 5 minutos (KAIDANOVICH-BEILIN et al., 2010). Foi avaliado o tempo gasto em cada uma das câmaras e o tempo interagindo com o animal desconhecido, e a preferência social foi definida como: (% o tempo gasto na câmara social) – (% o tempo gasto na câmara oposta).

Figura 7– Teste de preferência social

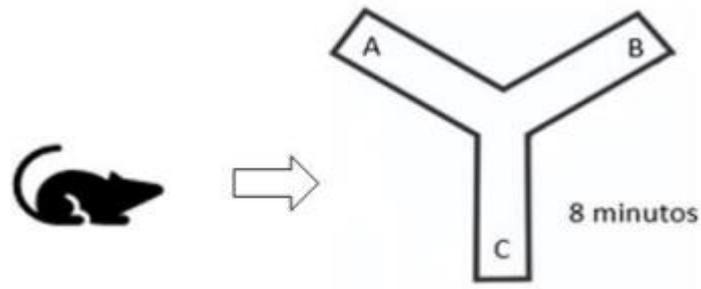


Fonte: MONTE, 2017

#### - Teste do labirinto em Y (Y maze)

O desempenho da memória operacional imediata, ou seja, o comportamento cognitivo exploratório dos animais foi avaliado através do comportamento de alternância espontânea dos braços enumerados (1, 2, 3) do labirinto em Y, durante uma única sessão (HUGHES, 2004). O labirinto consiste em 3 braços idênticos de 30 cm de comprimento, 6 cm de largura e 20 cm de altura). Cada camundongo foi colocado na extremidade de um braço e pôde se mover livremente através do labirinto durante uma sessão de 8 min. A sequência de entrada nos braços foi anotada e a percentagem de alternância correta foi calculada da seguinte forma: total de alternâncias / (total de entradas nos braços - 2) x 100, como previamente descrito (DALL'IGNA et al., 2007).

Figura 8 – Teste do labirinto em Y

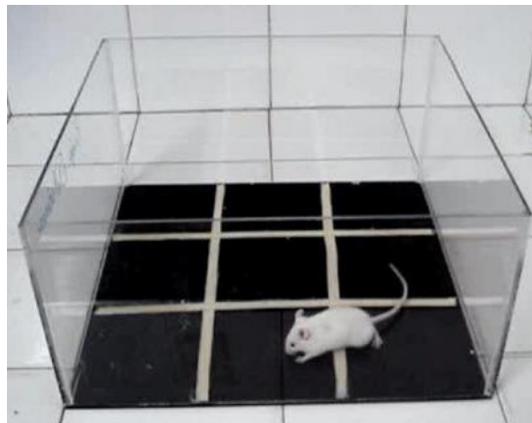


Fonte: CRISTINO, 2019

### - Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto tem como finalidade avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais e identificar comportamentos de ansiedade. A arena para este teste é feita de acrílico (30 x 30 x 15 cm) com o chão dividido em nove quadrantes iguais. Os animais foram cuidadosamente colocados no centro da arena e sua atividade exploratória foi registrada durante 5 minutos, após 1 minuto de habituação (ARCHER, 1973). Os parâmetros avaliados foram: o número de travessias, número de self-groomings (comportamentos estereotipados) e número de rearings (atividade exploratória vertical).

Figura 9 – Teste do campo aberto



Fonte: CUSTÓDIO, 2017

#### **4.5 Testes Neuroquímicos**

O córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo foram retirados e imediatamente acondicionado em temperatura a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realização das seguintes avaliações neuroquímicas após o PN45.

##### **- Atividade da enzima Arginase**

A atividade da enzima arginase foi determinada conforme descrito por (CORRALIZA et al., 1994). Para isso, as áreas foram homogeneizadas a 10% (w/v) em tampão PBS com inibidor de protease ( $5\mu\text{L}$  por ml de tampão). Os homogenatos foram incubados em tampão de ativação enzimática (10 mM  $\text{MnCl}_2$ , 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) por 10 min a  $55^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foi incubado 50  $\mu\text{L}$  do lisado ativado anteriormente com 50  $\mu\text{L}$  de solução de arginina (0.5 M arginine, pH 9.7) por 70 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  em eppendorfs. A reação foi interrompida com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de tampão ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}$  na proporção 1:3:7). Foi adicionado aos eppendorfs 25  $\mu\text{L}$  de solução de ISPF 9% dissolvida em etanol absoluto, e por fim aquecidos a  $100^{\circ}\text{C}$  por 45 min no escuro. Foi pipetado 200  $\mu\text{L}$  do produto final da reação em placas de 96 poços e ler absorbância a 540 nm em leitor de microplacas. A atividade da enzima arginase foi determinada pela concentração final de uréia produzida ( $\mu\text{g}$ ) a partir de uma curva padrão de uréia.

##### **- Níveis de nitrito**

Os homogenatos das áreas cerebrais foram preparados a 10% (w/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Após a centrifugação (800xg, 10 min) os sobrenadantes foram coletados e o conteúdo de nitrito foi determinado através da reação de Griess. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubada com 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1%/N- 53 (-1-naphthyl)- ethylenediamine 0,1%/ $\text{H}_3\text{PO}_4$  1%/diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550nm. A concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ) (GREEN et al., 1982).

##### **- Dosagem das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ por ensaio imunoenzimático (ELISA)**

As áreas cerebrais dissecadas foram homogeneizadas em 8 volumes de tampão PBS com protease (EMD Biosciences), fosfatase (Sigma-Aldrich) e inibidores para posteriormente serem

centrifugadas (10000 rpm, 5 min). O sobrenadante (50 uL de amostras) foi utilizado para determinar os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- $\alpha$  por ELISA (R&D Systems DuoSet DY406 e DY404 para camundongos, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e expressa em pg / g de tecido.

#### **- Análise Estatística**

Os dados foram analisados por análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) considerando como fatores "LPS" (controle e LPS) vs. "Sexo" (macho e fêmea) e de duas vias considerando os fatores "LPS" (controle e LPS) vs. Tratamento com CBD (salina e CBD), bem como de 3 vias considerando os fatores "LPS" (controle e LPS) vs. Tratamento com CBD (salina e CBD) vs. Sexo (machos e fêmeas). Em todas as situações o teste *post hoc* de Tukey foi utilizado. O nível de significância foi estabelecido em  $P \leq 0,05$ . As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism (Versão 9.00 para Windows).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Testes Comportamentais

#### - Teste de Enterrar Esferas

Conforme visto na figura 10A, no teste de enterrar esferas, no PN25 verifica-se maiores valores de bolas escondidas nos grupos LPS, em ambos os sexos. Através deste teste é possível avaliar comportamento do tipo repetitivo compulsivo, dessa forma, no grupo LPS há comportamentos do tipo repetitivo mais notórios quando comparado ao grupo controle (SAL). O mesmo tipo de comportamento é mantido no PN45 (Fig. 10B). Esse resultado evidencia o funcionamento do modelo em gerar fenótipo autismo símile.

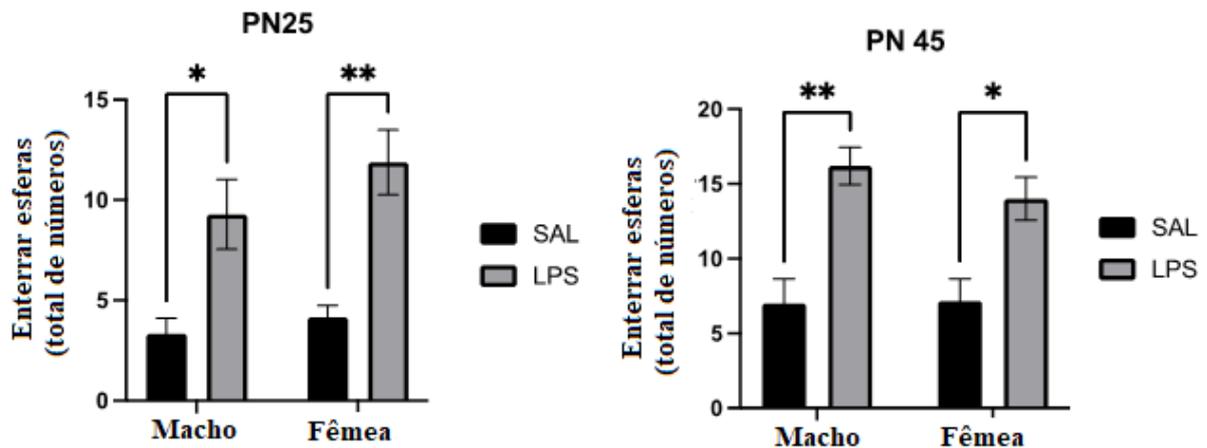


Figura 10 - Comportamento de esconder esferas (Marble burying) em animais infantis (dia pós-natal-PN 25 - A) e ao final da adolescência (PN 45 - B) expostos ou não ao LPS com 3, 5 e 7 dias pós-natal. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  para comparações entre os grupos indicados pelos conectores. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

Em seguida, analisou-se o efeito do tratamento com CBD sobre o comportamento repetitivo compulsivo. Foi visto que no PN45, em relação aos machos (Fig. 11A), no grupo LPS houve diminuição de valores em relação ao grupo tratado com CBD, indicando uma possível atenuação de sintomas repetitivo para essa população. Já em relação ao grupo controle (SAL) o tratamento com CBD não mostrou expressão.

Quanto às fêmeas (Fig. 11B), o tratamento com CBD mostrou atenuar o comportamento tipo repetitivo/compulsivo relevante em ambos os grupos, LPS e controle (SAL), entretanto a

redução foi mais expressiva no grupo LPS. Na fêmea não houve efeito o CBD sozinho, o CBD faz voltar à valores de controle.

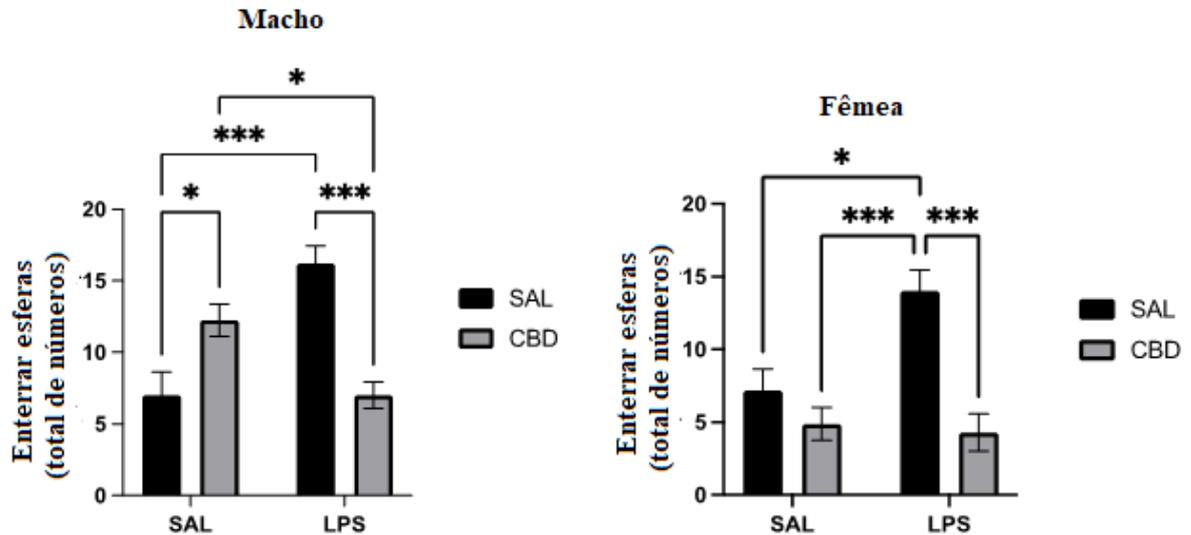


Figura 11 - Comportamento de esconder esferas (Marble burying) em animais adolescentes (avaliados no dia pós-natal - PN 45) machos (A) e fêmeas (B) expostos ou não ao LPS com 3, 5 e 7 dias pós-natal e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$  para comparações entre os grupos indicados pelos conectores. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

### - Teste da preferência social

Analisando a preferência social, foi calculado o percentual dessa condição. Nesse teste a avaliação incluiu o tempo que o animal ficou na câmara social e quantas vezes interagiu com o animal na gaiola. Como visualizado na figura 12 não houve diferença entre os grupos relativo à preferência social, em ambos os momentos (PN25 e PN45).

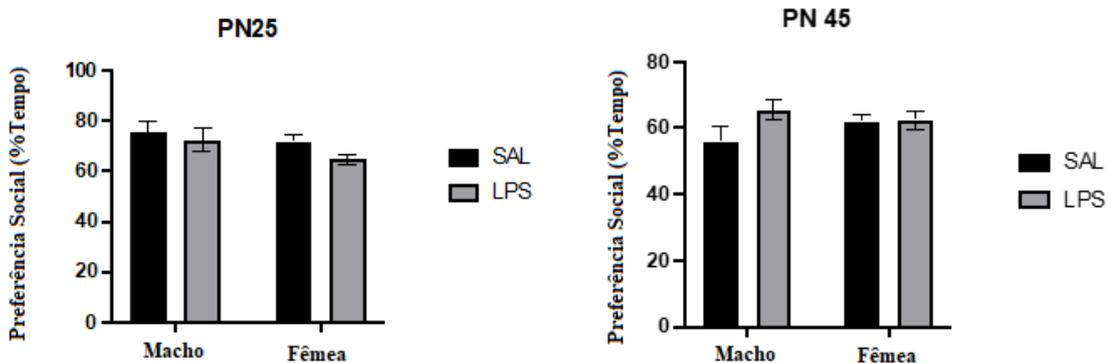


Figura 12 – Pectencial de preferência social em animais infantis (dia pós-natal-PN 25 - A) e ao final da adolescência (PN 45 - B) expostos ou não ao LPS com 3, 5 e 7 dias pós-natal. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

No que diz respeito ao número de contatos com a gaiola contendo animal, no PN25 os machos do grupo LPS interagiram mais com a gaiola em comparação com as fêmeas (Fig. 13).

