



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

CAMILA NOGUEIRA DOS SANTOS

**EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO HONOKIOL NA PROLE
DE RATOS WISTAR INDUZIDA AO AUTISMO EXPOSTOS AO ÁCIDO
VALPRÓICO NO PERÍODO PRÉ-NATAL**

FORTALEZA

2025

CAMILA NOGUEIRA DOS SANTOS

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO HONOKIOL NA PROLE DE
RATOS WISTAR INDUZIDA AO AUTISMO EXPOSTOS AO ÁCIDO VALPRÓICO NO
PERÍODO PRÉ-NATAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Medicina Translacional. Área de concentração: Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão.

FORTALEZA

2025

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)

- S234e Santos, Camila Nogueira dos.
Efeito antiinflamatório e antioxidante do honokiol na prole de ratos Wistar induzida ao autismo expostos ao ácido valpróico no período pré-natal / Camila Nogueira dos Santos. – 2025.
118 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão.
1. Magnolia. 2. Transtorno do Espectro Autista. 3. Simulação de Acoplamento Molecular. I. Título.
CDD 610
-

CAMILA NOGUEIRA DOS SANTOS

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO HONOKIOL NA PROLE DE
RATOS WISTAR INDUZIDA AO AUTISMO EXPOSTOS AO ÁCIDO VALPRÓICO NO
PERÍODO PRÉ-NATAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Medicina Translacional. Área de concentração: Medicina Translacional.

Orientador: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Gabriela Fernandes Oliveira Marques
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Prof. Dra. Charliene Freire Xavier Vieira
Escola de Saúde Pública do Ceará (ESP/CE)

Dedico esta dissertação com amor e gratidão a Deus, fonte de toda sabedoria e força, que me sustentou em cada etapa desta caminhada acadêmica. Aos meus pais, Leonice e Nailson, pelo apoio incondicional, à minha irmã, Lidiane e meus sobrinhos Livia e João.

Aos meus queridos avós, João e Francisca, que, com seu amor e ensinamentos, deixaram marcas eternas na minha vida.

Esta conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

A realização dessa pesquisa é para mim, a concretização de um sonho que há muito tempo nutria, e não teria sido possível sem o apoio, carinho e incentivo de tantas pessoas especiais.

Agradeço, de maneira profunda e sincera, ao meu orientador, Prof. Dr. Gislei Frota Aragão, que confiou em meu potencial, guiou-me com paciência, conhecimento e dedicação, e tornou-se um verdadeiro mentor ao longo desta trajetória.

Sou grata aos professores colaboradores, Prof. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy, Prof. Dra. Marisa Jadna Frederico Silva Canuto, Prof. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte, e ao técnico de laboratório Dr. Francisco Arnaldo Viana Lima pelo apoio e por contribuírem para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas da pós-graduação, Gerllanny Mara de Souza Lopes, Quezia Damaris Jones Severino Vasconcelos e Nayrene Amorin Carvalho de Oliveira, agradeço pelo companheirismo, incentivo e por tornarem esta jornada mais leve e alegre. A Renê Felipe de Freitas, meu agradecimento especial pela ajuda nas análises e realização dos protocolos. E a Matheus Firmino de Moraes, pela valiosa contribuição que ajudou a tornar este trabalho possível.

Aos alunos de iniciação científica Laura Beatriz de Souza Martins, Yury Abreu Nascimento, Wendel Farias de Lemos, Maria Julia Soares Rodrigues e Thayna Alves da Costa, minha gratidão pelo empenho e disponibilidade.

À veterinária do biotério, Gabriela Mariangela Farias de Oliveira, agradeço pelo cuidado e manejo dos animais, e por sempre me encorajar quando me encontrava desanimada e a técnica do biotério, Hanna Beatriz de Sena Barbosa, meu muito obrigado pelo suporte fundamental nas atividades experimentais.

Aos membros do Grupo de Estudos em Neuroinflamação e Neurotoxicologia (GENIT), agradeço pelo aprendizado compartilhado, pelas discussões inspiradoras e pelo ambiente de incentivo à ciência que vocês proporcionam.

À minha família, que suportou minha ausência e me apoiou incondicionalmente, meu amor e gratidão eternos: à minha mãe, Leonice da Costa Nogueira, ao meu pai, Nailson da Costa dos Santos, e à minha querida irmã, Lidiane da Costa Nogueira.

Às minhas amigas Elisangela Rocha, Valnice Karolino e Rosangela Del Vecchio, que sempre acreditaram em mim e me encorajaram a seguir em frente.

Por fim, agradeço ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), à Universidade Federal do Ceará, à Universidade Estadual do Ceará e à FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte institucional e financeiro, fundamentais para a realização desta pesquisa.

A todos vocês, meu mais profundo e sincero agradecimento. Este trabalho é, de alguma forma, um reflexo do apoio, amor e incentivo que recebi de cada um.

“Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de gigantes.” (Newton, 1675, tradução própria).

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento com alta prevalência mundial, manifestado por meio de características comportamentais, bem como padrões restritos e repetitivos de comportamento e respostas sensoriais atípicas. O honokiol, uma substância bioativa polifenólica considerada um dos principais componentes extraído da planta, *Magnolia officinalis*, possui várias características terapêuticas envolvendo ações antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena, antitrombótica, antidepressiva e neuroprotetora. Este estudo investiga seus efeitos no comportamento, estresse oxidativo, proteínas, AChE, monoaminas e dissacaridases intestinais em modelo animal de TEA. Inicialmente foram realizadas análises *in silico* para predições de farmacocinética, toxicidade, identificação de alvos farmacológicos, e força de interação e conservação de estrutura proteicas entre o rato e o ser humano. No estudo *in vivo*, foram utilizados ratos wistar machos e fêmeas nulíparas, com oito semanas de idade como matrizes (CEUA/UFC: 89011223-0). As matrizes fêmeas foram divididas randomicamente de acordo com o tratamento que receberam em quatro grupos: controle, VPA (ácido valproico 600 mg/dose única), honokiol (honokiol 10 mg/kg/dia), VPA+honokiol, nas mesmas doses anteriores). Os filhotes (fêmeas e machos) foram utilizados para avaliação comportamental, neuroquímica e digestiva. A atividade comportamental foi avaliada por meio dos testes de campo aberto, interação social, labirinto em cruz elevado e Y-maze. Na avaliação locomotora, considerando os parâmetros de movimentação espontânea, as fêmeas do grupo VPA+HK apresentaram uma redução de aproximadamente 45,4% no número de cruzamentos em relação ao grupo VPA. Quanto ao comportamento ansioso, observou-se que as fêmeas do grupo VPA apresentaram menor ansiedade e maior impulsividade; entretanto, o tratamento com honokiol reduziu essa impulsividade em 57,6% no grupo VPA+HK quando comparado ao VPA. No perfil oxidativo, o honokiol promoveu efeitos antioxidantes expressivos: reduziu os teores de MDA no córtex pré-frontal em 40,7% e no hipocampo em 42% em comparação ao grupo VPA. Além disso, aumentou os níveis de GSH no hipocampo em 94%, embora tenha reduzido essa concentração no córtex pré-frontal em 80% em relação ao controle. Também foi observada diminuição das proteínas totais no córtex pré-frontal dos machos em 20,5%, e nas fêmeas houve redução de 16,4% no hipocampo no grupo VPA+HK comparado ao VPA. No sistema monoaminérgico, o honokiol reduziu os níveis de serotonina em 58% nos machos e 44,6% nas fêmeas (VPA versus VPA+HK). No sistema colinérgico, observou-se uma redução de 38% nos níveis de acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo das fêmeas tratadas com honokiol. Por fim, no intestino, o honokiol aumentou a atividade

enzimática da sacarase em 1,68 X nos machos, quando comparado ao grupo VPA. Em conjunto, os resultados demonstram que o honokiol efeito neuroprotetor no modelo de TEA induzido por VPA, ao aumentar os níveis de glutathione, reduzir MDA e proteínas totais, melhorando a percepção de risco e modulação das vias serotoninérgicas e colinérgicas, favorecendo maior disponibilidade de serotonina e menor atividade da AChE.

Palavras-chave: Magnolia; Transtorno do Espectro Autista; Simulação de Acoplamento Molecular.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder with a high global prevalence, manifested through behavioral characteristics, as well as restricted and repetitive patterns of behavior and atypical sensory responses. Honokiol, a polyphenolic bioactive substance considered one of the main components extracted from the plant *Magnolia officinalis*, possesses several therapeutic properties involving antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, anticancer, antithrombotic, antidepressant, and neuroprotective actions. This study investigates its effects on behavior, oxidative stress, proteins, AChE, monoamines, and intestinal disaccharidases in an animal model of ASD. Initially, *in silico* analyses were performed to predict pharmacokinetics, toxicity, identification of pharmacological targets, and the strength of interaction and conservation of protein structure between rats and humans. In the *in vivo* study, eight-week-old nulliparous male and female Wistar rats were used as breeding stock (CEUA/UFC: 89011223-0). The female breeding stock were randomly divided into four groups according to the treatment they received: control, VPA (valproic acid 600 mg/single dose), honokiol (honokiol 10 mg/kg/day), VPA+honokiol (valproic acid + honokiol, at the same doses as above). The pups (females and males) were used for behavioral, neurochemical, and digestive evaluation. Behavioral activity was assessed using open field tests, social interaction tests, elevated plus maze, and Y-maze tests. In the locomotor evaluation, considering spontaneous movement parameters, females in the VPA+HK group showed an approximately 45.4% reduction in the number of matings compared to the VPA group. Regarding anxious behavior, it was observed that females in the VPA group presented less anxiety and greater impulsivity; however, treatment with honokiol reduced this impulsivity by 57.6% in the VPA+HK group when compared to the VPA group. In the oxidative profile, honokiol promoted significant antioxidant effects: it reduced MDA levels in the prefrontal cortex by 40.7% and in the hippocampus by 42% compared to the VPA group. Furthermore, it increased GSH levels in the hippocampus by 94%, although it reduced this concentration in the prefrontal cortex by 80% compared to the control group. A decrease in total proteins was also observed in the prefrontal cortex of males by 20.5%, and in females there was a 16.4% reduction in the hippocampus in the VPA+HK group compared to the VPA group. In the monoaminergic system, honokiol reduced serotonin levels by 58% in males and 44.6% in females (VPA versus VPA+HK). In the cholinergic system, a 38% reduction in acetylcholinesterase (AChE) levels was observed in the hippocampus of females treated with honokiol. Finally, in the intestine, honokiol increased sucrase enzyme activity by 1.68 times in males compared to the VPA group. Taken together,

these results demonstrate that honokiol exerted a significant neuroprotective action in the VPA-induced ASD model, by increasing glutathione levels, reducing MDA and total proteins, improving risk perception, and modulating serotonergic and cholinergic pathways, favoring greater serotonin availability and lower AChE activity.

Keywords: Magnolia; Autism Spectrum Disorder; Molecular Docking Simulation.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | – Divisão Córtex Pré-frontal | 26 |
| Figura 2 | – Ilustração do Hipocampo | 27 |
| Figura 3 | – Ilustração do Corpo Estriado | 28 |
| Figura 4 | – Ilustração do eixo intestino-cérebro | 29 |
| Figura 5 | – Forma estrutural do honokiol | 36 |
| Figura 6 | – Protocolo experimental nas matrizes | 46 |
| Figura 7 | – Alvos moleculares do honokiol | 53 |
| Figura 8 | – Interação proteína-proteína (PPI), KEGG e Ontologia Gênica (GO: <i>Biological Process</i>) | 54 |
| Figura 9 | – KEGG e Ontologia Gênica (GO: <i>Biological Process</i>) | 56 |
| Figura 10 | – Validação da proteína MAOB de <i>rattus norvegicus</i> | 60 |
| Figura 11 | – Validação da proteína AKT1 de <i>rattus norvegicus</i> | 62 |
| Figura 12 | – Validação da proteína IL1RAPL1 de <i>rattus norvegicus</i> | 64 |
| Figura 13 | – Análise de acoplamento molecular e perfil de interação – MAOA | 67 |
| Figura 14 | – Análise de acoplamento molecular e perfil de interação – MAOB | 69 |
| Figura 15 | – Análise de acoplamento molecular e perfil de interação – AKT1 | 70 |
| Figura 16 | – Análise de acoplamento molecular e perfil de interação - IL1RAPL1 | 72 |
| Figura 17 | – Análise de acoplamento molecular e perfil de interação – KCNB1 | 74 |
| Figura 18 | – Alinhamento de sequência e superposição estrutural entre proteínas de <i>Homo sapiens</i> e <i>Rattus norvegicus</i> | 75 |
| Figura 19 | – Efeito do honokiol sobre a atividade exploratória | 77 |
| Figura 20 | – Efeito do honokiol sobre a avaliação de comportamento ansioso | 78 |
| Figura 21 | – Efeito do honokiol sobre a avaliação da capacidade de interação | 79 |
| Figura 22 | – Efeito do honokiol sobre avaliação de memória | 80 |
| Figura 23 | – Efeito do honokiol sobre o MDA | 81 |
| Figura 24 | – Efeito do honokiol sobre o GSH | 82 |
| Figura 25 | – Efeito do honokiol sobre proteínas totais | 83 |
| Figura 26 | – Efeito do honokiol sobre neurotransmissores | 84 |
| Figura 27 | – Efeito do honokiol sobre as dissacaridases intestinais | 86 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | – Formação dos Grupos Experimentais (Filhotes) | 46 |
| Tabela 2 | – Predição da atividade farmacocinética e toxicidade do honokiol ^{a,b,c} | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| 5-HT | 5-hidroxitriptamina |
| AChE | Acetilcolinesterase |
| ADT | <i>AutoDock Tools</i> |
| AGCC | Ácido graxo de cadeia curta |
| AKT1 | Proteína quinase 1 |
| ARE | Elemento de resposta antioxidante |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BHE | Barreira hematoencefálica |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| CAT | Catalase |
| CEUA | Comitê de Ética e Pesquisa Animal |
| CL | Depuração plasmática |
| cm | Centímetro |
| CPF | Córtex pré-frontal |
| DA | Dopamina |
| DAT | Transportador de dopamina |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DTNB | Ácido ditiobisnitrobenzóico |
| E/I | Excitatório/inibitório |
| ELA | Esclerose Lateral Amiotrófica |
| EPM | Erro padrão da média |
| FU% | Fração livre |
| G | Gestacional |
| GABA | Ácido gama-aminobutírico |
| GSH | Glutathiona reduzida |
| HDAC | Histona desacetilase |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IFN- γ | Interferon-gama |
| IL | Interleucina |

| | |
|-------|--|
| iNOS | Óxido nítrico sintase |
| kcal | Quilocaloria |
| kg | Quilograma |
| LCE | Labirinto em cruz elevado |
| LGA | Algoritmo Genético Lamarckiano |
| MAOA | Monoamina oxidase A |
| MAOB | Monoamina oxidase B |
| MDA | Malondialdeído |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mtROS | Espécies reativas de oxigênio mitocondrial |
| n° | Número |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NMDA | N-metil-d-aspartico |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido Nítrico Sintase |
| NPDM | Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimentos de Medicamentos |
| Nrf2 | Fator Nuclear Eritroide 2 |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| PND | Dia pós-natal |
| PPI | Interações proteína-proteína |
| RMSD | <i>Root Mean Square Deviation</i> |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SERT | Transportador de serotonina |
| SIRT3 | Sirtuína 3 |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SOD | Superóxido dismutase |
| T1/2 | Meia-vida biológica |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TBARS | Substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TEA | Transtorno do Espectro Autista |
| TH | Tirosina-hidroxilase |

| | |
|--------|-------------------------------|
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| UFC | Universidade Federal do Ceará |
| VD | Volume de distribuição |
| VPA | Ácido valpróico |
| Y-maze | Teste do labirinto em Y |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------|------------------|
| α | Alfa |
| Å | Angstrom |
| β | Beta |
| °C | Grau Celsius |
| ® | Marca Registrada |
| < | Menor |
| % | Porcentagem |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO | 22 |
| 2.1 | Transtorno do Espectro Autista (TEA) | 22 |
| 2.2 | Neuroanatomia do TEA e suas alterações | 25 |
| 2.2.1 | <i>Córtex pré-frontal</i> | 25 |
| 2.2.2 | <i>Hipocampo</i> | 26 |
| 2.2.3 | <i>Corpo estriado</i> | 27 |
| 2.3 | Eixo intestino-cérebro | 28 |
| 2.4 | Estresse oxidativo no TEA | 30 |
| 2.5 | Acetilcolinesterase no TEA | 31 |
| 2.6 | Serotonina no TEA | 32 |
| 2.7 | Monoaminas no TEA | 33 |
| 2.8 | Modelo de indução animal por ácido valproico (VPA) | 34 |
| 2.9 | Honokiol | 35 |
| 2.10 | Similaridade estrutural e funcional das proteínas entre espécies (<i>Rattus novergicus</i> x <i>Homo sapiens</i>) - Bioinformática estrutural e sua relação com TEA | 37 |
| 3 | OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 | Objetivo geral | 39 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 39 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODO | 40 |
| 4.1 | Estudo <i>in silico</i> | 40 |
| 4.1.1 | <i>Obtenção da estrutura química</i> | 40 |
| 4.1.2 | <i>Predição de alvos moleculares potenciais</i> | 40 |
| 4.1.3 | <i>Análise de interações proteína-proteína e vias funcionais</i> | 40 |
| 4.1.4 | <i>Predições farmacocinética e toxicológica</i> | 41 |
| 4.1.5 | <i>Modelagem de interações moleculares (docking molecular)</i> | 41 |
| 4.1.6 | <i>Comparação de proteínas: integração de análise de sequência e estrutura</i> | 42 |
| 4.2 | Estudo <i>in vivo</i> | 43 |
| 4.2.1 | <i>Delineamento experimental</i> | 43 |
| 4.2.2 | <i>Aspectos éticos</i> | 43 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.2.3 | <i>Animais matrizes</i> | 43 |
| 4.2.4 | <i>Avaliação do ciclo estral e acasalamento</i> | 44 |
| 4.2.5 | <i>Distribuição dos animais (matrizes) e formação dos grupos</i> | 44 |
| 4.2.6 | <i>Indução ao TEA e tratamento das matrizes</i> | 45 |
| 4.2.7 | <i>Formação dos grupos experimentais (filhotes)</i> | 46 |
| 4.2.8 | <i>Testes comportamentais</i> | 47 |
| 4.2.8.1 | <i>Teste do campo aberto</i> | 47 |
| 4.2.8.2 | <i>Teste de interação social</i> | 47 |
| 4.2.8.3 | <i>Labirinto em cruz elevado (LCE)</i> | 47 |
| 4.2.8.4 | <i>Teste do labirinto em Y (Y-maze)</i> | 48 |
| 4.2.9 | <i>Eutanásia e remoção das áreas cerebrais</i> | 48 |
| 4.3 | Estudo post mortem | 49 |
| 4.3.1 | <i>Análise de marcadores do estresse oxidativo – Quantificação de MDA</i> | 49 |
| 4.3.2 | <i>Avaliação do Estresse Oxidativo – Quantificação de GSH</i> | 49 |
| 4.3.3 | <i>Quantificação de proteínas totais</i> | 50 |
| 4.3.4 | <i>Avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)</i> | 50 |
| 4.3.5 | <i>Dosagem de monoaminas para quantificação de serotonina e dopamina</i> | 51 |
| 4.3.6 | <i>Análises das dissacaridases intestinais</i> | 51 |
| 4.3.7 | <i>Análise dos dados e testes estatísticos</i> | 52 |
| 5 | RESULTADOS | 53 |
| 5.1 | Estudo in silico | 53 |
| 5.1.1 | <i>Alvos moleculares do honokiol</i> | 53 |
| 5.1.2 | <i>Análise de interações proteína-proteína e vias funcionais</i> | 53 |
| 5.1.3 | <i>Análise de interações proteína-proteína e vias funcionais</i> | 55 |
| 5.1.4 | <i>Predição de farmacocinética e toxicidade in silico</i> | 58 |
| 5.1.5 | <i>Validação de proteínas e acoplamento molecular do honokiol com alvos selecionados</i> | 59 |
| 5.1.6 | <i>Similaridade estrutural das proteínas entre espécie <i>Rattus norvegicus</i> e <i>Homo sapiens</i></i> | 74 |
| 5.2 | Estudo in vivo | 76 |
| 5.2.1 | <i>Efeito do honokiol sobre a avaliação da atividade exploratória e comportamento estereotipado - Teste do Campo Aberto</i> | 76 |
| 5.2.2 | <i>Efeito do honokiol sobre a avaliação do comportamento tipo ansioso</i> | 77 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 5.2.3 | <i>Efeito do honokiol sobre a interação social dos animais</i> | 78 |
| 5.2.4 | <i>Efeito do honokiol sobre a memória dos animais</i> | 80 |
| 5.3 | Estudo <i>post mortem</i> | 80 |
| 5.3.1 | <i>Efeito do honokiol sobre os parâmetros de estresse oxidativo (MDA E GSH)</i> | 80 |
| 5.3.2 | <i>Efeito do honokiol sobre a permeabilidade vascular</i> | 82 |
| 5.3.3 | <i>Ação do honokiol sobre neurotransmissores</i> | 83 |
| 5.3.4 | <i>Ação do honokiol sobre as dissacaridases</i> | 85 |
| 6 | DISCUSSÃO | 87 |
| 6.1 | Estudo <i>in silico</i> | 87 |
| 6.1.1 | <i>Avaliação da predição <i>in silico</i> farmacocinética e tóxica do honokiol</i> | 87 |
| 6.1.2 | <i>Avaliação da conservação estrutural das proteínas entre espécie</i> | 88 |
| 6.2 | Estudo <i>in vivo</i> | 89 |
| 6.2.1 | <i>Avaliação comportamental</i> | 89 |
| 6.3 | Estudo <i>post mortem</i> | 90 |
| 7 | CONCLUSÃO | 96 |
| | REFERÊNCIAS | 97 |
| | ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA | 118 |

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizado por comportamentos com padrões restritos, repetitivos e respostas sensoriais atípicas (American Psychiatric Association, 2023; Ostrowski *et al.*, 2024; Silva Junior *et al.*, 2021), afetando 1 em cada 31 crianças nos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention, 2025), e 2,4 milhões de pessoas no Brasil (Brasil, 2022). Esses comportamentos estão associados a disfunção do córtex pré-frontal (CPF) que é responsável pelas funções cognitivas e emocionais, coordena o planejamento e as atividades executivas de outras áreas cerebrais gerando resultados comportamentais (Varghese *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2021).

A disfunção do CPF está relacionada algumas das principais manifestações do TEA, como o desequilíbrio entre excitação e inibição, causando redução do ácido gama-aminobutírico (GABA), prejudicando a comunicação entre neurônios e levando a alterações sociais, como observado em modelos animais induzidos ao TEA por ácido valpróico (Han *et al.*, 2022).

Embora os mecanismos etiológicos do TEA ainda não sejam completamente elucidados, estudos relatam que a neuroinflamação do cérebro pode estar ligada à sua patogênese (Theoharides *et al.*, 2016). Visto que, em crianças associadas aos sintomas de TEA grave, foi encontrando a presença de inúmeras moléculas inflamatórias no sangue como interleucinas 1 β , 4, 6, 8, Fator de Necrose Tumoral Alfa e Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (Masi *et al.*, 2014; Krakowiak *et al.*, 2017)

No que tange a abordagens terapêuticas do TEA, as intervenções farmacológicas são usadas, a fim de tratar os sintomas associados ao transtorno incluindo ansiedade, depressão, alterações gastrointestinais e disfunções imunológicas (Maniram *et al.*, 2022). Embora estes medicamentos possam apresentar diversos efeitos colaterais, incluindo ganho de peso, sedação, e disfunções metabólicas (Iffland *et al.*, 2023). Diante desse cenário, cresce a importância de alternativas terapêuticas com menos efeitos adversos e ação direcionada a mecanismos biológicos específicos a fim de evitar os efeitos deletérios.

Diante desse cenário, o honokiol surge como novas alternativas terapêuticas. Ele é uma substância bioativa polifenólica considerado um dos principais componentes extraído da planta, *Magnolia officinalis* (Zhang *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2023a). O honokiol apresenta diversas características terapêuticas, dentre elas ações antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena, antitrombótica, anti depressiva e neuroprotetora (Talarek *et*

al., 2017).

O honokiol, tem demonstrado propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras em diferentes modelos experimentais de doenças neurológicas, como alzheimer, parkinson e epilepsia (Hou *et al.*, 2022; Fagen *et al.*, 2023; Park *et al.*, 2024). Apesar do seu potencial terapêutico, ainda não há estudos que explorem os efeitos do honokiol em modelos pré-clínicos de TEA.

Dessa forma, este estudo se justifica diante das limitações das terapias atualmente disponíveis para o TEA, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas capazes de preencher lacunas importantes no tratamento dos sintomas centrais e das comorbidades associadas ao transtorno. Nesse contexto, o honokiol destaca-se como um composto promissor, em virtude de suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras, apresentando potencial terapêutico relevante para a modulação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no TEA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento que apresenta dificuldades persistentes de comunicação e interação social, além de comportamentos sensório-motores restritivos, repetitivos ou estereotipados (American Psychiatric Association, 2013). O TEA está associado a altos níveis de ansiedade, estresse e isolamento nas famílias dos pacientes (Bozkut; Uysal; Düzkaya, 2019). Sua etiologia está relacionada a fatores genéticos, ambientais, imunológicos, perinatais, neuroanatômicos e bioquímicos (Salari *et al.*, 2022).

A fisiopatologia do Transtorno do Espectro Autista envolve processos de neuroinflamação persistente em diferentes regiões cerebrais, manifestados principalmente pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias no cérebro e por alterações na função das células do sistema imune (Lee; Azmitia; Whitaker-Azmitia, 2017).

Atualmente, descreve-se que a neuroinflamação é modulada principalmente por dois mecanismos: a interação entre mastócitos, células gliais e neurônios, que leva à liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas, hidrolases proteicas e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Shen *et al.*, 2023); e o aumento dos níveis periféricos de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-17, associado à redução de citocinas e interleucinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4 (Nour-Eldine *et al.*, 2022; Saghazadeh *et al.*, 2019; Krakowiak *et al.*, 2017). Essa desregulação imunológica indica um desequilíbrio sistêmico que contribui para a manutenção de processos inflamatórios no organismo (Rajabi; Noori; Sargolzaei, 2024).

O estresse oxidativo presente no TEA corresponde a um desequilíbrio entre a produção de agentes pró-oxidantes e a capacidade antioxidante das células, levando ao dano celular causado pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Bjørklund *et al.*, 2020). Devido à falta de capacidade de produção de glutatona dos neurônios, o sistema nervoso central (SNC) tem uma capacidade limitada de desintoxicar ROS. Portanto, os neurônios são as primeiras células a serem afetadas pelo aumento de ROS e pela escassez de antioxidantes (Wang; Michaelis, 2010).

A remoção do excesso de metabólitos reativos de oxigênio é garantida pelas enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e glutatona peroxidase. Quando esses mecanismos falham em combater eficazmente a ROS, resulta em danos celulares (Yenkoyan *et al.*, 2018).

De acordo com dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2025), cerca de 1 em cada 31 (3,2%) crianças de 8 anos foi diagnosticada com TEA nos Estados Unidos. Essa taxa representa um aumento significativo em relação aos dados anteriores, que eram de 1 em 44 (com dados de 2018) e 1 em 59 (com dados de 2016) (Shaw *et al.*, 2021). No Brasil, o dado mais recente disponível sobre o TEA foi divulgado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) com base no censo demográfico de 2022. Foram identificadas cerca de 2,4 milhões de pessoas com diagnóstico de TEA no território nacional, o que corresponde a aproximadamente 1,2% da população com 2 anos ou mais de idade.

A prevalência mundial do TEA é estimada entre 0,02% e 3,66% da população. Estudos indicam taxas variáveis de prevalência, com o TEA afetando aproximadamente 0,38% a 3,13% da população europeia. No Oriente Médio estes números variam de 0,11% a 1,53%. Na Ásia a prevalência é de 0,08% a 9,3%, enquanto na América do Norte é de 0,87% a 2,21% e cerca de 1% na África e 1,7% na Austrália (Alrehaili *et al.*, 2023; Ostrowski *et al.*, 2024). Compreendido a sua prevalência é necessário entender que este transtorno é amplo e heterogêneo, com início variável e frequentemente compreendida como um processo dimensional (Ozonoff *et al.*, 2008).

Os primeiros sinais costumam tornar-se perceptíveis entre 18 e 24 meses, sobretudo nas esferas da comunicação social e do comportamento. Embora algumas manifestações possam surgir ainda mais cedo, o diagnóstico tende a ser estabelecido com maior precisão entre o 3º e 4º ano de vida da criança (APA, 2013).

Entre esses sinais iniciais, destacam-se as dificuldades na comunicação social, consideradas um dos principais marcadores do TEA. Mesmo quando a fala está presente, limitações comunicativas permanecem comuns, uma vez que a linguagem verbal não supre todas as demandas de interação. Como consequência, podem ocorrer isolamento social e prejuízos na construção e manutenção de vínculos interpessoais (Martínez-González; Cervin; Piqueras, 2021).

Além das dificuldades comunicativas, os comportamentos repetitivos rígidos representam outro núcleo central da sintomatologia. Esses comportamentos são altamente prevalentes e geralmente refletem um forte desejo de manter o padrão de comportamento (Zhang *et al.*, 2022). Apesar de sua ampla variabilidade, tendem a ser agrupados em categorias gerais, o que pode limitar a compreensão de sua diversidade. Eles incluem ações não mediadas cognitivamente e sem finalidade aparente, como bater as mãos ou manipular objetos de maneira repetitiva (Jasim; Perry, 2023).

Associadas a esses comportamentos, as diferenças no processamento sensorial

também exercem papel relevante na apresentação clínica do TEA. Crianças podem mostrar intolerância a estímulos como toque, luz intensa, ruídos, texturas de alimentos, roupas ou até cores específicas, o que compromete atividades cotidianas e rotinas de autocuidado. Em contrapartida, algumas buscam estímulos sensoriais de forma intensa, em comportamentos conhecidos como “busca sensorial” (Patil; Kaple, 2023; Thye *et al.*, 2018).

Indivíduos com TEA frequentemente apresentam sintomas de ansiedade e depressão, irritabilidade, humor deprimido, insegurança e sentimentos de tristeza (Tafolla; Lord, 2024). Esses sintomas podem impactar a socialização, o bem-estar emocional e a participação em atividades diárias, influenciando a qualidade de vida ao longo do desenvolvimento. O TEA afeta crianças e famílias no decorrer da vida e em vários aspectos emocionais, sociais, seus principais sintomas são geralmente observados pelos pais durante a primeira infância (Bone; Leppert, 2024).

O TEA vem apresentando crescimento significativo, associado à ampliação da definição do transtorno, às modificações nos critérios diagnósticos, aos avanços nas ferramentas de triagem, às mudanças nos métodos de pesquisa e ao aumento da conscientização sobre o TEA (Salari *et al.*, 2022). O diagnóstico é realizado por meio de uma avaliação abrangente conduzida por equipe multidisciplinar, sendo fundamentado no histórico detalhado do desenvolvimento da criança, no julgamento clínico e na aplicação de instrumentos diagnósticos padronizados (Charman; Baird, 2002; Malhi; Singhi, 2011; Singhi; Malhi, 2022). Apesar dos avanços na detecção de sinais precoces, o processo diagnóstico permanece desafiador devido às semelhanças clínicas entre o TEA e outros transtornos do desenvolvimento, o que pode retardar o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, postergar intervenções oportunas (Lima *et al.*, 2022).

Atualmente não existe um medicamento capaz de tratar os sintomas centrais do TEA. As diretrizes recomendam que, diante de comportamentos estereotipados ou agressivos, sejam utilizados antipsicóticos, como risperidona ou aripiprazol (Roy; Strate, 2023). Esses fármacos atuam diretamente sobre o sistema dopaminérgico, exercendo efeitos por meio do bloqueio parcial ou total dos receptores D2. Dessa forma, o uso clínico desses fármacos reforça a hipótese de que desequilíbrios na sinalização da dopamina especialmente no estriado e no núcleo accumbens podem contribuir para as manifestações comportamentais do TEA, como atividade locomotora, comportamento motivado e o processamento de recompensa (Maisterrena *et al.*, 2022). sustentando a relevância do sistema dopaminérgico como alvo terapêutico no manejo desses sintomas (Blum *et al.*, 2024; Posey *et al.*, 2008).

Os inibidores seletivos da recaptção de serotonina, como fluoxetina, sertralina e

citalopram, têm sido utilizados para reduzir sintomas de ansiedade, depressão e comportamentos repetitivos em indivíduos com TEA (Hollander *et al.*, 2004; King *et al.*, 2009). A serotonina tem ganhado destaque nas pesquisas sobre o TEA porque, ao bloquear o transportador de serotonina, pode melhorar seu quadro clínico, reforçando a sua importância da modulação serotoninérgica (Makkonen *et al.*, 2008).

Além dos fármacos moduladores da via de serotonina e dopamina, a via da acetilcolinesterase quando está em desequilíbrio pode contribuir para déficits sociais, cognitivos e sensoriais observados no TEA. Nesse contexto, inibidores da acetilcolinesterase, como donepezila, rivastigmina e galantamina, têm sido investigados como potenciais moduladores desses circuitos (Ure *et al.*, 2023).

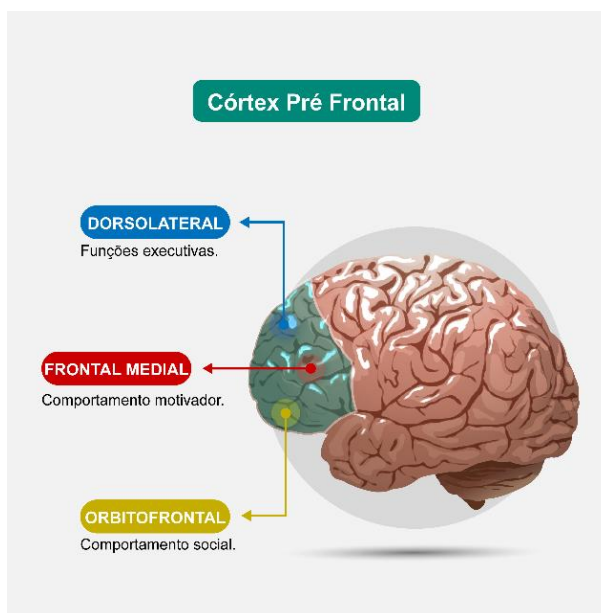
Estes medicamentos visam principalmente atenuar sintomas associados, comorbidades psiquiátricas e cognitivas que estão comumente associadas com TEA, entre elas estão o transtorno de ansiedade social, transtorno desafiador de oposição, transtorno de déficit de atenção/hiperatividade e deficiência intelectual (Masi *et al.*, 2017). Assim, destaca-se a complexidade do transtorno e a dificuldade em realizar um tratamento em que possa abranger de forma ampla todas as comorbidades do TEA.

2.2 Neuroanatomia do TEA e suas alterações

2.2.1 Córtex pré-frontal

O córtex pré-frontal (CPF) desempenha um papel essencial em diversos aspectos do comportamento social dos mamíferos, como motivação social, reconhecimento e processo de tomada de decisão, controle emocional e função executiva, que frequentemente são prejudicadas em indivíduos com TEA (Mohapatra; Wagner 2023; Misra, 2014; Mediane *et al.*, 2024). A subdivisão dorsolateral está envolvida no controle executivo geral, enquanto o CPF ventromedial é responsável pelas funções cognitivas e afetivas, e a subdivisão orbitofrontal está relacionada às funções sociais (Figura 1) (Liss *et al.*, 2025).

Figura 1 - Divisão Córtex Pré-frontal.



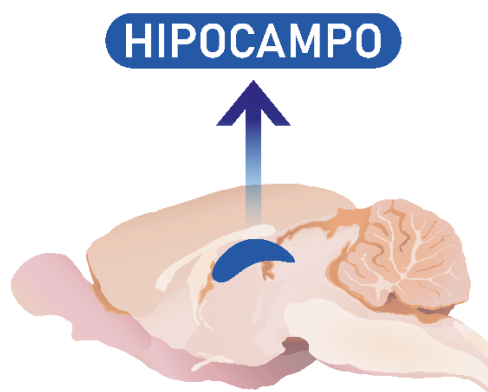
Fonte: Adaptado de Liss *et al.* (2025).

Estudos indicam que no TEA há um desequilíbrio excitatório/inibitório (E/I) no córtex pré-frontal, com redução dos níveis de GABA e aumento da excitabilidade neuronal. Modelos animais com duplicação do gene 15q11-13 mostram esse mesmo padrão, sugerindo que a hiperexcitação glutamatérgica ou a deficiência GABAérgica contribuem para a fisiopatologia do TEA. Assim, restaurar esse equilíbrio pode ser um alvo promissor para novas terapias (Harada *et al.*, 2010; Kurahashi *et al.*, 2024; Sacai *et al.*, 2020). Além de disso, o estudo de Cao *et al.* (2024) mostra que acontece um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e interleucina-1 β (IL-1 β), no córtex pré-frontal de tecidos cerebrais pós-morte de indivíduos com TEA.

2.2.2 Hipocampo

O hipocampo, assim como o córtex pré-frontal, é uma das áreas cerebrais comumente afetadas pelo TEA (Figura 2). A sua estrutura cerebral é bilateral e exerce um papel crucial na memória episódica, raciocínio espacial e interação social (Liu *et al.*, 2023a; Arutiunian *et al.*, 2023). Modelos pré-clínicos comprovaram um papel importante do hipocampo na disfunção da memória social associada ao TEA, junto a diminuição da plasticidade sináptica (Rexrode *et al.*, 2024). Quando diminui a integridade da conectividade do hipocampo, a taxa de atrofia se estende e a função neuronal é prejudicada, resultando em deficit de memória, ocasionando as manifestações do TEA (Chen *et al.*, 2024).

Figura 2 – Ilustração do Hipocampo.



Fonte: Elaborado pela autora.

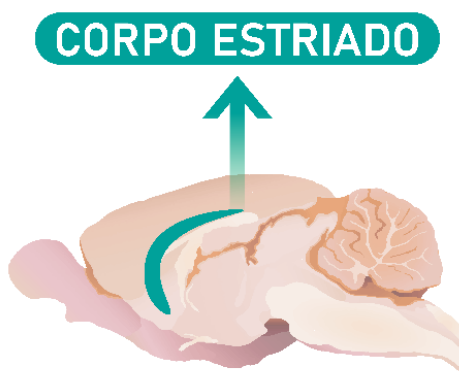
De acordo com o estudo de Bonetti *et al.* (2024), camundongos com características comportamentais semelhantes ao TEA apresentam inflamação no hipocampo, redução da plasticidade sináptica e alterações no circuito trissináptico, o que pode estar relacionado aos déficits cognitivos e comportamentais do transtorno. Em modelo de indução por ácido valpróico (VPA), de acordo com o estudo de Long *et al.* (2024), ocorre o aumento dos níveis dos marcadores pró-inflamatórios (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17, TGF- β) e redução os níveis do marcador anti-inflamatório (IL-10) na região do hipocampo.

Além dos níveis de marcadores inflamatórios observa-se também anormalidades no volume do hipocampo em indivíduos com TEA quando comparados a pessoas com desenvolvimento típico. O volume do hipocampo pode diminuir de forma adaptativa devido suas funções estarem sendo menos demandadas no contexto do TEA (Sussman *et al.*, 2015). Isso pode estar relacionado à redução na necessidade de processamento de informações espaciais, emocionais e sociais, levando a mudanças estruturais ao longo do tempo (Nees *et al.*, 2022).