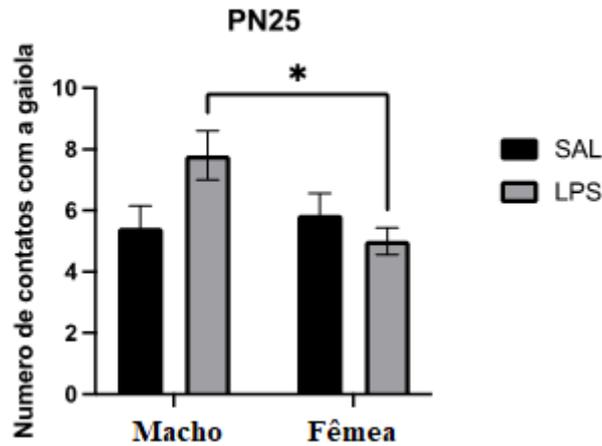


Figura 13 – Número de contatos com a gaiola em animais infantis (dia pós-natal-PN 25). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey.  $*P < 0,05$  para comparações entre os grupos indicados pelos conectores. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

Em relação ao fator interação com o animal na gaiola no PN45 (fig. 14), na análise ANOVA de duas vias observou-se que para o grupo LPS houve tendência à queda nos machos, em torno de 21 %, contudo, não estatisticamente significativo, enquanto que para as fêmeas do mesmo grupo (LPS), houve diferença significativa.

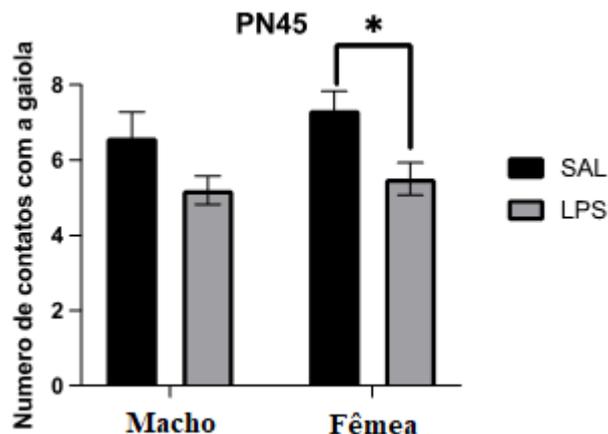


Figura 14 - Número de contatos com a gaiola em animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. \* $P < 0,05$  para comparações entre os grupos indicados pelos conectores. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

Como pode ser visto na figura 15, o tratamento com CBD não foi capaz de reverter a parte social dos animais, revelando a tendência em manter a redução que o LPS causou.

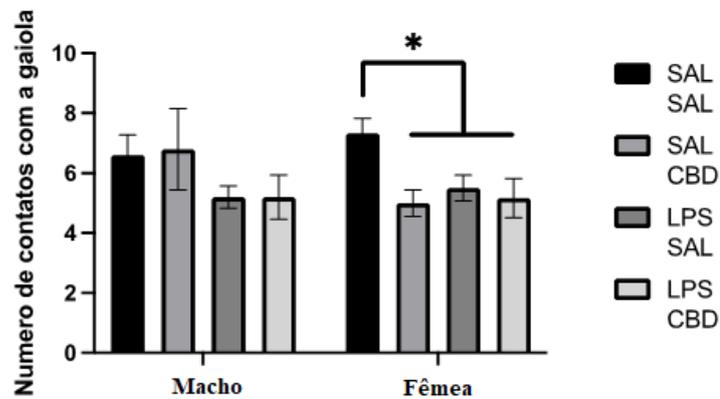
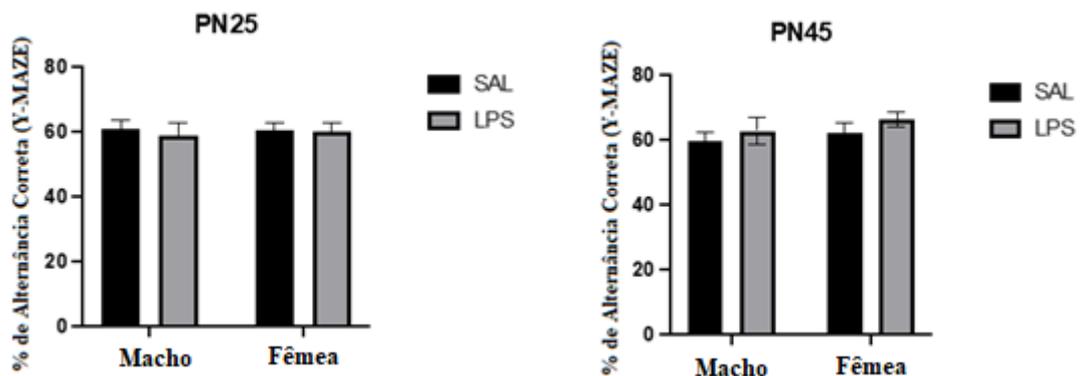


Figura 15 - Número de contatos com a gaiola em animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. \* $P < 0,05$  para comparações entre os grupos indicados pelos conectores. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

### - Teste do Y-MAZE

Esse teste, também conhecido como teste do labirinto em Y, foi utilizado com a finalidade de investigar alterações da memória operacional. A análise pela ANOVA de duas vias mostrou que houve não alterações comportamentais significativas, para ambos os momentos PN25 e PN45, como visto na figura 16.



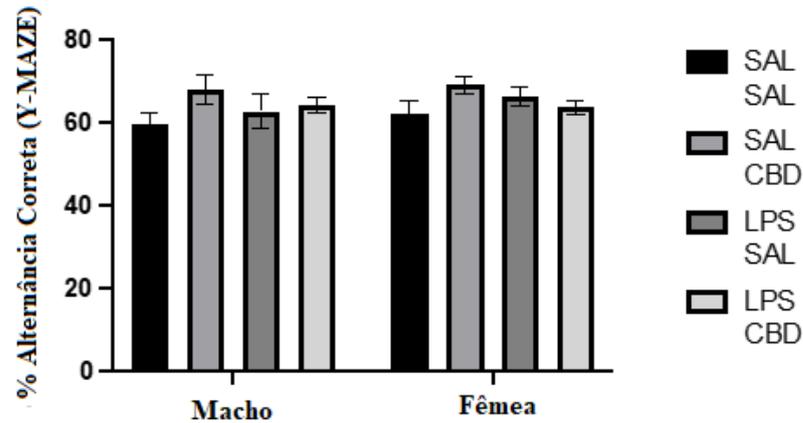


Figura 16 – Avaliação da memória operacional pelo teste do Y maze em animais infantis (dia pós-natal-PN 25 - A) e ao final da adolescência (PN 45 - B) expostos ou não ao LPS com 3, 5 e 7 dias pós-natal e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40 (C). Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

### - Teste do Campo Aberto

Para as avaliações de crossing (Fig. 17) e grooming (Fig. 18) não houve diferenças significativas. Em relação ao crossing, por mais que não tenha aparecido alterações significativas, observa-se que o tratamento com CBD não foi capaz de causar interferências na função motora do animal, como deixá-lo letárgico, por exemplo, sendo o animal preservado com seus movimentos normais.

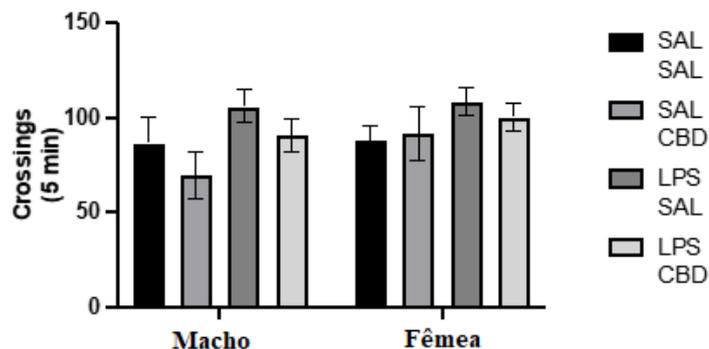


Figura 17 - Número de crossings em animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 45. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

Já para a avaliação de grooming, no PN45, observa-se que o tratamento com CBD não foi capaz de atenuar os sinais de estereotipias que refletem o comportamento de grooming.

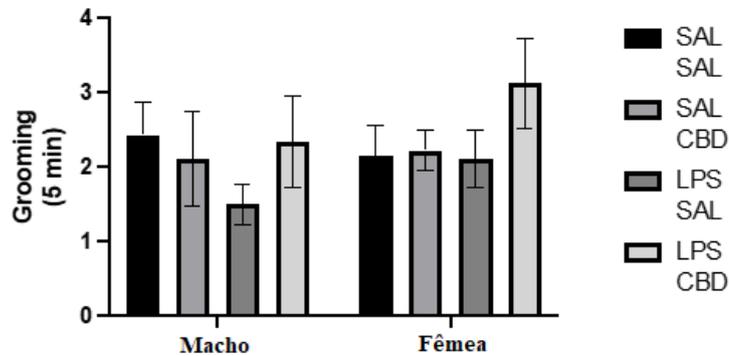


Figura 18 - Número de groomings em animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

## 5.2 Testes Neuroquímicos

### - Teste da Arginase

O teste da Arginase (Fig. 19) revelou resultados significativos para as áreas do córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo, enquanto a área do cerebelo não mostrou significância.

No CPF, CBD sozinho diminuiu a atividade da arginase em fêmeas. Quando comparados machos e fêmeas desse grupo (salina + CBD) observa-se que a atividade da arginase foi menor nas fêmeas que nos machos. Além disso, fêmeas tratadas com LPS e CBD exibiram maior atividade da arginase que fêmeas tratadas com salina e CBD.

No hipocampo, as fêmeas também apresentaram redução da atividade da arginase quando tratadas apenas com CBD. Os machos expostos ao LPS apresentaram aumento da atividade da arginase, o que foi normalizado pela administração de CBD. Quando comparadas as fêmeas desafiadas ou não com LPS, observou-se que o CBD aumentou a atividade da arginase nas fêmeas desafiadas em comparação as não expostas ao LPS.

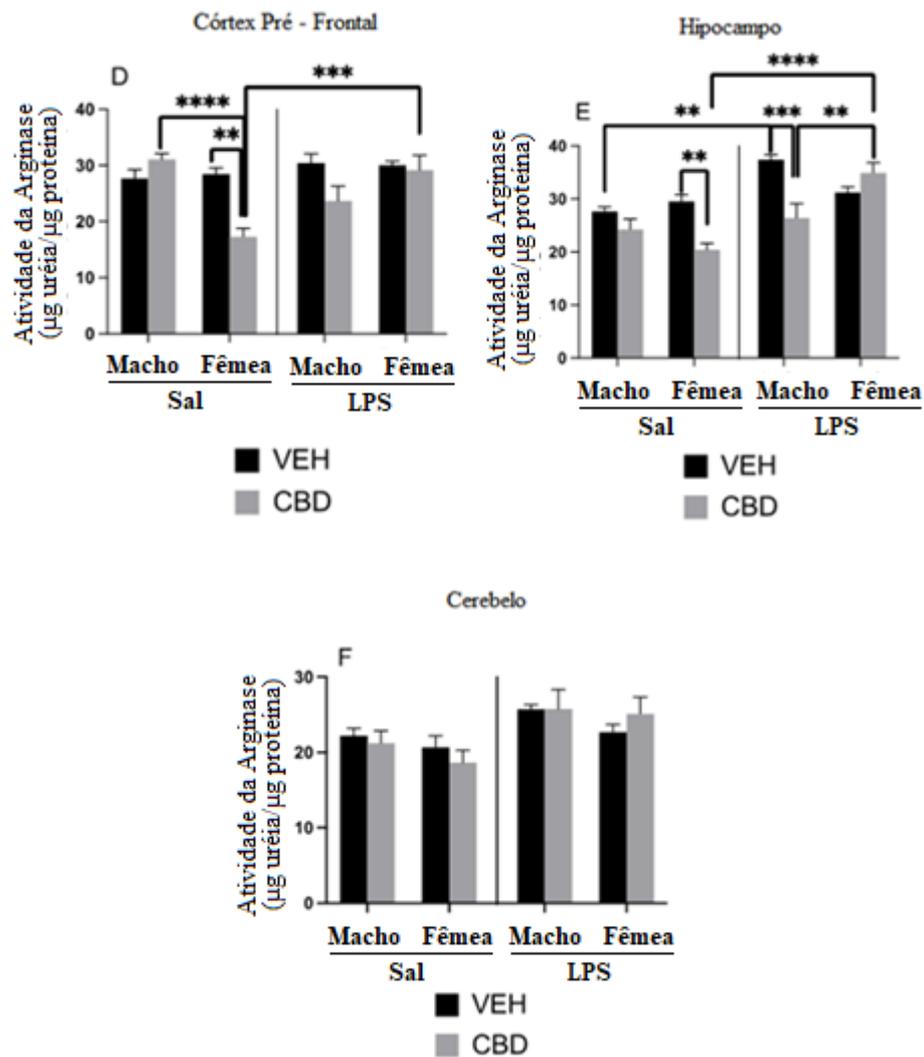


Figura 19 – Atividade da arginase no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  para comparações entre os grupos indicados pelos conectores. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

### - Avaliação dos níveis de Nitrito

A avaliação dos níveis de nitrito (Figura 20) revelou na área do córtex pré-frontal ausência de alterações significativas, apenas nas áreas de hipocampo e cerebelo.

Para a região do hipocampo, as fêmeas do grupo salina diminuíram a produção de nitritos pelo tratamento com CBD. As fêmeas expostas ao LPS apresentaram redução significativa nos níveis de nitrito, enquanto o tratamento com CBD aumentou os níveis de nitrito em comparação com o grupo exposto ao LPS.

Os resultados do cerebelo mostraram que, novamente, nas fêmeas tratadas com LPS, o CBD aumentou a produção de nitritos. Comparando machos e fêmeas, tratados com LPS e CBD, as fêmeas exibem maior produção que os machos.

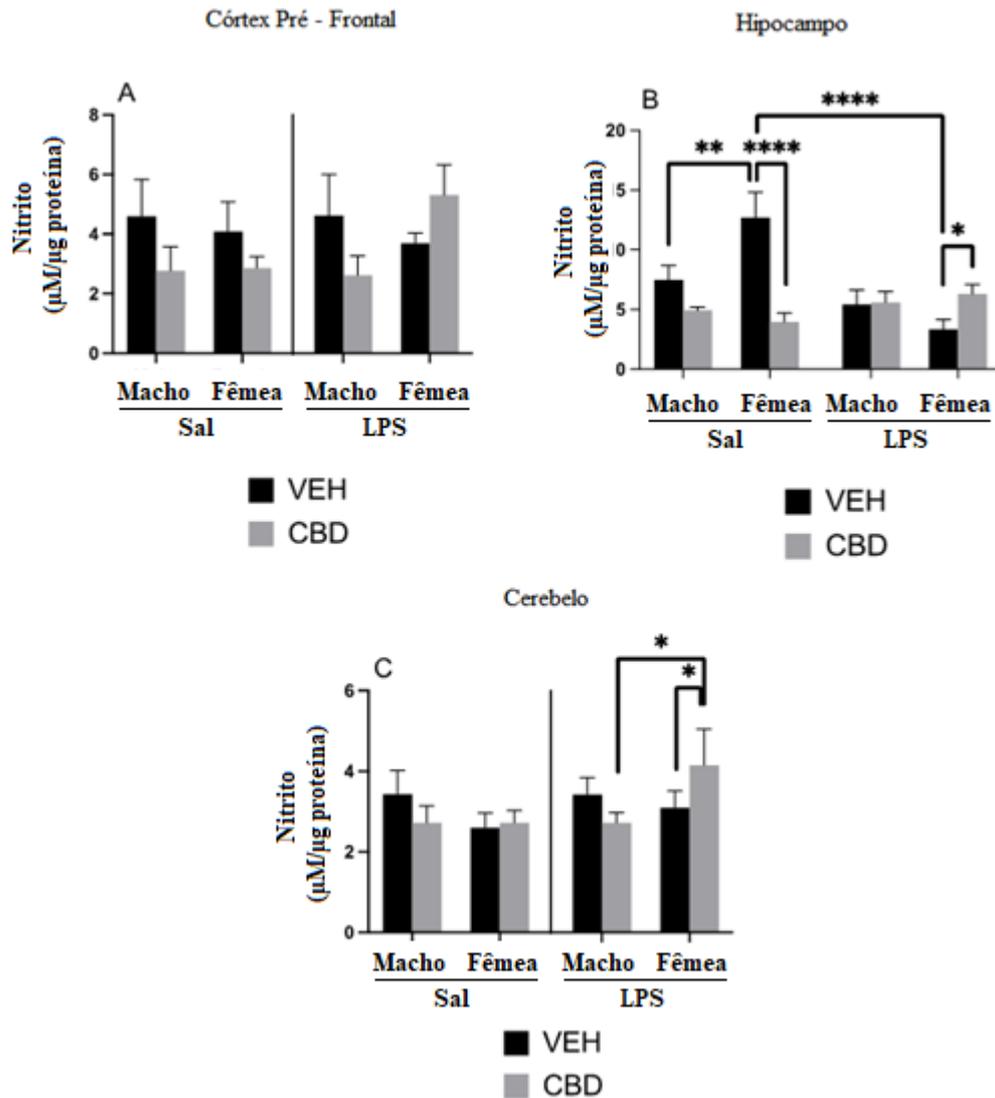


Figura 20 – Níveis de nitrito no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  para comparações entre os grupos indicados pelos conectores. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

### - Níveis de Citocinas: IL-6

Os níveis de IL-6 (Fig. 21) mostraram diferença estatisticamente significativa apenas para a área do Hipocampo. Para os machos tratados com LPS e CBD houve aumento da produção de IL-6, já para as fêmeas desse mesmo grupo houve diminuição da produção.

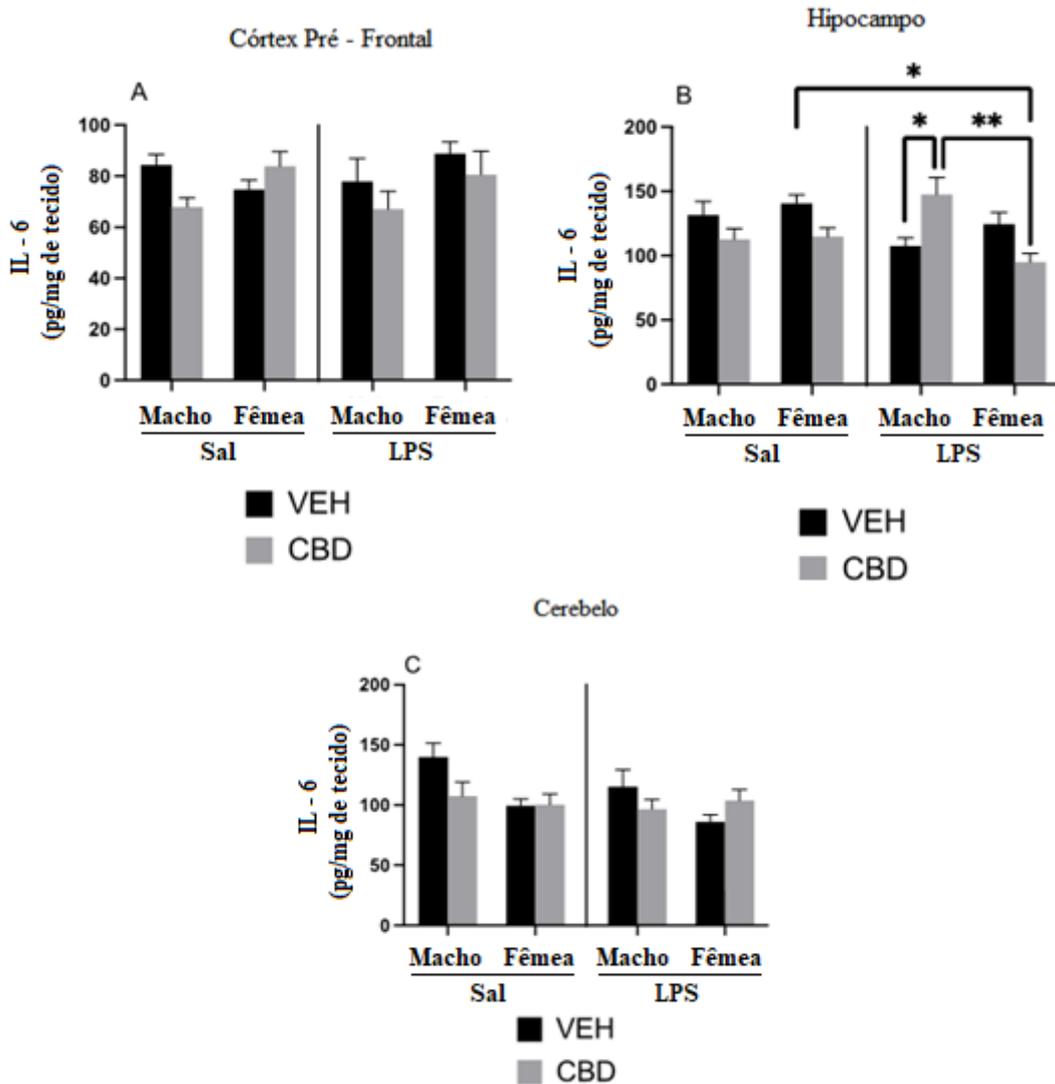


Figura 21 – Níveis de interleucina 6 no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  para comparações entre os grupos indicados pelos conectores. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

**- Níveis de Citocinas: TNF- $\alpha$** 

O teste do TNF- $\alpha$  (Fig. 22) revelou resultados estatisticamente significativos para as três áreas cerebrais analisadas.

No córtex pré-frontal, os machos tratados com salina e CBD tiveram diminuição da produção de TNF- $\alpha$ .

Na área do hipocampo, as fêmeas do grupo salina + CBD, apresentaram diminuição da produção de TNF- $\alpha$ . Em relação aos demais grupos, de uma maneira geral, pode-se inferir que as fêmeas exibem tendência de maior produção de TNF- $\alpha$  que os machos. As fêmeas expostas ao LPS apresentaram níveis reduzidos de TNF- $\alpha$  no hipocampo, o que permaneceu reduzido pela administração do CBD.

Já para o cerebelo, analisando o sexo feminino, CBD mostrou elevar a produção de TNF- $\alpha$  para fêmeas tratadas e não tratadas com LPS.

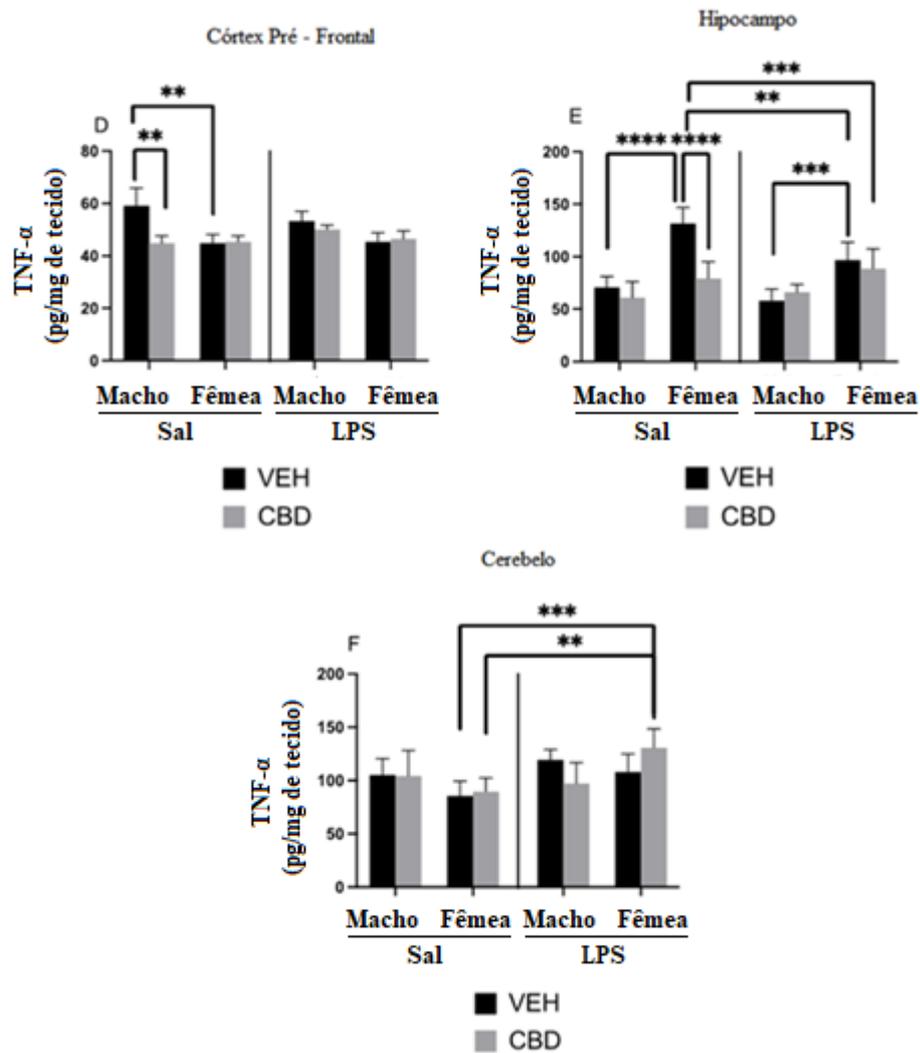


Figura 22 – Níveis de TNF- $\alpha$  no córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo de animais adolescentes (dia pós-natal-PN 45) expostos ao LPS nos dias pós-natais 3, 5 e 7 e tratados com canabidiol (CBD) entre os PNs 25 e 40. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido por teste de Tukey. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  para comparações entre os grupos indicados pelos conectores. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM e considerando  $n = 7 - 10$  animais/grupo.