2.2.3 Corpo estriado

O corpo estriado é a principal via de entrada dos gânglios da base e regula funções motoras e cognitivas (Figura 3). Ele é composto por neurônios de projeção GABAérgicos, que transmitem sinais para outras regiões cerebrais e interneurônios locais, modulando essa atividade. Sua função é essencial para o controle dos movimentos e processos como aprendizado e comportamento, estando envolvido em condições neurológicas como o TEA (Cording; Bateup, 2023; Evans *et al.*, 2024; Tai *et al.*, 2012).

Figura 3 – Ilustração do Corpo Estriado.



Fonte: Elaborado pela autora.

O TEA está associado a um desequilíbrio entre os sinais excitatórios e inibitórios (E/I) no cérebro, o que pode contribuir para sua fisiopatologia e comorbidades. Esse desequilíbrio já foi amplamente estudado em redes corticais, mas também pode afetar o corpo estriado, uma região cerebral que recebe estímulos excitatórios do córtex e estímulos inibitórios dos interneurônios locais (Thabault *et al.*, 2022; Lauber; Filice; Schwaller, 2016).

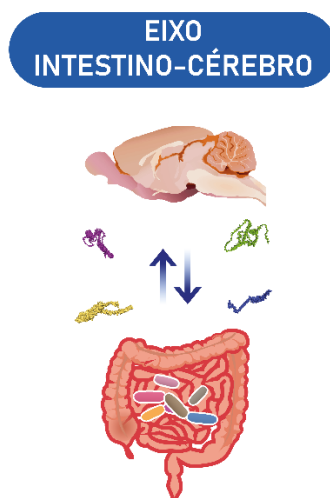
Além disso, a modulação por neurotransmissores como dopamina e serotonina é fundamental para manter o equilíbrio funcional no estriado (Maisterrena *et al.*, 2022). Esse desequilíbrio E/I no estriado pode estar relacionado a diversas alterações genéticas envolvidas no TEA, sugerindo um papel crucial dessa região na manifestação do transtorno (Nardi *et al.*, 2023). Isso sugere que o estriado pode atuar como um ponto de convergência para os dois principais domínios sintomáticos do transtorno.

2.3 Eixo intestino-cérebro

O eixo intestino-cérebro consiste em um sistema de comunicação bidirecional que integra o trato gastrointestinal, o sistema nervoso central e a microbiota intestinal, envolvendo vias neurais, imunológicas, endócrinas e metabólicas (Figura 4). Evidências indicam que alterações na microbiota intestinal podem modular a permeabilidade intestinal, a liberação de metabólitos microbianos, a ativação do sistema imune e a produção de citocinas inflamatórias, impactando diretamente o neurodesenvolvimento e o comportamento (Cryan *et al.*, 2019; Sharon *et al.*, 2016). No contexto do TEA, disfunções no eixo microbiota-intestino-cérebro tem sido associadas tanto a sintomas gastrointestinais quanto a alterações comportamentais e cognitivas, sugerindo que a disbiose intestinal pode contribuir para a neuroinflamação e a desregulação neuroquímica observadas nesses indivíduos (Kang *et al.*, 2017; Park; Gao, 2024;

Zarimeidani *et al.*, 2024).

Figura 4 – Ilustração do eixo intestino-cérebro.



Fonte: Elaborado pela autora.

A disbiose intestinal se refere a um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal, caracterizado pela redução de microrganismos benéficos e pela proliferação de espécies potencialmente patogênicas associadas ao TEA (Srikantha; Mohajeri, 2019). A interação bidirecional entre a microbiota intestinal e a função cerebral, indica que a disbiose pode exercer um papel relevante no desenvolvimento e na modulação do SNC, bem como na patogênese de distúrbios do neurodesenvolvimento (Guevara-Ramírez *et al.*, 2025; Petropoulos *et al.*, 2025).

No contexto do TEA, esse eixo tem ganhado destaque devido ao crescente número de evidências que mostram que alterações da microbiota intestinal, da permeabilidade da barreira intestinal e da resposta imune podem influenciar diretamente o neurodesenvolvimento e os comportamentos associados ao TEA (Sales-Millán *et al.*, 2023). No contexto do TEA, tem sido amplamente descrita a presença de inflamação intestinal generalizada, frequentemente acompanhada por aumento da permeabilidade da barreira mucosa, condição conhecida como “intestino permeável”. Esse estado inflamatório é caracterizado pela ativação de células imunes intestinais e pela alteração na expressão de genes envolvidos em vias pró-inflamatórias (Cuomo *et al.*, 2023)

Entre os metabólitos produzidos pela microbiota, o butirato um ácido graxo de cadeia curta (AGCC) com importante ação anti-inflamatória e reguladora da atividade neuronal, costuma estar reduzido no TEA, o que pode prejudicar a comunicação entre o intestino e o

sistema imune e favorecer alterações de motilidade intestinal (Sales-Millán *et al.*, 2023). Além disso, essa disbiose está associada a sintomas gastrointestinais frequentes no TEA, que podem influenciar comportamento, humor e cognição (Mulle; Sharp; Cubells, 2013).

Muitas crianças com TEA apresentam atividade reduzida de pelo menos uma dissacaridase, como lactase, sacarase, maltase, palatinase ou glucoamilase (Horvath *et al.*, 1999). Além disso, crianças com TEA apresentam distúrbios gastrointestinais há níveis baixos de transcritos que codificam dissacaridasas e transportadores de hexose em biópsias intestinais, quando comparadas a crianças com queixas gastrointestinais (Robas *et al.*, 2025).

A redução dessas atividades compromete a digestão final dos carboidratos, levando ao acúmulo de dissacarídeos no lúmen intestinal, fermentação pela microbiota, produção de gases e diarreia. Esse déficit enzimático contribui para dor abdominal, distensão e intolerância alimentar, sintomas frequentemente relatados por indivíduos com TEA e também observados em modelos animais que estudam esse transtorno (Iglesias-Vázquez, 2020).

No modelo VPA, evidências demonstram prejuízo intestinal estrutural e funcional. A exposição ao VPA reduz a espessura da túnica mucosa e muscular do estômago e íleo, além de diminuir a motilidade gastrointestinal em filhotes expostos durante a gestação (Kim *et al.*, 2013). Também foi descrito atraso significativo no esvaziamento gástrico (Varley; Browning, 2024), condição associada a náuseas, dor abdominal, distensão, sensação de plenitude e alterações alimentares sintomas amplamente relatados em pacientes com TEA (Camilleri; Saslow; Bharucha, 1996; Taniya *et al.*, 2022).

2.4 Estresse oxidativo no TEA

O estresse oxidativo é reconhecido como um dos principais mecanismos biológicos envolvidos nas alterações neurocomportamentais observadas em modelos animais de TEA. Esse processo resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante endógena, culminando em danos lipídicos, proteicos e mitocondriais no tecido nervoso (Usui; Kobayashi; Shimada, 2023).

A exposição ao VPA aprofunda esse cenário ao induzir um estado de estresse oxidativo exacerbado no sistema nervoso central. Isso ocorre por meio do aumento da geração de EROs, associado à disfunção mitocondrial e à ativação de vias de sinalização que desestabilizam a homeostase redox (Pangrazzi; Balasco; Bozzi, 2020). Como consequência, as defesas antioxidantes tornam-se sobrecarregadas e menos eficientes, favorecendo o estabelecimento de danos celulares e processos neurodegenerativos. Além desses efeitos, o

VPA atua como inibidor da histona desacetilase (HDAC), modulando a expressão gênica e interferindo diretamente na neurogênese, o que contribui para déficits neurobiológicos adicionais (Kaewngam *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2018a).

Crianças com TEA apresentam aumento consistente de estresse oxidativo, evidenciado por disfunção mitocondrial, redução da atividade de enzimas antioxidantes, maior peroxidação lipídica e acúmulo de produtos de glicação avançada (Usui; Kobayashi; Shimada, 2023). Como as mitocôndrias são fundamentais para a produção de adenosina trifosfato (ATP), a regulação de radicais livres e a apoptose, sua disfunção contribui diretamente para a fisiopatologia do TEA (Frye *et al.*, 2024). A relação entre alterações epigenéticas e expressão gênica no TEA indica que modificações nos níveis de acetilação de histonas, capazes de alterar o padrão de transcrição gênica, podem desempenhar um papel central na fisiopatologia do transtorno (Tseng *et al.*, 2022). Estudos apontam que essa combinação de disfunção mitocondrial e aumento de danos oxidativos está fortemente associada ao desenvolvimento e à progressão do TEA.

O honokiol por sua vez modula esses processos inflamatórios por meio da ativação da atividade e a expressão da SOD2 e promove a eliminação de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (mtROS) por meio da ativação da Sirt3 (Wang *et al.*, 2022). O honokiol, por sua vez, modula esses processos inflamatórios ao aumentar a atividade e a expressão da SOD2 e promover a eliminação de mtROS por meio da ativação da Sirt3 (Qi *et al.*, 2024). Além disso, o honokiol inibe a ativação do NF- κ B e suprime a via TLR4/MyD88, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e contribuindo adicionalmente para a redução do estresse oxidativo (Chao *et al.*, 2010).

2.5 Acetilcolinesterase no TEA

A acetilcolinesterase (AChE), é uma enzima hidrolase, que regula a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina nos neurônios (Sivaraman *et al.*, 2022). Alterações na sua atividade podem impactar diretamente a neurotransmissão colinérgica, afetando processos como memória, aprendizagem e interação social que estão associadas ao TEA (Suzuki *et al.*, 2011). De acordo com o estudo de Varela *et al.* (2013), o VPA aumenta a atividade da acetilcolinesterase. O aumento da AChE induzido pelo VPA pode estar relacionado ao seu papel como inibidor de histona desacetilase (HDAC). A inibição de HDAC promove hiperacetilação de histonas e, conseqüentemente, maior acessibilidade da cromatina, resultando em alterações de expressão gênica durante o neurodesenvolvimento (Chen *et al.*, 2018a).

Esse mecanismo epigenético pode levar ao aumento da síntese de diversas proteínas, incluindo enzimas reguladoras da neurotransmissão, como a AChE. Assim, a exposição ao VPA durante períodos críticos do desenvolvimento pode favorecer uma superexpressão ou hiperatividade da AChE, intensificando a degradação da acetilcolina e comprometendo a sinalização colinérgica. Ademais, estudos demonstram que o VPA também induz estresse oxidativo e neuroinflamação (Chelaru *et al.*, 2025; Chaudhary; Parvez, 2012), condições que modulam negativamente a função colinérgica e podem contribuir para a elevação da AChE observada em modelos animais. Dessa forma, o aumento da AChE em animais expostos ao VPA reflete uma possível via patofisiológica pela qual o VPA impacta memória, atenção e comportamento social domínios dependentes da integridade colinérgica (Varela *et al.*, 2013; Nakhil *et al.*, 2023).

2.6 Serotonina no TEA

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é um neurotransmissor essencial para o desenvolvimento e a modulação de funções cerebrais como humor, sociabilidade, cognição, plasticidade sináptica e maturação de circuitos neurais (Olivier, 2015). A serotonina (5-HT) é produzida a partir do triptofano pelas enzimas TPH1, na periferia, e TPH2, no sistema nervoso central (Maffei, 2020).

Embora mais de 90% da 5-HT seja sintetizada no intestino, é no SNC que ela exerce funções essenciais, modulando humor, apetite, sociabilidade e agressividade (Gershon; Tack, 2007). De acordo com o estudo de Garbarino *et al.* (2019), alterações na sinalização serotoninérgica estão associadas a características comportamentais do TEA, incluindo déficits sociais e comportamentos repetitivos. Sua participação no neurodesenvolvimento é tão essencial que alterações precoces na sinalização serotoninérgica podem impactar diretamente processos como migração neuronal, formação sináptica e organização cortical, domínios frequentemente disfuncionais no TEA.

Um dos achados biológicos mais consistentes com TEA é a hiperserotonemia periférica, observada em aproximadamente 25–30% dos indivíduos com o transtorno. Esse aumento de 5-HT nas plaquetas sugere alterações sistêmicas na síntese, captação ou metabolismo da serotonina e constitui um dos biomarcadores mais replicados na literatura sobre TEA (Muller; Anacker; Veenstra-Vanderweele, 2016; Esposito *et al.*, 2024).

No modelo de TEA induzido por VPA, alterações significativas no sistema serotoninérgico têm sido consistentemente observadas, refletindo padrões semelhantes aos

descritos em indivíduos com autismo (Ay *et al.*, 2024).

A exposição pré-natal ao VPA compromete o desenvolvimento de neurônios serotoninérgicos, reduzindo a expressão de TPH2 a enzima que sintetiza serotonina no SNC e diminuindo os níveis centrais de 5-HT durante períodos críticos do neurodesenvolvimento (Miyazaki; Narita; Narita, 2004). Além disso, o transportador de serotonina (SERT) regula os níveis sinápticos de 5-HT, e variantes alélicas no polimorfismo 5-HTTLPR reduzem sua expressão, aumentando a vulnerabilidade a transtornos neuropsiquiátricos (Thorne; Ellenbroek; Day, 2025). Essas alterações, associadas também a mudanças na sensibilidade de receptores serotoninérgicos, contribuem para a manifestação de déficits sociais, comportamentos repetitivos e hiper-reatividade emocional característicos do modelo de indução ao TEA (Muller; Anacker; Veenstra-Vanderweele, 2016).

2.7 Monoaminas no TEA

As vias dopaminérgicas desempenham papel fundamental em diversos processos fisiológicos, como controle motor, cognição, funções executivas, recompensa e motivação o sistema dopaminérgico é composto principalmente pelas vias mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e tuberoinfundibular, cada uma contribuindo para aspectos distintos da modulação comportamental e neuroendócrina (Havranek; Bacova; Bakos, 2024). Além disso a dopamina desempenha um papel essencial tanto na aprendizagem quanto no comportamento motivador podendo ser entendida como uma forma do organismo avaliar se vale a pena gastar seus recursos em uma tarefa motora ou cognitiva (DiCarlo; Wallace, 2022).

Indivíduos com TEA apresentam respostas estriatais reduzidas a estímulos recompensadores (Clements *et al.*, 2018). Diante da estreita relação entre dopamina e processamento de recompensa, propõe-se que uma sinalização dopaminérgica mesolímbica atípica diminua o valor atribuído a estímulos sociais, o que pode contribuir para as dificuldades sociais centrais observadas no TEA (Martin *et al.*, 2025).

Além das alterações no processamento de recompensa, evidências recentes apontam que o sistema dopaminérgico apresenta disfunções mais amplas no TEA, envolvendo desde a neurogênese e maturação neural até a modulação corticoestriatal. Estudos de neuroimagem e modelos animais demonstram que alterações dopaminérgicas precoces podem impactar a formação de circuitos sociais, sugerindo que a disfunção dopaminérgica no TEA é tanto desenvolvimental quanto funcional (Bariselli *et al.*, 2018). Modelos animais de TEA, como o modelo induzido por ácido valpróico (VPA), resulta em redução da síntese e da

atividade dopaminérgica no estriado e no córtex pré-frontal, acompanhada por menor expressão do transportador de dopamina (DAT), dos receptores D1 e D2, bem como da tirosina-hidroxilase (TH) (Cezar *et al.*, 2025).

2.8 Modelo de indução animal por ácido valproico (VPA)

O ácido valproico (VPA), ou ácido 2-propilpentanóico, é um ácido graxo de cadeia curta vastamente utilizado como um medicamento antiepiléptico e estabilizador de humor (Nicolini; Fahnestock, 2018). Em humanos, o VPA usado no período gestacional é considerado um fator de risco pois afeta o desenvolvimento cerebral fetal, além de atravessar a placenta e acumular-se na circulação fetal com uma concentração maior do que o sangue materno atribuindo um grande risco ao feto pela exposição ao VPA (Zarate-Lopez, *et al.*, 2024; Sharma *et al.*, 2022; Kim; Hong; Ahn, 2022).

Diante dessa associação, evidências experimentais demonstram que a exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA) em roedores foi estabelecida como um modelo translacional confiável para o estudo da fisiopatologia do Transtorno do Espectro Autista (TEA) (Sato *et al.*, 2022). A administração de VPA no 12,5º dia de gestação em ratos e camundongos reproduz de forma consistente alterações comportamentais, neuroquímicas e neuroinflamatórias observadas em indivíduos com TEA, validando esse modelo experimental (Kim *et al.*, 2011). A exposição intrauterina ao VPA constitui um modelo amplamente reconhecido de autismo, apresentando validade de face, de construto e preditiva. Refletindo de maneira mais fidedigna os casos de autismo idiopático, frequentemente associados a fatores ambientais e epigenéticos, assim, o modelo induzido por VPA constitui uma ferramenta essencial para investigar os mecanismos neurobiológicos do TEA e para orientar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. (Nicolini; Fahnestock, 2018; Zarate-Lopez *et al.*, 2024).

O VPA atua inibindo os canais de sódio voltagem-dependentes, reduzindo a atividade neuronal, além de aumentar a neurotransmissão GABAérgica ao inibir a GABA transferase causando um desequilíbrio na relação excitação/inibição (E/I) nos circuitos neurais. Este mecanismo é apontado como um dos principais mecanismos patogênicos do TEA (Hussman, 2001). Além disso, o VPA pode funcionar como um inibidor não específico da histona desacetilase (HDAC) que pode afetar o desenvolvimento neural pela remodelação cromossômica, causando interrupção no DNA e aumento do estresse oxidativo em um feto (Sandhu *et al.*, 2023). Essa modulação pode alterar a expressão de genes importantes para o desenvolvimento neural, como os que estão envolvidos na formação sináptica, plasticidade

neuronal e comunicação celular (Kataoka *et al.*, 2013; Kuo; Liu, 2022).

De acordo com o estudo Bambini-Junior *et al.* (2014), ratos expostos no período pré-natal ao VPA apresentam alterações anatômicas e déficits de desenvolvimento equivalentes aos encontrados em crianças com TEA, abrangendo diminuição da interação social e aumento do comportamento repetitivo/estereotipado, que são elencados como principais critérios diagnósticos para o transtorno, e aumento do comportamento ansioso, que é uma comorbidade comum em humanos.

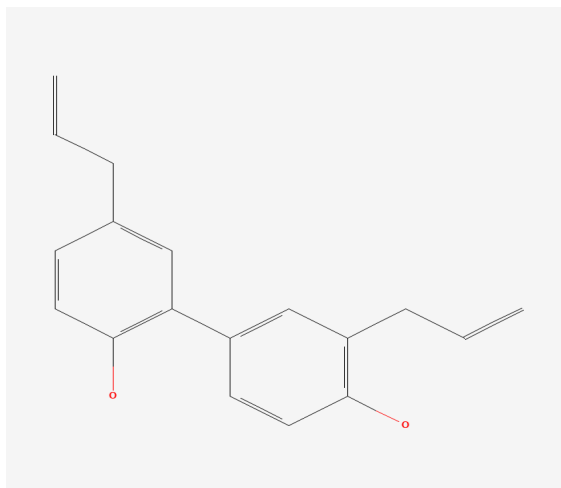
Paralelamente, o modelo de exposição pré-natal ao ácido valproico reproduz de maneira robusta e reprodutível características centrais do TEA, como perda de células de Purkinje, danos em núcleos motores, redução neuronal no tronco cerebral e aumento dos níveis de IL-6, TNF- α e NF κ B. Além disso, pacientes autistas apresentam redução de glutathiona reduzida (GSH) no cerebelo e córtex temporal, assim como alterações em GSH e malondialdeído (MDA) no plasma e eritrócitos. De forma semelhante, ratos tratados com VPA exibem esgotamento de GSH cerebral e aumento de MDA, reforçando a validade desse modelo para estudos sobre TEA (Mirza; Sharma, 2019). A teratogenicidade tem sido fundamental para ajudar a elucidar os mecanismos neuropatológicos do TEA. Além disso, a exposição ao VPA foi associada a um aumento da permeabilidade e peroxidação da barreira hematoencefálica (BHE), o que reforça o estado pró-inflamatório observado nesses modelos (Mehra *et al.*, 2022).

2.9 Honokiol

Magnolia officinalis é uma planta medicinal tradicional amplamente utilizada em países asiáticos (Niu *et al.*, 2021). Mais de 200 compostos químicos, incluindo fenólicos, alcaloides, esteroides e óleos voláteis, foram isolados e identificados na casca de *Magnolia officinalis*. Dentre esses constituintes, os neolignanos fenólicos magnolol (5,5''-dialil-bifenil-2,2''-diol) e honokiol (5,3'-dialil-bifenil-2,4'-diol) representam os principais componentes bioativos amplamente caracterizados, sendo frequentemente associados às propriedades farmacológicas (Olas, 2025).

Honokiol é um composto fenilpropanoide e pertence às neolignanas, que têm um para-alil fenol e um orto-alil fenol unidos com o acoplamento orto-, para-C-C (Figura 5) (Li; Liang; Zhou, 2022; Talarek *et al.*, 2017).

Figura 5 – Forma estrutural do honokiol.



Fonte: National Library of Medicine (2025).

De acordo com o estudo de Snow e Albensi (2016), o honokiol melhora a plasticidade e sinalização neuronal, inibe a ativação do NF- κ B e previne a neurodegeneração na doença de Alzheimer. Além disso, aumenta a capacidade cognitiva ao inibir a acetilcolinesterase (AChE), preservando os níveis de acetilcolina e otimizando a transmissão neuronal no cérebro. De acordo com o estudo de Li *et al.* (2024a), vários mecanismos estão envolvidos na neuroproteção como: supressão de cascatas neuroinflamatórias e estresse óxido-nitrosativo regulação da sinalização (Óxido Nítrico Sintase – NOS) e ativação de Fator Nuclear Eritroide 2 (Nrf2) e Sirtuína 3 (SIRT3). Além disso, ao ativar a SIRT3 acontece uma melhora da função mitocondrial nos neurônios (Li *et al.*, 2024b).

O honokiol exerce efeito anti-inflamatório por meio da atuação em diferentes vias, como fosfoinositídeo-3 quinase/AKT (proteína quinase/AKT), quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), bem como quinases N-terminais c-Jun 1/2 (JNK1/2) (Sulakhiya *et al.*, 2014).

Estudo com o uso do honokiol usando com ácido N-metil-d-aspártico (NMDA), restaurou o nível de GSH total e diminuiu a peroxidação lipídica no cérebro (Cui *et al.*, 2007). De acordo com o estudo de Zhou *et al.* (2023a), mostrou que o honokiol melhorou o estresse oxidativo celular intensificando a síntese de glutatona (GSH) e ativando a via do NRF2, elemento de resposta antioxidante (ARE). Desta forma, otimizando a função mitocondrial e a morfologia pelo ajuste fino da dinâmica mitocondrial em células SOD1-G93A, e mostrando ser uma droga favorável para o tratamento da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

Além disso melhora o comportamento depressivo em camundongos, apresentando como principal mecanismo de ação, a inibição do NF- κ B, diminuindo os níveis de Interferon-

gama (IFN- γ) no cérebro, diminuindo citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , e Interleucina 1 beta (IL-1 β) no sangue periférico, inibindo desta forma a resposta inflamatória (Zhang *et al.*, 2019). A via NF-kB é um fator de transcrição pró-inflamatório crucial, enquanto o óxido nítrico (NO) serve como um mediador central e regulador inflamatório. Exibe atividade anti-inflamatória regulando a sinalização MAPK/NF-kB, seguida pela regulação negativa do óxido nítrico sintase (iNOS) e COX-2, e níveis reduzidos de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β , IL-6, TNF- α) (Li *et al.*, 2024a).

O honokiol apresenta diversas ações farmacológicas, incluindo efeitos neuroprotetores, antidepressivos, analgésicos, antimicrobianos e antitumorígenicos. Seus mecanismos envolvem indução de apoptose em células doentes, redução da expressão de proteínas defeituosas, inibição do estresse oxidativo, supressão de citocinas pró-inflamatórias Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e melhora da função hepática (Rauf *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2023b). Uma característica importante desses compostos é a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), permitindo que eles atuem diretamente no sistema nervoso central. Isso possibilita efeitos neuroprotetores, que podem ocorrer por diversos mecanismos, como ação antioxidante, anti-inflamatória e modulação de neurotransmissores (Li *et al.*, 2023).

Assim, observa-se que os mecanismos de ação do honokiol especialmente sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo, modular citocinas inflamatórias e promover neuroproteção convergem com as alterações biológicas amplamente descritas no TEA, como disfunção mitocondrial, desequilíbrio imunológico e aumento do dano oxidativo (Chen *et al.*, 2021). Essa sobreposição de vias reforça a pertinência de considerar o honokiol como um potencial modulador dessas disfunções, justificando sua investigação como abordagem terapêutica no contexto do TEA.

2.10 Similaridade estrutural e funcional das proteínas entre espécies (*Rattus norvegicus* x *Homo sapiens*) - Bioinformática estrutural e sua relação com TEA

A Bioinformática é um campo de pesquisa dedicado à obtenção de conhecimento a partir de dados biológicos utilizando modelos e algoritmos da ciência da computação. Sua atuação envolve a coleta, processamento e modelagem de dados, permitindo análises, visualizações e previsões por meio do desenvolvimento de estratégias e algoritmos computacionais (Paiva *et al.*, 2022). A bioinformática estrutural compreende recursos de dados, algoritmos e ferramentas para investigar, analisar, prever e interpretar estruturas

biomacromoleculares (Keskin *et al.*, 2008).

Seus métodos e abordagens têm sido fundamentais para o avanço do conhecimento científico e a exploração de novos direcionamentos. Ao transformar dados computacionais em insights valiosos, gerando previsões que impulsionam a pesquisa e reduzem custos, além de possibilitar a formulação de novas hipóteses testáveis. A bioinformática estrutural desempenha um papel fundamental na ciência contemporânea (Soares; Lousa, 2025).

Essa abordagem permite uma compreensão mais profunda dos distúrbios associados ao TEA, através de previsões de interação proteína-proteína, gene-proteína, estudos de atracagem molecular, triagem de moléculas como também predizer modulação de fármacos em sistemas biológicos, facilitando a identificação de mecanismos subjacentes aos fenótipos da doença e construindo futuras estratégias terapêuticas (Abuelrub *et al.*, 2025).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos neuroinflamatório e antioxidante do honokiol em prole de ratos machos e fêmeas induzidos ao TEA pela exposição pré-natal ao ácido valpróico durante o período gestacional.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar análises *in silico* para determinar a farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade do honokiol;
- Avaliar os parâmetros comportamentais relacionadas aos padrões de ansiedade, atividade exploratória, interação social, comportamentos repetitivos/restritivos, memória operacional e aprendizado na prole de ratos induzidos ao TEA;
- Analisar os marcadores de estresse oxidativo malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) no CPF, hipocampo e ceco;
- Quantificar os níveis de proteínas totais no hipocampo, córtex pré-frontal e Ceco;
- Avaliar a atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) no hipocampo e córtex pré-frontal;
- Quantificar neurotransmissores (serotonina e dopamina no corpo estriado);
- Avaliar parâmetros bioquímicos intestinais e no duodeno avaliar as dissacaridases.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Estudo *in silico*

O método *in silico* foi empregado para a predição da farmacodinâmica, farmacocinética e toxicidade do honokiol.

4.1.1 Obtenção da estrutura química

A estrutura molecular da honokiol foi obtida a partir do banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), da qual foi obtida o código “*smile*” para as análises subsequentes.

4.1.2 Predição de alvos moleculares potenciais

Foram utilizadas as plataformas “string-db.org” “STRING” e “<http://www.swisstargetprediction.ch/>” “SwissTargetPrediction”, para determinação de alvos terapêuticos. Foi utilizado o descritor “Autism” no organismo “homo sapiens”, para a identificação e predição de alvos terapêuticos associados ao Transtorno do Espectro Autista. Esses dados foram correlacionados utilizando o método de predição que foi feita na plataforma “SwissTargetPrediction”, que foi subido o “*smile*” e escolhido o organismo “homo sapiens”.

4.1.3 Análise de interações proteína-proteína e vias funcionais

Os alvos moleculares foram submetidos à análise de interações proteína-proteína (PPI) na plataforma STRING (<https://string-db.org/>), utilizando um score de confiança adequado para garantir interações relevantes. Na mesma plataforma, também foram obtidas as análises de enriquecimento referentes às vias KEGG e aos termos de Ontologia Gênica (GO: *Biological Process*). Posteriormente, as redes de interação foram exportadas e visualizadas no software Cytoscape v3.10.0, empregando-se os plugins ClueGO e CluePedia para realizar o enriquecimento funcional, integrar os resultados de KEGG/GO e identificar vias biológicas e processos moleculares associados aos alvos investigados.

4.1.4 Predições farmacocinética e toxicológica

As propriedades farmacocinéticas foram avaliadas utilizando a plataforma pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/>) e o ADMETlab 3.0 (<https://admetlab3.scbdd.com/>).

Para permitir a variação sistemática dos parâmetros farmacocinéticos, os valores de referência foram obtidos das plataformas para absorção (inibição da glicoproteína P I e II, absorção intestinal) e metabolismo (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4), avaliados utilizando pkCSM.

A plataforma ADMETlab 3.0 foi usada para a predição da distribuição (ligação às proteínas plasmáticas, volume de distribuição - VD, fração livre - FU%) e excreção (depuração plasmática - CL, meia-vida biológica - T1/2).

As propriedades de toxicidade foram avaliadas pela plataforma ProTox 3.0 (https://tox-new.charite.de/protox_II), considerando parâmetros como toxicidade de órgãos (neurotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, toxicidade respiratória e cardiotoxicidade), classe de toxicidade e dose letal – DL50.

4.1.5 Modelagem de interações moleculares (*docking molecular*)

Os alvos mais promissores previamente identificados foram selecionados para as simulações de docking molecular do honokiol. As estruturas tridimensionais das proteínas foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) ou modeladas por homologia utilizando a plataforma Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>). Os modelos gerados foram submetidos à validação estrutural para garantir confiabilidade geométrica e estereoquímica, bem como sua adequação às análises de atracamento. A validação dos modelos foi realizada por meio do PROCHECK, que avalia a qualidade estereoquímica por meio dos gráficos de Ramachandran; Verify3D, que analisa a compatibilidade entre a estrutura tridimensional e sua sequência de aminoácidos; e pelo QMEAN4 Normalizado fornecido pela plataforma Swiss-Model.

A preparação das estruturas moleculares foi realizada utilizando o AutoDock Tools v1.5.7, e as simulações de *docking* molecular foram conduzidas com o AutoDock Vina v1.2.3. A estrutura tridimensional de cada proteína alvo foi selecionada com base na melhor resolução cristalográfica (<2,5 Å). Todas as moléculas de água cristalográfica, ligantes originais e solventes presentes no sítio ativo foram removidos para evitar interferências nas interações

ligante–receptor. Em seguida, foram adicionados hidrogênios polares e atribuídas cargas parciais de acordo com o método Gasteiger Charges.

Os arquivos do receptor e dos ligantes foram convertidos para formatos compatíveis com o programa de *docking* utilizando o AutoDock Tools (ADT). A Grid Box foi centralizada no sítio ativo da proteína, com dimensões fixas de $40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$, com *spacing* 1 \AA . As coordenadas (x, y, z) e o espaçamento da malha foram ajustados para abranger todos os resíduos catalíticos relevantes, com um *exhaustiveness* 33.

O *docking* molecular foi realizado utilizando o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), conforme implementado no AutoDock. As conformações geradas foram analisadas com base nos valores de energia de afinidade (kcal/mol), sendo selecionadas as poses com menor energia, pois indicam maior estabilidade e potencial de interação. A validação de *docking* incluiu a análise do *Root Mean Square Deviation* (RMSD), considerando os valores de limite inferior (lb) e limite superior (ub), além da formação de clusters para identificar conformações recorrentes e estáveis.

As interações moleculares entre os ligantes e os resíduos do sítio ativo foram visualizadas e analisadas nos softwares PyMOL e BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*.

O coeficiente de inibição (K_i) foi estimado a partir da energia de ligação (ΔG) utilizando a seguinte equação:

$$K_i = e^{\left(\frac{\Delta G \times 1000}{R \times T}\right)}$$

Em que ΔG representa a energia de ligação (kcal/mol), R é a constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta (298 K).

4.1.6 Comparação de proteínas: integração de análise de sequência e estrutura

Análise de sequência foi realizada por meio da plataforma *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov), com a avaliação estrutural executada no software PyMOL. A etapa inicial concentrou-se na análise de sequência utilizando o BLASTp (*Protein* BLAST). Nesta etapa, foram analisados os parâmetros de identidade, correspondente à porcentagem de aminoácidos idênticos entre duas sequências, e de positividade, que inclui aminoácidos quimicamente semelhantes (conservativos) capazes de manter a função proteica.

Na etapa subsequente, as estruturas tridimensionais das proteínas homólogas identificadas foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB) e analisadas no PyMOL. Para avaliar a similaridade estrutural, utilizou-se o comando align, que realiza a superposição da proteína-alvo (referência) com as estruturas homólogas, permitindo comparar a conservação espacial dos

resíduos e inferir possíveis semelhanças funcionais entre as proteínas.

4.2 Estudo *in vivo*

4.2.1 Delineamento experimental

O efeito antioxidante e anti-inflamatório do honokiol foi avaliado por meio de métodos *in silico*, *in vivo* e *in vitro*. O método *in silico* foi empregado para a predição da farmacodinâmica, farmacocinética, toxicidade do honokiol, como também avaliação de estrutura de proteínas entre espécies. *in vivo*, foi utilizado o modelo de indução ao TEA com ácido valpróico (VPA) em ratos, os animais foram tratados por 10 dias durante o período gestacional com honokiol ou solução, solução de dimetilsulfóxido - DMSO e avaliados parâmetros comportamentais relacionados a ansiedade, atividade exploratória, interação social, comportamentos repetitivos/restritivos, memória operacional e aprendizado na prole dos ratos induzidos ao TEA e após 30 dias foram eutanasiados com 40 dias pós nascido. Foram dissecados as áreas cerebrais, córtex pré-frontal, corpo estriado, hipocampo e o ceco para dosagem de marcadores de estresse oxidativo (malondialdeído, glutathiona reduzido) e proteínas totais, atividade enzimáticas no duodeno (dissacaridases), e neurotransmissores (serotonina, dopamina e acetilcolinesterase) *in vitro*.

4.2.2 Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram de acordo com o Guia de Cuidados e Usos de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (National Research Council, 2011) e ARRIVE guidelines (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (ARRIVE, 2020). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (NPDM/UFC) e foi aprovado com a numeração 89011223-0 (Anexo A).

4.2.3 Animais matrizes

Foram utilizados 24 ratos *wistar* como matrizes (sendo 12 machos e 12 fêmeas), nulíparas, com peso corporal entre 200 a 300g e com oito semanas de idade. Os animais foram

obtidos no biotério do NPDM/UFC e mantidos a temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, com um ciclo 12/12h de luz/escuro, recebendo água e ração *ad libitum*. Os ratos machos foram mantidos separados, em gaiolas, das fêmeas, para evitar o acasalamento antes do período desejado e para a aclimação. Para o cálculo do número de matrizes em cada grupo, foi utilizado o *software* G*Power v3.0. Os seguintes parâmetros foram utilizados baseando-se em dados de publicações anteriores: $\alpha = 0.05$; poder = 0.85; tamanho de efeito = 0.8, a partir desses critérios foi gerado o n° amostral.

4.2.4 Avaliação do ciclo estral e acasalamento

Os acasalamentos foram acompanhados diariamente através da avaliação do ciclo estral das ratas fêmeas, desde o 21° dia do nascimento, analisando a proporção e tipo de células presentes na secreção vaginal, pelo método de esfregaço vaginal (Marcondes; Bianchi; Tanno, 2002). O método de avaliação citológica consiste em aplicar 20 μL de água destilada próximo ao canal vaginal, em seguida aspirado com pipeta e aplicado sobre lâmina para análise microscópica das células.

Para o acasalamento, os animais machos foram colocados em contato com as fêmeas nulíparas por um período de 24h (das 19h às 7h), na proporção de 1 fêmea:1 macho por caixa, sendo o macho somente introduzido na gaiola no final do período de estro (Marcondes; Bianchi; Tanno, 2002). A prenhez foi confirmada por meio da identificação do plug vaginal, indicativo da ocorrência de acasalamento (Marcondes; Bianchi; Tanno, 2002), sendo este momento considerado como o dia da concepção (G0).

4.2.5 Distribuição dos animais (matrizes) e formação dos grupos

As matrizes fêmeas foram randomizadas em quatro grupos, cada grupo com um número de 3 animais de acordo com o seu esquema de tratamento. A denominação dos grupos matrizes foi a mesma utilizada para identificar os grupos dos filhotes:

- a) Grupo I - Controle (Dimetilsulfóxido-DMSO) = 3 matrizes fêmeas;
- b) Grupo II – Honokiol 10 mg/kg/dia = 3 matrizes fêmeas;
- c) Grupo III - Ácido Valpróico (VPA, 600mg/DU) = 3 matrizes fêmeas (aplicado no 12,5° dia da gestação);
- d) Grupo IV - VPA + Honokiol (600mg/DU + 10 mg/kg/dia) = 3 matrizes fêmeas.

Os filhotes provenientes das matrizes foram randomizados em sorteio por meio do uso do aplicativo RandomIZE[®], e utilizado para mensuração do efeito do tratamento aplicado nas matrizes aos 21 dias de vida.

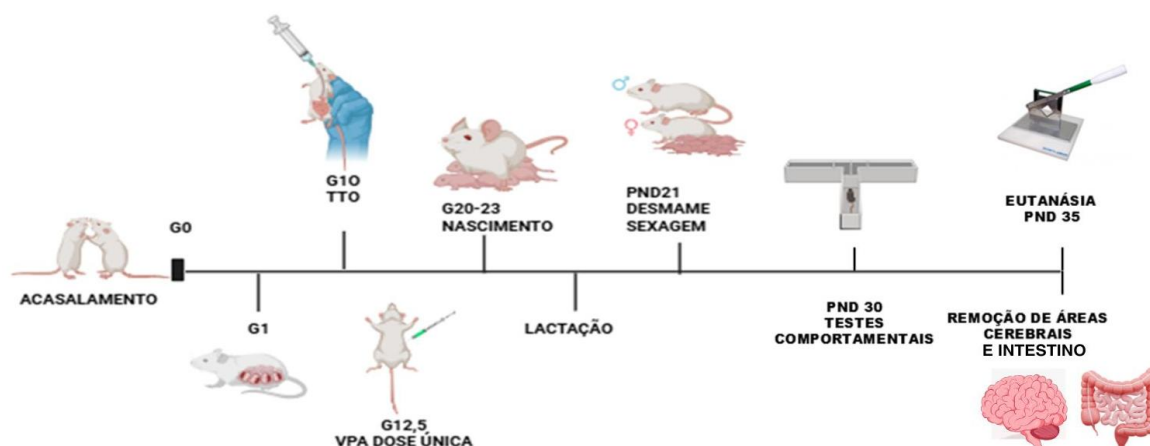
4.2.6 Indução ao TEA e tratamento das matrizes

A definição das doses utilizadas neste estudo foi baseada em evidências previamente estabelecidas na literatura, considerando esses parâmetros a dose adotada foi de 10 mg/kg/dia (Guo *et al.*, 2019; Sulakhiya *et al.*, 2014; Qu *et al.*, 2022; Jangra *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

Os animais foram induzidos ao TEA pela administração de VPA via intraperitoneal (i.p.) 600 mg/kg diluído em solução (NaCl 0,9%), e aqueles que não foram induzidos (controle) foi administrado solução salina (NaCl 0,9%) via i.p, no 12, 5^o dia da fertilização após a constatação do acasalamento (Viana *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024). Após o período do acasalamento e nascimento da prole, as matrizes de ratos machos e fêmeas foram eutanasiadas por superdose de anestésicos, ketamina 300 mg/kg e xilazina 30 mg/kg.

As ratas fêmeas foram tratadas com o honokiol fórmula pura apresentada em cápsulas disponíveis comercialmente pela MCS Fórmulas na concentração de 250mg de >98%, que foi solubilizada em 0,5% de Dimetilsulfóxido (DMSO) ou por Tween 80 a 0,1% água destilada e administrada por via oral (gavagem), durante o período gestacional G10 até o nascimento. O dia em que a prole nasceu foi considerado dia pós-natal 1 (PND1), após o nascimento a prole ficará com sua genitora até o período de desmame que acontecerá no PND21.

Figura 6 – Protocolo experimental nas matrizes.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: G: Gestacional; PND: dia pós-natal; VPA: ácido valproico; Controle: Dimetilsulfóxido - DMSO. Exposição materna ao honokiol nos grupos: II e IV, no período gestacional G11 ao G21.

4.2.7 Formação dos grupos experimentais (filhotes)

A divisão dos grupos de filhotes dos animais que foram usados para as análises experimentais foi realizada considerando a indução prévia das matrizes e divididos por sexo conforme a descrição.

Dessa forma, as matrizes tiveram seus filhotes distribuídos nos seguintes grupos: grupos controles, grupos honokiol, grupos induzidos TEA, grupos tratados com honokiol.

Os animais de cada grupo foram utilizados da seguinte maneira: Os testes comportamentais foram realizados com 69 animais machos e 58 fêmeas (Tabela 1). Estes animais foram divididos e utilizados para análises de estresse oxidativo, proteínas totais, AChE. Para as análises de enzimas intestinais foram utilizados 6 machos e 6 fêmeas de cada grupo e para quantificação de neurotransmissores 8 machos e 8 fêmeas de cada grupo

Tabela 1 – Formação dos Grupos Experimentais (Filhotes).

| Grupos | Machos (n) | Fêmeas (n) |
|----------------------|------------|------------|
| Grupo Controle | 20 | 21 |
| Grupo Honokiol | 15 | 08 |
| Grupo VPA | 19 | 15 |
| Grupo VPA + Honokiol | 15 | 14 |
| Total | 69 | 58 |

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.8 Testes comportamentais

4.2.8.1 Teste do campo aberto

Na avaliação da atividade locomotora e padrão de ansiedade dos animais foi utilizado o teste do Campo Aberto que consiste em um aparato feito de acrílico (paredes transparentes) dividido em 9 quadrantes iguais, em uma caixa quadrada medindo aproximadamente 50 cm x 50 cm. Os ratos foram habituados ao aparato pelo período de 1 min, e avaliado sua atividade por 5 min após ambientação (Zhong *et al.*, 2023).

Os parâmetros observados foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*) e número de elevações sobre duas patas (*rearing*), esses parâmetros deram subsídios para determinação de eventual hiperatividade e ansiedade dos animais (Zimcikova *et al.*, 2017; File; Hyde, 1978).

4.2.8.2 Teste de interação social

O teste de Interação Social é um modelo experimental empregado para investigar alterações comportamentais em animais associadas a distúrbios psiquiátricos.

O aparato consiste em um caixa (40 cm × 60 cm × 22 cm), dividida em três câmaras sendo a central neutra, possuindo aberturas para as duas laterais, acoplando duas gaiolas de acrílico, sendo uma vazia e a outra com outro animal desconhecido, do mesmo sexo e tamanho do animal que foi avaliado.

Os ratos filhotes ficaram 5 minutos explorando o aparelho, sendo avaliados quanto ao tempo de permanência explorando o compartimento com animal e sem animal, além do número de entradas nas câmaras com e sem animal, como também o tempo no espaço neutro. Esses parâmetros deram subsídios para a determinar a sociabilidade desses animais (Radyushkin *et al.*, 2009).

4.2.8.3 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Para a avaliação do comportamento ansioso, foi utilizado o teste de labirinto em cruz elevado, os ratos foram postos no centro da estrutura em cruz feita de material opaco a 70 cm acima do solo, as extremidades superior e inferior possuem braços abertos e os segmentos esquerdo e direito tem braços fechados. O comprimento da parede é de 50 cm e a largura 10

cm, a atividade dos ratos foi registrada por uma câmera durante um período de 5 min após a inserção, foram avaliados o tempo nos braços abertos e fechados, bem como o número de entradas. A ansiedade foi observada pelo aumento do tempo gasto nos braços abertos, local que costuma causar este tipo de comportamento devido à sua altura e maior luminosidade (Han, 2022).

4.2.8.4 Teste do labirinto em Y (Y-maze)

A memória de reconhecimento espacial dos ratos foi avaliada usando o teste do labirinto em Y, que consiste em um aparato com três braços fechados interconectados ($40 \times 12 \times 30$ por braço) em um ângulo de 120° , que foram marcados para A, B e C, respectivamente. Os animais ficaram na área central do labirinto em Y e foi permitida a exploração livre por 8 min, seguido pelo registro da sequência em que o rato entrou nos braços do labirinto. Uma sequência correta foi definida como três letras desiguais em uma linha. A taxa de precisão foi calculada como o número de vezes de sequência correta dividido pelo número total de vezes (Sarter; Bodewitz; Stephens, 1988).

4.2.9 Eutanásia e remoção das áreas cerebrais

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Seguindo as diretrizes éticas garantindo o bem estar animal. Esta técnica foi escolhida devido à necessidade de manter a integridade cerebral, evitando possíveis alterações bioquímicas e histológicas causadas pelo uso de anestésicos, que podem interferir em análises neuroquímicas e moleculares. Além disso, a decapitação permite a rápida coleta de tecidos sem comprometimento da viabilidade celular e da atividade enzimática (Ko; Mulia; van Rijn, 2019).

Durante o procedimento, cuidados rigorosos foram tomados para garantir a boa condição do equipamento, assegurando cortes precisos e minimizando o sofrimento animal. A guilhotina foi devidamente higienizada entre cada animal, seguindo protocolos de biossegurança e boas práticas experimentais para evitar o estresse do animal e a contaminação cruzada, garantindo a reprodutibilidade dos resultados.

Imediatamente após a decapitação, o crânio foi exposto, e uma incisão foi feita na linha média com um bisturi nº 15. A calota craniana foi cuidadosamente removida para expor o cérebro, que foi delicadamente extraído com o auxílio de uma espátula ou pinça, começando

pela região frontal e deslocando-o para trás para liberar as conexões nervosas e a medula espinhal. As áreas cerebrais como o córtex pré-frontal, hipocampo, e corpo estriado foram dissecadas com instrumentos finos e precisos, como pinças e tesouras de microdissecção, para posterior análise (Paxinos; Franklin, 2019).

Para retirada do intestino procedeu-se à laparotomia mediana para exposição da cavidade abdominal e exteriorização do trato gastrointestinal. O intestino delgado foi identificado entre o piloro e a junção íleo-cecal. O íleo foi cuidadosamente isolado, removido, lavado com solução salina para remoção do conteúdo luminal, acondicionado em tubos apropriados e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises da atividade das enzimas dissacaridases (maltase, lactase e sacarase) (Lowry, 1951). O ceco foi removido integralmente, submetido aos mesmos procedimentos de lavagem, e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior avaliação dos marcadores de estresse oxidativo.

4.3 Estudo *post mortem*

4.3.1 Análise de marcadores do estresse oxidativo – Quantificação de MDA

A metodologia para a determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi aplicada ao homogêneo do hipocampo, córtex pré frontal e ceco com o objetivo de quantificar o MDA. Inicialmente, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato 150 mM para obtenção do homogenato. Em seguida, foram retirados 63 μL dessa amostra, aos quais foram adicionados 100 μL de ácido perclórico 35%, seguido de centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C para precipitação de proteínas. O sobrenadante obtido (150 μL) foi então incubado com 50 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1,2%, sendo a mistura aquecida em banho-maria a 95°C por 30 minutos para permitir a reação entre o TBA e os aldeídos derivados da peroxidação lipídica. Após resfriamento, 150 μL das amostras foram transferidos para os poços de uma placa de ELISA, onde a absorbância foi medida a 535 nm, permitindo a quantificação do MDA e, conseqüentemente, a avaliação do estresse oxidativo nas regiões cerebrais analisadas (Nagababu *et al.*, 2009).

4.3.2 Avaliação do Estresse Oxidativo – Quantificação de GSH

A metodologia para a determinação da concentração de GSH foi aplicada ao homogenato do hipocampo, córtex préfrontal e ceco em leitor de ELISA. As amostras foram

preparadas adicionando-se 65,57 μL do homogenato (10%) a 52,45 μL de água destilada e 13,11 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 50%, seguido de centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C para precipitação de proteínas. Durante todo o procedimento, as amostras foram mantidas resfriadas para evitar degradação. Para a reação, 131,14 μL da solução de Tris-HCl foram adicionados a cada poço da placa de ELISA, seguidos de 65,57 μL das amostras previamente preparadas. Imediatamente antes da leitura, 3,27 μL de DTNB foram adicionados para permitir a formação do complexo cromogênico, cuja absorbância foi medida a 412 nm. A reação permaneceu estável por apenas 5 minutos, tornando essencial um controle rigoroso do tempo de leitura (Sedlak; Lindsay, 1968).

4.3.3 Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), através de ELISA no hipocampo, córtex préfrontal e ceco. O ensaio baseia-se na interação do corante Coomassie Blue G250 com aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas das proteínas, resultando em um deslocamento do equilíbrio do corante para sua forma aniônica, que apresenta forte absorbância a 595 nm. As amostras foram preparadas garantindo um volume final de 40 μL por poço, ajustado com tampão adequado. A curva padrão foi construída utilizando solução de albumina a 0,2 mg/mL em concentrações crescentes. A solução de Bradford foi obtida pela diluição da solução-mãe 5x em água destilada (1 mL da solução-mãe + 4 mL de H₂O). Após a adição de 200 μL da solução de Bradford diluída nos poços contendo amostras e padrões, a reação foi incubada por 5 minutos antes da leitura da absorbância a 595 nm. Esse método permitiu a quantificação precisa das proteínas presentes nas amostras, sendo essencial para normalização dos dados em análises bioquímicas subsequentes (Bradford, 1976).

4.3.4 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada pelo método de Ellman *et al.* (1961), em leitor de ELISA. O princípio do ensaio baseia-se na hidrólise da acetilcolina pela AChE, resultando na formação de tiocolina, que reage com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB), produzindo um complexo de coloração amarela cuja absorbância é medida a 412 nm. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em tampão fosfato (pH 7,4) e a concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford, ajustado para 0,5 mg/mL. O ensaio foi conduzido em microplacas de 96 poços, onde foram adicionados 34 μL

do homogenato e 134 μL de DTNB (0,75 mM). A absorbância foi registrada a 412 nm antes da adição do substrato (leitura de branco), considerando a coloração basal do DTNB. Em seguida, foram adicionados 34 μL de ATC (9 mM), e a absorbância foi monitorada do minuto 1 ao 5. A atividade enzimática foi expressa em nanomoles de ATC hidrolizados por miligrama de proteína por minuto (nmol/min/mg), sendo a variação da absorbância por minuto utilizada para o cálculo da taxa de reação. Esse método permitiu avaliar com precisão a atividade da AChE nos tecidos analisados (Isomae *et al.*, 2002).

4.3.5 Dosagem de monoaminas para quantificação de serotonina e dopamina

A quantificação dos níveis de catecolaminas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica, utilizando um sistema Alliance Waters[®]. As amostras de tecido foram previamente homogeneizadas em ácido perclórico (HClO_4 a 1%) por cerca de 30 segundos, e, em seguida, o homogenato foi transferido para tubos Eppendorf[®] de 2 mL e submetido à centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C. Após a centrifugação, 20 μL do sobrenadante foram coletados e injetados no sistema cromatográfico para análise. A separação das amostras foi conduzida em coluna Symmetry[®] C18 (150 mm \times 4,6 mm; tamanho de partícula de 5 μm , WATERS[®]). A fase móvel consistiu em tampão de ácido cítrico 50 mM (pH 3,5), suplementado com ácido heptanossulfônico sódico (0,69 M) como agente de pareamento iônico, EDTA (0,1 mM), KCl (2 mM), acetonitrila (2,1% v/v) e metanol (9,4% v/v). A dopamina (DA) e a serotonina (5-HT) foram detectadas por meio de detector amperométrico, conforme descrito previamente na literatura (Cheng *et al.*, 1993; Benedetto *et al.*, 2014).

4.3.6 Análises das dissacaridases intestinais

A análise da atividade das enzimas intestinais foi realizada a partir da remoção do intestino delgado. O jejuno removido foi lavado com solução de NaCl a 0,9% e cortado em pequenos pedaços (2 cm). Em seguida, os tecidos foram homogeneizados, centrifugados e uma alíquota foi reservada para a dosagem de proteínas totais. O homogenato foi incubado a 37 °C por 10 minutos em solução tampão de maleato (pH 6,0) com os substratos: maltose, sacarose e lactose na concentração de 0,11 M. As atividades das enzimas maltase, sacarase e lactase foram determinadas pelo método de glicose oxidase (método colorimétrico) e lido em espectrofotômetro a 500 nm. A atividade específica foi definida como atividade enzimática (U)

por mg de proteína (correspondente a quantidade de enzima que catalisa 1 micromol por minuto). A concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951).

4.3.7 Análise dos dados e testes estatísticos

Para a análise estatística, os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Considerando que o delineamento experimental envolveu filhotes provenientes de diferentes matrizes, adotou-se um modelo estatístico que controla o efeito de ninhada. Assim, para os dados paramétricos, empregou-se uma ANOVA nested (Análise de Variância Hierárquica), na qual os indivíduos estão aninhados (nested) dentro de cada matriz, e as matrizes estão distribuídas nos quatro grupos experimentais. Quando identificadas diferenças significativas, aplicou-se o teste post hoc de Tukey. O nível de significância adotado em todas as análises foi $p < 0,05$. As análises foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism, versão 9.0.

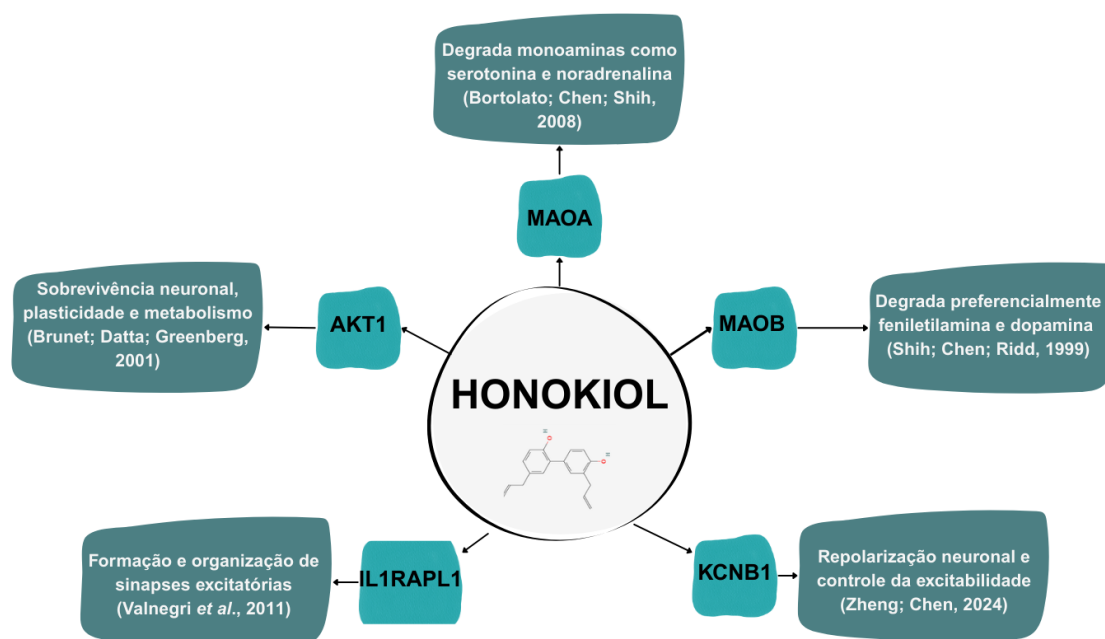
5 RESULTADOS

5.1 Estudo *in silico*

5.1.1 Alvos moleculares do honokiol

Os alvos previstos para o honokiol foram monoamina oxidase A (MAOA), monoamina oxidase B (MAOB), proteína quinase 1 (AKT1), Canal de Potássio Regulável por Voltagem, Subfamília B, Membro 1 e Proteína Semelhante ao Receptor Acessório da Interleucina-1, Tipo 1.

Figura 7 - Alvos moleculares do honokiol.



Fonte: Adaptado por Brunet, Datta e Greenberg (2001); Bortolato, Chen e Shih (2008); Shih, Chen e Ridd (1999); Valnegri *et al.* (2011); e Zheng e Chen (2024).

5.1.2 Análise de interações proteína-proteína e vias funcionais

A análise da rede de interação proteína-proteína (PPI) revelou diferentes módulos funcionais centrados nos alvos MAOA, MAOB, AKT1, IL1RAPL1 e KCNB1, evidenciando a inserção dessas proteínas em vias biológicas distintas, porém complementares.

As proteínas A (MAOA) e B (MAOB) demonstram redes altamente interconectadas envolvendo enzimas-chave do metabolismo das monoaminas, como COMT, DDC, DBH, ALDH2 e CYP2D6, apresentando altos escores de confiança, indicando forte integração

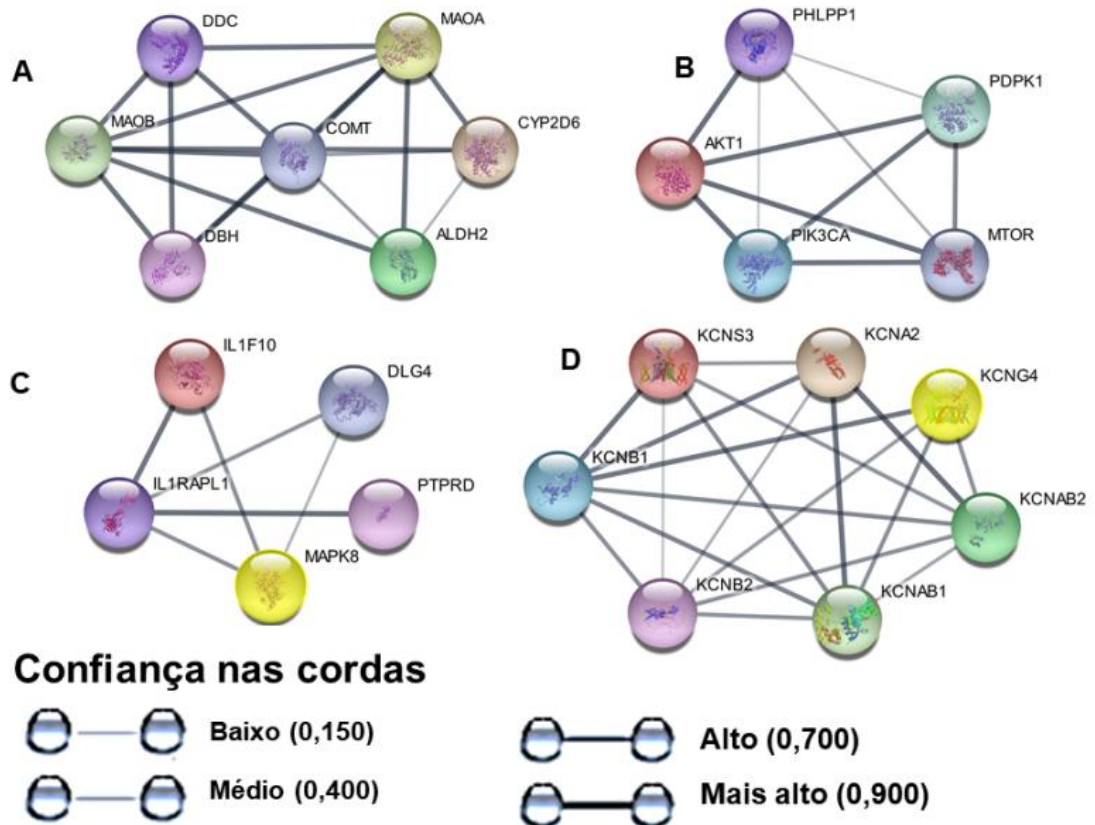
funcional (Figura 8A).

A rede de interações centrada na proteína AKT1 evidenciou forte associação com componentes-chave da via PI3K/AKT/mTOR, incluindo PIK3CA, MTOR, PDPK1 e PHLPP1, os quais apresentaram interações de alta confiança, indicando uma organização funcional altamente conservada e biologicamente relevante entre esses alvos (Figura 8B).

As interações centradas na proteína IL1RAPL1 apresentam envolvimento com proteínas relacionadas à organização sináptica e à sinalização inflamatória/neural, como DLG4, MAPK8 e PTPRD, apresentaram interações de alta confiança (Figura 8C).

A rede de interações da KCNB1, envolvendo principalmente canais de potássio voltagem-dependentes, como KCNB2, KCNA2, KCNS3, KCNAB1, KCNAB2 e KCNG4 apresentaram interações de alta confiança (Figura 8D).

Figura 8 – Interação proteína-proteína (PPI), KEGG e Ontologia Gênica (GO: *Biological Process*).



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Rede de interação dos alvos moleculares selecionados. As redes foram geradas usando o STRING e visualizadas no Cytoscape, e KEGG e Ontologia Gênica (GO: *Biological Process*) foram obtidos na plataforma STRING.

5.1.3 Análise de interações proteína-proteína e vias funcionais

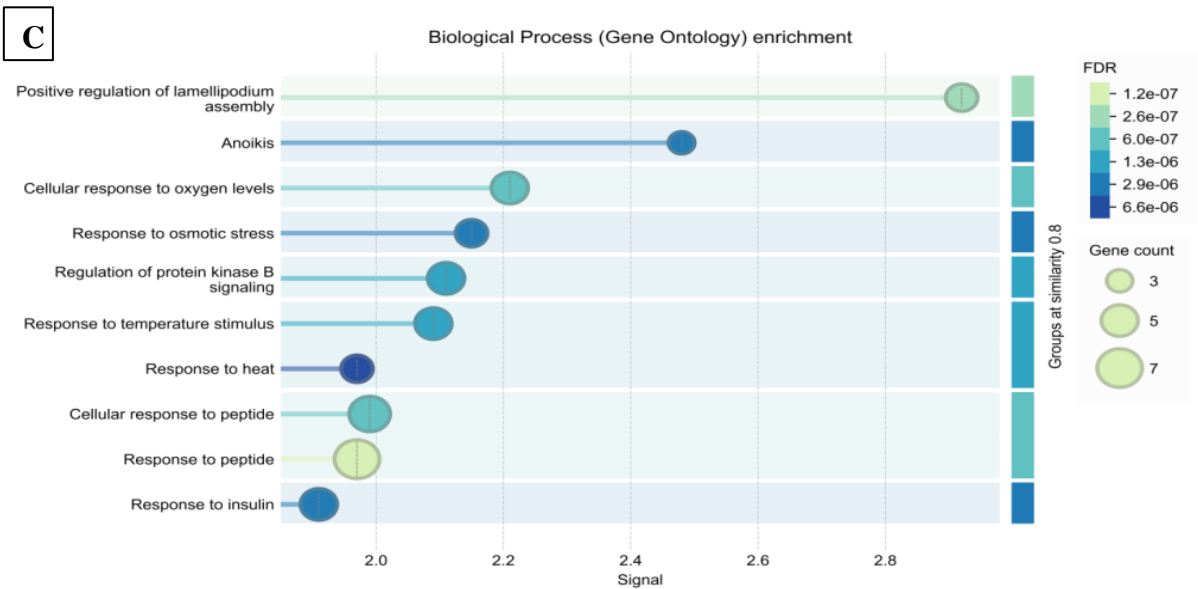
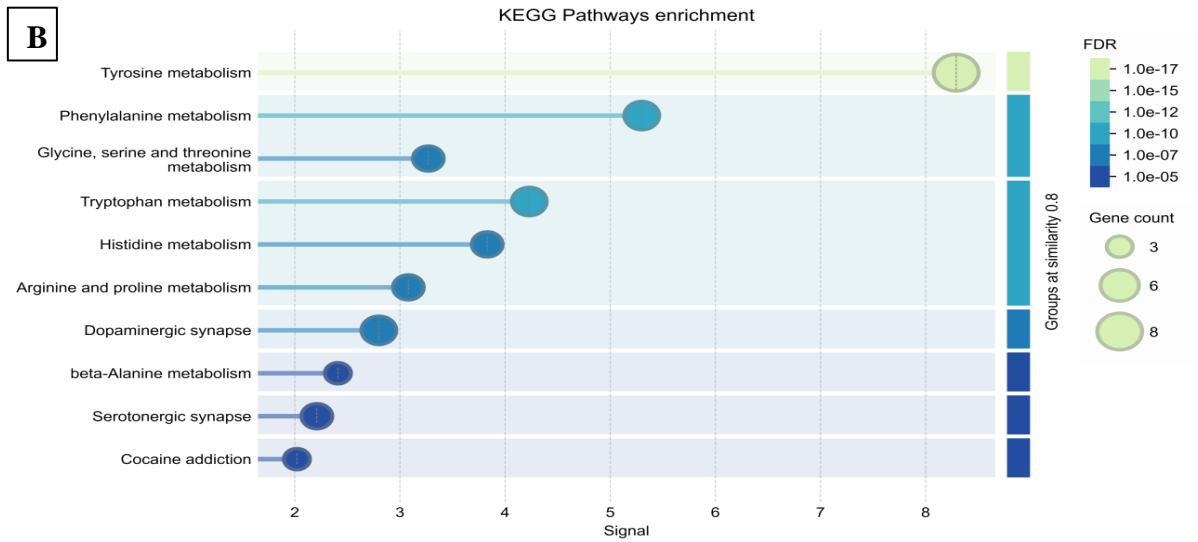
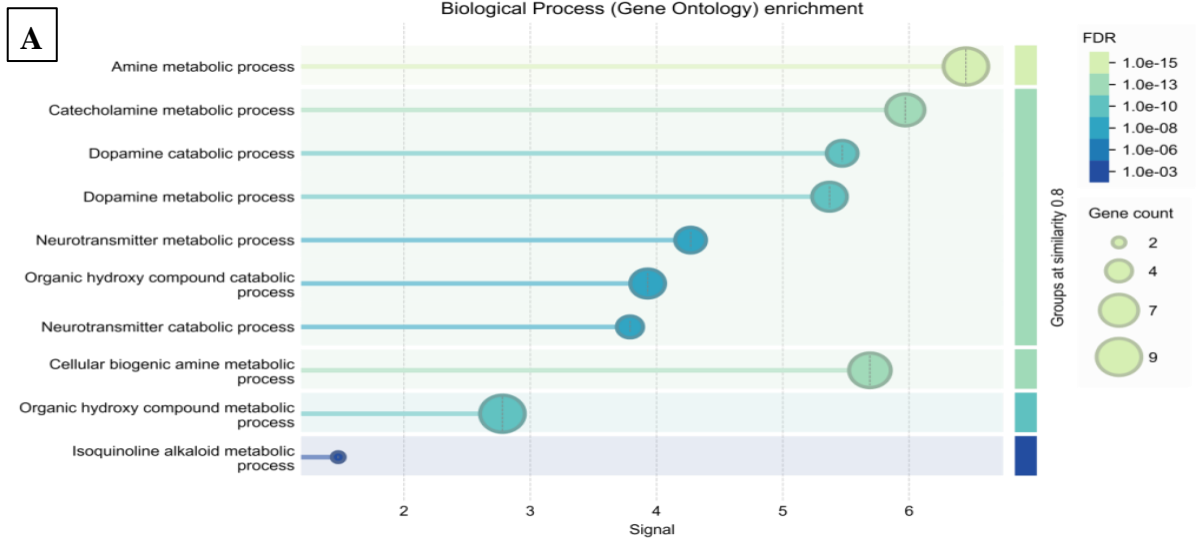
A MAOA e MAOB evidenciam o enriquecimento de processos biológicos diretamente relacionados ao metabolismo de aminas biogênicas e catecolaminas, incluindo metabolismo de dopamina, noradrenalina e outros neurotransmissores monoaminérgicos. Observa-se também a participação em processos catabólicos de neurotransmissores e compostos nitrogenados, indicando forte envolvimento dessas enzimas na regulação da neurotransmissão e da homeostase neuroquímica. O baixo valor de FDR associado aos termos reforça a robustez estatística da associação desses genes com vias metabólicas críticas do sistema nervoso central, especialmente aquelas relacionadas ao controle do humor, comportamento e resposta ao estresse (Figura 9A-B).

O enriquecimento de processos ligados a AKT1 envolve à sinalização intracelular, resposta a estímulos externos e regulação da sobrevivência celular. Destacam-se vias relacionadas à resposta a estresse oxidativo, regulação de quinases proteicas e homeostase metabólica. No enriquecimento por vias KEGG, observa-se associação com a via PI3K-Akt, longevidade celular, resistência à insulina e senescência celular, confirmando o papel central do AKT1 como um nó regulador de sobrevivência, metabolismo e plasticidade celular (Figura 9C-D).

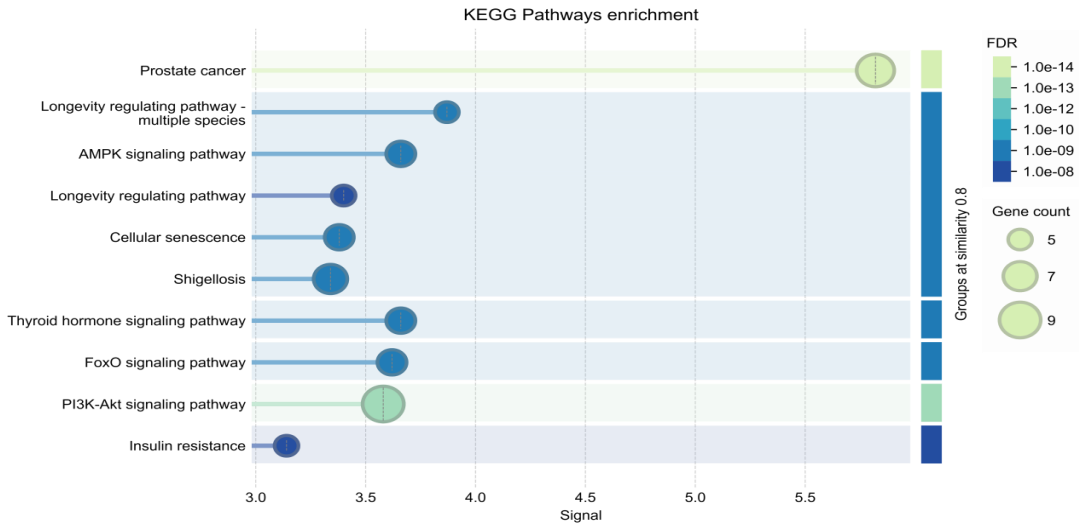
A IL1RAPL1 está associada a processos de adesão sináptica, organização da sinapse e montagem pré e pós-sináptica. Há enriquecimento significativo em termos relacionados à organização da densidade pós-sináptica e regulação da montagem da sinapse, evidenciando seu papel estrutural e funcional na formação e manutenção de circuitos neurais (Figura 9E).

O enriquecimento de processos da KCNB1 está relacionado à homogeneização proteica, regulação do transporte transmembrana e exportação de íons potássio pela membrana plasmática. Além disso, observa-se associação com regulação de secreção de catecolaminas, organização de complexos proteicos e localização de organelas na membrana (Figura 9F). As proteínas KCNB1 e IL1RAPL1, não possuíam o enriquecimento das vias KEGG.

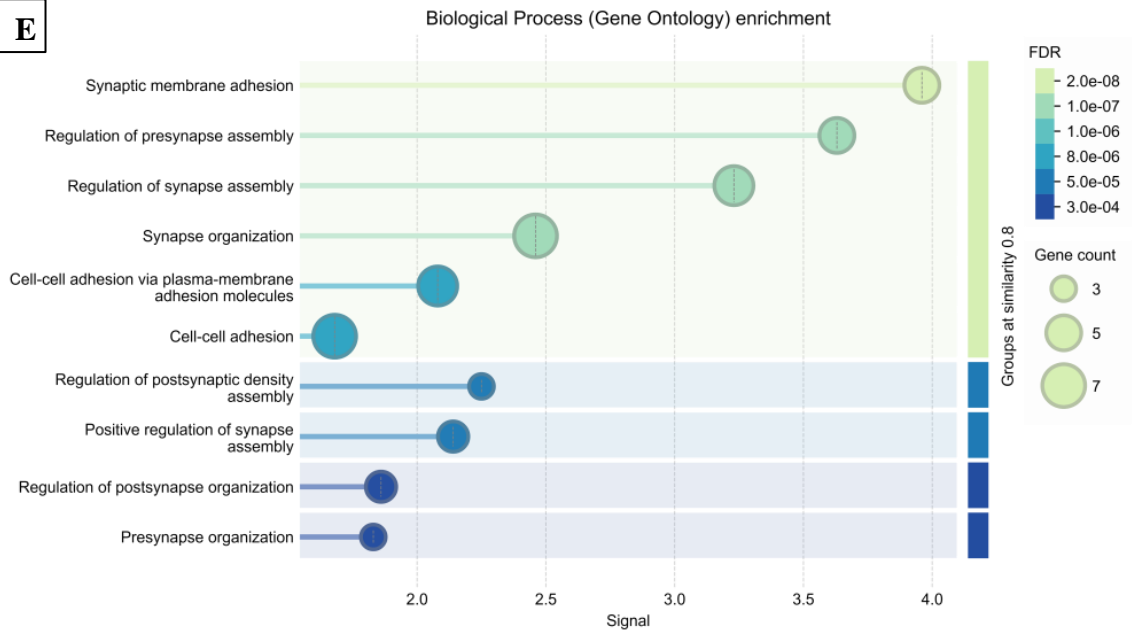
Figura 9 - KEGG e Ontologia Gênica (GO: *Biological Process*).



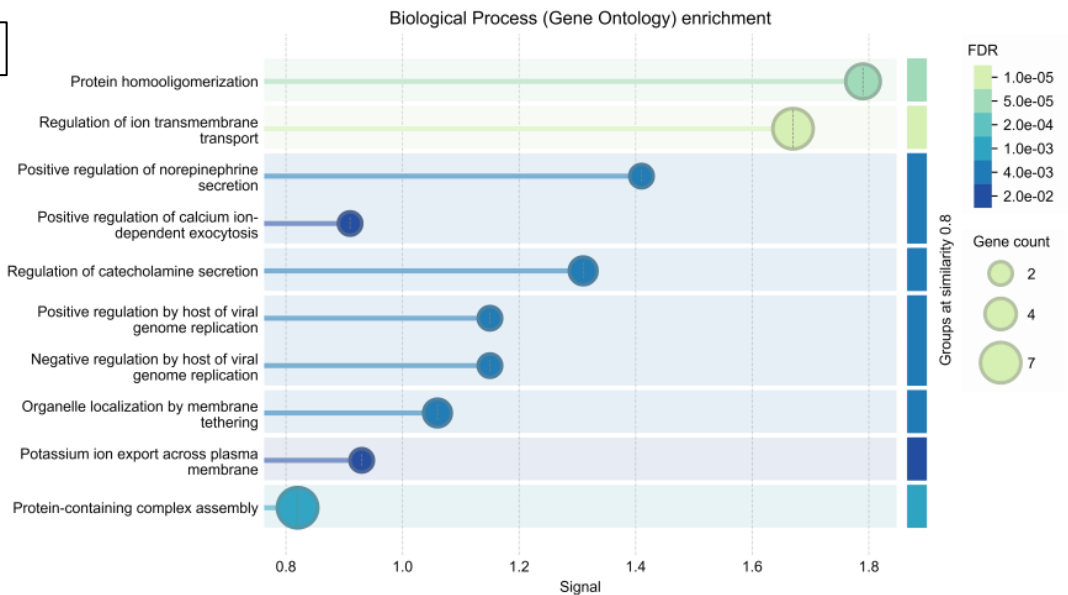
D



E



F



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Rede de interação dos alvos moleculares selecionados KEGG e Ontologia Gênica (GO: *Biological Process*) foram obtidos na plataforma STRING.

5.1.4 Predição de farmacocinética e toxicidade *in silico*

A predição *in silico* do perfil farmacocinético do honokiol indica boa absorção intestinal. Além disso, não é inibido pela P-glicoproteína (I e II). No que se refere à distribuição, o honokiol apresentou baixa ligação a proteínas plasmáticas. A fração não ligada ao plasma também foi classificada como excelente. O volume de distribuição encontra-se fora do intervalo de referência ideal. Quanto à metabolização, o honokiol demonstrou potencial de interação metabólica, com predição positiva para as isoenzimas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4, indicando que o composto pode sofrer metabolismo hepático. Não foi observada interação com a CYP2D6. Em relação à excreção, o honokiol apresentou depuração plasmática moderada. O tempo de meia-vida foi classificado como curto (Tabela 2).

No perfil de toxicidade, o honokiol foi classificado como inativo para hepatotoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e toxicidade respiratória, sugerindo baixo risco toxicológico sistêmico. A DL₅₀ predita foi de 1649 mg/kg, enquadrando o composto na Classe IV de toxicidade, caracterizada por toxicidade moderada, compatível com substâncias de uso potencialmente seguro em doses terapêuticas (Tabela 2).

Tabela 2 – Predição da atividade farmacocinética e toxicidade do honokiol ^{a,b,c}.

(Continua)

| Propriedades farmacocinéticas | Honokiol | Valores de referência |
|-------------------------------------|----------|--|
| Absorção | | |
| Absorção intestinal (%) | 92,564 | > 30% bem absorvido < 30% mal absorvido |
| Inibidor P-glycoprotein I | Não | Não |
| Inibidor P-glycoprotein II | Não | Não |
| Distribuição | | |
| Ligação a proteínas plasmáticas (%) | 37.6 | ≤ 90%: excelente > 90%: ruim |
| Volume de distribuição (L/kg) | -0.528 | 0,04-20: excelente; Fora do intervalo: ruim |
| Fração não ligada ao plasma (FU%) | 55.1 | > 5%: excelente < 5%: ruim |
| Metabolismo | | |
| CYP1A2 | Sim | Não |
| CYP2C19 | Sim | Não |
| CYP2C9 | Sim | Não |
| CYP2D6 | Não | Não |
| CYP3A4 | Sim | Não |
| Excreção | | |
| Liberação total log (ml/min/kg) | 0,333 | ----- |

Tabela 2 – Predição da atividade farmacocinética e toxicidade do honokiol ^{a,b,c}.