Os quadros abaixo demonstram o resumo dos resultados obtidos nesse estudo através dos testes comportamentais (Quadro 2) e neuroquímicos (Quadro 3) realizados, segundo os parâmetros analisados e a manifestação de acordo com o gênero:

Quadro 2 – Resumo dos resultados comportamentais obtidos no presente estudo (PN25/PN45)

<i>Teste</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>PN</i>	<i>LPS macho</i>	<i>LPS fêmea</i>	<i>LPS + CBD macho</i>	<i>LPS + CBD fêmea</i>
<b>PREFERÊNCIA SOCIAL</b>	Preferência social com animal da gaiola	25	↑	↓	-	-
		45	Não significativo	↓	Não significativo	↓
<b>Y MAZE</b>	Alternâncias corretas	25	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
		45				
<b>CAMPO ABERTO</b>						
rearing	Fuga	25	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
		45				
crossing	Locomoção	25	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
		45				
grooming	Autolimpeza	25	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
		45				
<b>MARBLE BURING</b>	Comportamentos repetitivos obsessivos	25	↑	↑	-	-
		45	↑	↑	↓	↓

Quadro 3 – Resumo dos resultados neuroquímicos obtidos no presente estudo (PN45)

<i>Teste</i>	<i>Área cerebral</i>	<i>Sal + CBD fêmeas</i>	<i>Sal + CBD machos</i>	<i>LPS + CBD fêmeas</i>	<i>LPS + CBD machos</i>
<b>ARGINASE</b>	CPF	↓	Não significativo	↑	Não significativo
	HP	↓	Não significativo	↑	↓
	CER	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
<b>NITRITO</b>	CPF	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
	HP	↓	Não significativo	↑	Não significativo
	CER	Não significativo	Não significativo	↑	Não significativo
<b>IL - 6</b>	CPF	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
	HP	Não significativo	Não significativo	↓	↑
	CER	Não significativo	Não significativo	Não significativo	Não significativo
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CPF	Não significativo	↓	Não significativo	Não significativo
	HP	↓	Não significativo	Não significativo	Não significativo
	CER	↑	Não significativo	↑	Não significativo

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo revelaram que os comportamentos tipo repetitivos induzidos pela exposição neonatal ao LPS em machos e fêmeas, analisados através do teste de esconder esferas, voltaram aos níveis de animais controle após o tratamento com CBD, para ambos os sexos quando avaliados na adolescência. Já as fêmeas submetidas ao LPS no período neonatal mostraram menor capacidade de preferência social, mas o tratamento com CBD não foi capaz de reverter esse quadro. Em relação aos testes neuroquímicos, o aumento da atividade da arginase foi observado nas áreas cerebrais do córtex pré-frontal e hipocampo das fêmeas, enquanto para os machos a elevação da atividade da arginase foi revertida pelo CBD no hipocampo. Quanto ao nitrito, o hipocampo das fêmeas expostas ao LPS mostrou redução desse índice, o que foi normalizado pelo tratamento com CBD. Os níveis de IL-6 apresentaram-se aumentados no hipocampo dos machos expostos ao LPS e tratados com CBD, bem como na mesma área cerebral as fêmeas expostas ao LPS apresentaram redução de TNF- $\alpha$ .

Nas últimas décadas a exposição pré-natal ao LPS vem sendo estudada como modelo animal de TEA (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012; CUSTÓDIO et al., 2017; KIRSTEN; PALERMONETO; BERNARDI, 2012). Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa resolveu estudar as alterações desenvolvimentais causadas pela exposição neonatal a esta endotoxina (CUSTÓDIO et al., 2017; CRISTINO et al., 2022). O modelo animal de autismo induzido por LPS tem o intuito de simular exposições bacterianas em períodos cruciais do desenvolvimento (pré-natal ou neonatal). Esses modelos servem para avaliar o impacto que a vulnerabilidade dessa fase pode trazer como consequências à puberdade ou vida adulta em relação aos transtornos do neurodesenvolvimento, como TEA ou esquizofrenia (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012; CUSTÓDIO et al., 2017; FORTIER; LUHESHI; BOKSA, 2007; HAVA et al., 2006; KIRSTEN; PALERMONETO; BERNARDI, 2012; PANG et al., 2016; PATTERSON, 2009; SMITH; NAYLOR, 2014).

Como as principais manifestações sintomáticas do TEA já aparecem em crianças na fase de primeira infância, optou-se por realizar os testes em animais infantis (PN25) como uma forma de correlação à infância. Enquanto os testes realizados com os animais no PN 45 simulam a fase da puberdade (DUTTA; SENGUPTA, 2016). Tendo em vista que é possível estabelecer um paralelo entre as idades de roedores e humanos, há uma correspondência de tempo que determina que os PNs 1-3 de animais representam 23-32 semanas de gestação humana (SEMPLE et al., 2013), enquanto os PNs 5 e 7 correspondem ao terceiro trimestre da gravidez,

em torno da última fase de uma gestação humana de 36-40 semanas (a termo) (ANDERSEN, 2003; SEMPLE et al. 2013).

No presente estudo, os animais foram expostos ao LPS em período neonatal que corresponde a um desafio no final do terceiro trimestre de fase gestacional humana, e posteriormente avaliados nos momentos PN25 e PN 45, que equivalem respectivamente, à infância e adolescência. O PN25 de roedores corresponde a fase de 4 a 5 anos no humano em comparação etológica (SEMPLE et al., 2013). Já o PN45 revela correspondência com a adolescência humana, em torno de 12-15 anos do ser humano, inferido através da literatura que traz que PN 33-36 faz alusão à adolescência e PN 55-65 à idade adulta (TISHKINA et al., 2016). As análises neuroquímicas realizadas no PN45, equivalem à fase de puberdade em humanos.

Apesar da alta prevalência de TEA no sexo masculino, no presente estudo os testes comportamentais com resultado significativo mostraram que as fêmeas expostas ao LPS tiveram prejuízo à preferência social e que nos machos essa circunstância não foi observada, corroborando resultado prévio publicado por nosso grupo de pesquisa (CRISTINO, 2019). Diferentemente deste estudo citado, no presente trabalho optamos por ampliar o tempo de exposição ao LPS em 1 dia, ou seja, iniciando no PN3 e testamos o efeito do tratamento com CBD na tentativa de reversão do comportamento TEA-símile. O CBD foi capaz de reverter o comportamento repetitivo observado em machos e fêmeas, enquanto não houve efeito do CBD no comportamento social.

Conforme acima mencionado, a respeito das análises referentes ao comportamento do tipo repetitivo compulsivo, através do teste de esconder esferas, constatamos que ambos os sexos foram impactados. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que a exposição neonatal ao LPS causa aumento de grooming no campo aberto, que também se relaciona com comportamentos estereotipados. Portanto, a exposição neonatal ao LPS induz comportamento tipo-ansioso e repetitivo em machos (CRISTINO, 2019; CUSTÓDIO et al., 2017).

Estudo de Cristino et al. (2019) aponta ainda que esse padrão de comportamento tipo-ansioso dos machos evidenciado em sua pesquisa, está em consonância com Custódio et al. (2017) apenas para o período da adolescência (PN 35), pois este último mostrou que na idade adulta (PN 70), os animais exibiram uma normalização tanto do comportamento ansioso quanto

no comportamento repetitivo-estereotipado no teste do campo aberto, sugerindo uma diminuição dessas características na vida adulta.

Ainda que parcialmente, resultados obtidos por Tishkina et al. (2016) corroboram com os nossos achados, uma vez que ratos Wistar machos que foram desafiados com LPS em período neonatal (PN 3 e 5) e posteriormente avaliados na adolescência (PN 33-36) e idade adulta (PN 101-107), apresentaram comportamento tipo-ansioso através da avaliação pelo número de entradas no centro da arena do campo aberto.

Além do teste do campo aberto, o teste de esconder esferas (NJUNG'E; HANDLEY, 1991) possibilita análise de comportamento tipo-ansioso, desempenho motor e traços de estereotipia por enterramento. É estabelecido que o burying (enterramento) não é despertado por novidade, refletindo um comportamento de escavação tipo obsessivo-compulsivo (THOMAS et al., 2009).

Estudiosos já têm utilizado este teste amplamente para avaliar o comportamento repetitivo/persistente relevante para transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e TEA em modelos de roedores (AMODEO et al. 2012 ; ANDERSEN et al. 2010 ; DEACON et al. 2006 ; MOY et al. 2014 ; SCATTONI et al. 2008 ; SILVERMAN et al. 2015 ; TAKEUCHI et al. 2002). O aumento da escavação repetitiva foi observado no teste do enterramento de esferas vítreas em vários modelos animais de TEA, como o camundongo BTBR T+ tf/J, camundongos transgênicos eIF4E (4E Tg), e no modelo de ativação imunológica materna (AMODEO et al., 2012; SANTINI et al., 2013 ; CHOI et al., 2016 ).

O tratamento com CBD evidenciou diminuir o comportamento do tipo repetitivo/persistente relevante, para machos e fêmeas nesse estudo. Outros estudos também exibiram resultados semelhantes, em que observaram efeito anticomulsivo através do teste de esconder esferas quando testada essa droga em animais com sintomas do tipo ansioso (CASAROTTO et al., 2010; NARDO et al., 2014).

Esses indícios sugerem que alguns comportamentos tendem a desaparecer com o decorrer do tempo, ressaltando a importância de avaliar os padrões comportamentais em diferentes momentos de vida. No presente estudo as idades estudadas equivalem à infância e adolescência, e o CBD mostrou-se como uma alternativa terapêutica aplicável para essas faixas etárias. Ao que parece na idade adulta os comportamentos repetitivos e estereotipados estão atenuados, não sendo um provável foco de tratamento para o CBD.

Os resultados encontrados sugerem que o sistema canabinoide atua no controle de comportamentos repetitivos, entretanto a explicação precisa desta interação ainda não foi completamente esclarecida (NARDO et al., 2014), sendo, portanto, um indicativo de que estudos mais robustos sejam orientados nessa direção.

Sintomas de TEA bem comuns envolvem déficits sociais e de comunicação, assim como comportamento repetitivo, portanto através dos resultados expostos o desafio animal imune neonatal por LPS permite simular esses sintomas, mostrando que a exposição causa prejuízos de habilidades sociais (em fêmeas) e induz comportamento tipo-ansioso e repetitivo (em machos e fêmeas). Esse modelo possibilita o estudo de como os comportamentos relevantes para o TEA em animais infantes e púberes podem ser beneficiados com o tratamento com CBD, apontando a potência que essa droga tem em ser objeto de estudos translacionais.

As análises cerebrais revelaram que quanto ao nitrito, o hipocampo das fêmeas expostas ao LPS mostrou redução desse índice, o que foi normalizado pelo tratamento com CBD. Diferentemente para Custódio (2017), o nitrito apresentou-se elevado nos machos adultos (PN70), entretanto a idade testada foi diferente do nosso estudo, onde os animais foram analisados na adolescência (PN45). Vale salientar também que esses estudos comparativos, foram conduzidos com exposição ao LPS neonatal em intervalos de tempo diferentes, sendo, portanto, plausível que os resultados possam diferir em alguns pontos.

Em relação aos níveis de IL-6, os mesmos apresentaram-se aumentados no hipocampo dos machos expostos ao LPS e tratados com CBD. A IL-6, é uma citocina neuropoiética, pró-inflamatória, associada ao desenvolvimento neurológico e à função cerebral (STOLP; 2013). Estudo de Custódio (2017), quando testou camundongos expostos ao LPS encontrou níveis de IL-6 diminuídos para ambos os sexos, nas áreas examinadas (córtex pré-frontal e hipocampo) nos períodos correspondentes à adolescência (PN35) e idade adulta (PN70). No estudo atual o tratamento com o CBD, mostrou que o mesmo é capaz de reverter esses índices, resgatando os níveis de IL-6 no hipocampo de machos.

A desregulação imune caracterizada por níveis anormais de citocinas como a interleucina IL-6, IL-4, IFN- $\gamma$  é observada no autismo (GOINES; ASHWOOD, 2013).

Ainda nessa pesquisa, os achados cerebrais mostraram que a exposição ao LPS elevou, nas áreas do córtex pré-frontal e hipocampo, a atividade da arginase em fêmeas, já para os machos a elevação foi apenas no hipocampo. Entretanto, o tratamento com CBD mostrou diminuir a atividade da arginase apenas nos machos (hipocampo). Na presença de padrões

moleculares associados a patógenos, como o LPS, micróglia em estado vigilante de alerta podem ser ativadas a um fenótipo tipo M2 liberando citocinas e levando à ativação de macrófagos que expressam a enzima arginase-1 na superfície celular, com atividade anti-inflamatória, que auxiliam na eliminação da inflamação (QUIRIÉ et al., 2013; RATH et al., 2014; MOSSER; EDWARDS, 2008).

Micróglia de fenótipos M1 representa um fenótipo reativo, pró-inflamatório, principalmente, no estágio inicial da resposta imune, enquanto o fenótipo M2 relaciona-se principalmente à um perfil pouco reativo, anti-inflamatório nos estágios intermediário e final da resposta imune (LAFFER et al., 2019).