(Conclusão)

| Propriedades farmacocinéticas | Honokiol | Valores de referência |
|---|----------|---|
| Excreção | | |
| Depuração de plasma (CL, ml/min/kg) | 13,722 | >15 alta 5-15 moderada < 5 baixa |
| Tempo de meia vida (T _{1/2} , horas) | 1,054 | ultracurta: < 1h curta: 1-4 h curta/ intermediária: 4-8 h longa: > 8 h |
| Toxicidade | | |
| Hepatotoxicidade | Inativo | Inativo |
| Neurotoxicidade | Inativo | Inativo |
| Nefrotoxicidade | Inativo | Inativo |
| Cardiotoxicidade | Inativo | Inativo |
| Toxicidade respiratória | Inativo | Inativo |
| Predição da DL 50% (Mg/Kg) | 1649 | ----- |
| Predição classe de toxicidade | Classe 4 | Classe I: LD ₅₀ ≤ 5 mg/kg Classe II: LD ₅₀ entre 5 e 50 mg/kg Classe III: LD ₅₀ entre 50 e 300 mg/kg Classe IV: LD ₅₀ entre 300 e 2000 mg/kg Classe V: LD ₅₀ entre 2000 e 5000 mg/kg Classe VI: LD ₅₀ > 5000 mg/kg |

Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: O código SMILE do honokiol foi submetido às plataformas de predição pkCSM e ADMETlab 3.0 para avaliar as propriedades farmacológicas. ^aPires; Blundell e Ascher (2015); ^bFu *et al.* (2024), e para a toxicidade foi submetido à plataforma ProTOX3.0; ^cBanerjee *et al.* (2024).

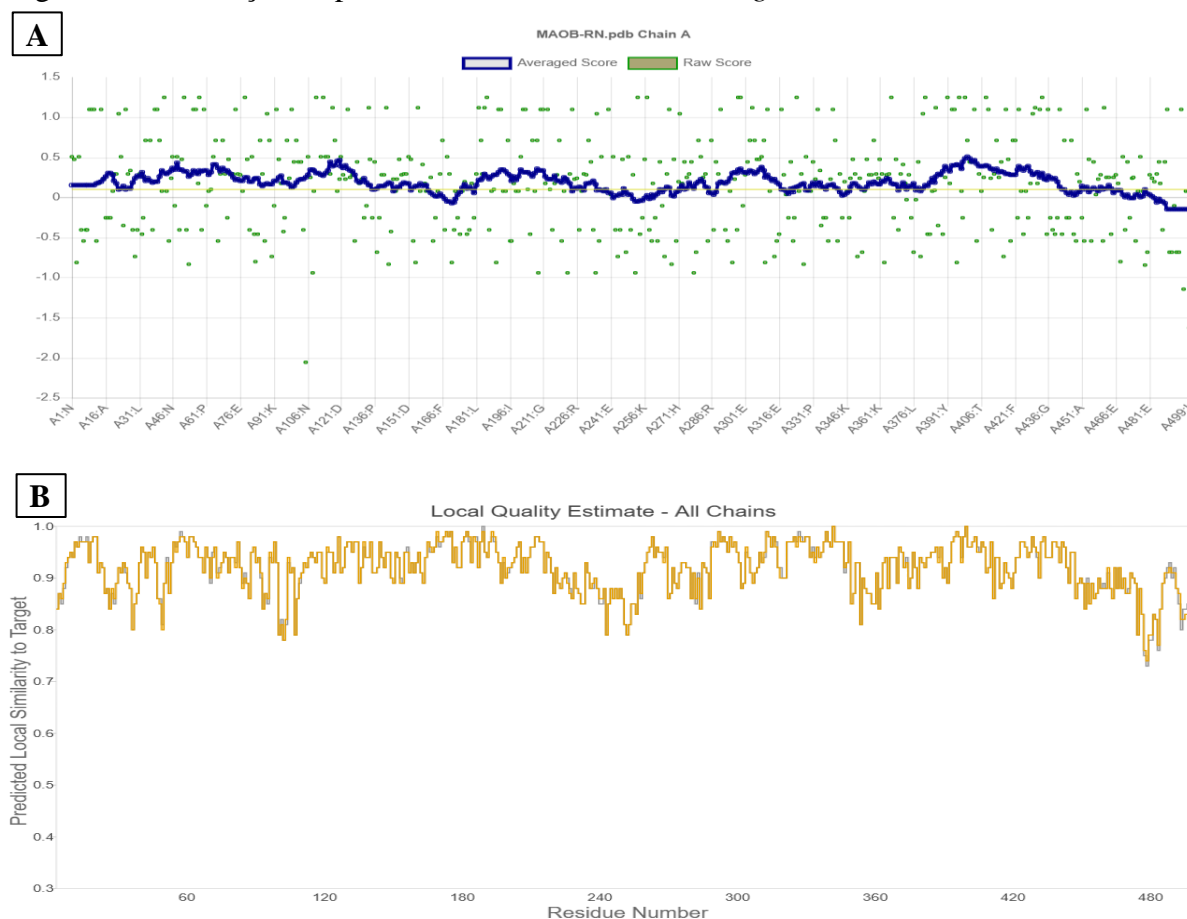
5.1.5 Validação de proteínas e acoplamento molecular do honokiol com alvos selecionados

Para a MAOA, há estrutura disponível tanto para *Homo sapiens* (2Z5X) quanto para *Rattus norvegicus* (1O5W). Em relação à MAOB, existe estrutura resolvida apenas para humanos (1OJJ). Para a proteína AKT1, observa-se a disponibilidade de estrutura apenas para *Homo sapiens* (3OCB). Já a proteína KCNB1 apresenta estruturas disponíveis para ambas as espécies, com os códigos 7RE5 para humanos e 8SD3 para ratos. A proteína IL1RAPL1 possui estrutura disponível apenas para *Homo sapiens* (4M92). As proteínas MAOB, AKT1 e

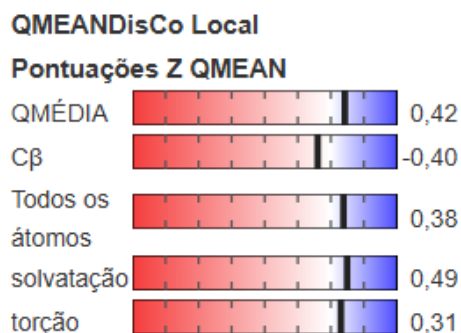
IL1RAPL1 de *Rattus norvegicus* não possuem estrutura experimental, sendo necessário modelar.

A validação estrutural do modelo da MAOB indicou elevada confiabilidade local e global, com a maioria dos resíduos apresentando escores próximos ou superiores a zero e valores de similaridade estrutural predominantemente entre 0,85 e 1,0. A análise global pelo índice QMEAN demonstrou parâmetros satisfatórios (QMEAN = 0,42; C β = -0,40; all-atom = 0,38; solvatação = 0,49; torção = 0,31), confirmando a boa coerência geométrica, energética e conformacional do modelo. O gráfico de Ramachandran revelou que 93,6% dos resíduos encontram-se em regiões mais favoráveis e 4,9% em regiões adicionalmente permitidas, com apenas uma fração mínima em regiões desfavoráveis. Adicionalmente, a comparação com estruturas experimentais do PDB não redundante mostrou Z-score normalizado inferior a 1, posicionando o modelo dentro da distribuição de estruturas resolvidas experimentalmente, o que reforça sua robustez e adequação para estudos posteriores de docking molecular e interações fármaco-alvo (Figura 10).

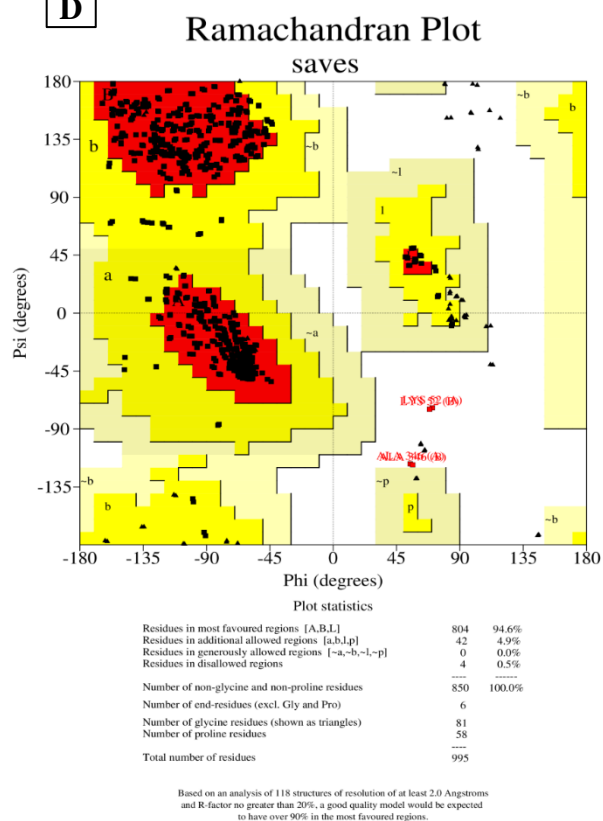
Figura 10 - Validação da proteína MAOB de *Rattus norvegicus*.



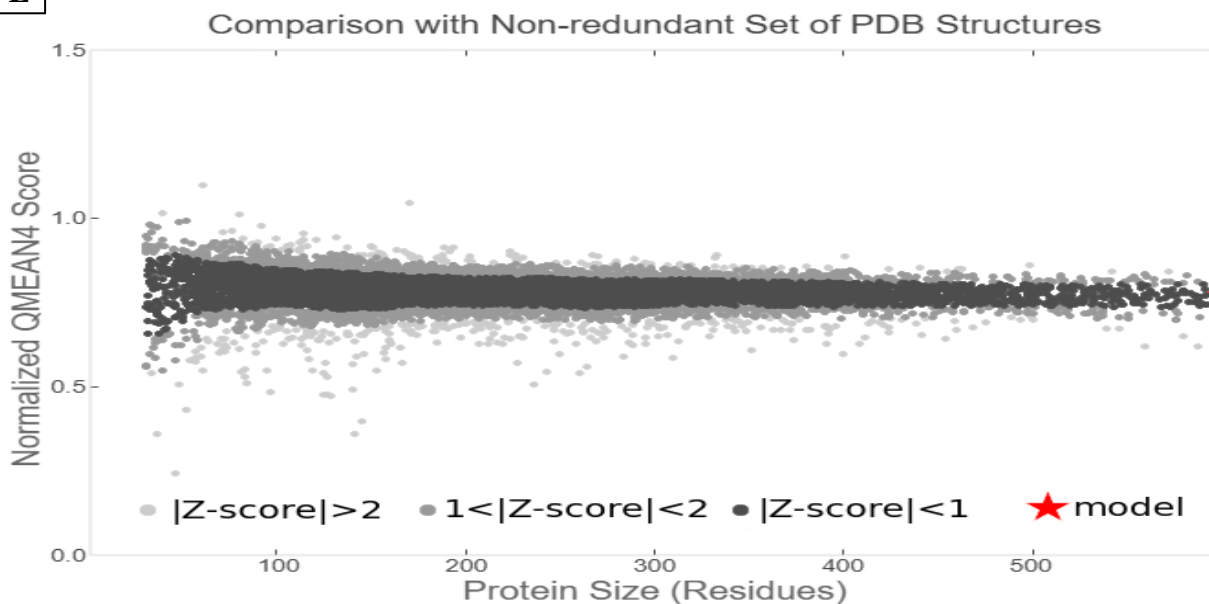
C



D



E



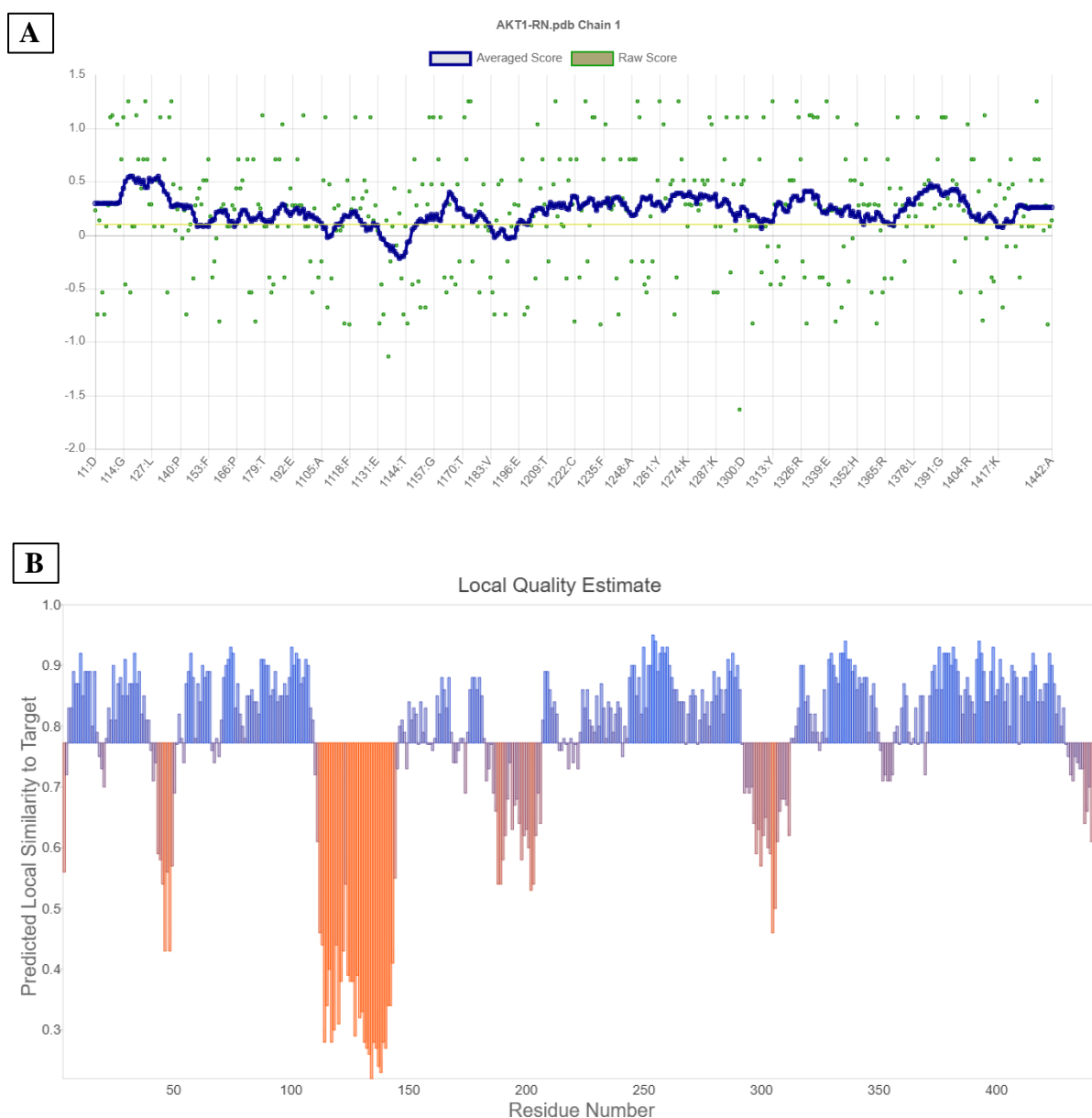
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Avaliação utilizando o Verify3D demonstrando a qualidade do dobramento local em relação ao ambiente estrutural esperado para cada resíduo; (B) Validação estrutural com pontuação QMEANDisCo Local gerada pela plataforma SwissModel; (C) Validação estrutural com pontuação Z QMEAN gerada pela plataforma SwissModel; (D) Avaliação da qualidade estereoquímica por meio de gráficos de Ramachandran; (E) Validação estrutural com pontuação QMEAN4 normalizada gerada pela plataforma SwissModel.

A validação estrutural da AKT1 indicou elevada confiabilidade tanto local quanto global, com a maior parte dos resíduos exibindo escores positivos ou próximos de zero, além

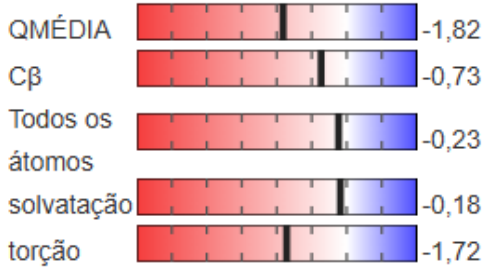
de padrões de similaridade estrutural predominantemente elevados ao longo da cadeia. A análise global pelo índice QMEAN revelou parâmetros consistentes (QMEAN = $-1,82$; $C\beta = -0,73$; all-atom = $-0,23$; solvatação = $-0,18$; torção = $-1,72$). O gráfico de Ramachandran mostrou que mais de 95% dos resíduos estão posicionados nas regiões mais favoráveis e adicionalmente permitidas, com apenas uma proporção mínima em regiões desfavoráveis, indicando boa estereoquímica do modelo. Complementarmente, a comparação com o conjunto não redundante de estruturas do PDB exibiu Z-score normalizado inferior a 1, situando o modelo dentro da distribuição esperada para proteínas resolvidas experimentalmente (Figura 11).

Figura 11 - Validação da proteína AKT1 de *Rattus norvegicus*.



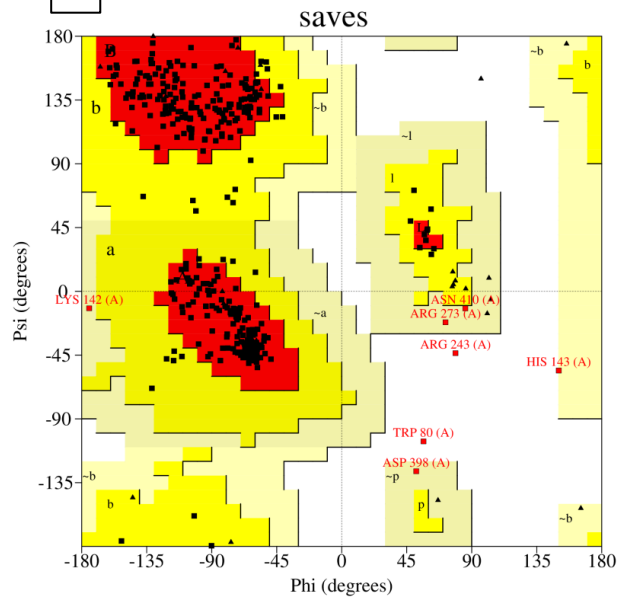
C

Pontuações Z QMEAN



D

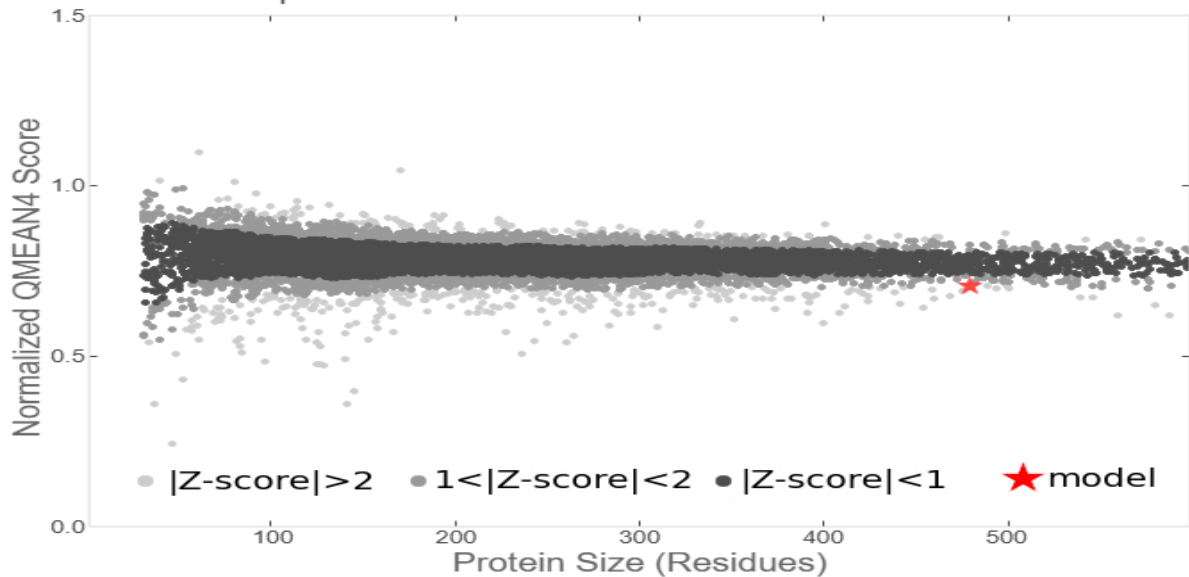
Ramachandran Plot



Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

E

Comparison with Non-redundant Set of PDB Structures



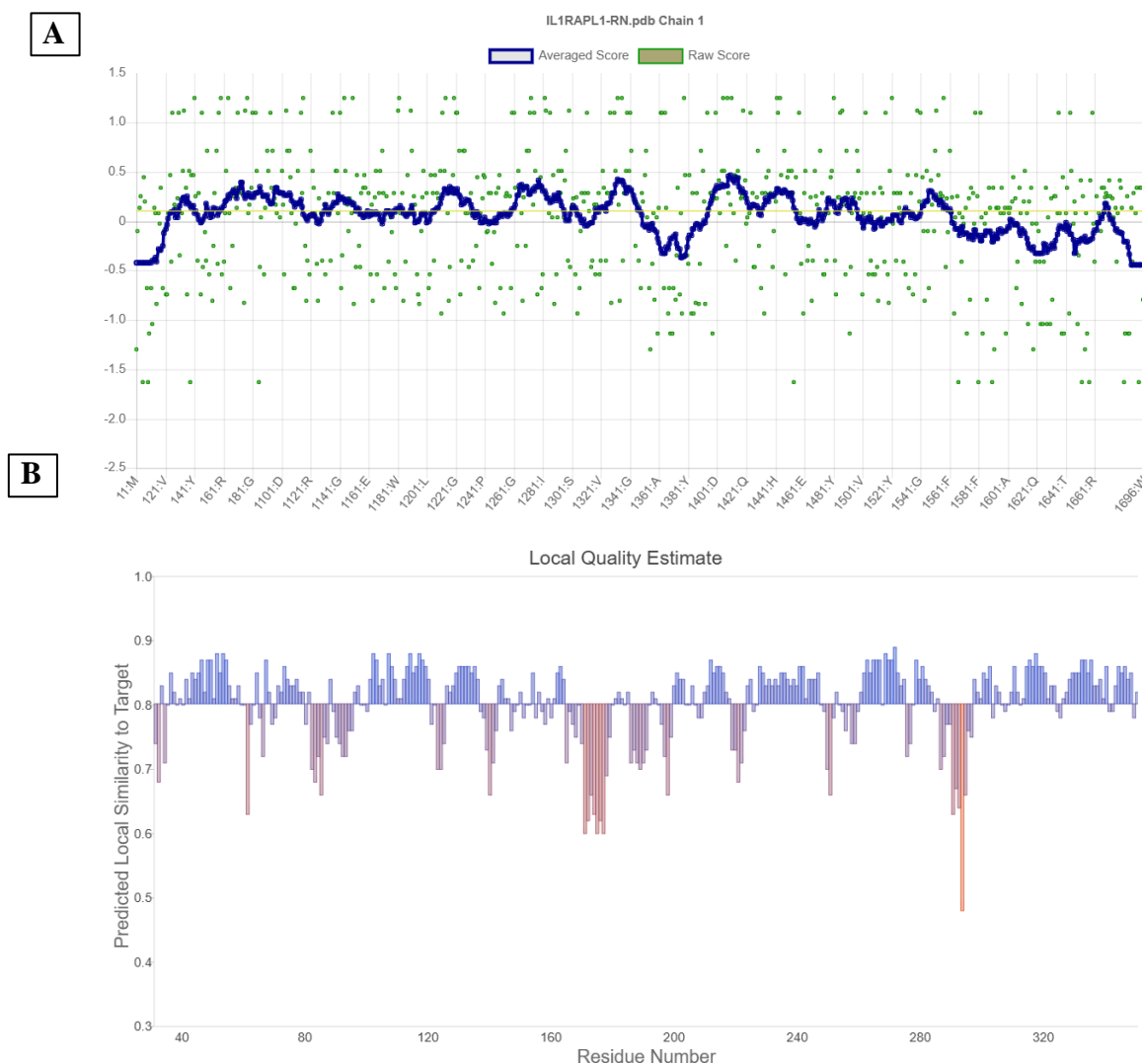
Fonte: Elaborado pela autora.

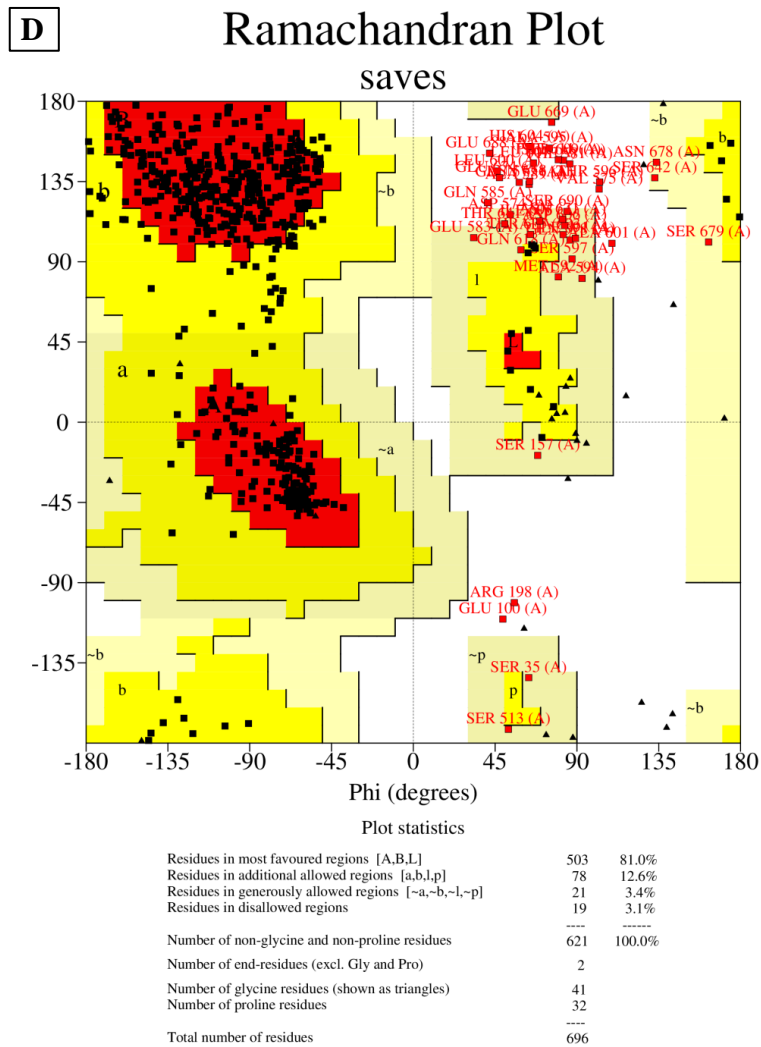
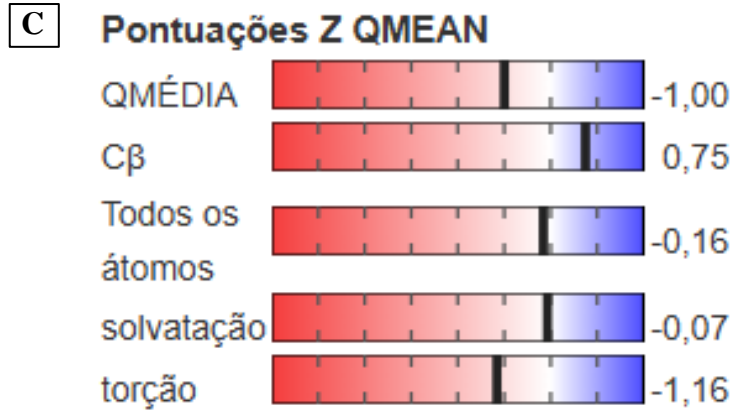
Legenda: (A) Avaliação utilizando o Verify3D demonstrando a qualidade do dobramento local em relação ao ambiente estrutural esperado para cada resíduo; (B) Validação estrutural com pontuação QMEANDisCo Local gerada pela plataforma SwissModel; (C) Validação estrutural com pontuação Z QMEAN gerada pela plataforma SwissModel; (D) Avaliação da qualidade estereoquímica por meio de gráficos de Ramachandran; (E) Validação estrutural com pontuação QMEAN4 normalizada gerada pela plataforma SwissModel.

A validação estrutural do modelo indicou elevada confiabilidade local e global, com a maior parte dos resíduos apresentando escores dentro da faixa aceitável, evidenciada pela

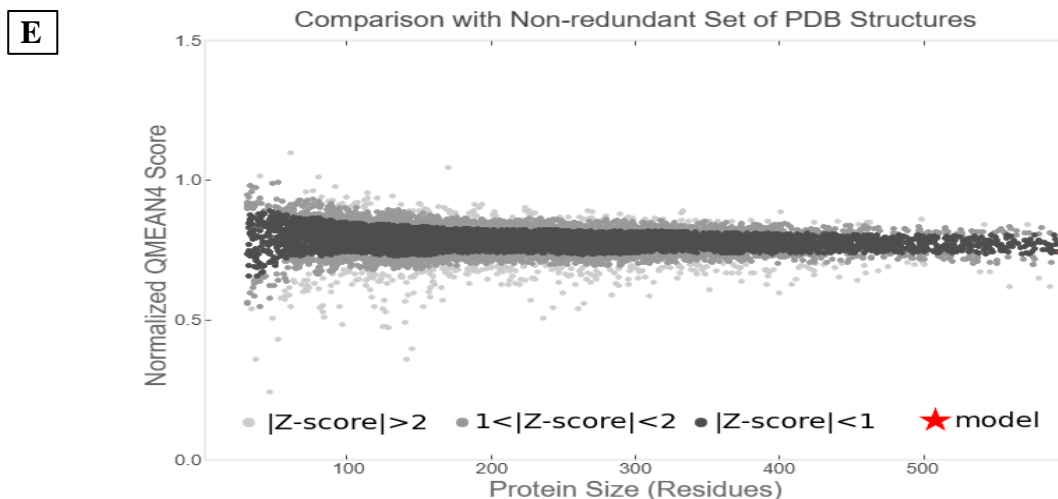
variação da qualidade local entre aproximadamente $-0,5$ e $0,5$ e pela distribuição homogênea dos escores individuais ao longo da cadeia. A similaridade estrutural local também se mostrou consistente, com valores predominantemente superiores a $0,7-0,8$, indicando boa correspondência do modelo com estruturas de referência. A avaliação global pelo índice QMEAN demonstrou parâmetros satisfatórios (QMEAN $\approx -1,00$; $C\beta = 0,75$; all-atom $\approx -0,16$; solvatação $\approx -0,07$; torção $\approx -1,16$), refletindo boa qualidade estereoquímica e físico-química do modelo. O gráfico de Ramachandran revelou que 81,0% dos resíduos estão posicionados nas regiões mais favorecidas e 12,6% em regiões adicionalmente permitidas, com apenas 3,4% localizados em regiões não permitidas, indicando geometria conformacional adequada. Por fim, a comparação do modelo com o conjunto não redundante de estruturas do PDB evidenciou que o valor normalizado do QMEAN se encontra dentro da distribuição esperada para proteínas resolvidas experimentalmente (Figura 12).

Figura 12 - Validação da proteína IL1RAPL1 de *Rattus norvegicus*.





Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: (A) Avaliação utilizando o Verify3D demonstrando a qualidade do dobramento local em relação ao ambiente estrutural esperado para cada resíduo; (B) Validação estrutural com pontuação QMEANDisCo Local gerada pela plataforma SwissModel; (C) Validação estrutural com pontuação Z QMEAN gerada pela plataforma SwissModel; (D) Avaliação da qualidade estereoquímica por meio de gráficos de Ramachandran; (E) Validação estrutural com pontuação QMEAN4 normalizada gerada pela plataforma SwissModel.

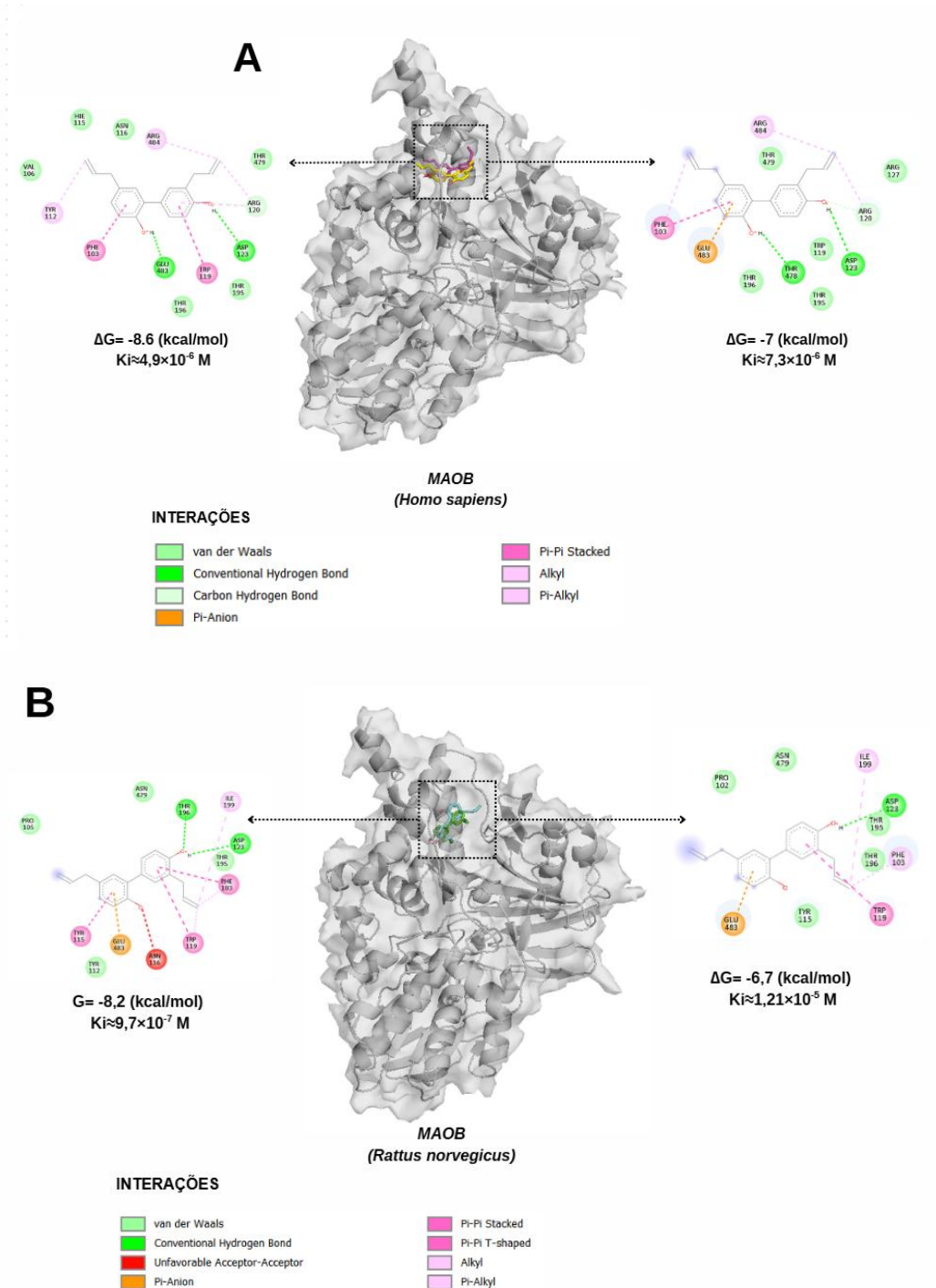
Os resultados do *docking* molecular entre o ligante e a enzima MAOA (Monoamina Oxidase A) de *Homo sapiens*, evidenciando a conformação de ligação em quatro sítios ativo. Três poses principais de ligação foram destacadas, com energias de ligação variando de $-6,5$ a $-7,3$ kcal/mol. A melhor conformação apresentou $\Delta G = -7,3$ kcal/mol, correspondendo a um K_i de $4,4 \times 10^{-6}$ M. As outras duas conformações exibiram $\Delta G = -6,7$ kcal/mol ($K_i = 1,21 \times 10^{-5}$ M) e $\Delta G = -6,5$ kcal/mol ($K_i = 1,7 \times 10^{-5}$ M). As interações mostram que a estabilidade do complexo é sustentada por uma combinação de ligações de hidrogênio convencionais e de carbono, interações de van der Waals, além de interações hidrofóbicas do tipo π - π empilhadas, π - π em T, π -ânion, π -alquil e alquil. Entre os resíduos mais relevantes envolvidos no reconhecimento molecular destacam-se TYR121, PHE112, GLU492, HIS458 (Figura 13A).

Os resultados do *docking* molecular do ligante com a enzima MAOA de *Rattus norvegicus*, evidenciando diferentes poses de ligação no sítio ativo. As melhores poses apresentaram valores de ΔG variando entre $-5,9$ e $-7,0$ kcal/mol, com K_i entre $1,0 \times 10^{-5}$ e $5,7 \times 10^{-5}$ M. A conformação mais estável foi aquela com $\Delta G = -7,0$ kcal/mol e $K_i = 1,21 \times 10^{-5}$ M. As representações bidimensionais das interações mostram que a estabilidade do complexo é sustentada principalmente por interações hidrofóbicas do tipo π - π empilhadas, π - π em T, π -ânion, π -alquil e alquil, além de interações de van der Waals. Entre os resíduos mais frequentemente envolvidos no reconhecimento molecular destacam-se TYR386, PHE314, TYR310, LYS311, GLU312, GLN884 e VAL390 (Figura 13B).

Os resultados do docking molecular do ligante com a enzima MAOB (*Homo sapiens*) observa-se que o ligante se acomoda de forma estável na região catalítica da MAOB, apresentou $\Delta G = -8,6$ kcal/mol e $K_i = 4,9 \times 10^{-6}$ M, indicando alta afinidade pelo alvo molecular. A segunda pose também foi energeticamente favorável, com $\Delta G = -7,0$ kcal/mol e $K_i = 7,3 \times 10^{-6}$ M. A estabilidade do complexo é sustentada por uma combinação de ligações de hidrogênio convencionais e de carbono, interações de van der Waals, além de interações hidrofóbicas do tipo π - π empilhadas, π -ânion, alquil e π -alquil. Entre os principais resíduos envolvidos na ancoragem do ligante ao sítio ativo destacam-se PHE103, TYR112, GLU483, ASP123, TRP478, THR195, THR196, ARG120, ARG 484 e THR479 (Figura 14A).

Os resultados do docking molecular do ligante com a enzima MAOB de *Rattus norvegicus*, evidenciando duas conformações principais de ligação no sítio catalítico, com seus respectivos valores de energia livre de ligação (ΔG), constantes de inibição (K_i). A conformação mais estável energeticamente apresentou $\Delta G = -8,2$ kcal/mol e $K_i = 9,7 \times 10^{-7}$ M, indicando alta afinidade do ligante pela MAOB murina. A segunda pose também foi favorável, com $\Delta G = -6,7$ kcal/mol e $K_i = 1,21 \times 10^{-5}$ M. As análises das interações 2D demonstram que a estabilidade do complexo é sustentada por uma combinação de interações de van der Waals, ligações de hidrogênio convencionais, interações π - π empilhadas, π - π em T, π -ânion, alquil e π -alquil. Também foi identificada uma interação desfavorável do tipo acceptor-acceptor. Entre os resíduos mais relevantes envolvidos na ancoragem destacam-se GLU483, ASP123, TRP119, TYR112, PHE103, THR195, THR196, ILE199, ASN479, PRO102 e TYR115 (Figura 14B).