Durante o neurodesenvolvimento, a micróglia elimina preferencialmente sinapses mais fracas ou menos ativas em cérebros normais, promovendo assim a poda fina de espinhas dendríticas, o que favorece sinapses mais fortes ou mais ativas (MALLYA et al., 2019). Aproximadamente 90% das sinapses excitatórias estão presentes em espinhas dendríticas e alterações na quantidade e morfologia acabam por interferir na regulação da transmissão sináptica e plasticidade neuronal (LEFEBVRE et al., 2015), relacionando-se à comunicação cerebral atípica de indivíduos com TEA (MARTÍNEZ-CERDEÑO, 2017). Desta forma, a homeostase microglial exerce papel fundamental no desenvolvimento e função das sinapses, e uma disfunção microglial, levando à poda reduzida ou poda excessiva, pode estar associada à patogênese do autismo (ANDOH; IKEGAYA; KOYAMA, 2019; LI et al., 2020).

A poda de sinapses e espinhas dendríticas por células microgliais (PAOLICELLI et al., 2011) é criticamente dependente da autofagia intraneuronal (POULTNEY et al., 2013; TANG et al., 2014). A autofagia microglial normal desempenha papel importante na manutenção da homeostase cerebral e estudos têm mostrado que esse processo está intimamente relacionado à ocorrência de autismo e favorece a polarização da microglia para o fenótipo M2 através da regulação negativa da expressão de marcadores microgliais M1, abrangendo iNOS/NO, TNF- $\alpha$  e IL-6, e regulação positiva da expressão de marcadores da microglia M2, compreendendo arginase-1 e IL-10 (CHO et al., 2020).

A arginase é uma enzima característica de micróglia de fenótipo tipo M2, revelando-se como marcador típico para macrófagos polarizados M2A (KALKMAN; FEUERBACH, 2017). Quando avaliada sua atividade pretende-se investigar se após a inflamação houve mobilização de células de defesas imunológicas a fim de reparar áreas cerebrais numa tentativa de reestabelecer a homeostase (CANDEIAS, 2020).

Desta forma, aumento da atividade da arginase, leva à interpretação de que o perfil de micróglia está mais inclinado ao fenótipo M2, após exposição neonatal ao LPS, levando o animal a apresentar alterações comportamentais. O tratamento com CBD mostrou ser uma alternativa para reverter este fenótipo microglial, em machos na idade da adolescência com o intuito de diminuir essa inclinação hipocampal ao perfil M2.

Em processos inflamatórios a disfunção microglial ocasiona uma redução na dimensão de micróglia e no número de ramificações desde o período pós-natal precoce até a adolescência, sendo, portanto, esse um período crucial para o estudo de novos alvos farmacológicos. A inflamação é capaz de regular a expressão de genes relacionados à função microglial, relaciona-se à diminuição da fagocitose pelas células da micróglia e está envolvida na expressão de proteínas lisossômicas, resultando em poda sináptica defeituosas, as quais são mediadas pela micróglia. Esse processo culmina em excesso de sinapses excitatórias no hipocampo e comportamentos similares ao autismo (SAITOH et al., 2021).

Análises de cérebro post mortem de humanos com TEA para medições dos níveis de citocinas e marcadores de micróglia sugerem uma mistura de estados M1 e M2, fornecendo evidências de que ainda não há uma padronização factual a respeito da polarização sobre o TEA e que é possível ainda que os diferentes subtipos de TEA refletem essa discrepância de resultados ou ainda em que fase da inflamação os estudos foram realizados, se quando na fase inicial da infecção onde há primeiro uma resposta de defesa (M1) ou se na fase posterior onde há reparo (M2) (KALKMAN; FEUERBACH, 2017).

Essas descobertas propõem que a micróglia pode ser determinante na patogênese do autismo devido à diferentes funções fisiológicas, mas seu papel e efeito precisos sobre a inflamação no sistema nervoso na conjuntura do autismo ainda precisam ser profundamente explorados (ZHANG et al., 2023).

O endocanabinóide anandamida (AEA), degradado principalmente pela enzima amida hidrolase de ácido graxo (FAAH) (LUTZ et al., 2015; ILYASOV et al., 2018) teve sua atividade analisada em um estudo em ratos adultos que mostrou que a inibição de FAAH através de drogas diminui a expressão de marcadores de ativação microglial, a produção de citocinas e os déficits de plasticidade sináptica no hipocampo (MURPHY et al., 2012). Desta forma, destaca-se que um aumento da sinalização de endocanabinóides relaciona-se a fenótipos antiinflamatórios e protetor de micróglia (BENITO et al., 2008 ; STELLA, 2009 ; LISBOA et al., 2016).

Um estudo realizado com ratos onde houve administração de LPS, porém em um dia pós-natal diferente do nosso estudo, revelou que a inflamação no início da vida induzida por aplicação única de LPS no PN14 foi relevante de maneira a afetar o comportamento social de machos e fêmeas adolescentes (PN40). Alterações do sistema EC foram relatadas e foi sugerido que os déficits sociais procederam da menor capacidade de ligação do receptor CB1, níveis aumentados de AEA e aumento da atividade de FAAH na amígdala. Essas alterações são atenuadas com a administração de um inibidor da FAAH (DOENNI et al., 2016).

Nesse contexto, a pesquisa com CBD em diversos transtornos neuropsiquiátricos, como esquizofrenia, revelou que o CBD aumenta os níveis séricos de AEA em indivíduos esquizofrênicos por inibição da enzima FAAH (LEWEKE et al., 2012). Ainda na esquizofrenia, em estudo pré – clínico em ratos o CBD mostrou melhorar disfunções sociais e cognitivas (OSBORNE et al., 2017), enquanto que acerca da síndrome de Dravet essa droga trouxe benefícios sobre convulsões e déficits sociais observados em modelo com camundongos (KAPLAN et al., 2017).

Essas evidências somadas a outros estudos que exibiram resultados positivos pelo uso do CBD em crianças com TEA (ARAN et al., 2019; BAR-LEV SCHLEIDER et al., 2019; TARTAGLIA et al., 2019), conduziram os pesquisadores a considerarem que o CBD pode ser uma boa alternativa para o tratamento de TEA, já que inibe a ação de FAAH e tende a normalizar a depleção de AEA observada nesses pacientes (ARAN et al., 2019; KARHSON et al., 2018). Além disso, vale ressaltar a boa tolerabilidade que o CBD exhibe em humanos (DEVINSKY et al., 2014).

Outros autores têm buscado explorar como esse suposto aumento do tônus endocanabinóide influencia positivamente sobre os sintomas de TEA de forma a atenuá-los. Diferentes compostos têm sido foco de pesquisa, como um outro inibidor de FAAH (URB597), que demonstrou aumentar os níveis de AEA e, portanto, exibiu potencial terapêutico em ratos expostos no momento pré-natal ao Valproato (VPA), ou seja, à um modelo de TEA de cunho ambiental (MELANCIA et al., 2018; SERVADIO et al., 2016; WU et al., 2020). Foi observado através desse estudo que houve efeitos positivos sobre o comportamento socioemocional dos animais testados (BARA et al., 2018; MANDUCA et al., 2016; TREZZA et al., 2012).

O CBD mostra-se capaz de bloquear a ativação microglial (MARTIN-MORENO et al., 2011) e neuroinflamação (ELLIOTT et al., 2018; MAROON E BOST, 2018), e na micróglia o receptor do tipo CB2 é o mais abundante. Além disso, três relatórios clínicos estabeleceram

recentemente que o uso de CBD em crianças atenua alguns sintomas associados ao TEA, como convulsões, insônia e ansiedade (BARCHEL et al., 2018 ; ARAN et al., 2019 ; BAR-LEV SCHLEIDER et al., 2019 ).

Drogas anti-inflamatórias, como o CBD quando administradas em camundongos com fenótipo de autismo induzem a redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17A e IFN- $\gamma$  no cérebro, e evidenciaram benefícios significativos sobre os sintomas do autismo, como disfunção cognitiva e comportamentos repetitivos (SHEIKH et al., 2018; COLIZZI et al., 2021).

Por ser um constituinte abundante, porém não psicomimético da planta *Cannabis sativa*, o composto bioativo CBD desperta interesse como estratégia promissora para tratar inflamação motivada por hiperatividade microglial (MARTIN-MORENO et al., 2011; MECHOULAM et al., 2007; SAITO et al., 2012), assim como para atenuar estresse oxidativo em diferentes modelos animais de doenças neuroinflamatórias (BOOZ, 2011; CASSOL et al., 2010; LIGRESTI et al., 2016; MUKHOPADHYAY et al., 2011; RUIZ-VALDEPENAS et al., 2011), conduzindo à novas possibilidades de terapêutica canabinóide em distúrbios neuronais no qual estão envolvidos imunidade e inflamação.

Interessantemente, as fêmeas tratadas apenas com CBD apresentaram redução da preferência social, redução da atividade da arginase e dos níveis de nitrito e TNF- $\alpha$  no hipocampo, mostrando que a exposição de cérebros controle ao CBD pode ocasionar alterações compatíveis com autismo. Finalmente, após análises dos resultados é importante considerar que para alcançar resultados mais eficazes um maior número de estudos precisa ser realizado a fim de determinar de que forma o CBD seja mais efetivo de modo a contemplar a reversão dos danos ocasionados pelo TEA.

Embora os estudos mostrem um grande progresso no contexto do TEA, esse transtorno do neurodesenvolvimento ainda se mostra insuficientemente elucidado. Inúmeras teorias foram concebidas, mas ainda faltam marcadores específicos, nos campos imunológicos, neuroquímicos e genéticos, que auxiliem a fundamentação da patogênese e subgrupos de TEA. Desta forma, o nosso estudo busca contribuir no que concerne a tentativa de esclarecer conexões entre marcadores e seus papéis fisiológicos normais e assim fornecer conhecimento sobre o curso patogênico do TEA que ofereça possibilidades de abordagem terapêutica factível para tratar os indivíduos o mais precocemente possível, ainda na faixa de infância e adolescência.

Vale salientar ainda que o estudo foi concebido e executado durante o período de pandemia da COVID-19, o que limitou a operacionalização de testes mais específicos que viessem a esclarecer melhor as repercussões do tratamento com o CBD. Além disso, a literatura oferece resultados acerca de várias doses de utilização da substância canabidiol, entretanto optamos por estudar apenas uma dose, o que pode impactar sobre os diversos efeitos encontrados a respeito do CBD.

## **7 CONCLUSÃO**

A exposição pré-natal ao LPS causou alguns comportamentos do tipo autista de maneira distinta entre animais machos e fêmeas. O comportamento obsessivo, avaliado pelo teste de esconder esferas, foi observado em animais machos e fêmeas avaliados na infância (dia pós-natal – PN 25) e no final da adolescência PN 45. O tratamento com CBD reverteu estas alterações em ambos os sexos. As fêmeas apresentaram comprometimento na preferência social que não foi revertido pelo CBD. As alterações induzidas pelo LPS em animais machos foram acompanhadas de aumento da atividade da arginase no hipocampo, o qual foi revertido pelo CBD. No hipocampo das fêmeas expostas ao LPS houve redução de nitrito, o que normalizou pelo tratamento com CBD. Interessantemente, as fêmeas tratadas apenas com CBD apresentaram redução da preferência social, redução da atividade da arginase e dos níveis de nitrito e TNF- $\alpha$  no hipocampo, mostrando que a exposição de cérebros controle ao CBD pode ocasionar alterações compatíveis com autismo. De forma geral, o modelo animal se mostra uma ferramenta importante para o estudo do TEA, bem como os resultados apontam para benefícios do CBD em animais expostos ao desafio com LPS, mas não em situações controle.

## REFERÊNCIAS

- ADRIANI, W.; SPIJKER, S.; DEROCHE-GAMONET, V.; LAVIOLA, G.; LE MOAL, M.; SMIT, A. B.; PIAZZA, P. V. Evidence for enhanced neurobehavioral vulnerability to nicotine during periadolescence in rats. **J. Neurosci.**, v. 23, p. 4712–4716, 2003.
- AMEIS S.H., KASSEE C., CORBETT-DICK P., et al. Systemic review and guide to management of core and psychiatric symptoms in youth with autism. **Acta Psychiatr Scand**, v. 138, n. 5, p. 379–400, 2018.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition (DSM-5). Washington, DC: **American Psychiatric Publishing**, 2013.
- AMODEO, D.A.; JONES, J.H.; SWEENEY, J.A.; RAGOZZINO, M.E. Differences in BTBR T+ tf/J and C57BL/6J mice on probabilistic reversal learning and stereotyped behaviors. **Behav Brain Res.**, v. 227, p. 64–72, 2012.
- ANDERSEN, S.L.; GREENE-COLOZZI, E.A.; SONNTAG, K.C. A novel, multiple symptom model of obsessive compulsive-like behaviors in animals. **Biol Psychiatry.**, v. 68, p. 741–747, 2010.
- ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v. 27, p. 3-18, 2003.
- ANDERSEN, S.L.; LEBLANC, C.J.; LYSS, P.J. Maturational increases in c-fos expression in the ascending dopamine systems. **Synapse**, v. 41, n. 4, p. 345–50, 2001.
- ANDOH, M.; IKEGAYA, Y.; KOYAMA, R. Microglia as possible therapeutic targets for autism spectrum disorders. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 167, p. 223-245, 2019.
- ARAN, A.; CASSUTO, H.; LUBOTZKY, A.; WATTAD, N.; HAZAN, E. Brief report: cannabidiol-rich cannabis in children with autism spectrum disorder and severe behavioral problems-a retrospective feasibility study. **J. Autism Dev. Disord.**, v. 49, p. 1284–1288, 2019.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- ASHWOOD P., SCHAUER J., PESSAH I.N., VAN DE WATER J. Preliminary evidence of the in vitro effects of BDE-47 on innate immune responses in children with autism spectrum disorders. **J. Neuroimmunol**, v. 208, p. 130–135, 2009.
- BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. **The Journal of neuroscience**, [s. l.], v. 21, n.17, p. 6480–6491, 2001.
- BARA, A.; MANDUCA, A.; BERNABEU, A.; BORSOI, M.; SERVIADO, M.; LASSALLE, O.; MURPHY, M.; WAGER-MILLER, J.; MACKIE, K.; PELISSIER-ALICOT, A.L.; TREZZA, V.; MANZONI, O.J. Sex-dependent effects of in utero cannabinoid exposure on cortical function. **Elife**, v. 7, p. e36234, 2018.

BARCHEL, D.; STOLAR, O.; DE-HAAN, T.; ZIV-BARAN, T.; SABAN, N.; FUCHS, D. O., et al. Oral cannabidiol use in children with autism spectrum disorder to treat related symptoms and Co-morbidities. **Front. Pharmacol.**, v. 9, n. 1521, 2018.

BAR-LEV SCHLEIDER, L.; MECHOULAM, R.; SABAN, N.; MEIRI, G.; NOVACK, V. Real life experience of medical cannabis treatment in autism: analysis of safety and efficacy. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 200, 2019.

BARON-COHEN, S. Autism: Research into causes and intervention. *Pediatr. Rehabil.*, v. 7, p. 73–78, 2004.

BAUMAN M.D., TOSCANO J.E., BABINEAU B.A., MASON W.A., AMARAL D.G. Emergence of stereotypies in juvenile monkeys (*Macaca mulatta*) with neonatal amygdala or hippocampus lesions. **Behav Neurosci.**, v. 122, p. 1005-1015, 2008.

BENITO, C.; TOLON, R. M.; PAZOS, M. R.; NUNEZ, E.; CASTILLO, A. I.; ROMERO, J. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, p. 277–285, 2008.

BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; TRINDADE, M. O. Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: Uma revisão. **Revista Neurociencias**, v. 20, n. 1, p. 117–127, 2012.

BIALAS, A. R.; AND STEVENS, B. TGF-beta signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. **Nat. Neurosci.**, v. 16, p. 1773–1782, 2013.

BILGE, S.; EKICI, B. CBD-enriched cannabis for autism spectrum disorder: an experience of a single center in Turkey and reviews of the literature. **J Cannabis Res.**, v. 3, n. 1, p. 53, 2021.

BISOGNO, T.; HANUS, L.; DE PETROCELLIS, L.; TCHILIBON, S.; PONDE, D.E.; BRANDI I.; MORIELLO, A.S.; et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 845–52, 2001.

BISWAS, S. K.; LOPEZ-COLLAZO, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 10, p. 475–487, 2009.

BLESSING, E. M.; STEENKAMP, M.M.; MANZANARES, J.; MARMAR, C. R. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. **Neurotherapeutics**, v. 12, p. 825–836, 2015.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010.

BOOZ G.W. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 51, p. 1054-1061, 2011.

BOU KHALIL, R. Would some cannabinoids ameliorate symptoms of autism? **Eur Child Adolesc Psychiatry**, v. 21, p. 237-238, 2012.

BRAGA; CARDOSO; TOKADA. Quem é a micróglia e como ela defende o cérebro? **Nanocell news**, v. 6, n. 7, 2019.

BRIDGEMANAN, M.B.; ABAZIA, D.T. Medicinal cannabis: history, pharmacology, and implications for the acute care setting. **P T.**, v 423, p. 180–188, 2017.

BUIE T., CAMPBELL D.B., FUCHS G.J. III, et al. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. **Pediatric**, v.125, n. 1, p. S1–S18, 2010.

BUTOVSKY, O.; WEINER, H. L. Microglial signatures and their role in health and disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 19, p. 622–635, 2018.

CABRAL, G.A.; FERREIRA, G.A.; JAMERSON, M.J. Endocannabinoids and the Immune System in Health and Disease. **Handb Exp Pharmacol**, v. 231, p. 185-211, 2015.

CABRAL, G.A., GRIFFIN-THOMAS, L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. **Expert Rev Mol Med**, v. 11, p. e3, 2009.

CANDEIAS, RAIMUNDA. **Influência dos hormônios sexuais no modelo desenvolvimental de esquizofrenia induzido por desafio imune pós-natal**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

CAROFF, M. et al. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 9, p. 915–926, 2002.

CASAROTTO, P.C.; GOMES, F.V.; RESSTEL, L.B.; GUIMARAES, F.S. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. **Behav. Pharmacol.**, v. 21, p. 353–358, 2010.

CASSOL, O.J.; COMIM, JR.; SILVA, C.M.; HERMANI, B.R.; CONSTANTINO, F.V.; FELISBERTO, L.S.; PETRONILHO, F.; HALLAK, F.; DE MARTINIS, J.E.; ZUARDI, B.S.; CRIPPA, A.W.; QUEVEDO, J.A.; DAL PIZZOL, F. J. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. **Brain Res**, v. 1348, p. 128-138, 2010.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Autism Spectrum Disorder (ASD). Disponível em <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/index.html> . Acesso em 01 de out. 2022.

CHAIDEZ V., HANSEN R.L., HERTZ-PICCIOTTO I. Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. **J Autism Dev Disord.**, v. 44, n. 5, p. 1117–1127, 2014.

CHANGEAUX, J.P.; DANCHIN, A. Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. **Nature**, v. 264, p. 705–12, 1976.

CHERRY, J. D.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Neuroinflammation and M2 microglia: The good, the bad, and the inflamed. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 11, p. 1–15, 2014.

CHOI, G.B. et al. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autismlike phenotypes in offspring. **Science**, v. 351, p. 933–939, 2016.

CHO, K.S.; LEE, J.H.; CHO, J.; CHA, G.H.; SONG, G.J. Autophagy modulators and neuroinflammation. **Curr Med Chem.**, v. 27, n. 6, p. 955-982, 2020.

COLIZZI, M.; BORTOLETTO, R.; COSTA, R.; ZOCCANTE, L. Palmitoylethanolamide and Its Biobehavioral Correlates in Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review of Human and Animal Evidence. **Nutrients**, v. 13, n. 1346, 2021.

COMERY, T. A.; HARRIS, J. B.; WILLEMS, P. J.; OOSTRA, B. A.; IRWIN, S. A.; WEILER, I. J.; et al. Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 94, p. 5401–5404, 1997.

CORRALIZA, I.M.; CAMPO, M.L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods* 174, 231–235, 1994.

COURY D.L., ANAGNOSTOU E., MANNINGCOURTNEY P., et al. Use of psychotropic medication in children and adolescents with autism spectrum disorders. **Pediatrics**, v. 130, n. 2, p. S69–S76, 2012.

CRAWLEY JN. Translational animal models of autism and neurodevelopmental disorders. **Dialogues Clin Neurosci.**, v. 14, n. 3, p. 293-305, sep. 2012.

CRAWLEY JN. What's Wrong With My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice. **Hoboken, NJ: John Wiley & Sons**, v. 2, 2007.

CRISTINO, LARISSA MARIA FROTA. **Modelo animal de autismo induzido pela administração neonatal de lipopolissacarídeo de Escherichia coli: estudo de alterações comportamentais e neuroquímicas em animais infantis.** Orientador: Danielle Macedo Gaspar. 2019. 61 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

CRISTINO, L. M. F.; CHAVES FILHO, A. J. M.; CUSTÓDIO, C. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; DE SOUSA, F. C. F.; SANDERS, L. L. O.; DE LUCENA, D. F.; MACEDO, D. S. Animal Model of Neonatal Immune Challenge by Lipopolysaccharide: A Study of Sex Influence in Behavioral and Immune/Neurotrophic Alterations in Juvenile Mice. **Neuroimmunomodulation**, v. X, p. 1-11, 2022.

CRUZ-MACHADO, S. DA S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2010.

CUSTÓDIO, CHARLLYANY SABINO. **Desafio imune neonatal com lipopolissacarídeo desencadeia alterações comportamentais e imunológicas/neurotróficas duradouras relacionadas ao sexo e a idade em camundongos: relevância para o transtorno do espectro autista (TEA).** Tese (Doutorado) – Curso de Microbiologia Médica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CUSTÓDIO, C. S. et al. Neonatal Immune Challenge with Lipopolysaccharide Triggers Longlasting Sex- and Age-related Behavioral and Immune / Neurotrophic Alterations in Mice: Relevance to Autism Spectrum Disorders. **Mol Neurobiol**, v. 55, n.5, p.3775-3788, 2018.

DALL'IGNA, O. P. et al. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent  $\beta$ -amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v. 203, n. 1, p. 241–245, 2007.

DEACON, R.M.; RAWLINS, J.N. T-maze alternation in the rodent. **Nat Protoc.**, v. 1, p. 7–12, 2006.

DEVINSKY, O.; NABBOUT, R.; MILLER, I.; LAUX, L.; ZOLNOWSKA, M.; WRIGHT, S.; ROBERTS, C. Long-term cannabidiol treatment in patients with Dravet syndrome: An open-label extension trial. **Epilepsia**, v. 60, p. 294-302, 2019.

DEVINSKY, O.; CILIO, M.R.; CROSS, H.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; FRENCH, J.; HILL, C.; KATZ, R.; DI MARZO, V.; JUTRAS-ASWAD, D.; NOTCUTT, W.G.; MARTINEZ-ORGADO, J.; ROBSON, P.J.; ROHRBACK, B.G.; THIELE, E.; WHALLEY, B.; FRIEDMAN, D. Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. **Epilepsia**, v. 55, p. 791-802, 2014.

DIÁCONO, R.M.; RAWLINS, J.N. Alternância do labirinto em T no roedor. **Nat Protoc.**, v. 1, p. 7-12, 2006.

DI MARCO, B.; BONACCORSO, C. M.; ALOISI, E.; D'ANTONI, S.; CATANIA, M. V. Neuro-Inflammatory mechanisms in developmental disorders associated with intellectual disability and autism spectrum disorder: a neuro- immune perspective. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, v. 15, p. 448–463, 2016.

DI MARZO V., PISCITELLI F. The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids. **Neurotherapeutics**, v. 12, p. 692–698, 2015.

DI MARZO, V.; DE PETROCELLIS, L. Endocannabinoids as regulators of transient receptor potential (TRP) channels: A further opportunity to develop new endocannabinoid-based therapeutic drugs. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, p. 1430–1449, 2010.

DOENNI, V.M.; GRAY, J.M.; SONG, C.M.; PATEL, S.; HILL, M.N.; PITTMAN, Q.J. Deficient adolescent social behavior following early-life inflammation is ameliorated by augmentation of anandamide signaling. **Brain Behav Immun.**, v. 58, p. 237-247, 2016.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**, v. 152, p. 244-248, 2016.

ELLIOTT, D. M.; SINGH, N.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. S. Cannabidiol attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis through induction of myeloid-derived suppressor cells. **Front. Immunol.**, v. 9, n. 1782, 2018.

EMANUELE E., ORSI P., BOSO M., BROGLIA D., BRONDINO N., BARALE F., DI NEMI S. U., POLITI P. Low-grade endotoxemia in patients with severe autism. **Neuroscience Letters**, v. 471, n. 3, p. 162-165, 2010.

ERGAZ Z., WEINSTEIN-FUDIM L., ORNOY A. Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). **Reproductive Toxicology**, v. 64, p. 116-140, 2016.

ERRIDGE C., ATTINA T., SPICKETT C.M., WEBB D.J. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 86, p. 1286–1292, 2007.

ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 8, p. 469–486, 2015.

FORTIER, M. E.; LUHESHI, G. N.; BOKSA, P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. **Behavioural Brain Research**, v. 181, n. 2, p. 270–277, 2007.

FUSAR-POLI, L.; VITO, C.; TINACCI, S.; CONCAS, I.; PETRALIA, A.; SIGNORELLI, M.S., ET AL. Cannabinoids for people with ASD: a systematic review of published and ongoing studies. **Brain Sci.**, v. 9, p. 572–576, 2020.

GARAY, P. A.; MCALLISTER, A. K. Novel roles for immune molecules in neural development: Implications for neurodevelopmental disorders. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 2, p. 1–16, 2010.

GOINES, P.E.; ASHWOOD, P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment. **Neurotoxicol Teratol.**, v.36, p. 67–81, 2013.

GOLDMAN-RAKIC, P.S.; BROWN, R.M. Postnatal development of monoamine content and synthesis in the cerebral cortex of rhesus monkeys. **Brain Res**, v. 256, n. 3, p. 339–49, 1982.

GRAEBER, M. B.; STREIT, W. J. Microglia: biology and pathology. **Acta neuropathology**, v. 119, n. 1, p. 89-105, 2010.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

HAMPSON, A. J.; GRIMALDI, M.; AXELROD, J.; WINK, D. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 8268–73, 1998.

HANSEL, C. Deregulation of synaptic plasticity in autism. **Neurosci. Lett.**, v. 688, p. 58–61, 2019.

HAROON, E.; MILLER, A. H.; SANACORA, G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 193–215, 2017.

HAVA, G. et al. Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. **Developmental Psychobiology**, v. 48, n. 2, p. 162–168, 2006.

HAYASHI, E.; KURATANI, K.; KINOSHITA, M.; HARA, H. Pharmacologically distinctive behaviors other than burying marbles during the marble burying test in mice. **Pharmacology**, v.86, p. 293-296, 2010.

HEO Y., ZHANG Y., GAO D., MILLER V.M., LAWRENCE D.A. Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders. **PLoS One**, v. 6, 2011.