Figura 14 - Análise de acoplamento molecular e perfil de interação - MAOB.



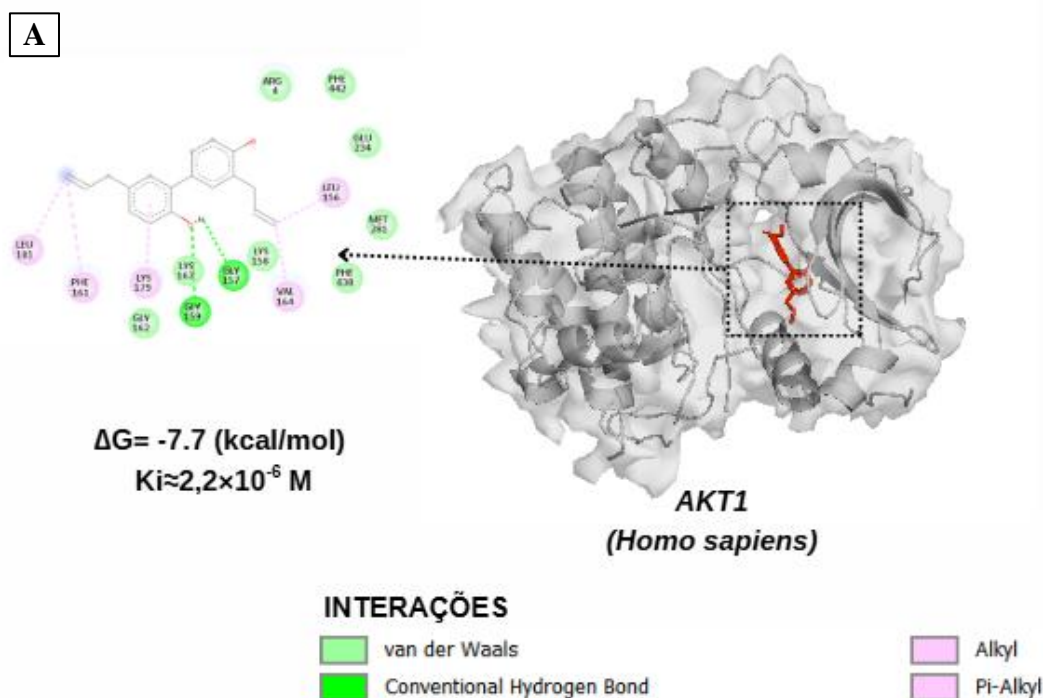
Fonte: Elaborado pela autora.

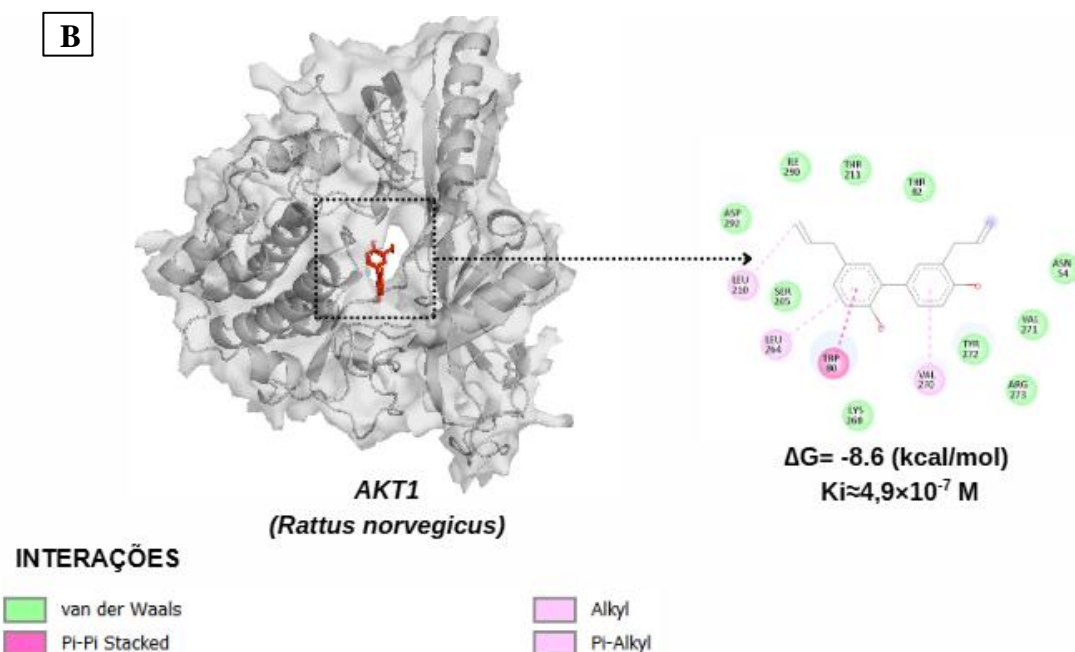
Legenda: Estrutura da MAOB de *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* predita e modo de ligação honokiol usando o software AutoDock Vina 1.5.7. A estrutura planar foi gerado pelo software Discovery, enquanto a estrutura 3D foi preparada com software Pymol, respectivamente. A afinidade de ligação (ΔG , kcal/mol) e coeficiente de inibição (K_i) para cada complexo ligante-proteína. (A) e (B) Visualização tridimensional das melhores poses de acoplamento de cada ligante no sítio ativo da proteína, obtidas usando o PyMOL, destacando a orientação dos compostos dentro da cavidade de ligação e os tipos de ligação entre os resíduos de aminoácidos e os átomos do ligante.

O ligante apresentou energia livre de ligação $\Delta G = -7,7$ kcal/mol e constante de inibição $K_i \approx 2,2 \times 10^{-6}$ M, indicando boa afinidade e estabilidade do complexo ligante–AKT1. A estabilidade do complexo é sustentada principalmente por ligações de hidrogênio convencionais e interações de van der Waals, além de contribuições de interações hidrofóbicas do tipo alquil e π -alquil. Entre os resíduos envolvidos na ancoragem do ligante destacam-se LYS156, LYS158, GLY159, PHE161, VAL164, LEU181, MET235, ILE234 e GLU234 (Figura 15A).

A interação do ligante no sítio ativo da AKT1 de *Rattus norvegicus* apresentou energia de ligação favorável ($\Delta G = -8,6$ kcal/mol) e uma constante inibitória estimada de $K_i \approx 4,9 \times 10^{-7}$ M. O ligante estabeleceu um conjunto de interações estabilizadoras, incluindo do tipo van der Waals, π - π , alquil e π -alquil com resíduos como ASP292, ILE290, THR211, THR82, ASN54, VAL271, ARG273, LEU264, ILE280, SER205, THR80, VAL270, TYR272 e THR80 (Figura 15B).

Figura 15 - Análise de acoplamento molecular e perfil de interação – AKT1.





Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Estrutura da AKT1 de *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* predita e modo de ligação honkiol usando o software AutoDock Vina 1.5.7. A estrutura planar foi gerado pelo software Discovery, enquanto a estrutura 3D foi preparada com software Pymol, respectivamente. A afinidade de ligação (ΔG , kcal/mol) e coeficiente de inibição (K_i) para cada complexo ligante-proteína. (A) e (B) Visualização tridimensional das melhores poses de acoplamento de cada ligante no sítio ativo da proteína, obtidas usando o PyMOL, destacando a orientação dos compostos dentro da cavidade de ligação e os tipos de ligação entre os resíduos de aminoácidos e os átomos do ligante.

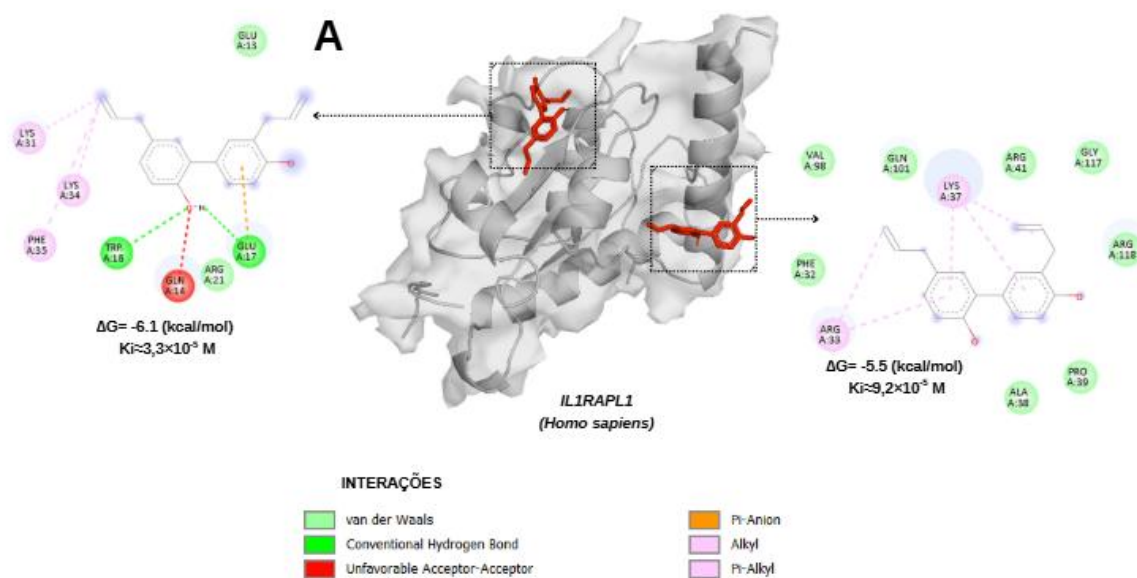
As interações moleculares entre o ligante e a proteína IL1RAPL1 de *Homo sapiens*, mostra dois sítios de ancoragem avaliada cada ampliada à esquerda e à direita. No primeiro sítio (à esquerda), o ligante estabeleceu interações do tipo van der Waals, ligação de hidrogênio convencional. A energia de ligação calculada para esse modo foi $\Delta G = -6,1$ kcal/mol, com constante inibitória estimada de $K_i \approx 3,3 \times 10^{-5}$ M. No segundo sítio (à direita), o ligante exibiu um padrão semelhante de interações hidrofóbicas, incluindo van der Waals, alkyl, π -alkyl e π -anion, envolvendo resíduos como os aminoácidos envolvidos incluem GLU431, ASN410, ARG429, TRP419, GLN421, GLU425 e LEU451. No segundo sítio, o ligante estabelece contatos com PHE551, LYS544, LYS538, ILE537, HIS540, LYS553, ILE383 e ARG554. Esse modo de interação apresentou energia de ligação de $\Delta G = -5,5$ kcal/mol, resultando em $K_i \approx 9,2 \times 10^{-5}$ M (Figura 16A).

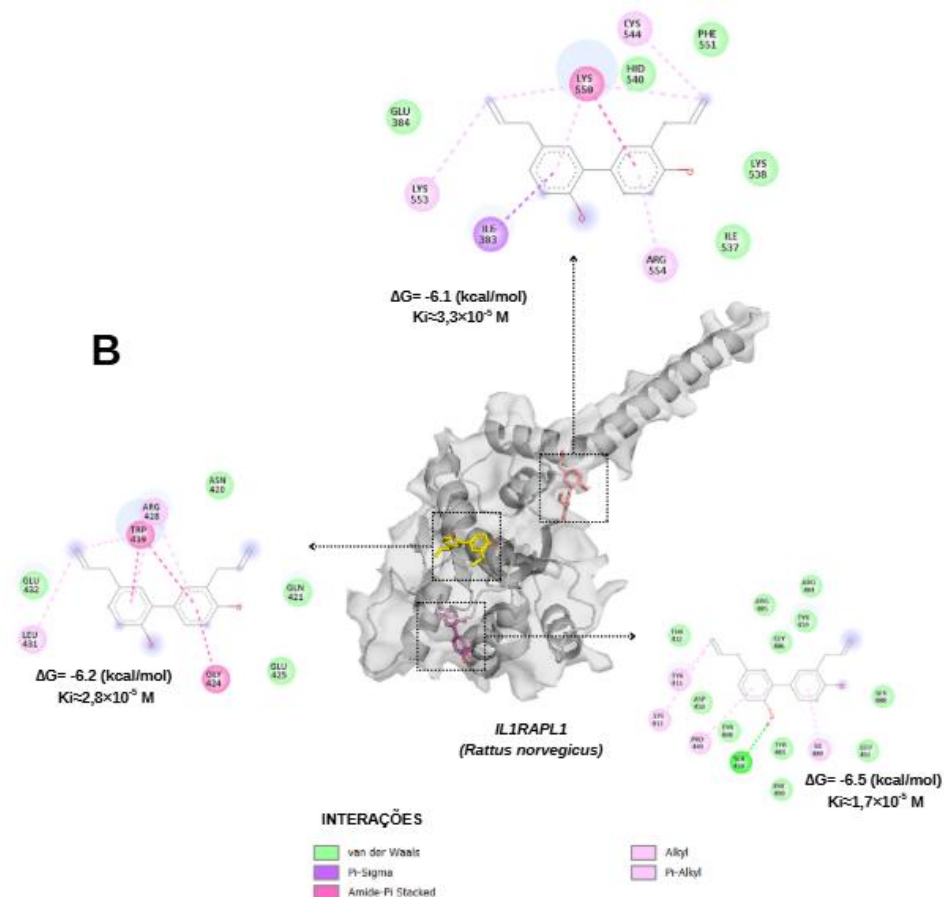
A análise de ancoragem molecular do ligante em diferentes regiões da proteína IL1RAPL1 de *Rattus norvegicus*. A estrutura tridimensional da proteína, destaca três cavidades potenciais de interação. No primeiro sítio de interação (acima), o ligante estabeleceu predominantemente interações hidrofóbicas, incluindo contatos van der Waals, π -sigma e π -alkyl com resíduos como LYS550, LYS544, HIS540, ILE383, LYS553 e ARG554. Esse modo

de ligação apresentou energia de interação de $\Delta G = -6,1$ kcal/mol e constante inibitória estimada de $K_i \approx 3,3 \times 10^{-5}$ M.

No segundo sítio (à esquerda), observou-se um conjunto de interações hidrofóbicas mais distribuídas, com destaque para contatos van der Waals, π -alkyl e empilhamento amide- π stacked envolvendo resíduos como ARG429, ASN410, GLU432, LEU451 e GLN421. A energia obtida para esse modo foi $\Delta G = -6,2$ kcal/mol, com $K_i \approx 2,8 \times 10^{-5}$ M. No terceiro sítio (à direita), o ligante exibiu novamente interações hidrofóbicas variadas, incluindo Van der Waals, alkyl e π -alkyl, envolvendo resíduos como PHE511, MET520, LEU523, ILE522, GLY519 e HIS518. Este modo de interação apresentou os melhores valores entre os três sítios avaliados, com energia de ligação de $\Delta G = -6,5$ kcal/mol e constante inibitória estimada de $K_i \approx 1,7 \times 10^{-5}$ M (Figura 16B).

Figura 16 - Análise de acoplamento molecular e perfil de interação - IL1RAPL1.





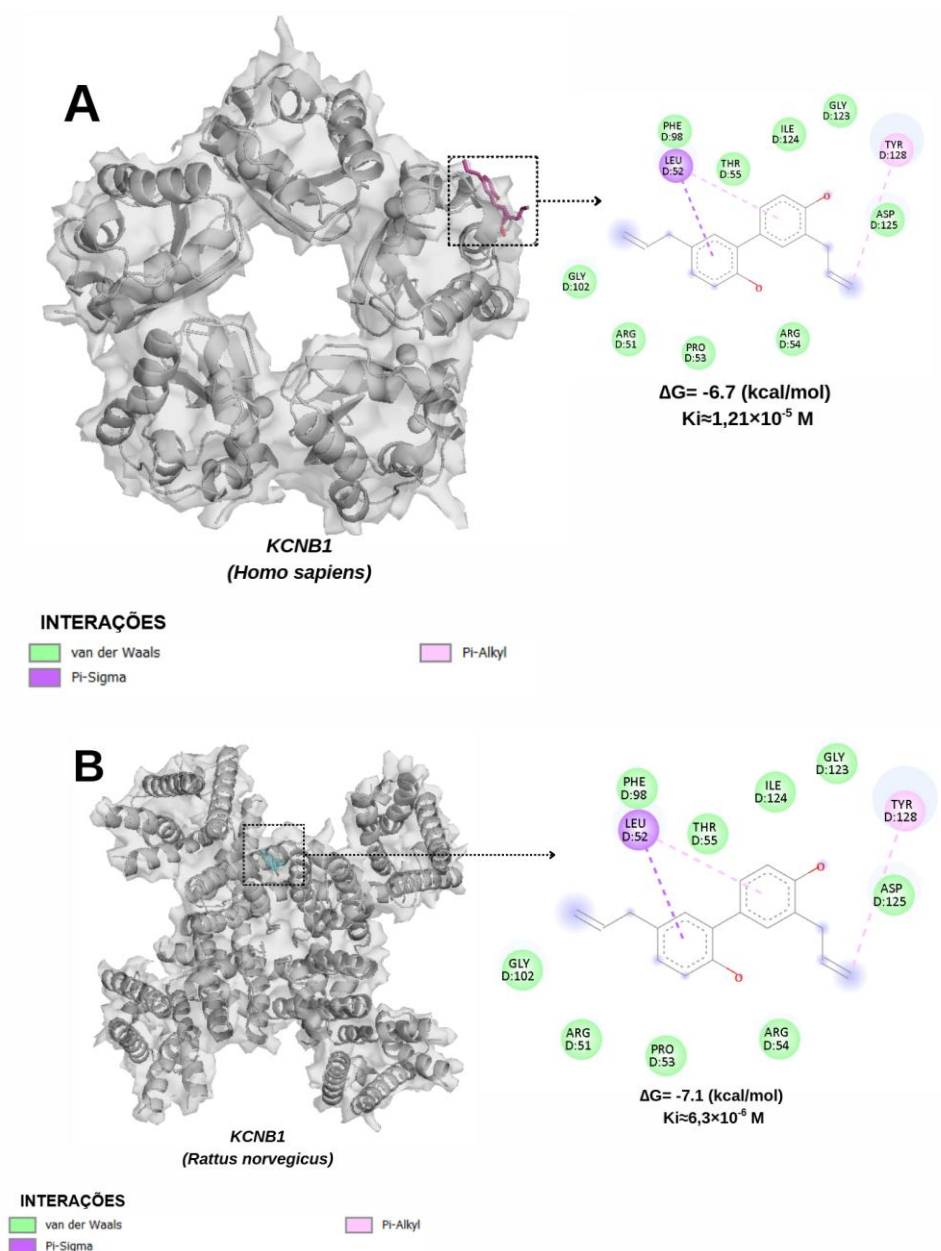
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: Estrutura da IL1RAPL1 de *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* predita e modo de ligação honokiol usando o software AutoDock Vina 1.5.7. A estrutura planar foi gerado pelo software Discovery, enquanto a estrutura 3D foi preparada com software Pymol, respectivamente. A afinidade de ligação (ΔG , kcal/mol) e coeficiente de inibição (K_i) para cada complexo ligante-proteína. (A) e (B) Visualização tridimensional das melhores poses de acoplamento de cada ligante no sítio ativo da proteína, obtidas usando o PyMOL, destacando a orientação dos compostos dentro da cavidade de ligação e os tipos de ligação entre os resíduos de aminoácidos e os átomos do ligante.

Os resultados da docagem molecular do composto analisado com o KCNB1 (*Homo sapiens*). O composto estabelece interações do tipo van der Waals, Pi-Sigma e Pi-Alkyl com diversos resíduos, incluindo ARG51, PRO53, ARG54, THR55, GLY102, PHE98, GLY123, ILE124, LEU52 e TYR128. O complexo apresentou energia de ligação $\Delta G = -6,7$ kcal/mol, indicando afinidade favorável, com um valor estimado de $K_i \approx 1,21 \times 10^{-5}$ M (Figura 17A).

A análise de ancoragem molecular do ligante em diferentes regiões da proteína KCBN1 de *Rattus norvegicus*. O composto estabelece interações do tipo van der Waals com múltiplos aminoácidos incluindo ARG51, PRO53, ARG54, THR55, GLY102, PHE98, GLY123, ILE124, LEU52 e TYR128. Além disso, ocorrem interações Pi-Sigma e Pi-Alkyl. O complexo apresentou energia de ligação $\Delta G = -7,1$ kcal/mol, indicando afinidade favorável, com um valor estimado de $K_i \approx 6,3 \times 10^{-6}$ M (Figura 17B).

Figura 17 - Análise de acoplamento molecular e perfil de interação – KCNB1.



Fonte: Elaborado pela autora.

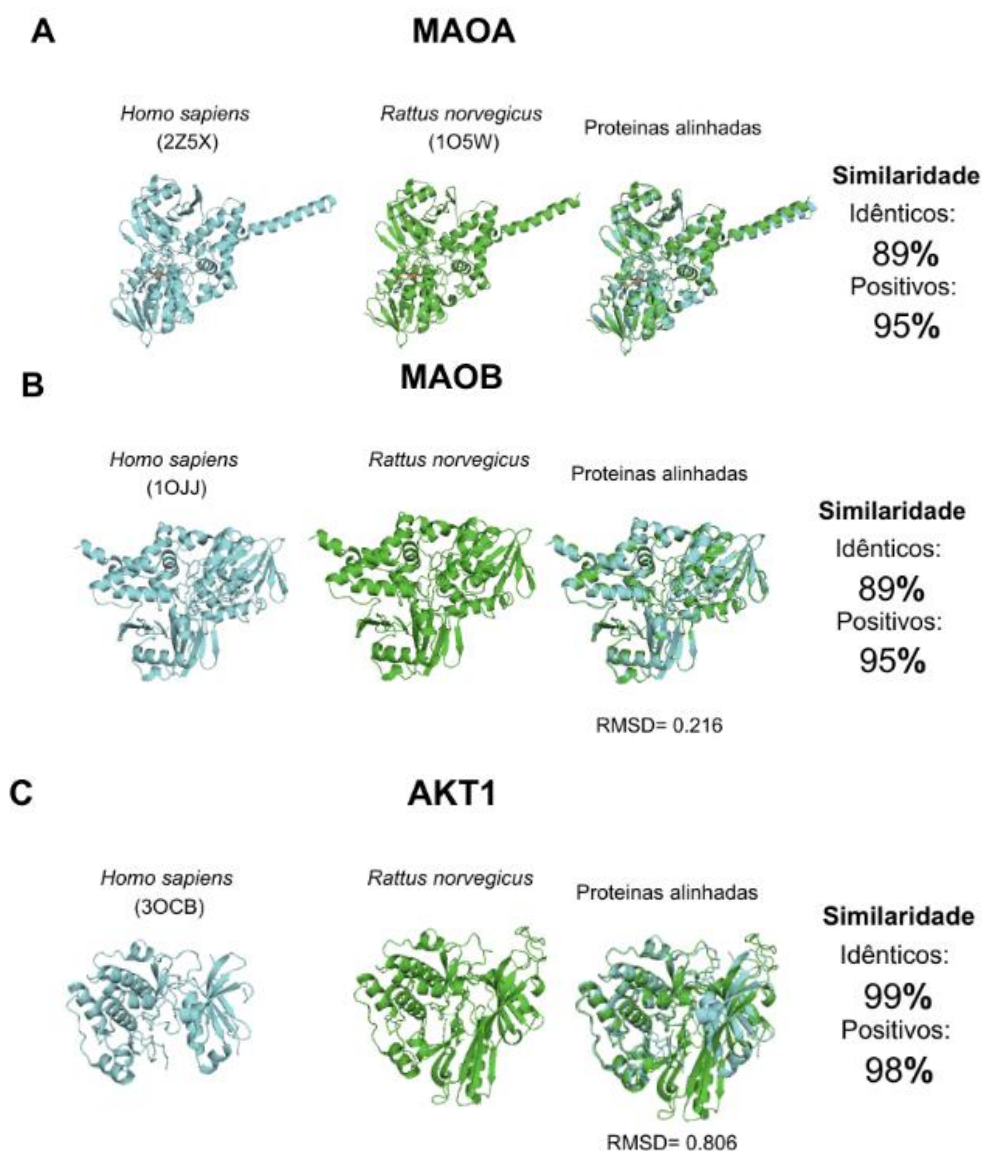
Legenda: Estrutura da KCNB1 de *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* predita e modo de ligação honokiol usando o software AutoDock Vina 1.5.7. A estrutura planar foi gerado pelo software Discovery, enquanto a estrutura 3D foi preparada com software Pymol, respectivamente. A afinidade de ligação (ΔG , kcal/mol) e coeficiente de inibição (K_i) para cada complexo ligante-proteína. (A) e (B) Visualização tridimensional das melhores poses de acoplamento de cada ligante no sítio ativo da proteína, obtidas usando o PyMOL, destacando a orientação dos compostos dentro da cavidade de ligação e os tipos de ligação entre os resíduos de aminoácidos e os átomos do ligante.

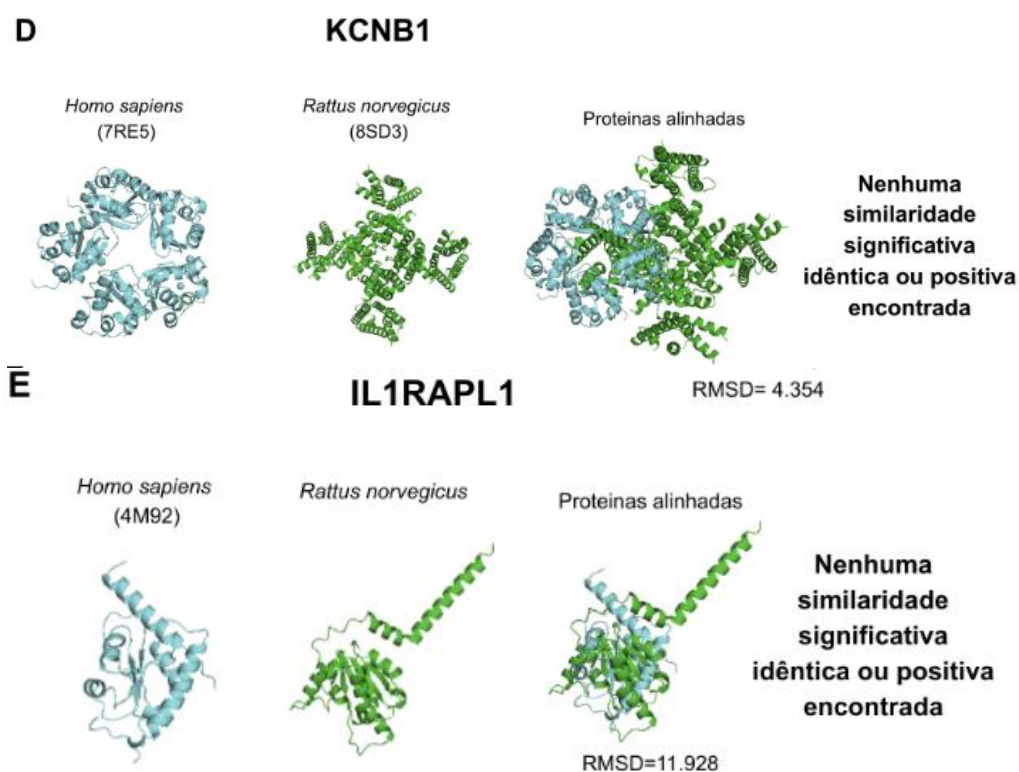
5.1.6 Similaridade estrutural das proteínas entre espécie *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*

O alinhamento estrutural entre as proteínas de *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* demonstrou elevados níveis de conservação para MAOA, MAOB e AKT1. Para MAOA, observou-se 89% de resíduos idênticos e 95% positivos, com RMSD = 0,440 Å, indicando alta

similaridade estrutural entre as espécies. Resultado semelhante foi encontrado para MAOB, com 89% de identidade, 95% de positividade e $\text{RMSD} = 0,216 \text{ \AA}$, confirmando forte conservação conformacional. Para AKT1, a conservação foi ainda mais expressiva, com 99% de identidade, 98% de positividade e $\text{RMSD} = 0,806 \text{ \AA}$, evidenciando quase sobreposição total das estruturas. Em contraste, para KCNB1 e IL1RAP L1 não foi observada similaridade significativa, com valores elevados de RMSD ($4,354 \text{ \AA}$ e $11,928 \text{ \AA}$, respectivamente) e ausência de identidade estrutural relevante (Figura 18).

Figura 18 - Alinhamento de sequência e superposição estrutural entre proteínas de *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus*.





Fonte: Elaborado pela autora.

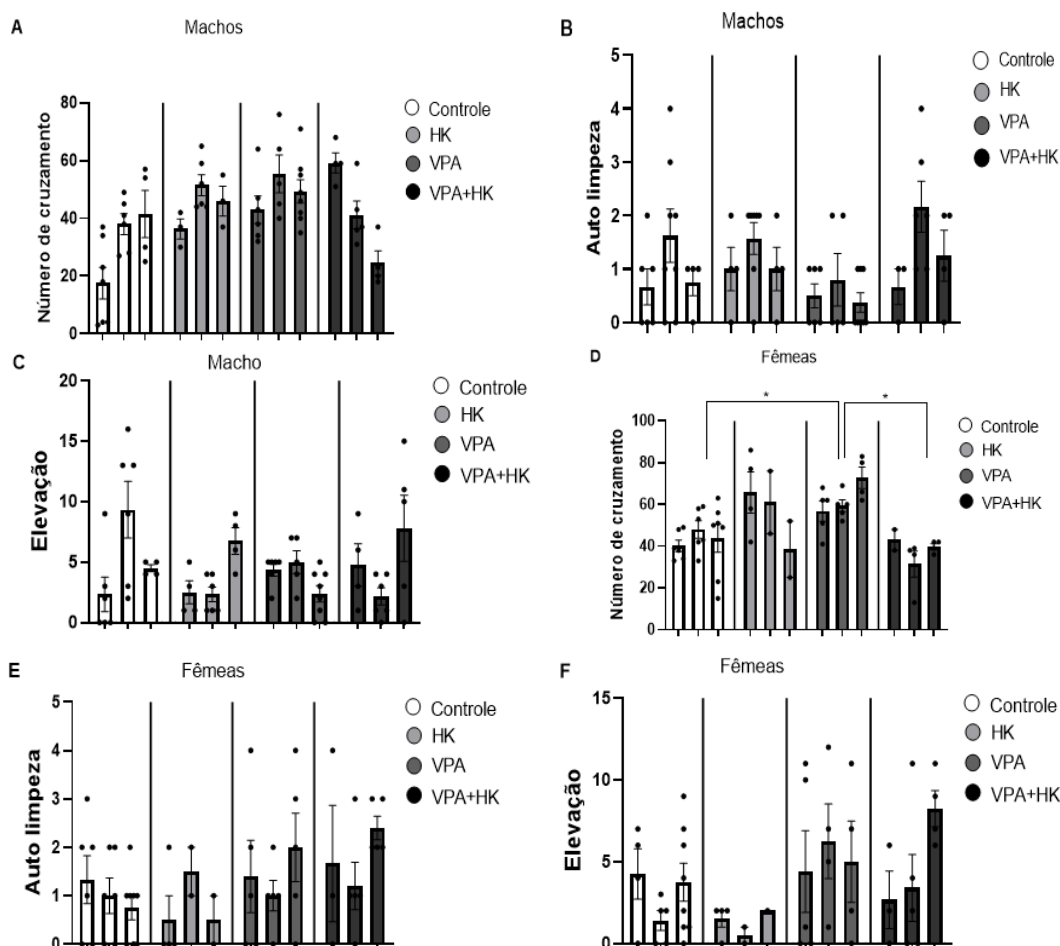
Legenda: As porcentagens de identidade e positividade foram avaliadas por BLASTp da sequência de nucleotídeos do alvo. A comparação da estrutura tridimensional foi realizada usando o comando align no software PyMOL. Alinhamento das proteínas (A) MAOA, (B) MAOB, (C) AKT1, (D) KCNB1 e (E) IL1RAPL1.

5.2 Estudo *in vivo*

5.2.1 Efeito do honokiol sobre a avaliação da atividade exploratória e comportamento estereotipado - Teste do Campo Aberto

Ao avaliar o parâmetro de movimentação espontânea, as fêmeas do grupo VPA+HK apresentaram redução de aproximadamente 45,4% no número de cruzamentos em relação ao grupo VPA (VPA+HK: 43; 31,5; 39,75 ± 5,00; 6,20; 1,43 vs. VPA: 56,8; 59,4; 72,75 ± 4,81; 2,82; 5,15) [F(3,8)=6,805] (Figura 19D). Para os demais parâmetros avaliados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 19).

Figura 19 - Efeito do honokiol sobre a atividade exploratória.



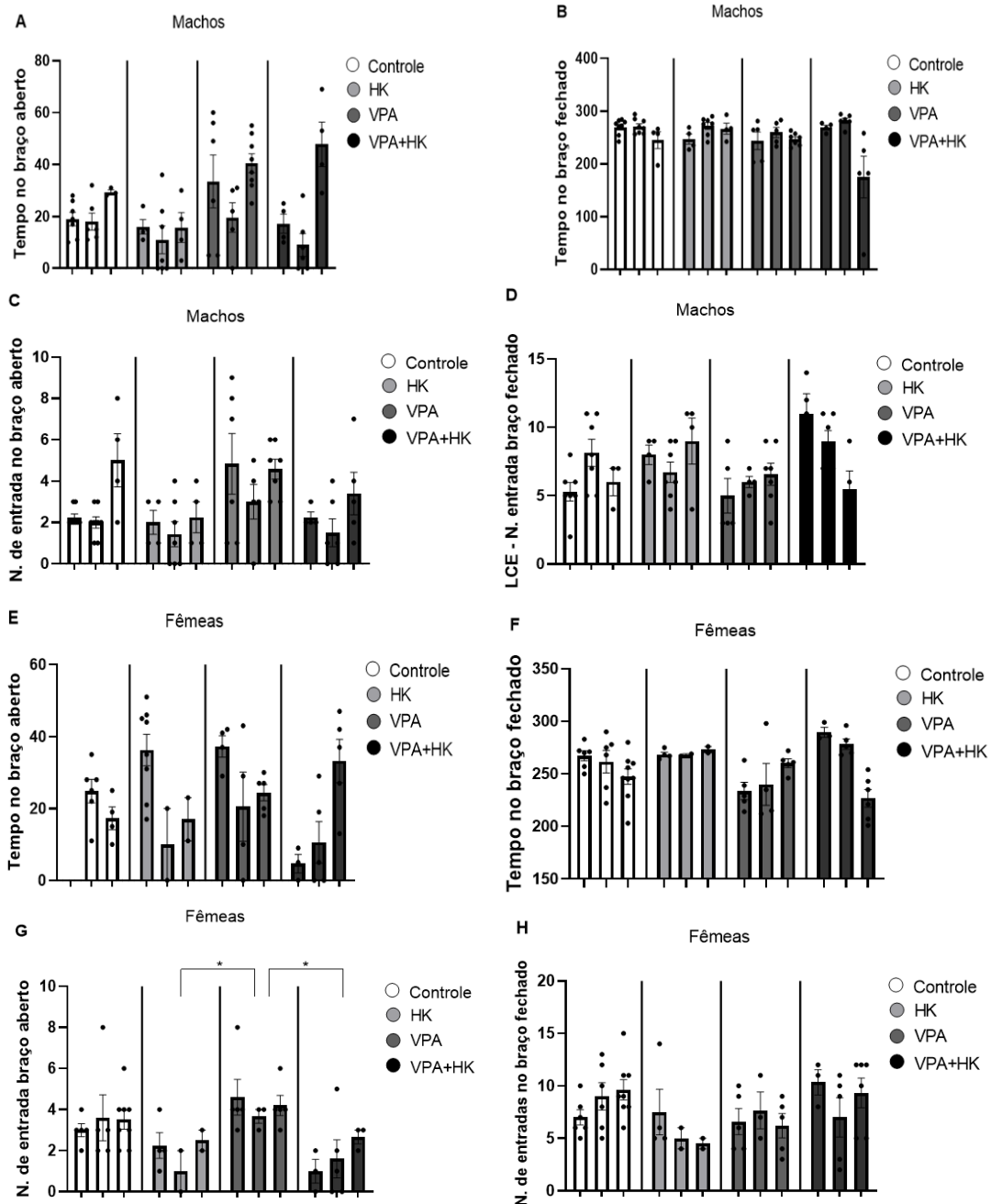
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A avaliação da atividade locomotora e padrão de ansiedade dos animais foram utilizados o teste comportamental "Campo Aberto". Os parâmetros observados foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de autolimpeza (grooming) e número de elevações sobre duas patas (rearing). (A) CA - Número de cruzamento macho; (B) CA - Auto limpeza macho; (C) CA - Elevação macho; (D) CA - Número de cruzamento fêmeas; (E) CA - Auto limpeza fêmeas; (F) CA - Elevação fêmeas. Média \pm EPM. (C, n = 13; HK, n = 12; VPA, n = 19; VPA+HK, n = 13). Nested teste ANOVA, pós-teste Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

5.2.2 Efeito do honokiol sobre a avaliação do comportamento tipo ansioso

Ao investigar o efeito do honokiol sobre o comportamento ansioso dos animais, foi constatado que os animais fêmeas do grupo VPA apresentaram menos comportamento ansioso e maior comportamento de impulsividade. VPA+HK reduziu em 57,6% (VPA+HK: 1; 1,6; 2,7 \pm 0,56; 0,93; 0,33 vs VPA: 4,6; 3,7; 4,2 \pm 0,88; 0,33; 0,49) o número de entradas no braço aberto quando comparado ao grupo VPA (Figura 20G) [F (3/8) = 7,639]. Quando avaliado os demais parâmetros não houve diferença estatística entre os grupos avaliados (Figura 20).

Figura 20 - Efeito do honokiol sobre a avaliação de comportamento ansioso.



Fonte: Elaborado pela autora.

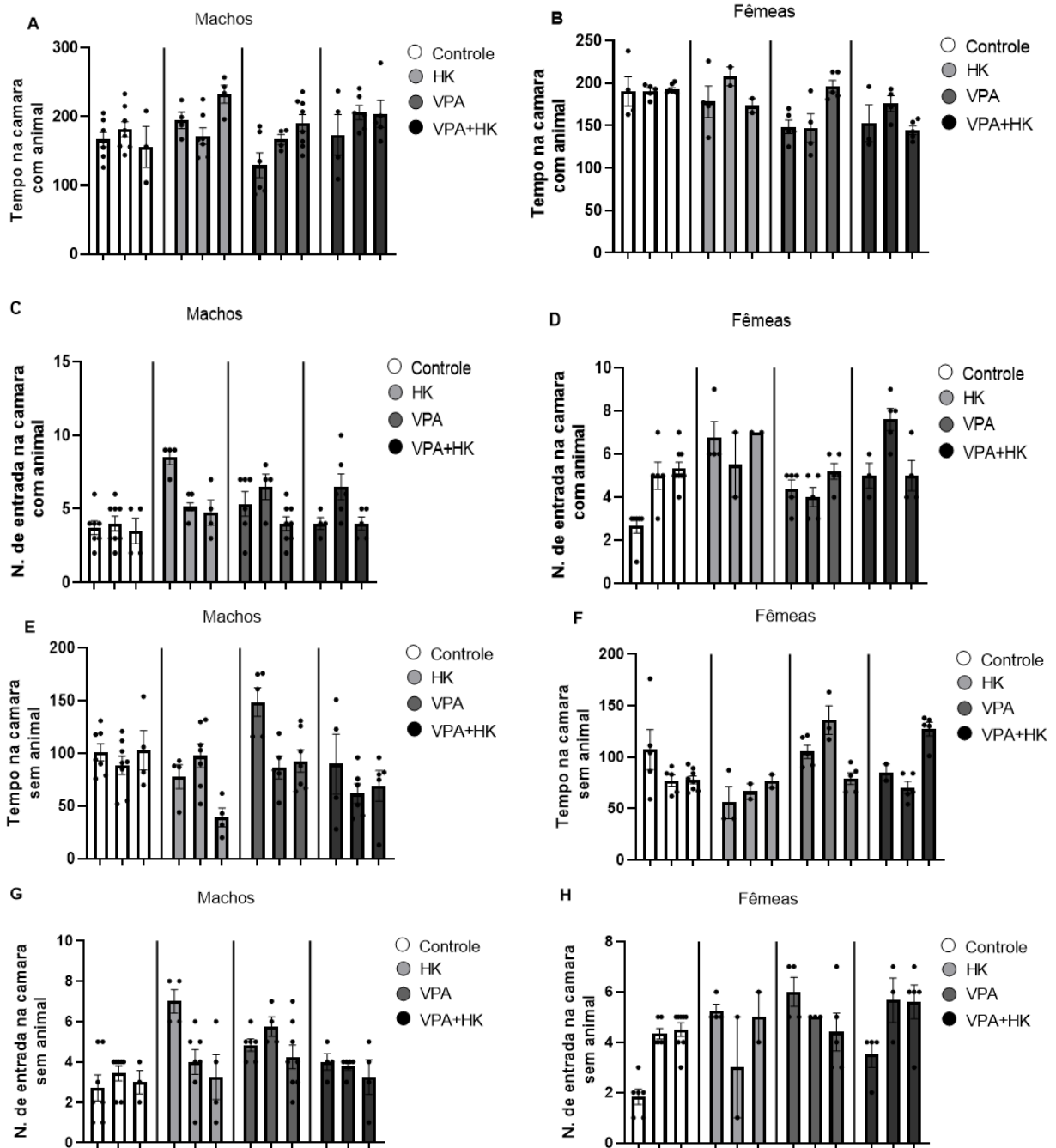
Legenda: A avaliação do comportamento ansioso, foi utilizado o teste de labirinto em cruz elevado (LCE), os ratos foram postos no centro da estrutura “cruzada (A) Tempo braço aberto (machos); (B) Tempo braço fechado (machos); (C) N. entrada braço aberto (machos); (D) N. entrada braço fechado (machos); (E) Tempo braço aberto (fêmeas); (F) Tempo braço fechado (fêmeas); (G) N. entrada braço aberto (fêmeas); (H) N. entrada braço fechado (fêmeas). Média \pm EPM. (C, n = 17; HK, n = 15; VPA, n = 19; VPA+HK, n = 13). Nested teste ANOVA, pós-teste tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.2.3 Efeito do honokiol sobre a interação social dos animais

Ao avaliar a interação social entre os animais, foi observado que a prole dos animais tratados com honokiol não apresentou diferença estatística quando avaliados os demais

paramentros entre os demais grupos (Figura 21).

Figura 21 - Efeito do honokiol sobre a avaliação da capacidade de interação.



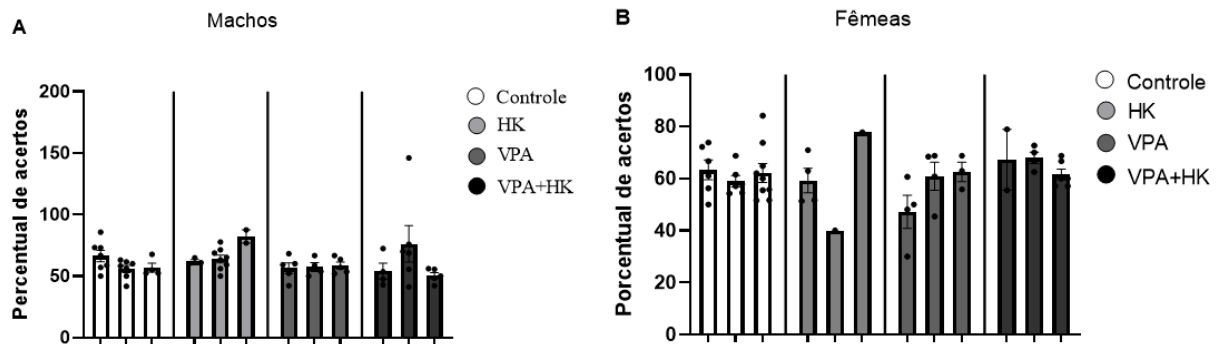
Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: O teste de Interação Social é um modelo experimental empregado para investigar alterações comportamentais em animais associadas a distúrbios psiquiátricos. Os ratos filhotes ficaram 5 minutos explorando o aparelho, sendo avaliados quanto ao tempo de permanência explorando o compartimento com animal e sem animal, além do número de entradas nas câmaras com e sem animal, como também o tempo no espaço neutro. (A) Tempo com animal (machos); (B) Tempo com animal (fêmeas); (C) Número de entrada na câmara com animal (machos); (D) Número de entrada na câmara com animal (fêmeas); (E) Tempo sem animal (machos); (F) Tempo sem animal (fêmeas); (G) Número de entrada na câmara sem animal (machos); (H) Número de entrada na câmara sem animal (fêmeas). Média \pm EPM. (C, n=13; HK, n=12; VPA, n=19; VPA+HK, n=13). Nested teste ANOVA, pós-teste tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

5.2.4 Efeito do honokiol sobre a memória dos animais

Ao avaliar a avaliação da memória entre os animais, foi observado que a prole dos animais tratados com honokiol não apresentou diferença estatística quando avaliados os demais grupos (Figura 22).

Figura 22 - Efeito do honokiol sobre avaliação de memória.



Fonte: Elaborado pela autora.

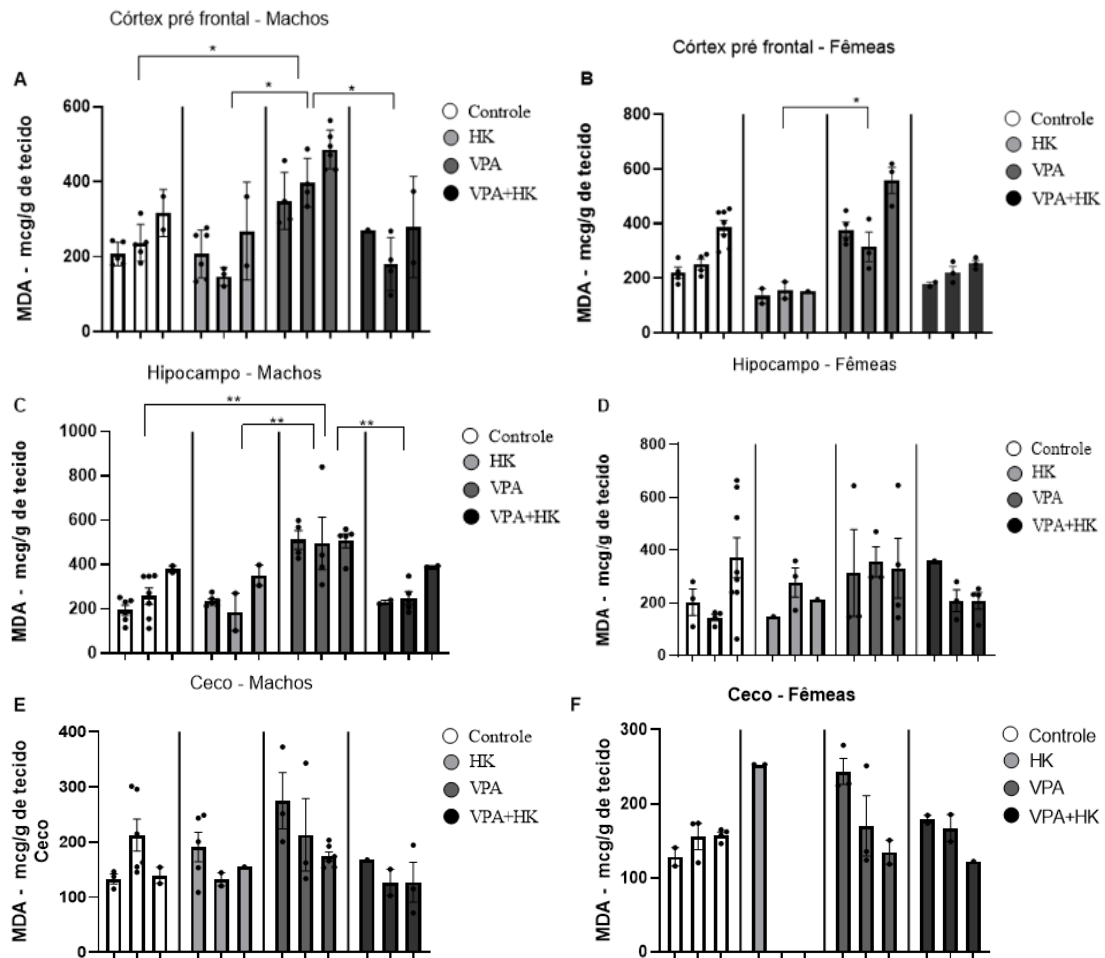
Legenda: A memória de reconhecimento espacial dos ratos foi avaliada usando o teste do labirinto em Y. Os animais foram na área central do labirinto em Y e permitiram a exploração livre por 8min, seguido pelo registro da sequência em entraram nos braços do labirinto. Uma sequência correta foi definida como três letras desiguais em uma linha. (A) Porcentual de acertos machos; (B) Porcentual de acertos das fêmeas. Média ± EPM (C, n=13; HK, n=12; VPA, n=19; VPA+HK, n=13). Nested teste ANOVA, pós teste tukey.*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

5.3 Estudo *post mortem*

5.3.1 Efeito do honokiol sobre os parâmetros de estresse oxidativo (MDA E GSH)

O honokiol reduziu os teores de MDA no córtex pré-frontal nos animais do grupo VPA+HK em 40,7% (VPA+HK: 271,04; 178; 279 ± 0; 35,5; 95,3 vs VPA: 348,75; 397; 485,7 ± 38; 32,57; 21) [F (3/8) = 7,618], e no hipocampo reduziu em 42% (VPA+HK: 230,5; 249,1; 390,8 ± 8,46; 28,4; 3,18 vs VPA: 511,8; 495,1; 507,1 ± 42; 118,3; 31,9) [F (3/8) = 14,81] quando comparado ao grupo VPA (Figura 23A-C). Não houve diferença estatística entre as fêmeas quando avaliado os mesmos tecidos cerebrais, e quando avaliado a presença de MDA no ceco não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 23).

Figura 23 - Efeito do honokiol sobre o MDA.

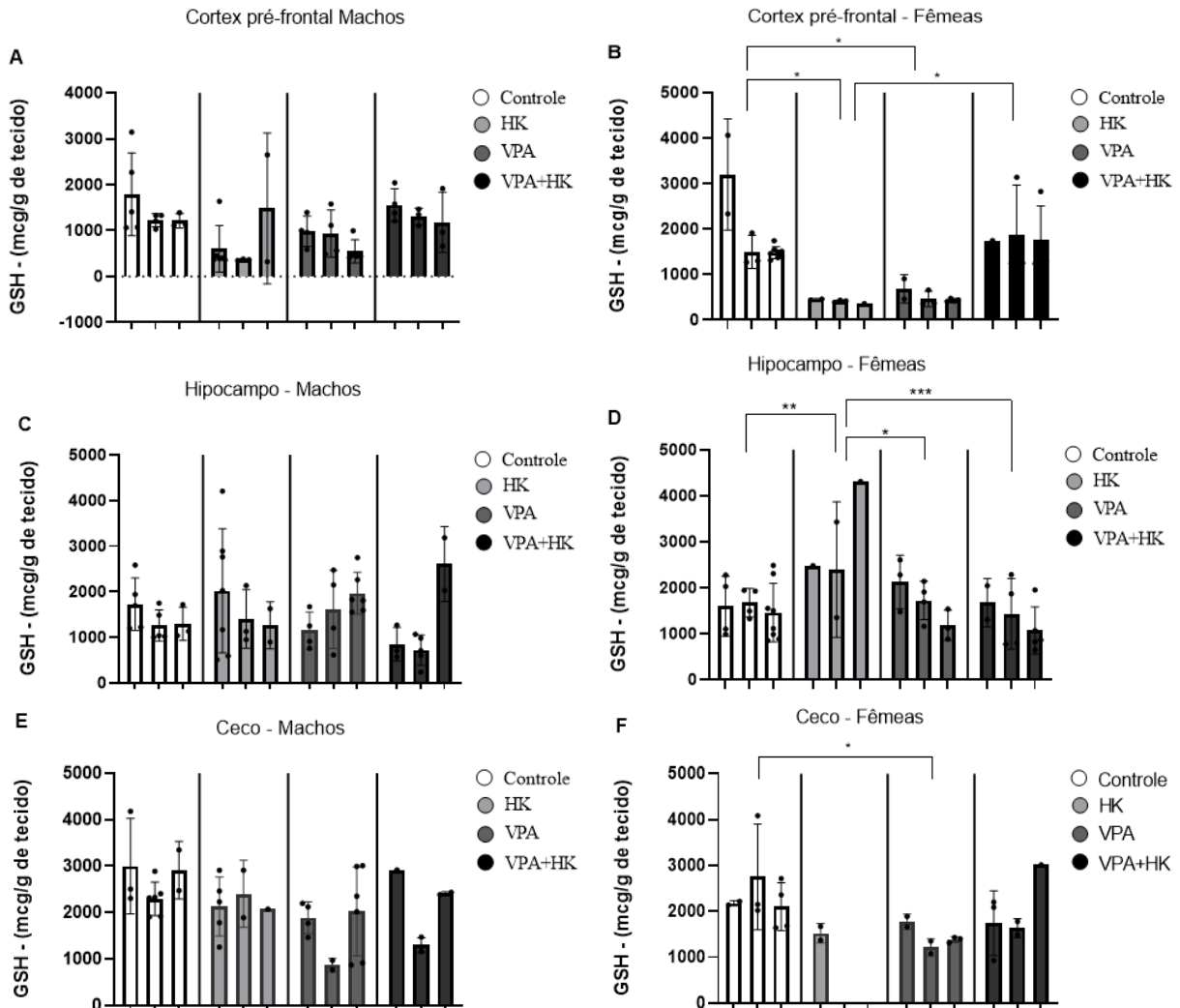


Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: As áreas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) e o ceco das proles dos animais tratados com honokiol ou salina foram coletados quando completaram 35 dias de vida. Foi realizada a dosagens de malondialdeído (MDA), marcador de estresse oxidativo. (A) Córtex pré-frontal de machos; (B) córtex pré-frontal de fêmeas; (C) hipocampo de machos; (D) hipocampo de fêmeas; (E) ceco dos machos; (F) ceco das fêmeas. Média \pm EPM (C, n=12; HK, n=11; VPA, n=13; VPA+HK, n=10). Nested teste ANOVA, pós teste tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

O honokiol aumentou os teores de GSH no hipocampo em 94% (HK: 2483; 2392; 4312 \pm 0; 1040; 0 vs Controle: 1598; 1674; 1460 \pm 324,7; 155; 224,6) [F(3/8) = 0,3186] e reduziu no córtex pré-frontal em 80% (HK: 450,6; 414,2; 359,8 \pm 11,64; 13,8; 0 vs Controle: 3200; 1496; 1479 \pm 865,9; 209,6; 46,38) F(3/8) = 7,912] nos animais femeas quando comparado ao grupo controle (Figura 24B-C). Não havendo diferença estatística nos demais grupos (Figura 24).

Figura 24 - Efeito do honokiol sobre o GSH.



Fonte: Elaborado pela autora.

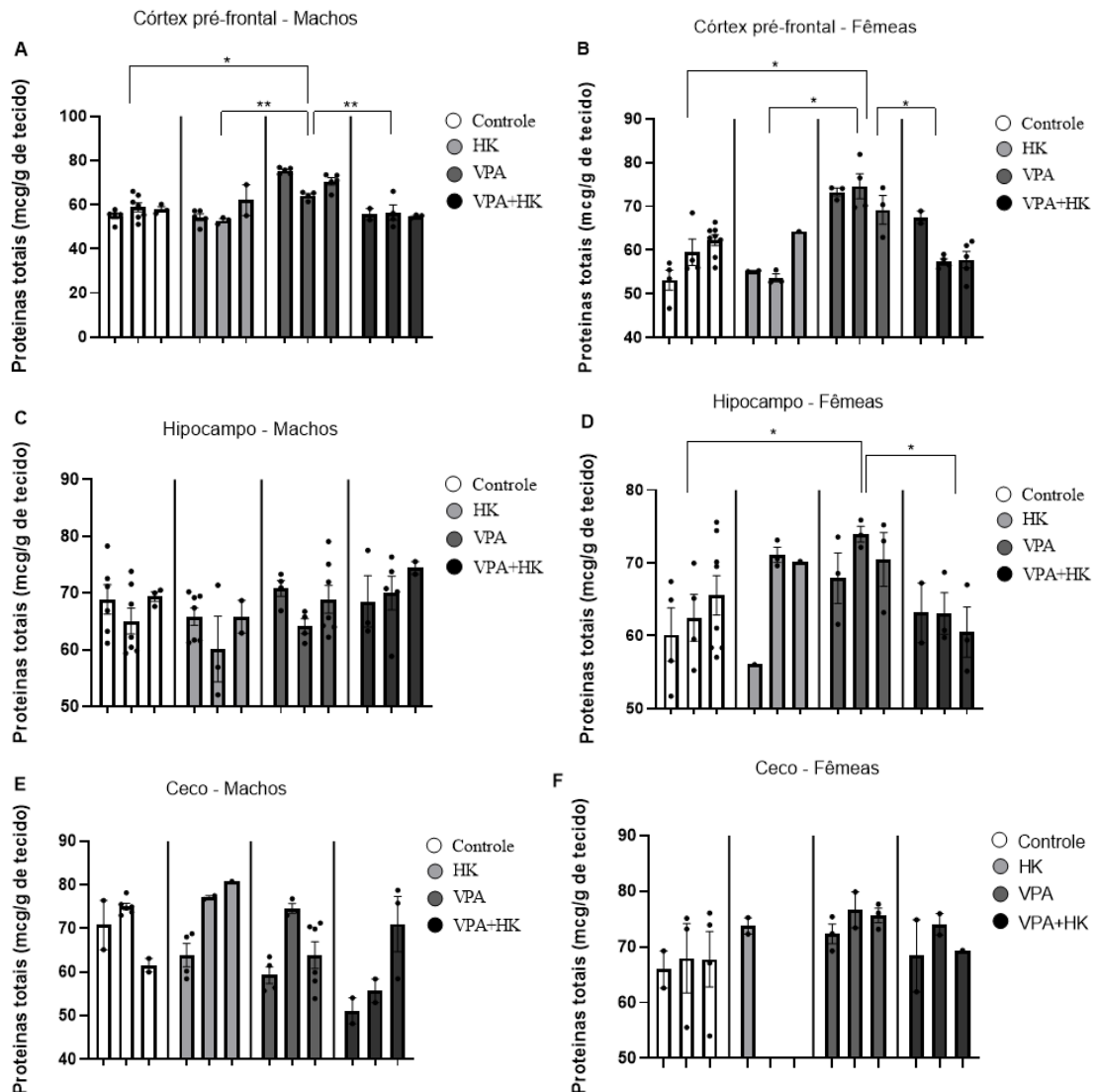
Legenda: As áreas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) e o ceco das proles dos animais tratados com honokiol ou salina foram coletadas quando completaram 35 dias de vida. Foi realizada a dosagens de glutathiona reduzida (GSH), marcador de estresse oxidativo. (A) Córtex pré-frontal de machos; (B) córtex pré-frontal de fêmeas; (C) hipocampo de machos; (D) hipocampo de fêmeas; (E) ceco dos machos; (F) ceco das fêmeas. Média \pm EPM (C, n=12; HK, n=11; VPA, n=13; VPA+HK, n=10). Nested teste ANOVA, pós teste tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.3.2 Efeito do honokiol sobre a permeabilidade vascular

O honokiol reduziu os teores de proteínas totais no córtex pré-frontal nos animais machos em 20,5% (VPA+HK: 55,7; 56,46; 54,73 \pm 2,57; 3,4; 0,46 vs VPA: 75,36; 64; 70,5 \pm 0,63; 0,95; 1,67) [F (3/8) = 10,04] e nas fêmeas em 16,4% (VPA+HK: 67,54; 57,31; 57,83 \pm 1,4; 0,7; 1,9 vs VPA: 73,27; 74,60; 69,21 \pm 0,9; 2,9; 3,33) [F (3/8) = 2,022] quando comparados ao grupo VPA (Figura 25A-B). No hipocampo o honokiol reduziu os valores em 16% (VPA+HK: 67,54; 57,3; 57,83 \pm 1,4; 0,7; 1,9 vs VPA: 73,3; 74,6; 69,2 \pm 0,9; 2,9; 3,33) [F (3/34) = 3,686] apenas nas fêmeas (Figura 25D), não havendo diferença estatística quando

avaliado o ceco (Figura 25E-F).

Figura 25 - Efeito do honokiol sobre proteínas totais.



Fonte: Elaborado pela autora.

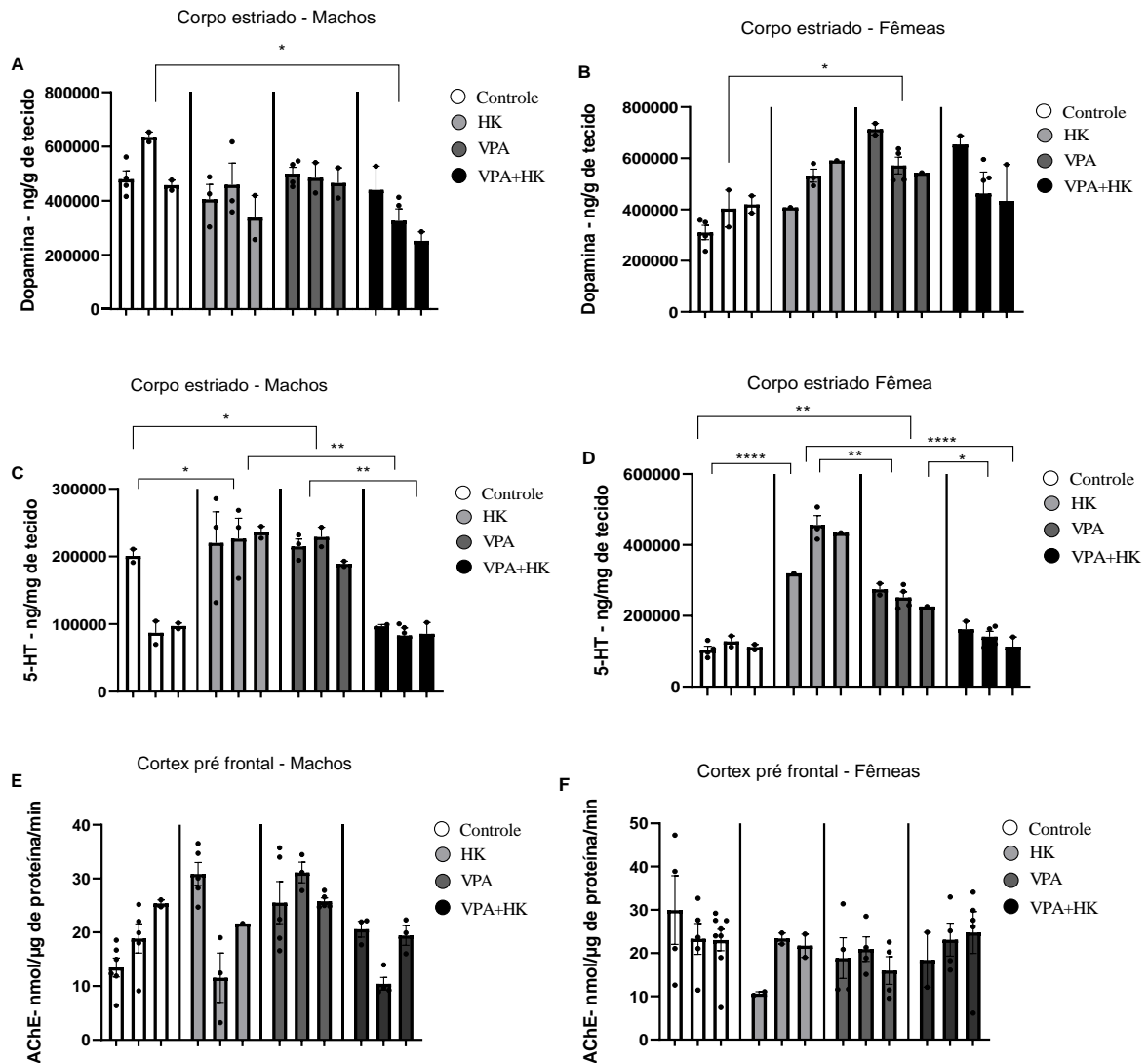
Legenda: As áreas cerebrais (córtex pré-frontal e hipocampo) e o ceco das proles dos animais tratados com honokiol ou salina foram coletados quando completaram 35 dias de vida. Foi realizada a dosagens de proteínas totais, marcador de permeabilidade vascular. (A) Córtex pré-frontal de machos; (B) córtex pré-frontal de fêmeas; (C) hipocampo de machos; (D) hipocampo de fêmeas; (E) ceco dos machos; (F) ceco das fêmeas. Média \pm EPM (C, n=15; HK, n=10; VPA, n=14; VPA+HK, n=10). Nested teste ANOVA, pós teste tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

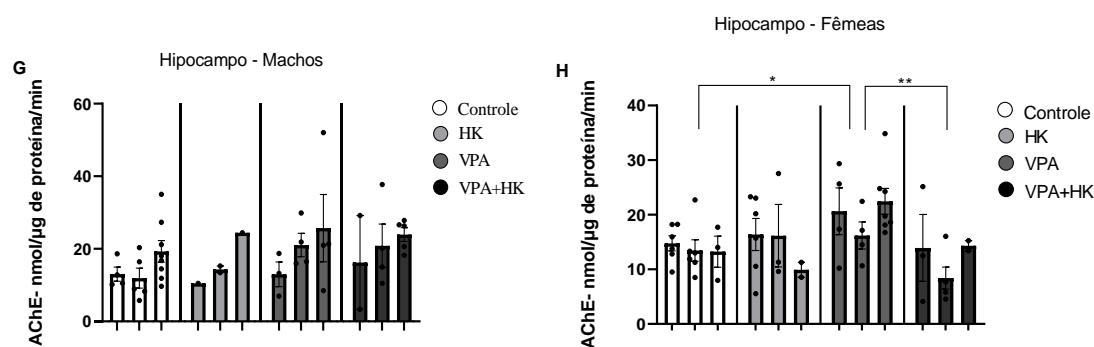
5.3.3 Ação do honokiol sobre neurotransmissores

O honokiol não alterou os teores de dopamina nos animais tratados (Figura 26A-B). Entretanto, quando avaliado os teores de serotonina o honokiol aumentou os teores em 77% (HK: 220240, 226394, 235865 \pm 45880, 30251, 8761 vs Controle: 200955, 87067, 97176 \pm 9814,1721,4339) [F(3/8) = 14,83] em machos, 2,5X% (HK: 319506, 456363, 434232 \pm 0,

26634, 0 vs Controle: 104038, 127687, 111718 ± 10340, 15427, 7568) [F(3/8) = 43,67] em fêmeas, quando comparado com o grupo controle. O honokiol reduziu os teores de serotonina em 58% (VPA+HK: 96773, 83227, 85730 ± 2515, 11094, 16706 vs VPA: 214917, 228970,189130 ± 11001,14526, 4001) [F(3/8) = 14,83] em machos, e 44,6% (VPA+HK: 162453, 141102, 113288 ± 22376,15032, 27011 vs VPA: 274886, 251833, 226128 ± 16161, 15957, 0) [F(3/8) = 43,67] em fêmeas quando comparado com o VPA (Figura 26C-D). O honokiol reduziu os teores de acetilcolinesterase em 38% (VPA+HK: 13,92; 8,4; 14,31 ± 6,12; 2; 0,94 vs VPA: 20,64; 16,19; 22,45 ± 4,3; 2,48;2,4) [F (3/8) = 4,991] no hipocampo em fêmeas (Figura 26H).

Figura 26 - Efeito do honokiol sobre neurotransmissores.





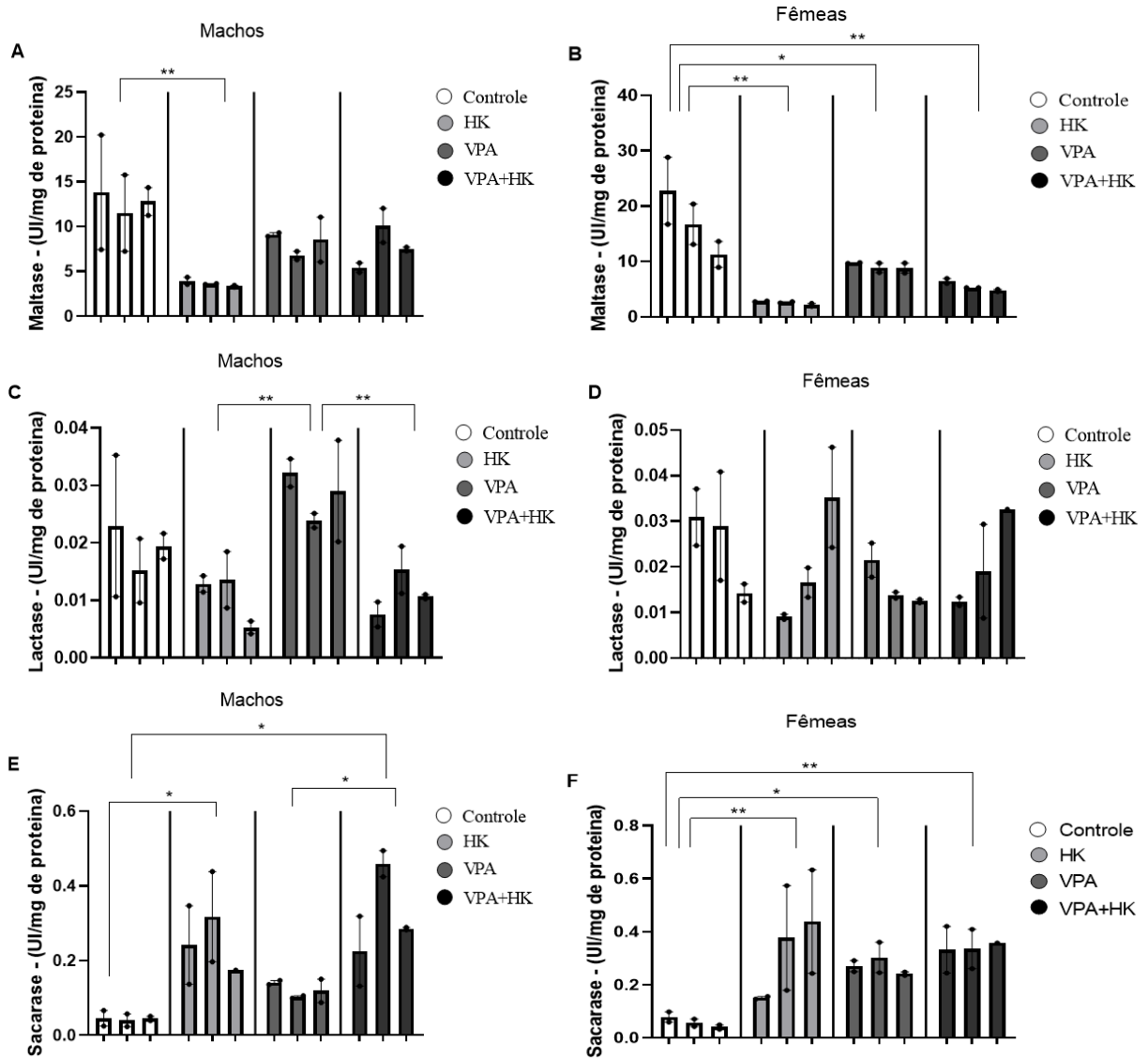
Fonte: Elaborado pela autora.

Fonte: Para a quantificação dos níveis de catecolaminas, foi coletado o corpo estriado das proles, seguido de homogeneização em ácido perclórico. A detecção foi realizada por HPLC, utilizando detecção eletroquímica para catecolaminas e fluorescência para aminoácidos. São apresentados os níveis de dopamina (DA), em ng/mg de tecido, no corpo estriado de (A) ratos machos e (B) ratas fêmeas, e os níveis de serotonina (5-HT), em ng/mg de tecido, em (C) ratos machos e (D) ratas fêmeas. Para a avaliação da atividade da acetilcolinesterase (AChE), foram coletados o córtex pré-frontal e o hipocampo das proles, sendo a atividade enzimática determinada pelo método de Ellman e expressa em nmol/min/mg de proteína. (E) e (F) correspondem ao córtex pré-frontal de ratos machos e fêmeas, respectivamente, enquanto (G) e (H) representam o hipocampo de ratos machos e fêmeas, respectivamente. **Média ± EPM*. (Catecolaminas: Controle n = 8; HK n = 8; VPA n = 5; VPA+HK n = 7. AChE: Controle n = 11; HK n = 10; VPA n = 13; VPA+HK n = 10; Ache C, n=11; HK, n=10; VPA, n=13; VPA+HK, n=10) Nested teste ANOVA, pós-teste tukey, *p < 0.05.

5.3.4 Ação do honokiol sobre as dissacaridases

O honokiol reduziu os teores de maltase em 71% (HK: 3,95; 3,6; 3,34 ± 0,4; 0,05; 0,11 vs Controle: 13,82; 11,5; 12,8 ± 6,4; 4,27; 1,55) [F (3/8) = 9,283] nos machos e 85% (HK: 2,8; 2,6; 2,16 ± 0,08; 0,11; 0,26 vs Controle: 22,77; 16,73; 11,28 ± 6,07; 3,7; 2,3) [F (3/8) = 13,62] nas fêmeas quando comparado ao grupo controle (Figura 27A-B). A lactase foi reduzida pela honokiol em 61% (VPA+HK: 0,007; 0,015; 0,011 ± 0,0022; 0,0041; 0,00037 vs VPA: 0,032; 0,024; 0,03 ± 0,0024; 0,0013; 0,009) [F (3/20) = 9,091], quando comparado ao grupo VPA (Figura 27C). O honokiol aumentou a atividade enzimática da sacarase em 1,68X% (VPA+HK: 0,225; 0,46; 0,29 ± 0,094; 0,035; 0,0032 vs VPA: 0,14; 0,103; 0,12 ± 0,0056; 0,003; 0,031) [F (3/8) = 7,356] quando comparado ao grupo machos induzidos com VPA, e quando comparado ao controle o honokiol aumentou em 2,8 X% (HK: 0,24; 0,32; 0,17 ± 0,1; 0,12; 0 vs Controle: 0,045; 0,04; 0,045 ± 0,02; 0,017; 0,0058); e 4,4X% (HK: 0,15; 0,38; 0,44 ± 0,0045; 0,2; 0,19 vs Controle: 0,08; 0,06; 0,04 ± 0,019; 0,014; 0,008) [F (3/19) = 6,446] quando comparado ao grupo controle em fêmeas (Figura 27E-F).

Figura 27 - Efeito do honokiol sobre as dissacaridasas intestinais.



Fonte: Elaborado pela autora.

Legenda: A análise da atividade das enzimas intestinais foi realizada a partir da remoção do intestino delgado. Os tecidos foram homogeneizados, centrifugados e uma alíquota foi reservada para a dosagem de proteínas totais. O homogenato foi incubado com os substratos: maltose, sacarose e lactose. As atividades das enzimas maltase, sacarase e lactase foram determinadas pelo método de glicose oxidase (método colorimétrico). A atividade específica foi definida como atividade enzimática (U) por mg de proteína. (A) Atividade enzimática de maltase dos animais machos; (B) Atividade enzimática de maltase dos animais fêmea; (C) Atividade enzimática de lactase dos animais machos; (D) Atividade enzimática de lactase dos animais fêmea; (E) Atividade enzimática de sacarase dos animais machos; (F) Atividade enzimática de sacarase dos animais fêmeas. Média \pm SEM. (C, n=6; HK, n=6; VPA, n=6; VPA+HK, n=6) Nested teste ANOVA, pós teste tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que o uso do honokiol por via oral durante o período gestacional promoveu nas proles melhora no comportamento ansioso (movimentação espontânea) nas fêmeas induzidas ao TEA. Além disso, reduziu o marcador de estresse oxidativo (malondialdeído-MDA) no córtex pré-frontal e hipocampo em ratos machos induzidos ao TEA; bem como, aumentou os teores basais de agente antioxidante (glutathiona reduzida-GSH) no hipocampo de ratas fêmeas. O Honokiol reduziu a permeabilidade vascular no córtex pré-frontal de animais de ambos os sexos dos animais induzidos ao TEA, como também reduziu no hipocampo de fêmeas (proteínas totais). Houve aumento nos teores de serotonina dos animais tratados, bem como a redução de serotonina e acetilcolinesterase (hipocampo de animais fêmeas) dos animais induzidos. O honokiol reduziu a atividade enzimática de maltase nos animais não induzidos, reduziu a lactase nos animais machos induzidos, sacarase teve aumento da atividade nos animais machos não induzidos e nas fêmeas não induzidas. Esses achados são compatíveis com os resultados *in silico*, que indicaram elevada biodisponibilidade oral do honokiol e interação favorável com alvos centrais, especialmente MAOA, MAOB e AKT1, cujas estruturas apresentaram alta conservação entre *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*. Em contraste, alvos como KCNB1 e IL1RAPL1 apresentaram baixa conservação estrutural entre as espécies, indicando limitação translacional para esses mecanismos específicos.

6.1 Estudo *in silico*

6.1.1 Avaliação da predição *in silico* farmacocinética e tóxica do honokiol

O perfil farmacocinético do honokiol indica elevada absorção intestinal, o que está de acordo com evidências experimentais que demonstram sua boa permeabilidade através de membranas biológicas, atribuída principalmente à sua natureza lipofílica e baixo peso molecular (Jun-Jun *et al.*, 2015). A ausência de inibição da P-glicoproteína I e II é um achado relevante, pois sugere menor risco de efluxo intestinal e, conseqüentemente, maior biodisponibilidade oral, além de reduzir a probabilidade de interações medicamentosas mediadas por transportadores de efluxo (Varma; Sateesh; Panchagnula, 2004).

A baixa ligação às proteínas plasmáticas e a elevada fração livre para o honokiol indicam maior disponibilidade do composto para exercer seus efeitos farmacológicos nos

tecidos-alvo. Compostos com alta fração livre tendem a apresentar início de ação mais rápido e maior penetração tecidual, o que é particularmente vantajoso em alvos no sistema nervoso central (Jun-Jun *et al.*, 2015; Talarek *et al.*, 2017).

Quanto à metabolização, a predição de interação com as isoenzimas CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4 indica que o honokiol sofre metabolismo hepático extenso pela via do citocromo P450, o que é confirmado por estudos farmacocinéticos que demonstram rápida biotransformação hepática e formação de metabólitos hidroxilados (Jun-Jun *et al.*, 2015). A ausência de interação com a CYP2D6 é um dado favorável, uma vez que essa isoenzima apresenta elevado polimorfismo genético, sendo frequentemente associada a variações interindividuais na resposta aos fármacos (Bibi, 2008).