HERBOMEL, P.; THISSE, B.; THISSE, C. Ontogeny and behaviour of early macrophages in the zebrafish embryo. **Development**, v. 126, n. 17, p. 3735–3745, 1999.

HUGHES, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 5, p. 497–505, 2004.

HUTSLER, J. J.; ZHANG, H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. **Brain Res.**, v. 1309, p. 83–94, 2010.

HYMAN S.L., LEVEY S.E., MYERS S.M. Council on Children with Disabilities, Section on Developmental and Behavioral Pediatrics. Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. **Pediatrics**, v.145, cap. 1, jan. 2020.

IANNOTTI, F.A.; DI MARZO, V.; PETROSINO, S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. **Prog. Lipid Res.**, v. 62, p. 107–128, 2016.

IBRAHIM S.H., VOIGT R.G., KATUSIC S.K., WEAVER A.L., BARBARESI W.J. Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. **Pediatrics**, v. 124, n. 2, p. 680–686, 2009.

ILYASOV, A. A.; MILLIGAN, C. E.; PHARR, E. P.; HOWLETT, A. C. The endocannabinoid system and oligodendrocytes in health and disease. **Front. Neurosci.**, v. 12, n. 733, 2018.

INGA, J.M.C.; MORALES, C.L.M.; VERA, C.H.; MARAGOTO, R.C.; WHILBY, S. M.; RAMOS, H.L.; NORIS, G. E.; GONZÁLEZ, F.M.E.; FERNANDEZ, V.C.I.; VEGAS, H.Y.; SINISCALCO, D.; GONÇALVES, C.A.; ROBINSON-AGRAMONTE, M.D.L.A. Peripheral Inflammatory Markers Contributing to Comorbidities in Autism. **Behav. Sci.**, v.6, n. 4, p. 29, 2016.

INNOCENTI, G.M. Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connections. **Science**, v. 212, p. 824–7, 1981.

INSEL, T.R. The development of brain and behavior. In: Bloom FE, Kupfer DJ, editors. Psychopharmacology: the fourth generation of progress. **New York: Raven Press**, p. 683–94, 1995.

JACOBSON, M. Developmental neurobiology. **New York: Plenum Press**, 1991.

JACOBSON, M. Genesis of neuronal specificity. In: Rockstein M, editor. Development and aging in the nervous system. **New York: Academic Press**, p. 103, 1973.

JOBSKI K., HÖFER J., HOFFMANN F., BACHMANN C. Use of psychotropic drugs in patients with autism spectrum disorders: a systematic review. **Acta Psychiatr Scand.**, v. 135, n.1, p. 8–28, 2017.

JYONOUCHI H., GENG L., CUSHING-RUBY A., QURAIISHI H.H. Impact of innate immunity in a subset of children with autism spectrum disorders: a case control study. **J. Neuroinflamm**, v. 5, n. 52, 2008

- JYONOUCHI H., SUN S., ITOKAZU N. Innate immunity associated with inflammatory responses and cytokine production against common dietary proteins in patients with autism spectrum disorder. **Neuropsychobiology**, v. 46, p. 76–84, 2002.
- K Aidanovich-Beilin, O. et al. Assessment of social interaction behaviors. **Journal of Visualized Experiments**, v. 0, n. 48, p. 1–6, 2010.
- Kalkman, H.O.; Feuerbach, D. Microglia M2A Polarization as Potential Link between Food Allergy and Autism Spectrum Disorders. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 95, 2017.
- KalsbEEK, A.; Voorn, P.; Buijs, R.M.; Pool, C.W.; Uylings, H.B. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. **J Comp Neurol**, v. 269, n. 1, p. 58–72, 1988.
- Kaplan, J.S.; Stella, N.; Catterall, W.A.; Westenbroek, R.E. Cannabidiol attenuates seizures and social deficits in a mouse model of dravet syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n.42, p. 11229-34, 2017.
- Karhson, D.S.; Krasinska, K.M.; Dallaire, J.A.; Libove, R.A.; Phillips, J.M.; Chien, A.S.; Garner, J.P.; Hardan, A.Y.; Parker, K.J. Plasma anandamide concentrations are lower in children with autism spectrum disorder. **Mol Autism**, v.2, n. 9, p. 18, 2018.
- Kirsten, T. B.; Palermo-Neto, J.; Bernardi, M. M. 11. A rat model of autism induced by a single early prenatal exposure to LPS. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, p. S4, 2012.
- Kogan M.D., Blumberg S.J., Schieve L.A., Boyle C.A., Perrin J.M., Ghandour R.M., et al. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. **Pediatrics**, v. 124, p. 1395–1403, 2009.
- Laffer, B.; Bauer, D.; Wasmuth, S.; Busch, M.; Jalilvand, T.V.; Thanos, S. et al. Loss of IL-10 promotes differentiation of microglia to a M1 phenotype. **Front Cell Neurosci.**, v. 13, p. 430, 2019.
- Laird M. H. W. et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, n. 6, p. 966–977, 2009.
- Landmesser, L.T. The generation of neuromuscular specificity. **Ann Rev Neurosci**, v. 3, p. 279–302, 1980.
- Lattanzi, S.; Brigo, F.; Cagnetti, C.; Trinka, E.; Silvestrini, M. Efficacy and Safety of Adjunctive Cannabidiol in Patients with Lennox-Gastaut Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. **CNS Drugs**, v. 32, p. 905-916, 2018.
- Lefebvre, J. L.; Sanes, J. R.; Kay, J. N. Development of dendritic form and function. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 31, p. 741–777, 2015.
- Lenz, K. M.; Nelson, L. H. Microglia and beyond: innate immune cells as regulators of brain development and behavioral function. **Front. Immunol.**, v. 9, n. 698, 2018.
- Leweke, F.M.; Piomelli, D.; Pahlisch, F.; Muhl, D.; Gerth, C.W.; Hoyer, C.; Klosterkotter, J.; Hellmich, M.; Koethe, D. Cannabidiol enhances anandamide

signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. **Transl Psychiatry**, v. 2, p. e94, 2012.

LI, T.; CHIOU, B.; GILMAN, C.K.; LUO, R.; KOSHI, T.; YU, D. et al. A splicing isoform of GPR56 mediates microglial synaptic refinement via phosphatidylserine binding. **EMBO J.**, v. 39, n. 16, 2020.

LIGHTMAN, S.L.; INSEL, T.R.; INGRAM, C.D. New genomic avenues in behavioural neuroendocrinology. **Eur J Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 369–72, 2002.

LIGRESTI, A.; DE PETROCELLIS, L.; DI MARZO, V. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. **Physiol Ver**, v. 96, p. 1593-1659, 2016.

LISBOA, S. F.; GOMES, F. V.; GUIMARAES, F. S.; CAMPOS, A. C. Microglial cells as a link between cannabinoids and the immune hypothesis of psychiatric disorders. **Front. Neurol.**, v. 7, n. 5, 2016.

LORD C., RISI S., DILAVORE P.S., SHULMAN C., THURM A., PICKLES A. Autism from 2 to 9 years of age. **Arch Gen Psychiatry**, v. 6, n. 6, p. 694-701, jun. 2006.

LUTZ, B.; MARSICANO, G.; MALDONADO, R.; HILLARD, C. J. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 16, p. 705–718, 2015.

LYRA L., RIZZO L.E., SUNAHARA C.S., et al. What do Cochrane systematic reviews say about interventions for autism spectrum disorders? **Sao Paulo Med J**, v. 135, n. 2, p. 192–201, 2017.

MACRAE, M., MACRINA, T., KHOURY, A., MIGLIORE, M.M., KENTNER, A.C. Tracing the trajectory of behavioral impairments and oxidative stress in an animal model of neonatal inflammation. **Neuroscience**, v. 298, p. 455–466, 2015.

MAENNER M.J., SHAW K.A., BAKIAN A.V., et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. **MMWR Surveill Summ**, v. 70, n. 11, p. 1–16, 2021.

MALKOVA L., MISHKIN M., SUOMI S.J., BACHEVALIER J. Long-term effects of neonatal medial temporal ablations on socioemotional behavior in monkeys (*Macaca mulatta*). **Behav Neurosci.**, v 124, p. 742-760, 2010.

MALLYA, A.P.; WANG, H.D.; LEE, H.N.R.; DEUTCH, A.Y. Microglial pruning of synapses in the prefrontal cortex during adolescence. **Cereb. Cortex**, v. 29, n. 4, p. 1634-1643, 2019.

MANDELL D.S., MORALES K.H., MARCUS S.C., STAHRMER A.C., DOSHI J., POLSKY D.E. Psychotropic medication use among Medicaid-enrolled children with autism spectrum disorders. **Pediatrics**, v.121, n.3, 2008.

MANDUCA, A.; SERVADIO, M.; DAMSTEEGT, R.; CAMPOLONGO, P.; VANDERSCHUREN, L.J.; TREZZA, V. Dopaminergic Neurotransmission in the Nucleus

Accumbens Modulates Social Play Behavior in Rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 2215-2223, 2016.

MANDY W.P., CHARMAN T., SKUSE D.H. Testing the construct validity of proposed criteria for DSM-5 autism spectrum disorder. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 41–50, 2012.

MAROON, J.; BOST, J. Review of the neurological benefits of phytocannabinoids. **Surg. Neurol. Int.**, v. 9, n. 91, 2018.

MARTIN-MORENO, A.M.; REIGADA, D.; RAMIREZ, B.G.; MECHOULAM, R.; INNAMORATO, N.; CUADRADO, A.; DE CEBALLOS, M.L. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. **Mol Pharmacol**, v. 79, p. 964-973, 2011.

MARTÍNEZ-CERDEÑO, V. Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. **Dev. Neurobiol.**, v. 77, p. 393–404, 2017.

MC PARTLAN, J.M.; GUY, G.W.; DI MARZO, V. Care and feeding of the endocannabinoid system: a systematic review of potential clinical interventions that upregulate the endocannabinoid system. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014.

MECHOULAM, R.; PARKER, L.A. The endocannabinoid system and the brain. **Annu Rev Psychol**, v. 64, p. 21–47, 2013.

MECHOULAM, R.; PETERS, M.; MURILLO-RODRIGUEZ, E.; HANUS, L.O. Cannabidiol recent advances. **Chem Biodivers**, v. 4, p. 1678-1692, 2007.

MELANCIA, F.; SCHIAVI, S.; SERVADIO, M.; CARTOCCI, V.; CAMPOLONGO, P.; PALMERY, M.; PALLOTTINI, V.; TREZZA, V. Sex-specific autistic endophenotypes induced by prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling. **Br J Pharmacol**, v. 175, p. 3699-3712, 2018.

MONTE, A. S. **Estudo da influência do sexo e do efeito preventivo da n-acetilcisteína em ratos submetidos ao modelo de esquizofrenia induzido por desafio imune neonatal combinado a estresse na adolescência.** Universidade Federal do Ceará, 2017.[s.l: s.n.].

MORICONI, A.; CERBARA, I.; MACCARRONE, M.; TOPAI, A. GPR55: Current knowledge and future perspectives of a purported “Type-3” cannabinoid receptor. **Curr. Med. Chem.**, v.17, p. 1411–1429, 2010.

MOSSER, D. M; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 958–969, 2008.

MOY, S.S. et al. Repetitive behavior profile and supersensitivity to amphetamine in the C58/J mouse model of autism. **Behav Brain Res.**, v. 259, p. 200–214, 2014.

MUKHOPADHYAY, P.; RAJESH, M.; HORVATH, B.; BATKAI, S.; PARK, O.; TANCHIAN, G.; GAO, R.Y.; PATEL, V.; WINK, D.A.; LIAUDET, L.; HASKO, G.; MECHOULAM, R.; PACHER, P. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion

injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. **Free Radic Biol Med**, v. 50, p. 1368-1381, 2011.

MURPHY, N.; COWLEY, T. R.; BLAU, C. W.; DEMPSEY, C. N.; NOONAN, J.; GOWRAN, A.; et al. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 exerts anti-inflammatory effects in hippocampus of aged rats and restores an age-related deficit in long-term potentiation. **J. Neuroinflammation**, v. 9, n. 79, 2012.

MURRAY, P. J; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 723–37, 2011.

MYERS S.M., JOHNSON C.P. American Academy of Pediatrics Council on Children With Disabilities. Management of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*, v.120, n. 5, p. 1162–1182, 2007.

NARDO, M.; CASAROTTO, P.C.; GOMES, F.V.; GUIMARÃES, F.S. Cannabidiol reverses the mCPP-induced increase in marble-burying behavior. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 28, n. 5, p. 544-50, out. 2014.

NJUNG'E, KUNG'U; HANDLEY, SHEILA L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 38, n. 1, p. 63-67, 1991.

OSBORNE, A.L.; SOLOWIJ, N.; BABIC, I.; HUANG, X.F.; WESTON-GREEN, K. Improved social interaction, recognition and working memory with cannabidiol treatment in a prenatal infection (poly i:c) rat model. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, p. 1447-1457, 2017.

PACHER, P.; KUNOS, G. Modulating the endocannabinoid system in human health and disease—successes and failures. **J. FEBS**, v. 280, p. 1918–1943, 2013.

PANG, Y. et al. Early postnatal lipopolysaccharide exposure leads to enhanced neurogenesis and impaired communicative functions in rats. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–18, 2016.

PAOLICELLI, R.C.; BOLASCO, G.; PAGANI, F.; MAGGI, L.; SCIANNI, M.; PANZANELLI, P.; GIUSTETTO, M.; FERREIRA, T.A.; GUIDUCCI, E.; DUMAS, L.; et al. Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **Science**, v. 333, p. 1456–1458, 2011.

PARDO C.A., VARGAS D.L, ZIMMERMAN A.W. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. **Int. Rev. Psychiatry**, v.17, p. 485–495, 2005.

PARRACHO H.M., BINGHAM M.O., GIBSON G.R., MCCARTNEY A.L. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. **J. Med. Microbiol**, v. 54, p. 987–991, 2005.

PATTERSON, P. H. Immune involvement in schizophrenia and autism: Etiology, pathology and animal models. **Behavioural Brain Research**, v. 204, n. 2, p. 313–321, 2009.

PERDIGUERO, E.G.; GEISSMANN, F. The development and maintenance of resident macrophages. **Nat Immunol**, v. 17, n. 1, p. 2–8, 2016.

PISANTI, S.; MALFITANO, A.M.; CIAGLIA, E.; LAMBERTI, A.; RANIERI, R.; CUOMO, G. et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.175, p. 133–150, 2017.

PISTIS M., MELIS M. From surface to nuclear receptors: The endocannabinoid family extends its assets. **Curr. Med. Chem.**, v. 17, p. 1450–1467, 2010.

POLEG, S.; GOLUBCHIK, P.; OFFEN, D.; WEIZMAN, A. Cannabidiol as a suggested candidate for treatment of autism spectrum disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 89, p. 90-96, 2019.

POULTNEY, C.S.; GOLDBERG, A.P.; DRAPEAU, E.; KOU, Y.; HARONY-NICOLAS, H.; KAJIWARA, Y.; DE RUBEIS, S.; DURAND, S.; STEVENS, C.; REHNSTROM, K.; et al. Identification of small exonic CNV from whole exome sequence data and application to autism spectrum disorder. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 93, p. 607–619, 2013.

PURCELL, A.E.; JEON, O.H.; ZIMMERMAN, A.W.; BLUE, M.E.; PEVSNER, J. Postmortem brain abnormalities of the glutamate neurotransmitter system in autism. **Neurology**, v. 57, p. 1618–1628, 2001.

PURVES, D.; LICHTMAN, J.W. Elimination of synapses in the developing nervous system. **Science**, v. 210, n. 4466, p. 153–7, 1980.

QIN L., WU X., BLOCK M.L., LIU Y., BREESE G.R., HONG J.S., CREWS F.T. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**, v.55, p. 453–462, 2007.

RAMENGGHI, L. A.; FUMAGALLI, M.; SUPRAMANIAM, V. Brain Development and Perinatal Vulnerability to Cerebral Damage. In: Neonatology. Cham: **Springer International Publishing**, p. 1999–2017, 2018.

RANSOHOFF, R. M. A polarizing question: Do M1 and M2 microglia exist. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 987–991, 2016.

RATH, M. et al., Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. **Front Immunol.**, v. 5, n. 532, p.1–10, 2014.

RETTEW D.C., GREENBLATT J., KAMON J., et al. Antipsychotic medication prescribing in children enrolled in Medicaid. **Pediatrics**, v. 135, n. 4, p. 658–665, 2015.

RICCERI, L.; MICHETTI, C.; SCATTONI, M. L. Mouse Behavior and Models for Autism Spectrum Disorders. **Elsevier**, 2016.

RIDDLE M.A. **Pediatric Psychopharmacology for Primary Care**. Elk Grove Village, IL. American Academy of Pediatrics, 1st ed., 2016.

ROSENBERG R.E., MANDELL D.S., FARMER J.E., LAW J.K., MARVIN A.R., LAW P.A. Psychotropic medication use among children with autism spectrum disorders enrolled in a national registry, 2007-2008. **J Autism Dev Disord**, v. 40, n. 3, p. 342–351, 2010.

- RUBINO, T.; ZAMBERLETTI, E.; PAROLARO, D. Endocannabinoids and mental disorders. **Handb. Exp. Pharmacol.**, v. 231, p. 261–283, 2015.
- RUSSO, E. B.; BURNETT, A.; HALL, B.; PARKER, K. K. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT<sub>1a</sub> receptors. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 8, p. 1037–43, 2005.
- RUIZ-VALDEPENAS, L.; MARTINEZ-ORGADO, J.A.; BENITO, C.; MILLAN, A.; TOLON, R.M.; ROMERO, J. Cannabidiol reduces lipopolysaccharide-induced vascular changes and inflammation in the mouse brain: an intravital microscopy study. **J Neuroinflammation**, v.8, n.5, 2011.
- SAITO, V.M.; REZENDE, R.M.; TEIXEIRA, A.L. Cannabinoid modulation of neuroinflammatory disorders. **Curr Neuropharmacol**, v. 10, p. 159-166, 2012.
- SAITO, V.M.; WOTJAK, C.T.; MOREIRA, F.A. Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão? **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, n. 1, 2010.
- SAITOH, B.Y.; TANAKA, E.; YAMAMOTO, N.; VAN KRUINING, D.; IINUMA, K.; NAKAMUTA, Y. et al. Early postnatal allergic airway inflammation induces dystrophic microglia leading to excitatory postsynaptic surplus and autism-like behavior. **Brain Behav. Immun.**, v. 95, n. 12, p. 362-380, 2021.
- SAIJO, K.; GLASS, C. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v.11, p. 775–787, 2011.
- SANTINI, E. et al. Exaggerated translation causes synaptic and behavioural aberrations associated with autism. **Nature**, v. 493, p. 411–5, 2013.
- SCATTONI, M.L.; GANDHY, S.U.; RICCERI, L.; CRAWLEY, J.N. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **PLoS One**, v. 3, n. 8, e3067, 2008.
- SCHREIBMAN L., DAWSON G., STAHLER A.C., et al. Naturalistic developmental behavioral interventions: empirically validated treatments for autism spectrum disorder. **J Autism Dev Disord.**, v. 45, n. 8, p. 2411–2428, 2015.
- SCHUBART J.R., CAMACHO F., LESLIE D. Psychotropic medication trends among children and adolescents with autism spectrum disorder in the Medicaid program. **Autism**, v.18, n. 6, p. 631–637, 2014.
- SEMPLE, B. D. et al. Progress in Neurobiology Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, 2013.
- SERVADIO, M.; MELANCIA, F.; MANDUCA, A.; DI MASI, A.; SCHIAVI, S.; CARTOCCI, V.; PALLOTTINI, V.; CAMPOLONGO, P.; ASCENZI, P.; TREZZA, V. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Transl Psychiatry**, v. 6, p. e902, 2016.
- SHEIKH, F. A.; AHMED, N.; MUSHTAQ, A. A.; SALEH, A. B.; MUSAAD, A. A.; SABRY, M. A. The PPAR $\delta$  agonist GW0742 restores neuroimmune function by regulating Tim-3 and

Th17/Treg-related signaling in the BTBR autistic mouse model. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 251-261, 2018.

SHIGEMOTO-MOGAMI, Y.; HOSHIKAWA, K.; GOLDMAN, J. E.; SEKINO, Y.; SATO, K. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. **J. Neurosci.**, v. 34, p. 2231–2243, 2014.

SILVERMAN, J.L. et al. GABAB Receptor Agonist R-Baclofen Reverses Social Deficits and Reduces Repetitive Behavior in Two Mouse Models of Autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, p. 2228–2239, 2015.

SMITH, P. L. P.; HAGBERG, H.; NAYLOR, S. A; MALLARD, C. Neonatal peripheral immune challenge Activates Microglia and Inhibits Neurogenesis in the Developing Murine Hippocampus. **Dev Neurosci**, v. 36, n. 2, p.119-31, 2014

SPEAR, L. P. Modeling adolescent development and alcohol use in animals. **Alcohol Res. Health**, v. 24, n. 2, p. 115-123, 2000.

SPENCER D., MARSHALL J., POST B., et al. Psychotropic medication use and polypharmacy in children with autism spectrum disorders. **Pediatric**, v. 132, n. 5, p. 833–840, 2013.

STEIMLE A., AUTENRIETH I. B.; FRICK J. S. Structure and function: Lipid a modifications in commensals and pathogens. **Elsevier GmbH**, 2016.

STELLA, N. Endocannabinoid signaling in microglial cells. **Neuropharmacology**, v. 56, n.1, p. 244–253, 2009.

STEVENS, B.; ALLEN, N. J.; VAZQUEZ, L. E.; HOWELL, G. R.; CHRISTOPHERSON, K. S.; NOURI, N.; et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. **Cell**, v.131, p. 1164–1178, 2007.

TAKEUCHI, H.; YATSUGI, S.; YAMAGUCHI, T. Effect of YM992, a novel antidepressant with selective serotonin re-uptake inhibitory and 5-HT 2A receptor antagonistic activity, on a marble-burying behavior test as an obsessive-compulsive disorder model. **Jpn J Pharmacol.**, v. 90, p. 197–200, 2002.

TANG, G.; GUDSNUK, K.; KUO, S.H.; COTRINA, M.L.; ROSOKLIJA, G.; SOSUNOV, A.; SONNERS, M.S.; KANTER, E.; CASTAGNA, C.; YAMAMOTO, A.; et al. Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. **Neuron**, v. 83, p. 1131–1143, 2014.

TARTAGLIA, N.; BONN-MILLER, M.; HAGERMAN, R. Treatment of Fragile X Syndrome with Cannabidiol: A Case Series Study and Brief Review of the Literature. **Cannabis Cannabinoid Res**, v. 13, n. 4, p. 3-9, 2019.

THOMAS, A.; BAILLIE, G.L.; PHILLIPS, A.M.; RAZDAN, R.K.; ROSS, R.A.; PERTWEE, R.G.; et al. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonist in vitro. **British, Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 61 -23, 2007.

THOMAS, A. et al. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 2, p. 361 - 373, 2009.

TISHKINA, A.; STEPANICHEV, M.; KUDRYASHOVA, I.; FREIMAN, S.; ONUFRIEV, M.; LAZAREVA, N.; GULYAEVA, N. Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: Effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response. **Behavioural Brain Research**, v. 304, p.1–10, 2016.

TREZZA, V.; DAMSTEEGT, R.; MANDUCA, A.; PETROSINO, S.; VAN KERKHOF, L.W.; PASTERKAMP, R.J.; ZHOU, Y.; CAMPOLONGO, P.; CUOMO, V.; DI MARZO, V.; VANDERSCHUREN, L.J. Endocannabinoids in amygdala and nucleus accumbens mediate social play reward in adolescent rats. **J Neurosci**, v. 32, p. 14899-14908, 2012.

VARGAS, D. L. et al. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 1, p. 67–81, 2005.

XIE, J.; HUANG, L.; LI, X.; LI, H.; ZHOU, Y.; ZHU, H.; PAN, T.; KENDRICK, K.M.; XU, W. Immunological cytokine profiling identifies TNF-alpha as a key molecule dysregulated in autistic children. **Oncotarget**, v. 8, p. 82390-82398, 2017.

WALKER, A.K.; NAKAMURA, T.; BYRNE, R.J.; NAICKER, S.; TYNAN, R.J.; HUNTER, M. et al. Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: Implications for the double-hit hypothesis. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n.10, p. 1515–25, 2009.

WANG, M.; LI, H.; TAKUMI, T.; QIU, Z.; XU, X.; YU, X.; et al. Distinct defects in spine formation or pruning in two gene duplication mouse models of autism. **Neurosci. Bull.**, v. 33, p. 143–152, 2017.

WATTS, C. Location, location, location: Identifying the neighborhoods of LPS signaling. **Nature Immunology**, v. 9, n. 4, p. 343–345, 2008.

WITWER A., LECAVALIER L. Treatment incidence and patterns in children and adolescents with autism spectrum disorders. **J Child Adolesc Psychopharmacol**, v. 15, n. 4, p. 671–681, 2005.

WONG C., ODOM S.L., HUME K.A., et al. Evidence-based practices for children, youth, and young adults with autism spectrum disorder: a comprehensive review. **J Autism Dev Disord**, v. 45, n. 7, p. 1951–1966, 2015.

WU, H.F.; LU, T.Y.; CHU, M.C.; CHEN, P.S.; LEE, C.W.; LIN, H.C. Targeting the inhibition of fatty acid amide hydrolase ameliorate the endocannabinoid-mediated synaptic dysfunction in a valproic acid-induced rat model of Autism. **Neuropharmacology**, v. 162, p. 107736, 2020.

YANG, J.; QI, F.; YAO, Z. Neonatal Bacillus Calmette-Guérin vaccination alleviates lipopolysaccharide-induced neurobehavioral impairments and neuroinflammation in adult mice. **Mol Med Rep**, v. 14, n. 2, p. 1574-86, aug. 2016.

ZABLOTSKY B., BLACK L.I., MAENNER M.J., SCHIEVE L.A., DANIELSON M.L., BITSKO R.H., BLUMBERG S.J., KOGAN M.D., BOYLE C.A. Prevalence and Trends of Developmental Disabilities among Children in the US: 2009–2017. **Pediatrics**, v. 144, n. 4, 2019.

ZHANG, YING-HUA; WANG, TING; LI, YAN-FAN; DENG, YA-NAN; SHEN, FENG-GE. Roles of the Notch signaling pathway and microglia in autism. **Behavioural Brain Research**, v. 437, 2023.

ZUARDI, A. Cannabidiol: from na active cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 30, n. 3, p. 271–280, 2008.