Em relação à excreção, a depuração plasmática moderada e o tempo de meia-vida curto corroboram dados experimentais que indicam eliminação relativamente rápida do honokiol, principalmente por vias hepáticas (Jun-Jun *et al.*, 2015). Embora uma meia-vida curta possa limitar a duração do efeito, esse parâmetro também reduz o risco de acúmulo sistêmico e toxicidade em tratamentos de uso contínuo.

No perfil de toxicidade, o honokiol foi classificado como inativo para hepatotoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade e toxicidade respiratória, o que está em consonância com estudos pré-clínicos que demonstram, a DL₅₀ predita de 1649 mg/kg enquadra o honokiol na Classe IV de toxicidade, indicando toxicidade moderada, compatível com substâncias de uso terapêutico.

Dessa forma, os resultados *in silico* reforçam o potencial farmacêutico do honokiol como candidato a fármaco, especialmente para aplicações no sistema nervoso central e em doenças inflamatórias, uma vez que apresenta perfil combinado de boa absorção, ampla distribuição, metabolismo previsível e baixa toxicidade sistêmica.

6.1.2 Avaliação da conservação estrutural das proteínas entre espécie

A conservação estrutural das proteínas-alvo do honokiol entre *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens* para as enzimas MAOA, MAOB e a quinase AKT1, observa-se um notável grau de preservação conformacional, o que indica uma forte similaridade funcional entre as espécies. Esta homologia estrutural, corroborada por análises de alinhamento de sequência e modelagem molecular, sugere que as interações do honokiol com esses sítios proteicos e as respostas farmacodinâmicas são equivalentes em roedores e humanos. Consequentemente, dados pré-clínicos obtidos em modelos murinos para esses alvos apresentam alta relevância translacional,

validando o uso desses modelos no estudo dos mecanismos de honokiol na modulação monoaminérgica e na sinalização via AKT1.

Em contraste, as proteínas KCNB1 e IL1RAPL1 exibem divergências conformacionais significativas entre as espécies. A falta de similaridade estrutural relevante implica que a afinidade de ligação e a modulação farmacológica pelo honokiol podem diferir. Portanto, os efeitos observados em ratos envolvendo esses alvos não podem ser extrapolados diretamente para a fisiologia humana, representando uma limitação translacional específica.

6.2 Estudo *in vivo*

6.2.1 Avaliação comportamental

A exposição ao VPA, no período pré-natal, é capaz de induzir alterações comportamentais compatíveis com o fenótipo do TEA, dentre eles estão inclusos diminuição do comportamento lúdico, aumento do comportamento de limpeza e autolimpeza, aumentou a atividade locomotora e diminuiu a atividade exploratória (Fereshteyan *et al.*, 2021). O tratamento com honokiol reduz a hiperativa locomotora, demonstrando efeito modulador do composto sobre este parâmetro induzido pelo VPA.

Esse efeito do honokiol pode estar associado à hiperexcitabilidade neuronal modulada pelo canal de potássio voltagem-dependentes KCNB1, que é um dos alvos do honokiol, ele regula a excitabilidade neuronal e a plasticidade sináptica, determinando a estabilidade das redes neurais responsáveis pelo processamento de informações e pelo comportamento. Alterações nesse canal pode gerar desequilíbrios entre excitação e inibição, resultando em hiperexcitabilidade, prejuízo cognitivo, estereotípias, hiperatividade e déficits sociais (Liu *et al.*, 2023b; Calhoun *et al.*, 2017; Manville *et al.*, 2024). Nesse contexto, a utilização do honokiol nos animais com TEA resultou em uma diminuição dessa atividade locomotora que pode ser explicada por esse mecanismo neurobiológico.

O honokiol reduz espécies reativas de oxigênio, estabiliza a função mitocondrial e ativa vias de sobrevivência neuronal, como AKT e MAPK, que regulam diretamente canais de potássio dependentes de voltagem. Assim, é biologicamente plausível que a normalização comportamental observada no grupo VPA + honokiol, incluindo a redução da hiperlocomoção no campo aberto, resulte de uma melhora indireta da função de canais como o KCNB1, cuja sua disfunção está associada à hiperexcitabilidade e a fenótipos comportamentais semelhantes ao TEA (Shen *et al.*, 2010; Chen; Liu; Lin-Shiau, 2007; Zhu *et al.*, 2025).

Os parâmetros de ansiedade avaliados no Labirinto em Cruz Elevado (LCE), observou-se que as fêmeas apresentaram o aumento do número de entradas nos braços abertos no grupo VPA, esses achados são coerentes com estudos anteriores que mostram que a exposição pré-natal ao ácido valpróico pode reduzir comportamentos ansiosos e aumentar a impulsividade, resultando em uma maior exploração de áreas aversivas no Labirinto em Cruz Elevado em animais fêmeas (Podgorac *et al.*, 2022; Larner *et al.*, 2021; Fereshetyan *et al.*, 2021). A maior exploração dos braços abertos pode ser interpretada como um déficit na percepção do risco ou uma falha na integração de informações sensoriais e emocionais, e não apenas como uma diminuição da ansiedade (Kinjo *et al.*, 2019). Dessa forma, pode-se afirmar que, no presente estudo, o honokiol contribuiu para a melhora da percepção de risco nos animais apresentando comportamentos menos impulsivo.

Além disso, a IL1RAPL1, uma das proteínas tida como alvo do honokiol, participa da formação e estabilidade das sinapses excitatórias que controlam impulsividade, exploração e avaliação de risco, função essas que é comprometida no modelo VPA, há desorganização sináptica e aumento da excitabilidade neural, resultando em desinibição comportamental (Valnegri *et al.*, 2011; Yasumura *et al.*, 2014). A melhora desse comportamento no grupo VPA + Honokiol pode refletir a restauração parcial das vias sinápticas moduladas por IL1RAPL1.

O tratamento com honokiol reverteu o padrão desinibido induzido pelo VPA, reduzindo significativamente o número de entradas nos braços abertos e restabelecendo um comportamento mais compatível com o controle. O honokiol demonstrou capacidade de reverter o padrão desinibitório induzido pelo VPA, efeito que pode ocorrer não apenas por meio da modulação do sistema GABAérgico, mas também por mecanismos anti-inflamatórios e antioxidantes, conforme evidenciado por Woodbury *et al.* (2013) e Bernaskova *et al.* (2015).

6.3 Estudo *post mortem*

O honokiol atenua os danos oxidativos induzidos pelo VPA, reduzindo os níveis de MDA no córtex pré-frontal e no hipocampo dos animais machos. Esse efeito antioxidante está alinhado a estudos prévios que descrevem a capacidade do honokiol de diminuir a formação de malondialdeído e restaurar o equilíbrio redox em tecidos neurais (Demir *et al.*, 2025; Lo *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2023b).

No que se refere à glutathiona, nossos resultados evidenciaram que o honokiol aumenta os níveis basais de GSH nas fêmeas, o que é consistente com achados anteriores demonstrando que o pré-tratamento com honokiol normaliza a glutathiona total no tecido

cerebral (Cui *et al.*, 2007; Demir *et al.*, 2025). Esse efeito pode ser atribuído à ativação da via NRF2–GSH, mecanismo pelo qual o honokiol reduz o dano oxidativo ao estimular a expressão de genes antioxidantes (Zhou *et al.*, 2023a). O NRF2, por sua vez, é reconhecido como um fator de transcrição central na defesa antioxidante, regulando diversas proteínas citoprotetoras, incluindo aquelas envolvidas na síntese e regeneração da glutatona (Zhang *et al.*, 2020), o que reforça o papel neuroprotetor do honokiol.

Além disso, Xu, Jiang e Li (2020) demonstraram que o honokiol tem como alvo a proteína AKT1 que integra a via PI3K/AKT, desempenhando papel essencial na defesa antioxidante celular, regulando diretamente a síntese de glutatona (GSH) e a contenção da peroxidação lipídica. A supressão dessa via aumenta o acúmulo de espécies reativas e eleva os níveis de MDA, como demonstrado em modelos animais em que a inibição de PI3K/Akt reduz GSH e intensifica o dano oxidativo.

Um estudo realizado com células mostra que AKT1 aumenta a capacidade antioxidante ao sustentar a regeneração de GSH, protegendo contra estresse oxidativo (Goetting *et al.*, 2022). No contexto do TEA, embora AKT1 não apresente redução de expressão gênica, alterações na via PI3K/AKT foram relatadas em indivíduos com autismo, sugerindo prejuízo funcional dessa sinalização (Yasuda *et al.*, 2011). O honokiol, utilizado no tratamento de osteossarcoma é capaz de modular a via PI3K/Akt, reduzindo sua atividade e influenciando processos de sobrevivência celular e resposta ao estresse oxidativo (Li *et al.*, 2017). Esses mecanismos explicam a relação entre disfunção em AKT1, aumento de MDA, redução de GSH e alterações comportamentais observadas no modelo de TEA.

Além disso, uma análise integrada dos marcadores oxidativos deste estudo revelou um padrão sexualmente dimórfico. Nas fêmeas, observou-se aumento nos níveis de GSH, sugerindo uma resposta antioxidante adaptativa mais eficiente frente ao insulto induzido pelo VPA. Esse perfil pode estar associado à maior capacidade regulatória dos estrógenos sobre vias de síntese de glutatona, além da maior resiliência mitocondrial descrita em organismos do sexo feminino (Torrens-Mas *et al.*, 2020).

Em contraste, os machos apresentaram elevação significativa de MDA, indicando maior peroxidação lipídica e maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo (Toda *et al.*, 2023). A ausência de aumento compensatório dos níveis de GSH sugere uma resposta antioxidante menos eficiente, favorecendo o acúmulo de dano celular (Schmitt *et al.*, 2016). Esses achados reforçam a existência de diferenças sexuais na susceptibilidade ao estresse oxidativo em modelos experimentais de TEA.

A análise dos níveis de proteínas totais no córtex pré-frontal e no hipocampo

permite avaliar a homeostase proteica, a plasticidade sináptica e o metabolismo neuronal (Bronzuoli *et al.*, 2018; Selamet; Usta, 2023). Nos diferentes grupos analisados deste estudo, tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo de machos e fêmeas, observou-se que a exposição ao VPA promoveu um aumento significativo dos níveis de proteínas totais, enquanto o tratamento com honokiol reduziu esses níveis, restaurando-os para valores próximos ao controle. O cérebro de ratos induzidos ao TEA por VPA no período pré natal apresenta forte neuroinflamação, evidenciada pelo aumento de proteínas astrogliais como aquaporina-4 e conexina-43, além de maior expressão de GFAP também há ativação microglial e elevação de citocinas pró-inflamatórias, indicando um ambiente cerebral inflamatório característico do TEA (Bronzuoli *et al.*, 2018).

O aumento das proteínas totais encontradas nos animais expostos ao VPA é compatível com estudos que mostram que esse composto eleva a produção de várias proteínas sinápticas, como VAMP1/2, sinaptofisina e sinapsina-1, especialmente no hipocampo (Gąssowska-Dobrowolska *et al.*, 2020). Essas alterações refletem maior atividade sináptica e reorganização neuronal induzidas pelo VPA. Além disso, o VPA ativa astrócitos e micróglia, elevando proteínas estruturais e inflamatórias. Assim, o incremento de proteínas totais observado no VPA provavelmente resulta da combinação entre aumento de proteínas sinápticas e ativação glial, mecanismos já descritos nesse modelo (Gąssowska-Dobrowolska *et al.*, 2020; Traetta *et al.*, 2021; Bódi *et al.*, 2022).

A literatura descreve que o honokiol exerce potente ação neuroprotetora ao modular negativamente a expressão de proteínas associadas a processos inflamatórios e degenerativos no sistema nervoso central. Estudos demonstram que o honokiol reduz de forma significativa a produção de proteínas pró-inflamatórias em astrócitos e micróglia ativadas, incluindo iNOS, TNF- α , IL-1 β e IL-6, atenuando a resposta inflamatória glial (Rickert *et al.*, 2018). De forma semelhante, o composto também diminui a expressão de proteínas reguladas por vias inflamatórias, como NF- κ B p65 e IDO, em modelos de neuroinflamação induzida por LPS (Zhang *et al.*, 2019).

Em modelos neuronais, o honokiol mostrou capacidade de reduzir tanto os níveis de mRNA quanto a quantidade proteica de α -sinucleína, indicando sua ação direta na modulação da síntese e estabilidade de proteínas neuronais (Fagen *et al.*, 2023). Além disso, estudos recentes confirmam que o honokiol inibe componentes proteicos do inflamassoma NLRP3, reduzindo a expressão de proteínas inflamatórias em diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* (Hua *et al.*, 2024). Esses achados sustentam que o honokiol possui a capacidade de reduzir a expressão de proteínas relacionadas à inflamação, estresse celular e disfunção neuronal, o que

pode explicar a diminuição nos níveis de proteínas observada no grupo VPA + honokiol do presente estudo.

No grupo de animais fêmeas induzidos ao TEA e tratado com honokiol, observou-se redução da atividade da AChE previamente elevada pelo VPA, demonstrando ação do tratamento ao sistema colinérgico. O honokiol apresenta propriedades antioxidantes e é capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e o dano mitocondrial (Wang *et al.*, 2022; Woodbury *et al.*, 2013), fatores que, quando aumentados pelo VPA, estão associados à elevação da expressão de AChE. Além disso, o honokiol exerce ação anti-inflamatória, inibindo vias como NF- κ B e diminuindo citocinas pró-inflamatórias (Zhou *et al.*, 2024), que também podem estimular a expressão da AChE. De forma geral, os resultados demonstram que a exposição ao VPA elevou a atividade da AChE, comprometendo a neurotransmissão colinérgica.

Em contraste, o tratamento com honokiol no grupo VPA+HK reduziu significativamente essa enzima, o que sugere maior disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica. Esse efeito pode ser observado nas fêmeas pois elas reduzem as atividades de AChE em diversas regiões cerebrais devido a presença de estrogênio, fazendo com que aumente a biodisponibilidade de acetilcolina; já nos machos a AChE possui um aumento da sua atividade devido a aromatização da testosterona em estradiol (Giacobini; Pepeu, 2018).

De acordo com o estudo de Hou, Chao e Chen (2000), o Honokiol tem demonstrado aumentar a atividade da colina acetiltransferase, inibir a acetilcolinesterase, estimular a liberação de acetilcolina induzida por potássio e exercer efeitos neurotróficos. Atuando na manutenção dos níveis desse neurotransmissor essencial para memória e cognição. Além disso, o honokiol apresenta ação neurotrófica, contribuindo para a sobrevivência e funcionalidade neuronal (Lee *et al.*, 2009). Esse efeito indica que o honokiol foi capaz de atenuar a disfunção colinérgica induzida pelo VPA, contribuindo potencialmente para a restauração de processos dependentes de acetilcolina no TEA.

A exposição pré-natal ao ácido valpróico (VPA) sobre o sistema serotoninérgico central demonstram que a administração de VPA entre os dias embrionários 9 e 12 provoca alterações irreversíveis na diferenciação e na migração de neurônios serotoninérgicos para o núcleo da rafe dorsal (Miyazaki; Narita; Narita, 2004) Além disso, foi verificado um aumento significativo nos níveis de serotonina em áreas do pro encéfalo, indicando que a exposição ao VPA resulta em uma neurotransmissão serotoninérgica exacerbada em roedores submetidos a esse modelo (Narita *et al.*, 2002; Tsujino *et al.*, 2007),

A elevação dos níveis de serotonina e dopamina observada nos animais expostos ao

VPA é compatível com evidências de que esse composto modula diretamente o metabolismo das monoaminas durante o neurodesenvolvimento. O VPA reduz a atividade da monoamina oxidase tipo A (MAO-A), enzima responsável pela degradação de serotonina e dopamina, o que resulta em acúmulo extracelular desses neurotransmissores em regiões como o hipocampo e o estriado (Wu; Shih, 2011; Maisterrena *et al.*, 2022). Essa regulação negativa da MAO-A decorre, em grande parte, da ação epigenética do VPA como inibidor de histona desacetilase (HDAC), levando à alteração da transcrição de genes relacionados ao metabolismo monoaminérgico (Gottlicher, 2001).

No presente estudo, foi observado que o honokiol, quando administrado isoladamente, promoveu um aumento dos níveis de 5-HTP no corpo estriado. Esses achados estão em consonância com estudos anteriores que reportaram elevação de 5-HTP em regiões como hipocampo e corpo estriado após o tratamento com honokiol (Qiang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008). Tais resultados reforçam a hipótese de que o honokiol exerce uma ação moduladora sobre a via serotoninérgica, possivelmente pela inibição da atividade da MAOA, aumentando a biodisponibilidade do neurotransmissor na fenda sináptica.

O honokiol, quando administrado ao grupo de animais induzidos ao TEA, foi capaz de reverter parcialmente o desequilíbrio neuroquímico causado pela exposição ao VPA, promovendo a redução dos níveis de serotonina (5-HT) para valores próximos aos basais. Dessa forma, a hipótese de que a administração concomitante desses dois fármacos resultaria na inibição da degradação da serotonina, em função da afinidade de ambos pela MAOA, não foi confirmada. Possivelmente, honokiol e VPA competem pelo mesmo sítio catalítico da MAOA, o que pode comprometer a ancoragem eficiente dessas moléculas à enzima, favorecendo sua atividade degradativa. Como consequência, observa-se maior degradação da 5-HT e redução de sua biodisponibilidade na fenda sináptica.

No presente estudo, o tratamento com honokiol não promoveu alterações de dopamina. No entanto, o docking molecular demonstrou afinidade do honokiol pela MAOB, sugerindo um potencial mecanismo de ação molecular que não se traduz necessariamente em alterações deste neurotransmissor. Essa afinidade sugere uma possível interação moduladora, mas não implica, por si só, em inibição funcional suficiente para alterar os níveis totais de dopamina.

Os animais fêmeas expostos ao VPA obtiveram um aumento dos teores de dopamina, e isso ocorre devido ao VPA ser capaz de aumentar a liberação extracelular e a modulação da sinalização dopaminérgica. Além disso, o VPA age como inibidor da histona deacetilases promovendo alterações epigenéticas que podem aumentar a expressão de genes

associados à neurotransmissão dopaminérgica e à eficiência da sinalização mediada por receptores dopaminérgicos, especialmente do subtipo D2 (Romoli *et al.*, 2019). Dessa forma, o aumento da dopamina observado no grupo VPA reflete uma reorganização neuroquímica e funcional desses circuitos, característica do modelo de TEA induzido por VPA.

A redução das atividades das enzimas digestivas maltases para ambos os sexos a níveis basais e lactase em machos induzidos ao TEA é compatível com outras pesquisas que demonstram que o honokiol atua como inibidor de outras dissacaridases como da α -glicosidase, e frutose reduzindo a degradação de carboidratos e liberação de monossacarídeos (Zhu; Zhong, 2024; Baumann *et al.*, 2025). Esses dados corroboram que o honokiol reduz a ação enzimática dos alvos metabólicos relacionados ao processamento de açúcares. Contudo, o honokiol apresenta propriedades gastroprotetoras, incluindo neutralização de ácido, atividade antioxidante, e redução da secreção gástrica, conforme demonstrado em modelos clássicos de gastrite (Cho *et al.*, 2008).

Além disso, em outros modelos patológicos o honokiol preserva a integridade da barreira intestinal, melhora a homeostase de óxido nítrico e reduz inflamação sistêmica, reforçando seu papel protetor sobre o trato gastrointestinal mesmo em condições metabólicas adversas em camundongos alimentados com frutose (Baumann *et al.*, 2025). Esses dados, em conjunto, confirmam que o honokiol exerce efeitos benéficos sobre o sistema digestivo, entretanto mesmo reduzindo a atividade enzimática das dissacaridase nos animais expostos ao VPA ele ainda é capaz de promover ação antiinflamatória, antioxidante e gastroprotetora, como descrito em outros modelos animais como colite (Wang; Wang, 2022).

Contudo, em contraste com os resultados obtidos no presente estudo, observou-se aumento na atividade da sacarase. Uma possível explicação para esse achado é a redução concomitante de outras dissacaridases, como maltase e lactase, o que pode induzir um mecanismo adaptativo do epitélio intestinal, aumentando seletivamente a atividade da sacarase para preservar a absorção mínima de carboidratos necessária ao metabolismo energético. Esse tipo de adaptação pode ocorrer especialmente em condições de lesão da mucosa, estresse oxidativo e inflamação intestinal, como aquelas induzidas pelo VPA (Rosensweig, 1975; Tappenden, 2006). Além disso, o honokiol, ao reduzir a inflamação local e favorecer a restauração da homeostase da mucosa intestinal, pode contribuir para a recuperação funcional, justificando o aumento seletivo da sacarase observado.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o honokiol exerce efeitos neuroprotetores em ratos com TEA induzido pela exposição gestacional ao VPA. O composto promoveu aumento dos níveis de glutathiona reduzida, redução do malondialdeído e diminuição da permeabilidade cerebral. Esses efeitos bioquímicos refletiram na melhora na percepção de risco dos animais induzidos e reduzindo comportamento ansioso (campo aberto). Além disso, o honokiol potencializou a biodisponibilidade sináptica de serotonina e contribuiu para a restauração da função colinérgica por meio da redução da atividade da AChE.

REFERÊNCIAS

- ABUELRUB, Anwar *et al.* Computational Analysis of CC2D1A Missense Mutations: insight into protein structure and interaction dynamics. **ACS Chemical Neuroscience**, [S.I.], v. 16, n. 19, p. 3665-3681, 10 jan. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/acschemneuro.4c00570>
- ALREHAILI, Ruba A. *et al.* Exploring Early Childhood Autism Spectrum Disorders: a comprehensive review of diagnostic approaches in young children. **Cureus**, [S.I.], p. 1-10, 7 dez. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.50111>
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5-TR - Texto Revisado**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2023. 1152 p.
- ARRIVE. **The ARRIVE guidelines 2.0**. 2020. Disponível em: <https://arriveguidelines.org/arrive-guidelines>. Acesso em: 8 out. 2024.
- ARUTIUNIAN, Vardan *et al.* Reduced grey matter volume of amygdala and hippocampus is associated with the severity of autistic symptoms and language abilities in school-aged children with Autism Spectrum Disorder: an exploratory study. **Brain Structure And Function**, [S.I.], v. 228, n. 6, p. 1573-1579, 11 jun. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-023-02660-9>
- AY, Hakan *et al.* Increased Serotonin Levels and Unchanged Glutamate and GABA Levels in Thalamic Microdialysates Despite Reduced Cell Numbers in a Valproic Acid-Induced Autism Model. **Neurochemical Research**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 1-11, 5 dez. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-024-04299-2>
- BAMBINI-JUNIOR, Victorio *et al.* Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neuroscience Letters**, [S.I.], v. 583, p. 176-181, nov. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>
- BANERJEE, Priyanka *et al.* ProTox 3.0: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 52, n. W1, p. W513-W520, 22 abr. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkae303>
- BARISELLI, Sebastiano *et al.* Role of VTA dopamine neurons and neuroligin 3 in sociability traits related to nonfamiliar conspecific interaction. **Nature Communications**, [S.I.], v. 9, n. 1, p. 1-15, 9 ago. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05382-3>
- BAUMANN, Anja *et al.* Honokiol, a Neolignan from *Magnolia officinalis*, Attenuated Fructose-Induced Hepatic Fat Accumulation by Improving Intestinal Barrier Function in Mice. **The Journal Of Nutrition**, [S.I.], v. 155, n. 4, p. 1173-1182, abr. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tjnut.2025.02.017>
- BENEDETTO, Giuseppe Egidio de *et al.* A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. **Journal Of Pharmaceutical And**

Biomedical Analysis, [S.I.], v. 98, p. 266-270, set. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.05.039>

BERNASKOVA, Marketa *et al.* Nitrogenated honokiol derivatives allosterically modulate GABAA receptors and act as strong partial agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 23, n. 20, p. 6757-6762, out. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.034>

BIBI, Zakia. Role of cytochrome P450 in drug interactions. **Nutrition & Metabolism**, [S.I.], v. 5, n. 1, p. 1-10, 18 out. 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-5-27>

BJØRKLUND, Geir *et al.* Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. **Molecular Neurobiology**, [S.I.], v. 57, n. 5, p. 2314-2332, 5 fev. 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-019-01742-2>

BLUM, Kenneth *et al.* Dopamine Dysregulation in Reward and Autism Spectrum Disorder. **Brain Sciences**, [S.I.], v. 14, n. 7, p. 1-22, 22 jul. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci14070733>

BÓDI, Veronika *et al.* Alterations of the Hippocampal Networks in Valproic Acid-Induced Rat Autism Model. **Frontiers In Neural Circuits**, [S.I.], v. 16, p. 1-12, 4 fev. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fncir.2022.772792>

BONE, Megan E.; LEPPERT, Mary L. O'connor. Autism Spectrum Disorder at Home and in School. **Pediatric Clinics Of North America**, [S.I.], v. 71, n. 2, p. 223-239, abr. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcl.2024.01.008>

BONETTI, Matteo *et al.* Potential Neuroprotective Effect of Melatonin in the Hippocampus of Male BTBR Mice. **Nutrients**, [S.I.], v. 16, n. 11, p. 1-17, 28 maio 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/nu16111652>

BORTOLATO, Marco; CHEN, Kevin; SHIH, Jean C. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.I.], v. 60, n. 13-14, p. 1527-1533, out. 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.06.002>

BOZKURT, Gülçin; UYSAL, Gülzade; DÜZKAYA, Duygu Sönmez. Examination of Care Burden and Stress Coping Styles of Parents of Children with Autism Spectrum Disorder. **Journal Of Pediatric Nursing**, [S.I.], v. 47, p. 142-147, jul. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedn.2019.05.005>

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S.I.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRASIL. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Panorama do Censo 2022**. 2022. Disponível em: <https://censo2022.ibge.gov.br/panorama/?localidade=BR>. Acesso em: 05 mar. 2025.

BRONZUOLI, Maria Rosanna *et al.* Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. **Molecular Autism**, [S.I.], v. 9, n. 1, p. 1-17, dez. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s13229-018-0254-0>

BRUNET, Anne; DATTA, Sandeep Robert; GREENBERG, Michael E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K–Akt signaling pathway. **Current Opinion In Neurobiology**, [S.I.], v. 11, n. 3, p. 297-305, jun. 2001. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0959-4388\(00\)00211-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00211-7)

CALHOUN, Jeffrey D. *et al.* Characterization of a KCNB1 variant associated with autism, intellectual disability, and epilepsy. **Neurology Genetics**, [S.I.], v. 3, n. 6, p. 1-5, dez. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1212/nxg.0000000000000198>

CAMILLERI, Michael; SASLOW, Stuart B.; BHARUCHA, Adil E. Gastrointestinal sensation. **Gastroenterology Clinics Of North America**, [S.I.], v. 25, n. 1, p. 247-258, mar. 1996. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0889-8553\(05\)70374-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0889-8553(05)70374-5)

CAO, Can *et al.* Metalomics Revealed that Changes of Serum Elements were Associated with Oxidative Stress-Induced Inflammation of Cortex in a Mouse Model of Autism. **Biological Trace Element Research**, [S.I.], v. 203, n. 8, p. 4296-4307, 28 dez. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-024-04501-0>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Autism Data Visualization Tool**. 2025. Disponível em: <https://www.cdc.gov/autism/data-research/autism-data-visualization-tool.html>. Acesso em: 10 nov. 2025.

CEZAR, Luana C. *et al.* Prenatal Valproic Acid Induces Autistic-Like Behaviors in Rats via Dopaminergic Modulation in Nigrostriatal and Mesocorticolimbic Pathways. **Journal Of Neurochemistry**, [S.I.], v. 169, n. 1, p. 16282, jan. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.16282>

CHAO, Louis Kuoping *et al.* Anti-Inflammatory Bioactivities of Honokiol through Inhibition of Protein Kinase C, Mitogen-Activated Protein Kinase, and the NF- κ B Pathway To Reduce LPS-Induced TNF α and NO Expression. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.I.], v. 58, n. 6, p. 3472-3478, 1 mar. 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/jf904207m>

CHARMAN, Tony; BAIRD, Gillian. Practitioner Review: diagnosis of autism spectrum disorder in 2- and 3-year-old children. **Journal Of Child Psychology And Psychiatry**, [S.I.], v. 43, n. 3, p. 289-305, mar. 2002. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-7610.00022>

CHAUDHARY, S.; PARVEZ, S. An in vitro approach to assess the neurotoxicity of valproic acid-induced oxidative stress in cerebellum and cerebral cortex of young rats. **Neuroscience**, [S.I.], v. 225, p. 258-268, dez. 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.08.060>

CHELARU, Ionut-Alexandru *et al.* Single and Combined Effects of Meropenem, Valproic Acid, and Ketoprofen on Adult Zebrafish Behavior, Oxidative Stress, and Acetylcholinesterase Activity. **Pharmaceuticals**, [S.I.], v. 18, n. 8, p. 1-20, 24 jul. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ph18081096>

CHEN, Chang-Mu; LIU, Shing-Hwa; LIN-SHIAU, Shoei-Yn. Honokiol, a Neuroprotectant against Mouse Cerebral Ischaemia, Mediated by Preserving Na⁺, K⁺-ATPase Activity and Mitochondrial Functions. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, [S.I.], v. 101, n. 2, p. 108-116, 20 jun. 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00082.x>

CHEN, Lei *et al.* Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of 87 studies (n=9109). **Translational Psychiatry**, [S.I.], v. 11, n. 1, p. 1-10, 5 jan. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-020-01135-3>

CHEN, Mengxiang *et al.* Research progress on hippocampal neurogenesis in autism spectrum disorder. **Pediatric Investigation**, [S.I.], v. 8, n. 3, p. 215-223, 23 jul. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ped4.12440>

CHEN, Shoubo *et al.* Valproic acid attenuates traumatic spinal cord injury-induced inflammation via STAT1 and NF- κ B pathway dependent of HDAC3. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.I.], v. 15, n. 1, p. 1-14, 18 maio 2018a. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-018-1193-6>

CHENG, Fu-Chou *et al.* Simultaneous measurement of serotonin, catecholamines and their metabolites in mouse brain homogenates by high-performance liquid chromatography with a microbore column and dual electrochemical detection. **Journal Of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, [S.I.], v. 615, n. 2, p. 225-236, jun. 1993. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)80336-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4347(93)80336-3)

CHO, So-Yean *et al.* Anti-gastric Effects of Magnolol and Honokiol from the Stem Bark of *Magnolia obovata*. **Biomolecules And Therapeutics**, [S.I.], v. 16, n. 3, p. 270-276, 30 set. 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2008.16.3.270>

CLEMENTS, Caitlin C. *et al.* Evaluation of the Social Motivation Hypothesis of Autism. **JAMA Psychiatry**, [S.I.], v. 75, n. 8, p. 797-808, 1 ago. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2018.1100>

CORDING, Katherine R.; BATEUP, Helen S. Altered motor learning and coordination in mouse models of autism spectrum disorder. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [S.I.], v. 17, p. 1-16, 8 nov. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2023.1270489>

CRYAN, John F. *et al.* The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiological Reviews**, [S.I.], v. 99, n. 4, p. 1877-2013, 1 out. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>

CUI, H. S. *et al.* Protective action of honokiol, administered orally, against oxidative stress in brain of mice challenged with NMDA. **Phytomedicine**, [S.I.], v. 14, n. 10, p. 696-700, out. 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2007.03.005>

CUOMO, Mariella *et al.* Host fecal DNA specific methylation signatures mark gut dysbiosis and inflammation in children affected by autism spectrum disorder. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 13, n. 1, p. 1-9, 24 out. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-45132-0>

DEMIR, Mehmet *et al.* Honokiol prevents central kainic acid-induced neurodegeneration by suppressing oxidative stress, inflammation, and TGF- β 1 expression. **Archives Of Physiology**

And Biochemistry, [S.I.], v. 132, n. 1, p. 37-48, 22 jul. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/13813455.2025.2535723>

ELLMAN, George L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, [S.I.], v. 7, n. 2, p. 88-95, jul. 1961. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

ESPOSITO, Dario *et al.* A Systematic Review on Autism and Hyperserotonemia: state-of-the-art, limitations, and future directions. **Brain Sciences**, [S.I.], v. 14, n. 5, p. 1-31, 10 maio 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci14050481>

EVANS, Maya M. *et al.* Developmental Disruptions of the Dorsal Striatum in Autism Spectrum Disorder. **Biological Psychiatry**, [S.I.], v. 95, n. 2, p. 102-111, jan. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2023.08.015>

FAGEN, Sara J. *et al.* Honokiol decreases alpha-synuclein mRNA levels and reveals novel targets for modulating alpha-synuclein expression. **Frontiers In Aging Neuroscience**, [S.I.], v. 15, p. 1-13, 10 ago. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2023.1179086>

FERESHETYAN, Katarine *et al.* Assessment of behavioral, morphological and electrophysiological changes in prenatal and postnatal valproate induced rat models of autism spectrum disorder. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 11, n. 1, p. 1-17, 6 dez. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-02994-6>

FILE, Sandra E.; HYDE, J.R.G. Can social interaction be used to measure anxiety? **British Journal Of Pharmacology**, [S.I.], v. 62, n. 1, p. 19-24, jan. 1978. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1978.tb07001.x>

FRYE, Richard E. *et al.* Biomarkers of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **Neurobiology Of Disease**, [S.I.], v. 197, p. 1-34, jul. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2024.106520>

FU, Li *et al.* ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online admet prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, api functionality and decision support. **Nucleic Acids Research**, [S.I.], v. 52, n. W1, p. W422-W431, 4 abr. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkae236>

GARBARINO, Valentina R. *et al.* Extreme enhancement or depletion of serotonin transporter function and serotonin availability in autism spectrum disorder. **Pharmacological Research**, [S.I.], v. 140, p. 85-99, fev. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2018.07.010>

GAŚSOWSKA-DOBROWOLSKA, Magdalena *et al.* Prenatal Exposure to Valproic Acid Affects Microglia and Synaptic Ultrastructure in a Brain-Region-Specific Manner in Young-Adult Male Rats: relevance to autism spectrum disorders. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 21, n. 10, p. 1-33, 18 maio 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21103576>

GERSHON, Michael D.; TACK, Jan. The Serotonin Signaling System: from basic understanding to drug development for functional gi disorders. **Gastroenterology**, [S.I.], v. 132, n. 1, p. 397-414, jan. 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.002>

GIACOBINI, Ezio; PEPEU, Giancarlo. Sex and Gender Differences in the Brain Cholinergic System and in the Response to Therapy of Alzheimer Disease with Cholinesterase Inhibitors. **Current Alzheimer Research**, [S.I.], v. 15, n. 11, p. 1077-1084, 7 set. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1567205015666180613111504>

GOETTING, Isabell *et al.* Targeting AKT-Dependent Regulation of Antioxidant Defense Sensitizes AKT-E17K Expressing Cancer Cells to Ionizing Radiation. **Frontiers In Oncology**, [S.I.], v. 12, p. 1-15, 8 jul. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2022.920017>

GOTTLICHER, M. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. **The EMBO Journal**, [S.I.], v. 20, n. 24, p. 6969-6978, 17 dez. 2001. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>

GUEVARA-RAMÍREZ, Patricia *et al.* Mechanistic Links Between Gut Dysbiosis, Insulin Resistance, and Autism Spectrum Disorder. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 26, n. 13, p. 1-17, 7 jul. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26136537>

GUO, Si *et al.* Honokiol Attenuates the Memory Impairments, Oxidative Stress, Neuroinflammation, and GSK-3 β Activation in Vascular Dementia Rats. **Journal Of Alzheimer's Disease**, [S.I.], v. 71, n. 1, p. 97-108, 16 jul. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.3233/jad-190324>

HAN, Feng. Effect of Restraint Stress on Pain Sensitivity, Spinal Trigeminal Nucleus Neurons, and Astrocytes in the Masseter Area of Rats. **Computational Intelligence And Neuroscience**, [S.I.], v. 2022, p. 1-8, 5 ago. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2022/2345039>

HAN, Yvonne M. Y. *et al.* Neurophysiological and behavioral effects of multisession prefrontal tDCS and concurrent cognitive remediation training in patients with autism spectrum disorder (ASD): a double-blind, randomized controlled fnirs study. **Brain Stimulation**, [S.I.], v. 15, n. 2, p. 414-425, mar. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2022.02.004>

HARADA, Masafumi *et al.* Non-Invasive Evaluation of the GABAergic/Glutamatergic System in Autistic Patients Observed by MEGA-Editing Proton MR Spectroscopy Using a Clinical 3 Tesla Instrument. **Journal Of Autism And Developmental Disorders**, [S.I.], v. 41, n. 4, p. 447-454, 21 jul. 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-010-1065-0>

HAVRANEK, Tomas; BACOVA, Zuzana; BAKOS, Jan. Oxytocin, GABA, and dopamine interplay in autism. **Endocrine Regulations**, [S.I.], v. 58, n. 1, p. 105-114, 1 jan. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.2478/enr-2024-0012>

HOLLANDER, Eric *et al.* A Placebo Controlled Crossover Trial of Liquid Fluoxetine on Repetitive Behaviors in Childhood and Adolescent Autism. **Neuropsychopharmacology**, [S.I.], v. 30, n. 3, p. 582-589, 15 dez. 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1300627>

HORVATH, Karoly *et al.* Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. **The Journal Of Pediatrics**, [S.I.], v. 135, n. 5, p. 559-563, nov. 1999. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476\(99\)70052-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476(99)70052-1)

HOU, Mingyue *et al.* Honokiol improves cognitive impairment in APP/PS1 mice through activating mitophagy and mitochondrial unfolded protein response. **Chemico-Biological Interactions**, [S.I.], v. 351, p. 1-13, jan. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109741>

HOU, Yu-Chi; CHAO, Pei-Dawn Lee; CHEN, Shiouh-Yi. Honokiol and Magnolol Increased Hippocampal Acetylcholine Release in Freely-Moving Rats. **The American Journal Of Chinese Medicine**, [S.I.], v. 28, n. 0304, p. 379-384, jan. 2000. doi: <http://dx.doi.org/10.1142/s0192415x00000441>

HUA, Kuo-Feng *et al.* Honokiol Exhibits Anti-NLRP3 Inflammasome and Antimicrobial Properties in Neisseria gonorrhoeae-Infected Macrophages. **Journal Of Inflammation Research**, [S.I.], v. 17, p. 3499-3513, maio 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.2147/jir.s454221>

HUSSMAN, John P. Letters to the Editor: suppressed gabaergic inhibition as a common factor in suspected etiologies of autism. **Journal Of Autism And Developmental Disorders**, [S.I.], v. 31, n. 2, p. 247-248, abr. 2001. doi: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1010715619091>

IFFLAND, Michelle *et al.* Pharmacological intervention for irritability, aggression, and self-injury in autism spectrum disorder (ASD). **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [S.I.], v. 2023, n. 10, p. 1-585, 9 out. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd011769.pub2>

IGLESIAS-VÁZQUEZ, Lucía *et al.* Composition of Gut Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorder: a systematic review and meta-analysis. **Nutrients**, [S.I.], v. 12, n. 3, p. 1-21, 17 mar. 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/nu12030792>

ISOMAE, Kazuo *et al.* Effects of T-82, a New Quinoline Derivative, on Cholinesterase Activity and Extracellular Acetylcholine Concentration in Rat Brain. **Japanese Journal Of Pharmacology**, [S.I.], v. 88, n. 2, p. 206-212, 2002. doi: <http://dx.doi.org/10.1254/jjp.88.206>

JANGRA, Ashok *et al.* Honokiol abrogates chronic restraint stress-induced cognitive impairment and depressive-like behaviour by blocking endoplasmic reticulum stress in the hippocampus of mice. **European Journal Of Pharmacology**, [S.I.], v. 770, p. 25-32, jan. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.047>

JASIM, Sara; PERRY, Adrienne. Repetitive and restricted behaviors and interests in autism spectrum disorder: relation to individual characteristics and mental health problems. **BMC Psychiatry**, [S.I.], v. 23, n. 1, p. 1-14, 23 maio 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s12888-023-04766-0>

JUN-JUN, Wang *et al.* The Pharmacokinetics and Tissue Distribution of Honokiol and its Metabolites in Rats. **European Journal Of Drug Metabolism And Pharmacokinetics**, [S.I.], v. 41, n. 5, p. 587-594, 9 maio 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s13318-015-0281-6>

KAEWNGAM, Soraya *et al.* The effects of hesperidin on valproic acid-induced reduction in hippocampal neurogenesis through the antioxidant and apoptotic pathways in adult rats. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 14, n. 1, p. 1-10, 21 nov. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-024-80183-x>

- KANG, Dae-Wook *et al.* Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. **Microbiome**, [S.I.], v. 5, n. 1, p. 1-16, 23 jan. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-016-0225-7>
- KATAOKA, Shunsuke *et al.* Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. **International Journal Of Neuropsychopharmacology**, [S.I.], v. 16, n. 1, p. 91-103, 1 fev. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/s1461145711001714>
- KESKIN, Ozlem *et al.* Principles of Protein–Protein Interactions: what are the preferred ways for proteins to interact?. **Chemical Reviews**, [S.I.], v. 108, n. 4, p. 1225-1244, 21 mar. 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/cr040409x>
- KIM, Ji-Woon *et al.* Gastrointestinal Tract Abnormalities Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rat Offspring. **Toxicological Research**, [S.I.], v. 29, n. 3, p. 173-179, 30 set. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.5487/tr.2013.29.3.173>
- KIM, Ki Chan *et al.* The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague–Dawley rats. **Toxicology Letters**, [S.I.], v. 201, n. 2, p. 137-142, mar. 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.018>
- KIM, Ui-Jin; HONG, Namgwe; AHN, Jin-Chul. Photobiomodulation Attenuated Cognitive Dysfunction and Neuroinflammation in a Prenatal Valproic Acid-Induced Autism Spectrum Disorder Mouse Model. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 23, n. 24, p. 1-18, 17 dez. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232416099>
- KING, Bryan H. *et al.* Lack of Efficacy of Citalopram in Children With Autism Spectrum Disorders and High Levels of Repetitive Behavior. **Archives Of General Psychiatry**, [S.I.], v. 66, n. 6, p. 1-19, 1 jun. 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.30>
- KINJO, Tomoya *et al.* Prenatal exposure to valproic acid is associated with altered neurocognitive function and neurogenesis in the dentate gyrus of male offspring rats. **Brain Research**, [S.I.], v. 1723, p. 1-9, nov. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146403>
- KO, Mee Jung; MULIA, Grace E.; VAN RIJN, Richard M. Commonly Used Anesthesia/Euthanasia Methods for Brain Collection Differentially Impact MAPK Activity in Male and Female C57BL/6 Mice. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [S.I.], v. 13, p. 1-10, 28 mar. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2019.00096>
- KRAKOWIAK, Paula *et al.* Neonatal Cytokine Profiles Associated With Autism Spectrum Disorder. **Biological Psychiatry**, [S.I.], v. 81, n. 5, p. 442-451, mar. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.08.007>
- KUO, Hsiao-Ying; LIU, Fu-Chin. Pathophysiological Studies of Monoaminergic Neurotransmission Systems in Valproic Acid-Induced Model of Autism Spectrum Disorder. **Biomedicines**, [S.I.], v. 10, n. 3, p. 1-25, 27 fev. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10030560>

KURAHASHI, Hitomi *et al.* Autism spectrum disorder-like behaviors induced by hyper-glutamatergic NMDA receptor signaling through hypo-serotonergic 5-HT1A receptor signaling in the prefrontal cortex in mice exposed to prenatal valproic acid.

Neuropsychopharmacology, [S.I.], v. 50, n. 5, p. 739-750, 11 out. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41386-024-02004-z>

LARNER, Olivia *et al.* A Need for Consistency in Behavioral Phenotyping for ASD: analysis of the valproic acid model. **Autism Research And Treatment**, [S.I.], v. 2021, p. 1-10, 19 mar. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2021/8863256>

LAUBER, Emanuel; FILICE, Federica; SCHWALLER, Beat. Prenatal Valproate Exposure Differentially Affects Parvalbumin-Expressing Neurons and Related Circuits in the Cortex and Striatum of Mice. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, [S.I.], v. 9, p. 1-16, 21 dez. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2016.00150>

LEE, Andrew S.; AZMITIA, Efrain C.; WHITAKER-AZMITIA, Patricia M. Developmental microglial priming in postmortem autism spectrum disorder temporal cortex. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.I.], v. 62, p. 193-202, maio 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2017.01.019>

LEE, Yong Kyung *et al.* Protective effect of the ethanol extract of *Magnolia officinalis* and 4-O-methylhonokiol on scopolamine-induced memory impairment and the inhibition of acetylcholinesterase activity. **Journal Of Natural Medicines**, [S.I.], v. 63, n. 3, p. 274-282, 4 abr. 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-009-0330-z>

LI, Haitao *et al.* Honokiol relieves hippocampal neuronal damage in Alzheimer's disease by activating the SIRT3-mediated mitochondrial autophagy. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, [S.I.], v. 30, n. 8, p. 1-21, ago. 2024b. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/cns.14878>

LI, Xiaofang *et al.* The Neuropharmacological Effects of Magnolol and Honokiol: a review of signal pathways and molecular mechanisms. **Current Molecular Pharmacology**, [S.I.], v. 16, n. 2, p. 161-177, abr. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/187446721566622022314110>

LI, Xiuxia *et al.* Recent advances of honokiol : pharmacological activities, manmade derivatives and structure-activity relationship. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 272, p. 1-16, jun. 2024a. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116471>

LI, Yao; LIANG, Chenglin; ZHOU, Xiyuan. The application prospects of honokiol in dermatology. **Dermatologic Therapy**, [S.I.], v. 35, n. 8, p. 1-9, 28 jun. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/dth.15658>

LI, Zhiquan *et al.* Honokiol induces autophagy and apoptosis of osteosarcoma through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, [S.I.], p. 2719-2723, 21 nov. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2017.8123>

LIMA, Taynara Amancio de *et al.* Differential diagnosis between autism spectrum disorder and other developmental disorders with emphasis on the preschool period. **World Journal Of Pediatrics**, [S.I.], v. 19, n. 8, p. 715-726, 25 out. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12519-022-00629-y>

LISS, Andrea *et al.* Neuroimmune regulation of the prefrontal cortex tetrapartite synapse. **Neuropharmacology**, [S.I.], v. 269, p. 1-14, maio 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2025.110335>

LIU, Chuanqi *et al.* Implication of Hippocampal Neurogenesis in Autism Spectrum Disorder: pathogenesis and therapeutic implications. **Current Neuropharmacology**, [S.I.], v. 21, n. 11, p. 2266-2282, nov. 2023a. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1570159x21666221220155455>

LIU, Zehui *et al.* The association between gene polymorphisms in voltage-gated potassium channels Kv2.1 and Kv4.2 and susceptibility to autism spectrum disorder. **Frontiers In Psychiatry**, [S.I.], v. 13, p. 1-13, 23 jan. 2023b. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2022.994166>

LO, Yu-Chiang *et al.* Magnolol and honokiol isolated from magnolia officinalis protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, [S.I.], v. 47, n. 3, p. 549-553, fev. 1994. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90187-2](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(94)90187-2)

LONG, Junzi *et al.* Insights into the structure and function of the hippocampus: implications for the pathophysiology and treatment of autism spectrum disorder. **Frontiers In Psychiatry**, [S.I.], v. 15, p. 1-25, 23 abr. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2024.1364858>

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAFFEI, Massimo E. 5-Hydroxytryptophan (5-HTP): natural occurrence, analysis, biosynthesis, biotechnology, physiology and toxicology. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 22, n. 1, p. 1-25, 26 dez. 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22010181>

MAISTERRENA, Alexandre *et al.* The State of the Dopaminergic and Glutamatergic Systems in the Valproic Acid Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. **Biomolecules**, [S.I.], v. 12, n. 11, p. 1-14, 15 nov. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/biom12111691>

MAKKONEN, Ismo *et al.* Serotonin and dopamine transporter binding in children with autism determined by SPECT. **Developmental Medicine & Child Neurology**, [S.I.], v. 50, n. 8, p. 593-597, ago. 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8749.2008.03027.x>

MALHI, Prabhjot; SINGHI, Pratibha. Follow up of Children with Autism Spectrum Disorders: stability and change in diagnosis. **The Indian Journal Of Pediatrics**, [S.I.], v. 78, n. 8, p. 941-945, 12 fev. 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12098-011-0370-8>

MANIRAM, Jennal *et al.* Pharmacological Management of Core Symptoms and Comorbidities of Autism Spectrum Disorder in Children and Adolescents: a systematic review. **Neuropsychiatric Disease And Treatment**, [S.I.], v. 18, p. 1629-1644, ago. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.2147/ndt.s371013>

MANVILLE, Rían W. *et al.* A novel autism-associated KCNB1 mutation dramatically slows Kv2.1 potassium channel activation, deactivation and inactivation. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [S.I.], v. 18, p. 1-10, 29 jul. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2024.1438101>

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal Of Biology**, [S.I.], v. 62, n. 4, p. 609-614, nov. 2002. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008>

MARTIN, Hugo *et al.* Review: dopamine, serotonin, and the translational neuroscience of aggression in autism spectrum disorder. **JAACAP Open**, [S.I.], v. 3, n. 1, p. 29-41, mar. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaacop.2024.01.010>

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Agustín E.; CERVIN, Matti; PIQUERAS, Jose A. Relationships Between Emotion Regulation, Social Communication and Repetitive Behaviors in Autism Spectrum Disorder. **Journal Of Autism And Developmental Disorders**, [S.I.], v. 52, n. 10, p. 4519-4527, 28 out. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-021-05340-x>

MASI, A. *et al.* Cytokine aberrations in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **Molecular Psychiatry**, [S.I.], v. 20, n. 4, p. 440-446, 17 jun. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2014.59>

MASI, Anne *et al.* An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. **Neuroscience Bulletin**, [S.I.], v. 33, n. 2, p. 183-193, 17 fev. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12264-017-0100-y>

MEDIANE, Diego H. *et al.* Medial prefrontal cortex circuitry and social behaviour in autism. **Neuropharmacology**, [S.I.], v. 260, p. 1-12, dez. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.110101>

MEHRA, Sweety *et al.* Critical Evaluation of Valproic Acid-Induced Rodent Models of Autism: current and future perspectives. **Journal Of Molecular Neuroscience**, [S.I.], v. 72, n. 6, p. 1259-1273, 30 maio 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-022-02033-7>

MIRZA, Roohi; SHARMA, Bhupesh. Benefits of Fenofibrate in prenatal valproic acid-induced autism spectrum disorder related phenotype in rats. **Brain Research Bulletin**, [S.I.], v. 147, p. 36-46, abr. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.02.003>

MISRA, Vivek. The Social Brain Network and Autism. **Annals Of Neurosciences**, [S.I.], v. 21, n. 2, p. 69-73, 1 abr. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210208>

MIYAZAKI, Kaoru; NARITA, Naoko; NARITA, Masaaki. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. **International Journal Of Developmental Neuroscience**, [S.I.], v. 23, n. 2-3, p. 287-297, 2 jul. 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.004>

MOHAPATRA, Alok Nath; WAGNER, Shlomo. The role of the prefrontal cortex in social interactions of animal models and the implications for autism spectrum disorder. **Frontiers In Psychiatry**, [S.I.], v. 14, p. 1-12, 20 jun. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2023.1205199>

MULLE, Jennifer G.; SHARP, William G.; CUBELLS, Joseph F. The Gut Microbiome: a new frontier in autism research. **Current Psychiatry Reports**, [S.I.], v. 15, n. 2, p. 1-13, 10 jan. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11920-012-0337-0>

MULLER, C.L.; ANACKER, A.M.J.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. The serotonin system in autism spectrum disorder: from biomarker to animal models. **Neuroscience**, [S.I.], v. 321, p. 24-41, maio 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.010>

NAGABABU, Enika *et al.* Assessment of Antioxidant Activity of Eugenol In Vitro and In Vivo. **Methods In Molecular Biology**, [S.I.], p. 165-180, 25 nov. 2009. doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8_10

NAKHAL, Mohammed Moutaz *et al.* Canagliflozin Ameliorates Oxidative Stress and Autistic-like Features in Valproic-Acid-Induced Autism in Rats: comparison with aripiprazole action. **Pharmaceuticals**, [S.I.], v. 16, n. 5, p. 1-18, 19 maio 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16050769>

NARDI, Leonardo *et al.* Neuroanatomical changes of ionotropic glutamatergic and GABAergic receptor densities in male mice modeling idiopathic and syndromic autism spectrum disorder. **Frontiers In Psychiatry**, [S.I.], v. 14, p. 1-15, 21 jul. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2023.1199097>

NARITA, Naoko *et al.* Increased Monoamine Concentration in the Brain and Blood of Fetal Thalidomide- and Valproic Acid-Exposed Rat: putative animal models for autism. **Pediatric Research**, [S.I.], v. 52, n. 4, p. 576-579, out. 2002. doi: <http://dx.doi.org/10.1203/00006450-200210000-00018>

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **PubChem**. 2025. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 7 maio 2025.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. 8. ed. Washington: The National Academies Press, 2011.

NEES, Frauke *et al.* Global and Regional Structural Differences and Prediction of Autistic Traits during Adolescence. **Brain Sciences**, [S.I.], v. 12, n. 9, p. 1-14, 2 set. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci12091187>

NEWTON, Isaac. **Isaac Newton letter to Robert Hooke, 1675**. 1675. Disponível em: <https://digitallibrary.hsp.org/index.php/Detail/objects/9792>. Acesso em: 7 set. 2025.

NICOLINI, Chiara; FAHNESTOCK, Margaret. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Experimental Neurology**, [S.I.], v. 299, p. 217-227, jan. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>

NIU, Lin *et al.* The rich pharmacological activities of Magnolia officinalis and secondary effects based on significant intestinal contributions. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.I.], v. 281, p. 1-22, dez. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2021.114524>

NOUR-ELDINE, Wared *et al.* In search of immune cellular sources of abnormal cytokines in the blood in autism spectrum disorder: a systematic review of case-control studies. **Frontiers In Immunology**, [S.I.], v. 13, p. 1-16, 4 out. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2022.950275>

- OLAS, Beata. The Cardioprotective Effect of *Magnolia officinalis* and Its Major Bioactive Chemical Constituents. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 26, n. 9, p. 1-15, 5 maio 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26094380>
- OLIVIER, Berend. Serotonin: a never-ending story. **European Journal Of Pharmacology**, [S.I.], v. 753, p. 2-18, abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.031>
- OSTROWSKI, Janusz *et al.* Autism Spectrum Disorders: etiology, epidemiology, and challenges for public health. **Medical Science Monitor**, [S.I.], v. 30, p. 1-6, 19 abr. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.12659/msm.944161>
- OZONOFF, Sally *et al.* The onset of autism: patterns of symptom emergence in the first years of life. **Autism Research**, [S.I.], v. 1, n. 6, p. 320-328, dez. 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/aur.53>
- PAIVA, Vinícius de Almeida *et al.* Protein structural bioinformatics: an overview. **Computers In Biology And Medicine**, [S.I.], v. 147, p. 1-27, ago. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiomed.2022.105695>
- PANGRAZZI, Luca; BALASCO, Luigi; BOZZI, Yuri. Oxidative Stress and Immune System Dysfunction in Autism Spectrum Disorders. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 21, n. 9, p. 1-14, 6 maio 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21093293>
- PARK, Kelly Jimin; GAO, Yao. Gut-brain axis and neurodegeneration: mechanisms and therapeutic potentials. **Frontiers In Neuroscience**, [S.I.], v. 18, p. 1-12, 23 out. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2024.1481390>
- PARK, Soojin *et al.* Honokiol-induced SIRT3 upregulation protects hippocampal neurons by suppressing inflammatory processes in pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurochemistry International**, [S.I.], v. 180, p. 1-8, nov. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105873>
- PATIL, Om; KAPLE, Meghali. Sensory Processing Differences in Individuals With Autism Spectrum Disorder: a narrative review of underlying mechanisms and sensory-based interventions. **Cureus**, [S.I.], p. 1-7, 31 out. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.7759/cureus.48020>
- PAXINOS, George; FRANKLIN, Keith B. J. **Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 2019. 246 p.
- PETROPOULOS, Andreas *et al.* Microbiota Gut–Brain Axis and Autism Spectrum Disorder: mechanisms and therapeutic perspectives. **Nutrients**, [S.I.], v. 17, n. 18, p. 1-26, 17 set. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/nu17182984>
- PIRES, Douglas E. V.; BLUNDELL, Tom L.; ASCHER, David B. PkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 22 abr. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
- PODGORAC, Jelena *et al.* The influence of continuous prenatal exposure to valproic acid on physical, nociceptive, emotional and psychomotor responses during adolescence in mice:

dose-related effects within sexes. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, [S.I.], v. 16, p. 1-17, 29 set. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fnbeh.2022.982811>

POSEY, David J. *et al.* Antipsychotics in the treatment of autism. **Journal Of Clinical Investigation**, [S.I.], v. 118, n. 1, p. 6-14, 2 jan. 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1172/jci32483>

QI, Xin-Yue *et al.* Sirtuin 3-mediated deacetylation of superoxide dismutase 2 ameliorates sodium fluoride-induced mitochondrial dysfunction in porcine oocytes. **Science Of The Total Environment**, [S.I.], v. 908, p. 1-17, jan. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168306>

QIANG, Li-Qin *et al.* Combined administration of the mixture of honokiol and magnolol and ginger oil evokes antidepressant-like synergism in rats. **Archives Of Pharmacal Research**, [S.I.], v. 32, n. 9, p. 1281-1292, set. 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-009-1914-6>

QIN, Luye *et al.* Deficiency of autism risk factor ASH1L in prefrontal cortex induces epigenetic aberrations and seizures. **Nature Communications**, [S.I.], v. 12, n. 1, p. 1-14, 15 nov. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-26972-8>

QU, Chang *et al.* Nano-Honokiol ameliorates the cognitive deficits in TgCRND8 mice of Alzheimer's disease via inhibiting neuropathology and modulating gut microbiota. **Journal Of Advanced Research**, [S.I.], v. 35, p. 231-243, jan. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2021.03.012>

RADYUSHKIN, K. *et al.* Neuroligin-3-deficient mice: model of a monogenic heritable form of autism with an olfactory deficit. **Genes, Brain And Behavior**, [S.I.], v. 8, n. 4, p. 416-425, jun. 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-183x.2009.00487.x>

RAUF, Abdur *et al.* Honokiol: a review of its pharmacological potential and therapeutic insights. **Phytomedicine**, [S.I.], v. 90, p. 1-16, set. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153647>

REXRODE, Lindsay E. *et al.* Molecular profiling of the hippocampus of children with autism spectrum disorder. **Molecular Psychiatry**, [S.I.], v. 29, n. 7, p. 1968-1979, 14 fev. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41380-024-02441-8>

RICKERT, Uta *et al.* Anti-inflammatory properties of Honokiol in activated primary microglia and astrocytes. **Journal Of Neuroimmunology**, [S.I.], v. 323, p. 78-86, out. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.07.013>

ROBAS, Raz *et al.* Digestive Neurobiology in Autism: from enteric and central nervous system interactions to shared genetic pathways. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 26, n. 19, p. 1-24, 1 out. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms26199580>

ROMOLI, Michele *et al.* Valproic Acid and Epilepsy: from molecular mechanisms to clinical evidences. **Current Neuropharmacology**, [S.I.], v. 17, n. 10, p. 926-946, 13 set. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1570159x17666181227165722>

ROSENSWEIG, N. S. Diet and intestinal enzyme adaptation: implications for gastrointestinal disorders. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.I.], v. 28, n. 6, p. 648-655, jun. 1975. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/28.6.648>

ROY, Mandy; STRATE, Peter. Autism spectrum disorders in adulthood. **Deutsches Ärzteblatt International**, [S.I.], p. 87-93, 10 fev. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.3238/arztebl.m2022.0379>

SACAI, Hiroaki *et al.* Autism spectrum disorder-like behavior caused by reduced excitatory synaptic transmission in pyramidal neurons of mouse prefrontal cortex. **Nature Communications**, [S.I.], v. 11, n. 1, p. 1-15, 12 out. 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18861-3>

SAGHAZADEH, Amene *et al.* A meta-analysis of pro-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: effects of age, gender, and latitude. **Journal Of Psychiatric Research**, [S.I.], v. 115, p. 90-102, ago. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.05.019>

SALARI, Nader *et al.* The global prevalence of autism spectrum disorder: a comprehensive systematic review and meta-analysis. **Italian Journal Of Pediatrics**, [S.I.], v. 48, n. 1, p. 1-16, 8 jul. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s13052-022-01310-w>

SALES-MILLÁN, Amapola de *et al.* Microbiome–Gut–Mucosal–Immune–Brain Axis and Autism Spectrum Disorder (ASD): a novel proposal of the role of the gut microbiome in asd aetiology. **Behavioral Sciences**, [S.I.], v. 13, n. 7, p. 1-21, 30 jun. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/bs13070548>

SANDHU, Arushi *et al.* Phosphodiesterase inhibitor, ibudilast alleviates core behavioral and biochemical deficits in the prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. **Brain Research**, [S.I.], v. 1815, p. 1-13, set. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148443>

SARTER, Martin; BODEWITZ, Geert; STEPHENS, David N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. **Psychopharmacology**, [S.I.], v. 94, n. 4, p. 491-495, abr. 1988. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/bf00212843>

SATO, Atsushi *et al.* Influence of Prenatal Drug Exposure, Maternal Inflammation, and Parental Aging on the Development of Autism Spectrum Disorder. **Frontiers In Psychiatry**, [S.I.], v. 13, p. 1-23, 9 fev. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2022.821455>

SCHMITT, Gabriela Cristina *et al.* Gender differences in biochemical markers and oxidative stress of rats after 28 days oral exposure to a mixture used for weight loss containing p-synephrine, ephedrine, salicin, and caffeine. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.I.], v. 52, n. 1, p. 59-68, mar. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502016000100007>

SEDLAK, Jozef; LINDSAY, Raymond H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, [S.I.], v. 25, p. 192-205, 1968. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

SELAMET, Ezgi; USTA, Miraç Barış. Mitochondrial Dysfunction and mTOR in Autism Spectrum Disorders. **Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar**, [S.I.], v. 15, n. 4, p. 697-704, 25 dez. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.18863/pgy.1205786>

SHARMA, Amit Raj *et al.* Valproic Acid and Propionic Acid Modulated Mechanical Pathways Associated with Autism Spectrum Disorder at Prenatal and Neonatal Exposure. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, [S.I.], v. 21, n. 5, p. 399-408, jun. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1871527320666210806165430>

SHARON, Gil *et al.* The Central Nervous System and the Gut Microbiome. **Cell**, [S.I.], v. 167, n. 4, p. 915-932, nov. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.027>

SHAW, Kelly A. *et al.* Early Identification of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 4 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. **MMWR. Surveillance Summaries**, [S.I.], v. 70, n. 10, p. 1-14, 3 dez. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.ss7010a1>

SHEN, Jui-Lung *et al.* Honokiol and Magnolol as Multifunctional Antioxidative Molecules for Dermatologic Disorders. **Molecules**, [S.I.], v. 15, n. 9, p. 6452-6465, 16 set. 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules15096452>

SHEN, Yingying *et al.* Bibliometric study of neuroinflammation in autism spectrum disorder. **Frontiers In Psychiatry**, [S.I.], v. 14, p. 1-15, 19 jan. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2023.1086068>

SHIH, J. C.; CHEN, K.; RIDD, M. J. Monoamine Oxidase: from genes to behavior. **Annual Review Of Neuroscience**, [S.I.], v. 22, n. 1, p. 197-217, mar. 1999. doi: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.197>

SILVA JUNIOR, Estácio Amaro da *et al.* Cannabis and cannabinoid use in autism spectrum disorder: a systematic review. **Trends In Psychiatry And Psychotherapy**, [S.I.], p. 1-10, 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.47626/2237-6089-2020-0149>

SINGHI, Pratibha; MALHI, Prahbjot. Early Diagnosis of Autism Spectrum Disorder: what the pediatricians should know. **Indian Journal Of Pediatrics**, [S.I.], v. 90, n. 4, p. 364-368, 18 out. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12098-022-04363-1>

SIVARAMAN, Bhuvaneswari *et al.* Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitor Molecules with Therapeutic Potential for Alzheimer's Disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, [S.I.], v. 21, n. 5, p. 427-449, jun. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1871527320666210928160159>

SNOW, Wanda M.; ALBENSI, Benedict C. Neuronal Gene Targets of NF- κ B and Their Dysregulation in Alzheimer's Disease. **Frontiers In Molecular Neuroscience**, [S.I.], v. 9, p. 1-19, 9 nov. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2016.00118>

SOARES, Cláudio M.; LOUSA, Diana. Structural Bioinformatics: exciting times in a rapidly evolving field. **FEBS Open Bio**, [S.I.], v. 15, n. 2, p. 200-201, fev. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/2211-5463.13968>

- SRIKANTHA, Piranavie; MOHAJERI, M. Hasan. The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 20, n. 9, p. 1-28, 29 abr. 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20092115>
- SULAKHIYA, Kunjbihari *et al.* Honokiol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive like behavior by impeding neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice. **European Journal Of Pharmacology**, [S.I.], v. 744, p. 124-131, dez. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.09.049>
- SUSSMAN, D. *et al.* The autism puzzle: diffuse but not pervasive neuroanatomical abnormalities in children with asd. **Neuroimage: Clinical**, [S.I.], v. 8, p. 170-179, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nicl.2015.04.008>
- SUZUKI, Katsuaki *et al.* Reduced Acetylcholinesterase Activity in the Fusiform Gyrus in Adults With Autism Spectrum Disorders. **Archives Of General Psychiatry**, [S.I.], v. 68, n. 3, p. 306-313, 7 mar. 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.4>
- TAFOLLA, Maira; LORD, Catherine. Longitudinal Analyses of Mental Health in Autistic Individuals: a systematic review. **Brain Sciences**, [S.I.], v. 14, n. 10, p. 1-21, 18 out. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci14101033>
- TAI, Lung-Hao *et al.* Transient stimulation of distinct subpopulations of striatal neurons mimics changes in action value. **Nature Neuroscience**, [S.I.], v. 15, n. 9, p. 1281-1289, 19 ago. 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3188>
- TALAREK, Sylwia *et al.* Neuroprotective effects of honokiol: from chemistry to medicine. **Biofactors**, [S.I.], v. 43, n. 6, p. 760-769, 17 ago. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/biof.1385>
- TANIYA, Masuma Afrin *et al.* Role of Gut Microbiome in Autism Spectrum Disorder and Its Therapeutic Regulation. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.I.], v. 12, p. 1-13, 22 jul. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.915701>
- TAPPENDEN, Kelly A. Mechanisms of Enteral Nutrient-Enhanced Intestinal Adaptation. **Gastroenterology**, [S.I.], v. 130, n. 2, p. S93-S99, fev. 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.051>
- THABAULT, Mathieu *et al.* Cerebellar and Striatal Implications in Autism Spectrum Disorders: from clinical observations to animal models. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 23, n. 4, p. 1-33, 18 fev. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23042294>
- THEOHARIDES, T. C. *et al.* Atopic diseases and inflammation of the brain in the pathogenesis of autism spectrum disorders. **Translational Psychiatry**, [S.I.], v. 6, n. 6, p. 1-9, 28 jun. 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2016.77>
- THORNE, Bryony N.; ELLENBROEK, Bart A.; DAY, Darren J. Reduced expression of the serotonin transporter impacts mitochondria in a sexually dimorphic manner. **Biochemistry And Biophysics Reports**, [S.I.], v. 41, p. 1-10, mar. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2024.101895>

- THYE, Melissa D. *et al.* The impact of atypical sensory processing on social impairments in autism spectrum disorder. **Developmental Cognitive Neuroscience**, [S.I.], v. 29, p. 151-167, jan. 2018. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dcn.2017.04.010>
- TODA, Irene Martínez de *et al.* Sex differences in markers of oxidation and inflammation. Implications for ageing. **Mechanisms Of Ageing And Development**, [S.I.], v. 211, p. 1-13, abr. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2023.111797>
- TORRENS-MAS, Margalida *et al.* Sexual hormones regulate the redox status and mitochondrial function in the brain. Pathological implications. **Redox Biology**, [S.I.], v. 31, p. 1-12, abr. 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2020.101505>
- TRAETTA, Marianela Evelyn *et al.* Hippocampal neurons isolated from rats subjected to the valproic acid model mimic in vivo synaptic pattern: evidence of neuronal priming during early development in autism spectrum disorders. **Molecular Autism**, [S.I.], v. 12, n. 1, p. 1-23, 6 mar. 2021. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s13229-021-00428-8>
- TSENG, Chieh-En Jane *et al.* Epigenetics of Autism Spectrum Disorder: histone deacetylases. **Biological Psychiatry**, [S.I.], v. 91, n. 11, p. 922-933, jun. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2021.11.021>
- TSUJINO, Naohisa *et al.* Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. **Neuroscience Research**, [S.I.], v. 57, n. 2, p. 289-295, fev. 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neures.2006.10.018>
- URE, Alexandra *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors for autistic spectrum disorders. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [S.I.], v. 2023, n. 6, p. 1-54, 1 jun. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd013851.pub2>
- USUI, Noriyoshi; KOBAYASHI, Hikaru; SHIMADA, Shoichi. Neuroinflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorder. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.I.], v. 24, n. 6, p. 1-22, 13 mar. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24065487>
- VALNEGRI, Pamela *et al.* The X-linked intellectual disability protein IL1RAPL1 regulates excitatory synapse formation by binding PTP δ and RhoGAP2. **Human Molecular Genetics**, [S.I.], v. 20, n. 24, p. 4797-4809, 17 set. 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr418>
- VARELA, Roger B. *et al.* Evaluation of acetylcholinesterase in an animal model of mania induced by d-amphetamine. **Psychiatry Research**, [S.I.], v. 209, n. 2, p. 229-234, set. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2012.11.021>
- VARGHESE, Merina *et al.* Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. **Acta Neuropathologica**, [S.I.], v. 134, n. 4, p. 537-566, 5 jun. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-017-1736-4>
- VARLEY, Ashley N.; BROWNING, Kirsteen N. Gastrointestinal dysfunction in the valproic acid induced model of social deficit in rats. **Autonomic Neuroscience**, [S.I.], v. 253, p. 1-21, jun. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2024.103161>

VARMA, Manthana V. S.; SATEESH, Khandavilli; PANCHAGNULA, Ramesh. Functional Role of P-Glycoprotein in Limiting Intestinal Absorption of Drugs: contribution of passive permeability to p-glycoprotein mediated efflux transport. **Molecular Pharmaceutics**, [S.I.], v. 2, n. 1, p. 12-21, 23 nov. 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/mp0499196>

VIANA, Cristini Escobar *et al.* Lutein-loaded nanoparticles reverse oxidative stress, apoptosis, and autism spectrum disorder-like behaviors induced by prenatal valproic acid exposure in female rats. **Neurotoxicology**, [S.I.], v. 94, p. 223-234, jan. 2023. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2022.12.006>

WANG, Dongmei *et al.* Mitigation of honokiol on fluoride-induced mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and cognitive deficits through activating AMPK/PGC-1 α /Sirt3. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.I.], v. 437, p. 1-14, set. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129381>

WANG, Lien *et al.* TAAR1 and 5-HT1B receptor agonists attenuate autism-like irritability and aggression in rats prenatally exposed to valproic acid. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, [S.I.], v. 245, p. 1-11, dez. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2024.173862>

WANG, Lu; WANG, Junping. Honokiol Ameliorates DSS-Induced Mouse Colitis by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress and Improving the Intestinal Barrier. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.I.], v. 2022, n. 1, p. 1-15, jan. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2022/1755608>

WANG, Xinkun; MICHAELIS, Elias K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Frontiers In Aging Neuroscience**, [S.I.], v. 2, p. 1-13, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2010.00012>

WOODBURY, Anna *et al.* Neuro-Modulating Effects of Honokiol: a review. **Frontiers In Neurology**, [S.I.], v. 4, p. 1-6, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2013.00130>

WU, Jason Boyang; SHIH, Jean C. Valproic Acid Induces Monoamine Oxidase A via Akt/Forkhead Box O1 Activation. **Molecular Pharmacology**, [S.I.], v. 80, n. 4, p. 714-723, out. 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1124/mol.111.072744>

XU, Qun *et al.* Antidepressant-like effects of the mixture of honokiol and magnolol from the barks of *Magnolia officinalis* in stressed rodents. **Progress In Neuro-Psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [S.I.], v. 32, n. 3, p. 715-725, abr. 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.11.020>

XU, Yun; JIANG, Yongfang; LI, Yi. Pyrazinamide enhances lipid peroxidation and antioxidant levels to induce liver injury in rat models through PI3k/Akt inhibition. **Toxicology Research**, [S.I.], v. 9, n. 3, p. 149-157, 28 abr. 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/toxres/tfaa015>

YASUDA, Yuka *et al.* Gene expression analysis in lymphoblasts derived from patients with autism spectrum disorder. **Molecular Autism**, [S.I.], v. 2, n. 1, p. 1-8, 26 maio 2011. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/2040-2392-2-9>

YASUMURA, Misato *et al.* IL1RAPL1 knockout mice show spine density decrease, learning deficiency, hyperactivity and reduced anxiety-like behaviours. **Scientific Reports**, [S.I.], v. 4, n. 1, p. 1-12, 14 out. 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/srep06613>

ZARATE-LOPEZ, David *et al.* Three Decades of Valproate: a current model for studying autism spectrum disorder. **Current Neuropharmacology**, [S.I.], v. 22, n. 2, p. 260-289, fev. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/1570159x22666231003121513>

ZARIMEIDANI, Fatemeh *et al.* Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorder: a neuroinflammatory mediated mechanism of pathogenesis?. **Inflammation**, [S.I.], v. 48, n. 2, p. 501-519, 2 ago. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-024-02061-y>

ZHANG, Anyi *et al.* Connectivity-Based Brain Network Supports Restricted and Repetitive Behaviors in Autism Spectrum Disorder Across Development. **Frontiers In Psychiatry**, [S.I.], v. 13, p. 1-10, 25 mar. 2022. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2022.874090>

ZHANG, Bo *et al.* Antidepressant-Like Effect and Mechanism of Action of Honokiol on the Mouse Lipopolysaccharide (LPS) Depression Model. **Molecules**, [S.I.], v. 24, n. 11, p. 1-17, 28 maio 2019. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24112035>

ZHANG, Yong *et al.* Emerging Substrate Proteins of Kelch-like ECH Associated Protein 1 (Keap1) and Potential Challenges for the Development of Small-Molecule Inhibitors of the Keap1-Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Protein-Protein Interaction. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [S.I.], v. 63, n. 15, p. 7986-8002, 1 abr. 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01865>

ZHENG, Yiting; CHEN, Jing. Voltage-gated potassium channels and genetic epilepsy. **Frontiers In Neurology**, [S.I.], v. 15, p. 1-9, 7 out. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2024.1466075>

ZHONG, Jiu-Gen *et al.* Associations between dysbiosis gut microbiota and changes of neurotransmitters and short-chain fatty acids in valproic acid model rats. **Frontiers In Physiology**, [S.I.], v. 14, p. 1-11, 22 mar. 2023a. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2023.1077821>

ZHOU, Qiang *et al.* Activation of Sirtuin3 by honokiol ameliorates alveolar epithelial cell senescence in experimental silicosis via the cGAS-STING pathway. **Redox Biology**, [S.I.], v. 74, p. 1-17, ago. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2024.103224>

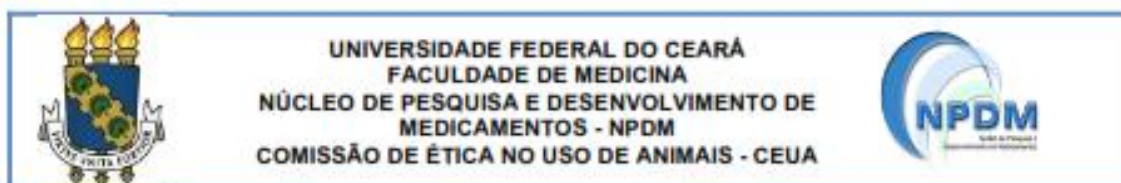
ZHOU, Yujun *et al.* Honokiol alleviated neurodegeneration by reducing oxidative stress and improving mitochondrial function in mutant SOD1 cellular and mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.I.], v. 13, n. 2, p. 577-597, fev. 2023b. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2022.07.019>

ZHU, Hua; ZHONG, Xin. Honokiol as an α -glucosidase inhibitor. **Frontiers In Pharmacology**, [S.I.], v. 15, p. 1-8, 19 jun. 2024. doi: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2024.1425832>

ZHU, Ling-Ping *et al.* Repurposing methimazole to promote coronary collateral circulation through MAPK1-mediated macrophage polarization via ferroptosis. **Theranostics**, [S.I.], v. 15, n. 14, p. 6686-6701, 9 jun. 2025. doi: <http://dx.doi.org/10.7150/thno.111606>

ZIMCIKOVA, Eva *et al.* Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: are the effects on mood and behavior detectable in open-field test?. **Seizure**, [S.I.], v. 52, p. 35-40, nov. 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seizure.2017.09.015>

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO HONOKIOL NA PROLE DE RATOS WISTAR INDUZIDA AO AUTISMO EXPOSTOS AO ÁCIDO VALPRÓICO NO PERÍODO PRÉ-NATAL** registrada com o protocolo **89011223-0**, sob a responsabilidade **GISLEI FROTA ARAGÃO** e **CAMILA NOGUEIRA DOS SANTOS** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião de **16/05/2024**

We hereby certify that the project entitled "**ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT EFFECT OF HONOKIOL IN THE OFFSPRING OF AUTISM-INDUCED WISTAR RATS EXPOSED TO VALPROIC ACID IN THE PRENATAL PERIOD**" identified by the protocol number **89011223-0**, and conducted by **GISLEI FROTA ARAGÃO** and **CAMILA NOGUEIRA DOS SANTOS** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the meeting of **16/05/2024**.

| | |
|---------------------------|---|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | Início: 03 / 06 / 2024 Fim: 01 / 06 / 2026 |
| Espécie | Rato heterogênico |
| Linhagem | Wistar |
| Nº de animais autorizados | 216 |
| Peso | 20 a 40g |
| Idade | 8 semanas |
| Sexo | Machos (108) e Fêmeas (108) |
| Origem (fornecedor) | Biotério do NPDM |
| Local do experimento | Biotério do NPDM |



Fortaleza, Ceará, 21 de maio de 2024.

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará