



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JÉSSICA MARIA PESSOA GOMES

**ISOLAMENTO NEONATAL EM RATOS INDUZ ENDOFENÓTIPOS DO
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA COM DIFERENÇAS ENTRE SEXOS**

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

- G614i Gomes, Jessica.
ISOLAMENTO NEONATAL EM RATOS INDUZ ENDOFENÓTIPOS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA COM DIFERENÇAS ENTRE SEXOS / Jessica Gomes. – 2020.
100 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. GEANNE MATOS DE ANDRADE.
1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Interação social. 3. Isolamento neonatal. 4. Endofenótipos. 5. Diferenças entre sexos. I. Título.

CDD 610

JÉSSICA MARIA PESSOA GOMES

**ISOLAMENTO NEONATAL EM RATOS INDUZ ENDOFENÓTIPOS DO
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA COM DIFERENÇAS ENTRE SEXOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Geanne Matos de Andrade

FORTALEZA

2020

JÉSSICA MARIA PESSOA GOMES

ISOLAMENTO NEONATAL EM RATOS INDUZ ENDOFENÓTIPOS DO
TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA COM DIFERENÇAS ENTRE SEXOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^ª. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Souza Menezes
UNICHRISTUS

AGRADECIMENTOS

Parafrazeando Martha Medeiros, em tempos em que quase ninguém se olha nos olhos, em que a maioria das pessoas pouco se interessa pelo que não lhe diz respeito, só mesmo agradecendo àqueles que percebem nossas descrenças, indecisões, suspeitas, tudo o que nos paralisa, e gastam um pouco da sua energia conosco, insistindo. Por tudo isso, adianto que as palavras a seguir jamais chegarão perto de expressar, de fato, toda a minha gratidão por todos os citados.

A minha orientadora, professora Geanne Matos, todo o meu respeito e reconhecimento, pela confiança depositada e por abrir as portas do Laboratório de Neurociências e Comportamento para mim. Muito obrigada, professora.

Ao Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC), do qual faço parte, pelo acolhimento e portas abertas.

Ao meu sempre orientador, desde o segundo semestre da graduação, parceiro de pesquisa e amigo Bruno Ceppi, por estar ao meu lado quando mais preciso. Muito obrigada por permanecer ao meu lado nessa caminhada, Bruno.

Ao melhor presente que a Psicologia Experimental me deu, Diego Rabelo, de quem tanto me orgulho e tenho a honra de ter como amigo. Muito obrigada pela presença mesmo à distância, por participar tão intimamente da minha vida e deste trabalho, por ser a melhor audiência não punitiva que eu poderia ter, irmão. Não consigo expressar minha saudade em palavras.

Às pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer nessa trajetória do mestrado, que participaram tão ativamente e foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, que viveram as dores e as delícias em laboratório ao meu lado, meus amigos do Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC), em especial: Tyciane Nascimento, pelo trabalho braçal, por me ensinar tantas coisas dentro e fora do laboratório, pelo acolhimento e amizade; Alfaete Vieira, pelo trabalho árduo dentro do laboratório, pela leveza da amizade e das brincadeiras que me arrancaram tantos sorrisos; Amanda Aragão, pela simpatia e acolhimento desde o início, pela solicitude e por salvar meu dia com seus doces; e Jéssica Rabelo, pela disponibilidade para me ajudar, pelo acolhimento e por compartilharmos de pensamentos e sentimentos semelhantes sobre a pós-graduação. Muito obrigada por tudo, gente. Sem vocês, não seria possível.

Aos ratos, pela contribuição fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada, seus lindos!

À Universidade Federal do Ceará, por ser minha casa ao longo de tantos anos e ter me proporcionado vivências tão essenciais, que fazem parte do que sou.

À Psicologia, pelo universo aberto diante dos meus olhos, por aguçar e moldar meu senso crítico e por contribuir na construção do meu olhar sobre o mundo e os seres humanos.

Aos meus amigos, que me suportaram ao longo dessa caminhada tão árdua e repleta de medos e incertezas, que ouviram minhas reclamações todas as vezes, que me acalmaram tentando fazer com que eu lembrasse sempre as razões pelas quais escolhi a academia, em especial: Ingrid Sampaio e Luísa Holanda.

Aos meus sobrinhos, Arthur e Bernardo, que vieram ao mundo para me fazer experimentar um sentimento que eu não imaginava ser possível existir. Obrigada pela doçura e leveza de vocês.

As minhas irmãs, Marcela e Carolina, por serem minhas pessoas no mundo.

Aos filhos de outra espécie, Simba, Valentim e Mari, pela recepção sempre calorosa e recheada de tanto amor verdadeiro.

Aos meus pais, Dona Isiane e Seu Oliveira, pela presença, por tornarem meus objetivos e planos possíveis, por todas as oportunidades, apoio e amor. Nada que eu diga ou escreva será capaz de expressar minha gratidão e meu amor por vocês.

À minha esposa, Marina, por ser presença que acolhe em todos os momentos, por me levantar todas as vezes em que caí, por me dar forças todas as vezes em que pensei em desistir, por me ensinar, da forma mais simples e pura, o que o combo do amor deve conter. O combo do amor contém parceria, companheirismo, amizade, momentos difíceis, momentos felizes, leveza, espontaneidade, e muito, mas muito carinho e amor para construir a caminhada e seguir da melhor maneira, da nossa maneira. Como bem disse Clarice Lispector, “não me lembro mais qual foi o nosso começo. Sei que não começamos pelo começo. Já era amor antes de ser.” Obrigada por me escolher para caminhar junto contigo e por, diariamente, me lembrar do por quê eu te escolhi. A nossa eternidade já começou.

“Drugs can reduce comorbid symptoms, but do not directly improve social communication. Creation of a supportive environment that accepts and respects that the individual is different is crucial.”

Lai, Lombardo & Baron-Cohen, 2013. The Lancet.

RESUMO

O Autismo ou Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por prejuízos na interação e comunicação sociais, com padrões restritos e repetitivos de comportamentos, interesses e atividades. Possui etiologia multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais e com prevalência global em aumento constante. Como os fatores ambientais mostraram forte relação com o autismo, estudos que utilizam insultos e fatores de risco ambientais tornaram-se fundamentais. Desse modo, o presente estudo induziu, através do isolamento neonatal, endofenótipos do TEA com diferenças entre sexos em roedores, focando em prejuízos da sociabilidade, principais sintomas presentes no transtorno e fundamentais para o diagnóstico. Trata-se de um estudo desenvolvimental misto, realizado na infância e periadolescência de machos e fêmeas. Foram utilizados casais de *Rattus norvegicus*, de linhagem *Wistar*, para fins de reprodução e posterior utilização dos filhotes para experimentação. Após o nascimento, os neonatos foram divididos, aleatoriamente, em 4 grupos: controle, isolamento social, isolamento social salina e isolamento social Risperidona. O tratamento com salina ou Risperidona foi realizado por via oral (v. o.). Os testes comportamentais realizados foram agregação social, campo aberto, ajuda pró-social, empatia/contágio emocional e comportamento de brincadeira. Após os testes, uma parte dos animais foi perfundida para as análises histopatológicas e outra parte foi eutanasiada para retirada de áreas cerebrais envolvidas no TEA (córtex frontal, corpo estriado e hipocampo) para análises bioquímicas. Os resultados mostraram que o isolamento neonatal é capaz de induzir endofenótipos do autismo com diferenças entre os sexos, como presença de comportamentos repetitivos e estereotipados, hiperatividade locomotora, respostas de ansiedade em novos ambientes, além de prejuízos na empatia e redução da frequência de comportamentos de brincadeira. Este estudo mostrou que o isolamento neonatal pode ser utilizado para investigar a influência dos fatores ambientais na gênese do TEA, além de abrir caminhos para novas investigações e perspectivas para estudos da fisiopatologia do autismo, bem como de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Transtorno do Espectro Autista. Interação social. Isolamento neonatal. Endofenótipos. Diferenças entre sexos. Ratos.

ABSTRACT

Autism or Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by impaired social interaction and communication, with restricted and repetitive patterns of behavior, interests, and activities. It has a multifactorial etiology, involving genetic and environmental factors and with global prevalence in constant increase. As environmental factors were strongly related to autism, studies that use insults and environmental risk factors have become critical. Thus, the present study induced, through neonatal isolation, endophenotypes of ASD with gender differences in rodents, focusing on social impairment, main symptoms present in the disorder and fundamental for diagnosis. This is a mixed developmental study conducted in childhood and periadolescence of males and females. Wistar Rattus norvegicus pairs were used for breeding purposes and subsequent use of pups for experimentation. After birth, neonates were randomly divided into 4 groups: control, social isolation, saline social isolation, and Risperidone social isolation. Treatment with saline or Risperidone was orally (o.v). Behavioral tests were social aggregation, open field, prosocial help, empathy / emotional contagion and play behavior. After the tests, part of the animals was perfused for histopathological analysis and part was euthanized to remove brain areas involved in the ASD (frontal cortex, striated body and hippocampus) for biochemical analysis. The results showed that neonatal isolation can induce autism endophenotypes with gender differences, such as the presence of repetitive and stereotyped behaviors, locomotor hyperactivity, anxiety responses in new environments, as well as impaired empathy and reduced frequency of play behaviors. This study showed that neonatal isolation can be used to investigate the influence of environmental factors on the genesis of ASD, in addition to opening the way for further investigations and perspectives for studies of the pathophysiology of autism, as well as new therapeutic strategies.

Key words: Autistic Spectrum Disorder. Social interaction. Neonatal isolation. Endophenotypes. Sex differences. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fatores genéticos e ambientais que influenciam o desenvolvimento intrauterino e nascimento precoce podem alterar trajetórias neurobiológicas e de neurodesenvolvimento que determinam o quadro clínico do TEA.....	20
Figura 2 – Desenho experimental.....	37
Figura 3 – Arena de Agregação Social.....	38
Figura 4 – Arena do Campo Aberto.....	39
Figura 5 – Caixa restritora para Ajuda Pró-social.....	40
Figura 6 – Caixa de comunicação (A) e diagrama esquemático da disposição dos animais no aparato (B).....	40
Figura 7 – Comportamento de brincar (atacar e rolar).....	41
Figura 8 – Efeito do isolamento neonatal sobre a latência para o encontro no teste de Agregação Social.....	45
Figura 9 - Efeito do isolamento neonatal sobre o tempo de interação social no teste de Agregação Social.....	46
Figura 10 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de <i>crossings</i> no teste do Campo Aberto.....	47
Figura 11 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre o <i>self-grooming</i> no teste do Campo Aberto.....	48
Figura 12 -Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre o <i>rearing</i> no teste do Campo Aberto.....	50
Figura 13 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de entradas na periferia no teste do Campo Aberto	51
Figura 14 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de <i>freezing</i> no teste de Empatia/Contágio Emocional.....	52
Figura 15 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de atacar no comportamento de brincar.....	54
Figura 16 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de rolar no comportamento de brincar.....	55

Figura 17 - Efeito do isolamento neonatal na frequência de boxear no comportamento de brincar.....	56
Figura 18 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de <i>rearing</i> social no comportamento de brincar	57
Figura 19 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de pular no comportamento de brincar.....	59
Figura 20 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de perseguir no comportamento de brincar.....	60
Figura 21 - Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de cheirar no comportamento de brincar	61
Figura 22 - Efeito do isolamento neonatal e da sessão na interação com a caixa restritora na Ajuda Pró-Social.....	63
Figura 23 - Efeito do isolamento neonatal e da sessão na frequência de abertura da caixa restritora na Ajuda Pró-Social.....	64
Figura 24 - Efeito do isolamento neonatal e da sessão na latência para abertura da caixa restritora na Ajuda Pró-Social	66
Figura 25 - Efeito do isolamento neonatal sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃) em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal e do hipocampo.....	67
Figura 26 - Efeito do isolamento neonatal sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal e do hipocampo.....	68
Figura 27- Fotomicrografias, aumento de 100x, representativas do efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de micróglia ativadas no córtex pré-frontal.....	69
Figura 28 - Efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de micróglia ativadas no córtex pré-frontal.....	69
Figura 29 -Fotomicrografias, aumento de 100x, representativas do efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de sinaptofisina no córtex pré-frontal.....	71
Figura 30 -Efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de sinaptofisina no córtex pré-frontal.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos, número de animais e tratamento.....	35
Tabela 2 – Testes, parâmetros e funções avaliadas.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Transtorno do Espectro Autista (TEA)	17
1.1.1 <i>Epidemiologia</i>	17
1.1.2 <i>Diagnóstico</i>	18
1.1.3 <i>Etiologia</i>	18
1.1.4 <i>Comorbidades</i>	21
1.1.5 <i>Fisiopatologia</i>	21
1.1.6 <i>Tratamento</i>	24
1.2 Modelos Animais de TEA	26
1.3 Neuroinflamação e Estresse Oxidativo no TEA	27
1.4 Teoria Motivacional do TEA	28
1.5 Isolamento Neonatal e TEA	29
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Animais	34
4.2 Drogas	34
4.3 Protocolo Experimental	34
4.4 Testes Comportamentais	37
4.4.1 <i>Agregação Social</i>	38
4.4.2 <i>Campo Aberto</i>	39

4.4.3 Ajuda Pró-Social.....	39
4.4.4 Empatia/ Contágio Emocional.....	40
4.4.5 Comportamento de Brincar.....	41
4.5 Análise Histopatológica.....	42
4.6 Análise do Estresse Oxidativo.....	43
4.6.1 Determinação da peroxidação lipídica.....	43
4.6.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato.....	43
4.7 Análise Estatística.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Efeito do isolamento neonatal sobre a latência para o encontro no teste de Agregação Social.....	45
5.2 Efeito do isolamento neonatal sobre o tempo de interação social no teste de Agregação Social.....	46
5.3 Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de <i>crossings</i> no teste do Campo Aberto	46
5.4 Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre o <i>self-grooming</i> no teste do Campo Aberto.....	48
5.5 Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre o <i>rearing</i> no teste do Campo Aberto.....	49
5.6 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de entradas na periferia no teste do Campo Aberto	50
5.7 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de <i>freezing</i> no teste de Empatia/Contágio Emocional.....	52
5.8 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de atacar no comportamento de brincar.....	53
5.9 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de rolar no comportamento de brincar.....	54

5.10 Efeito do isolamento neonatal na frequência de boxear no comportamento de brincar.....	56
5.11 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de <i>rearing</i> social no comportamento de brincar	57
5.12 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de pular no comportamento de brincar.....	58
5.13 Efeitos do isolamento neonatal e do sexo na frequência de perseguir no comportamento de brincar.....	59
5.14 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de cheirar no comportamento de brincar	61
5.15 Efeito do isolamento neonatal e da sessão na interação com a caixa restritora na Ajuda Pró-Social.....	62
5.16 Efeito do isolamento neonatal e da sessão na frequência de abertura da caixa restritora na Ajuda Pró-Social.....	64
5.17 Efeito do isolamento neonatal e da sessão na latência para abertura da caixa restritora na Ajuda Pró-Social	65
5.18 Efeito do isolamento neonatal sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃) em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal e do hipocampo.....	66
5.19 Efeito do isolamento neonatal sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal e do hipocampo.....	68
5.20 Efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de micróglia ativada em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal.....	69
5.21 Efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de sinaptofisina em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal.....	71
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) foi descrito, pela primeira vez, em 1943, por Leo Kanner. Trata-se de um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por prejuízos na interação e na comunicação social, padrões restritos e repetitivos de comportamentos, interesses e atividades, hiperatividade, hipersensibilidade sensorial, déficits no desenvolvimento da linguagem verbal e não-verbal, além da dificuldade no processamento de informações emocionais (KANNER, 1943; APA, 2013). O autismo vem se tornando um transtorno cada vez mais comum e apresenta diferentes níveis de gravidade e sintomas, por isso a denominação de espectro autista.

1.1.1 Epidemiologia

O avanço nos estudos e consequente evolução nos critérios diagnósticos, juntamente com o desenvolvimento de ferramentas especializadas mostram que a prevalência do transtorno vem crescendo. Em 2018, o governo dos Estados Unidos divulgou os números de prevalência do TEA atualizados: 1 para 59 crianças. A prevalência anterior era de 1 para cada 68, registrando aumento de 15% (BAIO *et al.*, 2018). Dados epidemiológicos globais mostram que o autismo é quatro vezes mais comum no sexo masculino (GARCIA-PEÑAS, 2009; BAIO *et al.*, 2018), além de ser menos prevalente em crianças negras, ainda que essa prevalência também esteja em queda, refletindo uma maior conscientização e triagem dessas minorias (BAIO, 2012; BAIO *et al.*, 2018).

No Brasil, poucos estudos de prevalência do TEA foram desenvolvidos. Como a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a estimativa de que, aproximadamente, 1% da população mundial esteja dentro do espectro autista, estima-se que o Brasil possua cerca de 2 milhões de habitantes com o transtorno (PAULA *et al.*, 2011; RIOS; ANDRADA, 2015).

A suscetibilidade masculina ao TEA pode estar associada a quantidade de hormônios androgênicos no estágio inicial do desenvolvimento cerebral, mais especificamente na fase de divisão celular e de desenvolvimento de neurônios (QUARTIER *et al.*, 2018). Porém, estudos sobre autismo no sexo feminino levantam questionamentos importantes acerca da eficácia das ferramentas de diagnóstico para meninas, que consequentemente implicam na prevalência do transtorno. Mulheres com autismo, em sua maioria, apresentam formas graves do transtorno (BEDFORD *et al.*, 2019), mas podem camuflar eficazmente os prejuízos sociais, adaptativos e de comunicação. As demandas e

pressões sociais sobre o sexo feminino podem ensiná-las a sobreviver com os sintomas, fazendo com que as ferramentas de diagnóstico mais utilizadas não sejam sensíveis a meninas (RATTO *et al.*, 2018). Outra hipótese sobre a prevalência masculina do autismo está relacionada com a regulação de proteínas do tipo adenilil ciclase III (AC3, ADCY3) que agem no cérebro, dado que essa regulação é mais rígida no cérebro feminino, possivelmente prevenindo o desenvolvimento do autismo em mulheres (ZHOU *et al.*, 2019).

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico do TEA pode ser feito ainda em fases precoces da infância, por volta do terceiro ano de vida (MANDELL *et al.*, 2005). Utilizando ferramentas mais modernas e sofisticadas, dados mostram que com 14 meses de idade já é possível realizar o diagnóstico (PIERCE *et al.*, 2019). É importante ressaltar que os critérios para diagnosticar TEA estão em constante alteração nos grandes manuais. O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5 (DSM V) trouxe mudanças importantes nos critérios diagnósticos do autismo (VOLKMAR; REICHOW, 2013), propondo maior flexibilidade e amplitude na identificação dos sintomas e, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade na avaliação do desenvolvimento social da criança. Um diagnóstico abrangente de autismo envolve a observação do comportamento infantil, da fala e da linguagem, entrevistas parentais para fins de investigação de histórico familiar, exames médicos diversos e a utilização de testes cognitivos (NYE; BRICE, 2005; MILLWARD *et al.*, 2008; REICHOW; VOLKMAR, 2010; REICHOW; STEINER; VOLKMAR, 2013).

A avaliação diagnóstica pode utilizar ainda testes genéticos e exames de neuroimagem como ressonância magnética e eletroencefalograma (EEG). Estudos mostraram que dados fornecidos por EEG podem auxiliar na identificação de autismo com precisão já aos três meses de vida (BOSL *et al.*, 2018; O'REILLY *et al.*, 2017). Desse modo, o diagnóstico precoce é fundamental para um prognóstico eficaz no autismo.

1.1.3 Etiologia

Devido o largo e complexo espectro de sintomas associados ao TEA, não se pode atribuir uma única etiologia ao transtorno. O TEA é classificado como um transtorno de forte base genética pela alta concordância entre gêmeos monozigóticos e baixa em gêmeos dizigóticos (GARCIA-PEÑAS, 2009). Genes envolvidos na codificação de proteínas relacionadas com migração neuronal, diferenciação, proliferação e adesão celular constituem a predisposição genética ao TEA, mas a nenhum gene específico é atribuída a

responsabilidade por desencadear o autismo (ARNDT *et al.*, 2005; VORSTMAN *et al.*, 2017).

Estudos genéticos mostraram que mutações no gene *Shank3*, envolvido na organização da estrutura das espinhas dendríticas, importantes estruturas pós-sinápticas, podem desencadear prejuízos na linguagem e na comunicação social (DURAND *et al.*, 2007; MONTEIRO; FENG, 2017). Além disso, esse gene pode estar envolvido com a conectividade neuronal no córtex pré-frontal, volume da massa cinzenta, distúrbios do sono em 80% dos pacientes diagnosticados e síndrome de Phelan-McDermid, quadro clínico que agrava os sintomas do autismo, fazendo com que esse gene ganhe importância no desenvolvimento de modelos animais genéticos de autismo (INGIOSI *et al.*, 2019; PAGANI *et al.*, 2019).

Análises de cérebros *post-mortem*, utilizando genômica unicelular, mostraram alterações na sinalização sináptica de neurônios excitatórios da camada superior do córtex e no estado molecular da micróglia, dados que contribuem com os estudos que mostraram que a desregulação de genes específicos em neurônios de projeção cortical possui correlação com a gravidade do TEA (VELMESHEV *et al.*, 2019). Outros estudos genéticos mostraram que as proteínas SYNGAP 1 e MET, bem como os genes CYFIP 1, CNTN 5 e EHMT 2 também estão envolvidos com o autismo (CRESON *et al.*, 2019; FRIAS *et al.*, 2019; BACHMANN *et al.*, 2019; DENEALT *et al.*, 2019).

Existem várias hipóteses que relacionam o TEA a patógenos, considerando a ação de fatores ambientais somada às predisposições genéticas e fortalecendo a ideia de que alterações epigenéticas durante o desenvolvimento podem ser causa primária do autismo (ARNDT *et al.*, 2005; GARDENER; SPIELGEMAN; BUKA, 2011; MAMIDALA *et al.*, 2013). Dados mostraram que fatores genéticos representam, aproximadamente, 35-40% das variáveis que contribuem para o transtorno, sendo os demais 60-65% relacionados a fatores ambientais pré-natais, perinatais e pós-natais (FROEHLICH-SANTINO *et al.*, 2014). Sofrimento fetal agudo, longa duração do parto, prematuridade, infecção pré-natal do trato urinário, infecção respiratória pós-natal, infecção pré-natal por rubéola, uso de drogas como talidomida, etanol e ácido valpróico, níveis elevados de agrotóxicos e poluição do ar configuram variáveis associadas ao TEA (HADJKACEM *et al.*, 2016; BROWN *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2018).

Nos mais diversos estudos, fatores ambientais mostraram forte relação com o TEA, provavelmente induzindo mudanças epigenéticas (NICOLINI; FAHNESTOCK, 2017), destacando a importância de produzir modelos animais de TEA que sejam ambientalmente induzidos e não farmacológicos, que possuam maior generalização para as diversas

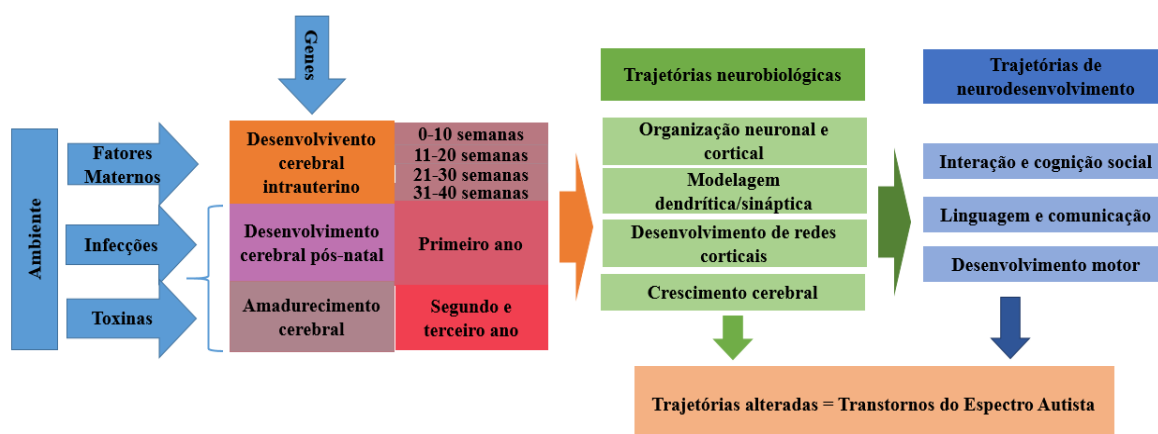
populações e maior valor translacional. Além disso, o TEA produz sintomas bastante semelhantes a outros transtornos, como a esquizofrenia, tornando o diagnóstico difícil (ZUGNO *et al.*, 2013; FORD *et al.*, 2019). Variantes genéticas comuns contribuem para a suscetibilidade ao TEA, a partir de fenótipos com arquiteturas genéticas significativamente sobrepostas, como os de esquizofrenia e depressão grave, evidenciando a similaridade entre esses transtornos (GROVE *et al.*, 2019). Assim, há carência de modelos capazes de reproduzir endofenótipos específicos, principalmente os prejuízos precoces na sociabilidade, tão característicos do TEA.

Estudos trouxeram dados que corroboram a hipótese da importância dos fatores pré-natais no autismo. O uso de antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina (IRSS) na gestação está envolvido no nascimento de uma prole que apresenta uma hiperativação de receptores serotoninérgicos no córtex pré-frontal, área implicada na modulação dos comportamentos sociais (YU *et al.*, 2019). Além disso, mulheres com síndrome do ovário policístico, carência de vitamina D e zinco possuem risco elevado de ter filho com autismo (CHERSKOV *et al.*, 2018; YATES *et al.*, 2018; HA *et al.*, 2018).

Existe ainda a relação entre a idade dos genitores e o risco de desenvolver autismo. Dados mostram que filhos de pais jovens apresentam maior risco para desenvolver transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e síndrome de Tourette e filhos de pais com idade mais avançada possuem maior risco para transtorno obsessivo compulsivo (TOC) e autismo (JANECKA *et al.*, 2018).

Desse modo, tanto a predisposição genética como a influência do ambiente, principalmente no período pré-natal e início da infância, precisam ser consideradas nos estudos que abordam alterações morfológicas, histológicas e neuronais do encéfalo que atingem o desenvolvimento cognitivo e social na infância (PARDO; EBERHART, 2007) (FIGURA 1).

Figura 1: Fatores genéticos e ambientais que influenciam o desenvolvimento intrauterino e nascimento precoce podem alterar trajetórias neurobiológicas e de neurodesenvolvimento que determinam o quadro clínico do TEA.



Adaptado de Pardo e Eberhart, 2007

1.1.4 Comorbidades

O TEA está associado à deficiência intelectual (SIMONOFF *et al.*, 2008; WHITE *et al.*, 2009), irritabilidade, agressividade, inconformidade, hiperatividade, dificuldades na atenção e na concentração, transtornos do humor, com ênfase na depressão, ansiedade e epilepsia (em 20% dos pacientes) (VOLKMAR; REICHOW, 2013). Estudos mostram que traços autistas também elevam o risco de ideação suicida (PELTON; CASSIDY, 2017).

A epilepsia é um importante preditor de alterações nos circuitos neuronais excitatórios e inibitórios e é comumente associada ao autismo, podendo chegar a 40% as chances do paciente diagnosticado com TEA desenvolver epilepsia ao longo da vida, com crises que ocorrem em maior frequência na infância, até os 5 anos de idade, e na adolescência, após os 10 anos de idade (TURK *et al.*, 2009; TUCHMANN *et al.*, 2011). Como as crises epiléticas comprometem os circuitos neuronais a cada episódio, prejuízos na linguagem e na sociabilidade podem ser observados já nos primeiros anos de vida. Além disso, a epilepsia tem alta correlação com a morbidade e a mortalidade de pacientes diagnosticados com TEA (TUCHMANN *et al.*, 2002). Estudos recentes mostraram que quanto mais prematuras forem as convulsões, mais sinapses serão precocemente ativadas, podendo contribuir para alterações no desenvolvimento neurológico dos pacientes com autismo (SUN *et al.*, 2018).

1.1.5 Fisiopatologia

Diversos estudos de variadas abordagens mostram a existência de padrões morfológicos capazes de caracterizar o autismo. Observou-se o aumento do volume cerebral nos primeiros anos de vida, alterações nos núcleos de nervos cranianos, déficit na quantidade de células de Purkinje, hipoplasia de estruturas do tronco cerebral, bem como alterações no

córtex frontal e no lobo temporal, mais especificamente na amígdala e no hipocampo (SCHULTZ, 2005). Pacientes diagnosticados com TEA e submetidos à ressonância magnética mostraram aumento no volume da amígdala no início da infância, que é normalizado mais tarde, além da redução no número de neurônios também na amígdala (BAUMAN *et al.*, 2005). Outro estudo constatou que o encéfalo de pacientes diagnosticados com autismo cresce rapidamente no período pós-natal em um primeiro momento, seguido por uma desaceleração desse crescimento de acordo com a idade. Após isso, na fase de pré-adolescência, uma degeneração neuronal foi observada em algumas regiões cerebrais, além de alterações estruturais do hipocampo, lobo temporal e amígdala (COURCHESNE *et al.*, 2007).

Aumento relativo do peso médio do cérebro de crianças com TEA e aumento no número total de neurônios no córtex pré-frontal (cerca de 60% quando comparado aos demais grupos) também foram importantes achados para o estudo do autismo. A hipótese dos autores deste estudo é de que pacientes diagnosticados com TEA podem estar suscetíveis a alterações em mecanismos que regulam o ciclo celular e a apoptose na fase embrionária, fase em que ocorre bastante neurogênese (COURCHESNE *et al.*, 2011). Também foram realizados estudos com encéfalos *post mortem* de pacientes com autismo que mostraram aumento no padrão de distribuição celular no córtex pré-frontal (CASANOVA *et al.*, 2006) e diminuição no número de células de Purkinje no cerebelo (AMARAL *et al.*, 2008). Além disso, neurônios de pacientes com TEA mostraram diferentes padrões de crescimento e se desenvolvem mais rapidamente (SCHAFER *et al.*, 2019).

Os primeiros estudos sobre TEA mostraram que a fisiopatologia dos transtornos parecia ser resultado de déficits na funcionalidade de várias estruturas encefálicas, ressaltando a diminuição da atividade do córtex pré-frontal e da amígdala, que estão intrinsecamente relacionadas aos comportamentos de interação social, funções executivas, linguagem e emoções. Porém, os resultados obtidos em modelos animais estão fazendo com que a hipótese do aumento da funcionalidade cortical venha ganhando espaço, dado que o autismo pode ser uma síndrome de hipersensibilidade ao ambiente, hipótese baseada em estudos que demonstraram aumento da atividade do córtex pré-frontal médio, amígdala e córtex somatosensorial, causada por insulto ou alteração genética em estágios do desenvolvimento embrionário (MARKRAM *et al.*, 2007).

Modelos animais de autismo mostraram um aumento da excitabilidade neuronal no córtex somatosensorial e no córtex pré-frontal médio, justificando assim os prejuízos na interação social e na atenção, bem como comportamentos repetitivos (RINALD *et al.*, 2008). Aumento na densidade de espinhas dendríticas nos lobos frontal, parietal e temporal foi

encontrado em cérebros *post mortem* de pacientes diagnosticados com autismo (HUTSLER *et al.*, 2010).

Estudos utilizando ressonância magnética encontraram uma diminuição das respostas no córtex pré-frontal ventromedial em crianças com TEA, possível evidência de que os cérebros dessas crianças não codificam o valor da interação social (KISHIDA *et al.*, 2019) e a conectividade entre amígdala e córtex pré-frontal ventrolateral é reduzida em pacientes com autismo, podendo justificar a ocorrência de comportamentos disruptivos, como agressividade, irritabilidade e inconformismo (IBRAHIM *et al.*, 2019).

Além do córtex pré-frontal, o hipocampo também é uma área cerebral que possui relação com o TEA, devido seu papel fundamental na formação das memórias, aprendizagem e emoções (BANNERMAN *et al.*, 2004; YAMAMURO *et al.*, 2010). Estudos mostram que a plasticidade sináptica e os níveis do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) estão alterados no hipocampo, resultados que contribuem para justificar os prejuízos cognitivos e comportamentais do TEA (NG *et al.*, 2019; FUENTEALBA *et al.*, 2019).

As sinapses neuronais também são importantes para a patogênese do TEA, acarretando prejuízos funcionais e cognitivos, como epilepsia, deficiência intelectual e TDAH, além de estarem envolvidas em outros transtornos neuropsiquiátricos, como esquizofrenia, transtorno bipolar e transtorno obsessivo-compulsivo (GILBERT; MAN, 2017). Desse modo, a sinaptopatologia no TEA é amplamente estudada, sobretudo, através da quantificação da densidade de marcadores sinápticos, para buscar entender de que forma a disfunção sináptica ocorre e se existe predomínio de mecanismos excitatórios ou inibitórios em áreas cerebrais específicas, principalmente no córtex pré-frontal e hipocampo (KELLER *et al.*, 2017; GUANG *et al.*, 2018).

Pesquisas também demonstraram que a participação do GABA em mecanismos de disfunção da excitabilidade neuronal no autismo é fundamental, mais especificamente dos interneurônios GABAérgicos parvalbumina positivos (PV+), visto que possuem papel essencial na geração de padrões oscilatórios corticais pela forte ação inibitória e por serem células de disparo rápido com baixa taxa de acomodação. Modelos animais de autismo mostraram redução de PV+ no córtex somatosensorial e animais *knockout* para esses interneurônios apresentaram padrões observados no autismo (GONCHAR *et al.*, 2007; GOGOLLA *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2010). Além disso, dados mostram que há aumento de respostas neurais no córtex cingulado anterior na antecipação do estímulo doloroso, evidenciando a hipersensibilidade de pacientes com autismo à dor (GU *et al.*, 2017).

1.1.6 Tratamento

Algumas estratégias são utilizadas no tratamento dos sintomas do autismo, baseadas no controle desses sintomas em cada paciente e, conseqüentemente, na combinação de vários fármacos, visto que TEA não possuem farmacoterapia padrão de tratamento. Fármacos psicotrópicos são comumente prescritos para sintomas comportamentais, principalmente os antipsicóticos atípicos, como Aripiprazol e Risperidona, que se mostram eficazes na redução da agressividade, da irritabilidade, dos comportamentos estereotipados e da hiperatividade, sendo a Risperidona o fármaco de primeira escolha (JI; FINDLING, 2015; GOEL *et al.*, 2018).

Lítio também pode ser eficaz na melhora dos prejuízos sociais característicos do TEA, na ansiedade e nos comportamentos depressivos, além de prevenir a diminuição da neurogênese no hipocampo (WU *et al.*, 2014). É importante salientar que a farmacoterapia possui muitos efeitos adversos e é bastante limitada, provavelmente por ainda existirem controvérsias acerca da gênese do autismo, carecendo de estudos que busquem fármacos mais específicos e que se preocupem com a redução dos efeitos adversos.

Desse modo, estratégias cada vez mais modernas têm sido desenvolvidas para auxiliar no tratamento do TEA, como o uso de realidade virtual para melhorar a percepção e ações sensorio-motoras (BANSAL *et al.*, 2019) e o tratamento com óleo de *cannabis* (CBD) que, segundo as evidências, melhorou significativamente sintomas como convulsões, tiques, depressão, hiperatividade e agressividade em pacientes com autismo (SCHLEIDER *et al.*, 2019).

Estudos tem buscado investigar também a relação entre microbiota gastrointestinal e TEA, visto que os pacientes diagnosticados com autismo demonstram alterações quantitativas e qualitativas da flora intestinal, que acarretam uma série de doenças do trato gastrointestinal (DE ANGELIS *et al.*, 2013; TOMOVA *et al.*, 2015, STRATI *et al.*, 2017). A terapia de transferência de microbiota pode alterar o ecossistema intestinal e reduz em até 50% os sintomas do autismo, visto que as doenças gastrointestinais estão correlacionadas com a gravidade dos TEA (KANG *et al.*, 2017). Além disso, diversos estudos já demonstraram a relação do autismo com a carência de vitaminas importantes para o desenvolvimento e determinantes para o risco do transtorno ainda na gestação, ressaltando a importância das medidas preventivas, como o uso de suplementação vitamínica a base de vitamina D, zinco e probióticos (DOLSKE *et al.*, 1993; WONG; SMITH, 2006; LAMMERT *et al.*, 2018).

Complexos vitamínicos à base de ômega 3 e vitamina D também tem sido utilizados no tratamento de sintomas do TEA. Exames demonstraram que existe deficiência desses compostos em pacientes com autismo, dando importância à investigação de fatores nutricionais e sua potencial relação com risco para TEA (INFANTE *et al.*, 2018).

A ocitocina também desempenha um importante papel na regulação dos comportamentos sociais. Trata-se de um neuropeptídeo que, quando em déficit, pode estar envolvido com a etiologia do TEA (DAI *et al.*, 2018). Estudos mostram evidências de que o tratamento com spray nasal de ocitocina melhora o reconhecimento da emoção em adolescentes diagnosticados com TEA, sugerindo que uma intervenção precoce pode melhorar a comunicação e a interação social dos jovens com autismo (GUASTELLA *et al.*, 2010; PAGANI *et al.*, 2020). Desse modo, investigar o sistema ocitocinérgico e suas influências no TEA são fundamentais para a compreensão e consequente tratamento do transtorno (BARTZ; HOLLANDER, 2008; QUATTROCKI; FRISTON, 2014).

Juntamente com a farmacoterapia, a intervenção psicoterápica também produz resultados positivos no tratamento dos sintomas do autismo. Existem programas de intervenção comportamental que visam abordar as áreas que necessitam ser desenvolvidas no indivíduo com TEA, realizando treino de habilidades sociais. Esse treino, baseado em condicionamento operante, busca reforçar comportamentos desejados e, consequentemente, diminuir a frequência de comportamentos inapropriados, demonstrando eficácia na comunicação e no gerenciamento dos comportamentos-problema no TEA (VISMARA; ROGERS, 2010). Esse tipo de intervenção tem sido bastante questionada, visto que se propõe a ensinar comportamentos socialmente aceitáveis, mantendo o indivíduo com autismo limitado a aceitação social (GRUSON-WOOD, 2016; KIRKHAM, 2017).

Desse modo, condutas que focam na estimulação somatosensorial e das funções psíquicas estão sendo utilizadas, como musicoterapia e arteterapia, que possuem evidências de melhora na atenção conjunta e no desempenho escolar (WARWICK; ALVIN, 1991) e a criação de ambientes interativos, que utilizam agentes socialmente inteligentes (robôs) para auxiliar na melhora da linguagem, cognição social e aprendizagem por imitação (DAUTENHAHN; WERRY, 2004). Além disso, a terapia familiar, baseada em estratégias da psicoeducação, também tem sido bastante utilizada, visto que utiliza uma abordagem que integra a família, buscando criar flexibilidade nos modos de lidar com os comportamentos e emoções do paciente com autismo (SOLOMON; CHUNG, 2012).

Em estudos sobre neuroplasticidade, praticar atividade física e estar inserido em um ambiente que promove desafios, moldando processos de aprendizagem, podem ser

estratégias terapêuticas para minimizar sintomas em diversos transtornos (VAN PRAAG, 2008). Logo, o enriquecimento ambiental consiste em um esquema experimental que possibilita o estudo de eventos que envolvem a neuroplasticidade nas diversas regiões cerebrais, em diferentes espécies de diversas faixas etárias (LORES-ARNAIZ *et al.*, 2006; SALE, CENNI *et al.*, 2007), propiciando aumento da interação social, além de possibilitar a prática de atividade física voluntária. Vale ressaltar que fazer modificações frequentes no ambiente enriquecido, como a troca dos objetos por novos objetos, bem como mudanças na posição, são características essenciais deste paradigma experimental, visto que possibilitam a construção de novos mapas espaciais e a modulação da plasticidade no hipocampo (NITHIANANTHARAJAH; HANNAH, 2006).

Além da neuroplasticidade, o enriquecimento ambiental possibilita a neurogênese, aumento de neurotrofinas, aumento da sobrevivência neuronal, sinaptogênese e proliferação celular, indução de cascatas de sinalização e modificações na árvore dendrítica em variadas regiões cerebrais (VAN PRAAG *et al.*, 2000; ROSSI *et al.*, 2006; MOHAMMED *et al.*, 2002; FAHERTY *et al.*, 2003).

1.2 Modelos Animais de TEA

Para buscar compreender a gênese do autismo, estudos utilizam modelos animais diversos. Existem modelos que utilizam animais geneticamente modificados, manipulando genes como, por exemplo, o estudo com camundongos knockout CNTNAP2 que demonstram prejuízos na interação social, comportamento repetitivo e hiperatividade (PEÑAGARIKANO *et al.*, 2011).

Além desses, existem os modelos que focam na neuroanatomia, lesionando regiões envolvidas nos transtornos, como hipocampo e estruturas do sistema límbico, como amígdala, acarretando em alterações na interação social, ausência de expressão facial e de comportamento emocional, além de comportamento repetitivo e agressividade (SWEETEN *et al.*, 2002).

Modelos farmacológicos também são propostos como modelos animais de autismo, como a exposição *in utero* ao ácido valpróico (VPA) em roedores (SCHNEIDER; PRZEWLOCKI, 2005; BROMLEY *et al.*, 2008; NADEBAUM *et al.*, 2011) e à toxinas, como talidomida e álcool (KLAUCK, 2006). Modelos de infecções pré-natais, bacterianas e virais, utilizam lipopolissacarídeo (LPS), vírus influenza e ácido poliinosinico-policidílico (PolyI:C) injetados em diferentes vias em roedores (KIRSTEN *et al.*, 2012).

O VPA é uma droga de alto poder de regulação da expressão gênica no período de neurogênese, podendo causar alterações nos genes relacionados ao neurodesenvolvimento. Além disso, o VPA apresenta efeitos teratogênicos quando administrado em altas doses no primeiro trimestre da gestação, causando alterações cognitivas, má formação em crianças e, em alguns casos, autismo (ARDINGER *et al.*, 1988; CHRISTIANSON *et al.*, 1994; WILLIAMS *et al.*, 2001). No modelo animal de autismo mais utilizado em estudos, a administração de ácido valpróico é feita por volta do 12º dia da gestação dos roedores, antes do fechamento do tubo neural (INGRAM *et al.*, 2000), promovendo alterações comportamentais e fisiológicas similares àquelas observadas em autistas (ROBERT; ROSA, 1983; DILIBERTI *et al.*, 1984). Desse modo, o ácido valpróico possui efeitos neurotóxicos, interferindo no metabolismo do ácido fólico e aumentando os riscos de má formação do tubo neural (VORHEES, 1987; EMMANOUIL-NIKOLOUSSI *et al.*, 2004). De modo complementar, estudos mostraram alterações na anatomia cerebral de autistas, sugerindo que a origem do TEA ocorra ainda no período pré-natal.

Nos modelos animais de neuroinflamação, como o tratamento com LPS, foi observada a importância da ativação imune materna para o desenvolvimento cerebral do feto (PATTERSON, 2002; MELTZER; VAN DE WATER, 2017). A prole apresentou expressão gênica, comportamentos e fisiologia similares aos de pacientes diagnosticados com esquizofrenia e autismo, como prejuízo sensorio-motor, déficit no teste de inibição pré-pulso e redução de receptores dopaminérgicos no córtex pré-frontal quando adultos (MEYER *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2007). Além disso, houve redução do comportamento de brincar dos filhotes e da interação social quando adultos (KIRSTEN *et al.*, 2010).

1.3 Neuroinflamação e Estresse Oxidativo no TEA

Evidências mostram que a neuroinflamação no TEA é mediada pelas células da glia e que, em condições inflamatórias, essas células contribuem para a perda de funções sinápticas, desencadeando o transtorno (LI *et al.*, 2019). Além disso, resultados neurodesenvolvimentais e comportamentais da exposição materna ao VPA em primatas não-humanos apresentaram astrócitos positivos para GFAP no córtex pré-frontal (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*, proteína fibrilar ácida da glia) (ZHAO *et al.*, 2019).

A disfunção microglial no cérebro em desenvolvimento também demonstrou relação com o TEA, através do desequilíbrio excitatório versus inibitório das sinapses (KOYAMA; IKEGAYA, 2015; KIM *et al.*, 2017). Usando imunohistoquímica para marcadores específicos de micróglia, como o IBA 1, um estudo com primatas não-humanos

forneceu evidências da existência de micróglia ativada em pacientes com TEA, demonstrando neuroinflamação (ICHINOHE *et al.*, 2019).

TEA também está associado a produção de um perfil de citocinas pró-inflamatórias específicas. Estudos pós-natais demonstraram a relação entre TEA e ambiente através de alterações nos níveis de interleucinas (IL), principalmente IL 6 (TURBÉ *et al.*, 2019; SAGHAZADEH *et al.*, 2019).

Estudos também mostram que o estresse oxidativo está aumentado no TEA, ainda que não seja conhecido o mecanismo específico de indução entre estresse oxidativo e inflamação (PARKER *et al.*, 2017; YUI *et al.*, 2016). No TEA, o estresse oxidativo foi observado a nível de membrana e através da mensuração de produtos da peroxidação lipídica. Os marcadores da peroxidação lipídica estão elevados no TEA, evidenciando um aumento do estresse oxidativo no transtorno (CHAUHAN; CHAUHAN, 2006).

1.4 Teoria Motivacional do TEA

As interações sociais são fundamentais para a adaptação de numerosas espécies, além de proporcionarem aprendizagem. Logo, a sociabilidade agrupa reconhecimento social, interesse pelo contato social e, conseqüentemente, formação de vínculo. Vários fatores são essenciais para a estrutura e estabelecimento das relações sociais que definem as sociedades e muitos transtornos neuropsiquiátricos são caracterizados por prejuízos no comportamento social, como depressão, TEA, transtorno bipolar e esquizofrenia (KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2011). Além das hipóteses que relacionam o autismo com déficits na cognição social e na teoria da mente, outras hipóteses focam na relevância dos fatores motivacionais para o TEA. A hipótese motivacional aponta fatores comportamentais, como orientação social, função de recompensa, busca por interação e manutenção social, e evolutivos, como adaptação e aptidão individual para cooperar com o grupo e propõem um modelo que abrange os níveis comportamental, biológico e evolutivo (CHEVALLIER *et al.*, 2012).

Segundo a teoria da motivação social no autismo, a nível comportamental, há prejuízos na atenção social, que privam a criança de experiências fundamentais para uma aprendizagem social adequada (MUDY; NEAL, 2001; DAWSON *et al.*, 2005). A orientação social, a busca pelo contato com os outros, o gosto pelo contato e, conseqüentemente, a manutenção social são interrompidos no TEA (OSTERLING *et al.*, 2002; KLIN *et al.*, 2002; RIBY; HANCOCK, 2008; NAKANO *et al.*, 2010; ELSABBAGH *et al.*, 2012). Além disso, pouco contato visual, distanciamento social, déficit de atenção para a fala, orientação pouco frequente para o próprio nome, menor predisposição para colaborar, fazer amigos e menor

sensibilidade à recompensa social também configuram prejuízos comportamentais característicos do autismo (BAON-COHEN; WHEELWRIGHT, 2003; LIEBAL *et al.*, 2008; DEMURIE *et al.*, 2011). Estudos mostram que baixa emissão de gestos de saudação e despedida, menor ênfase à reputação e baixa influência das impressões dos outros indicam déficits na manutenção social (HOSON; LEE, 1998; IZUMA *et al.*, 2011; CHEVALLIER *et al.*, 2012). Vale ressaltar que padrões não-sociais em crianças pequenas são um preditor robusto de autismo (PIERCE *et al.*, 2011) e anedonia social seletiva em adolescentes possui correlação positiva com a gravidade do TEA (CHEVALLIER *et al.*, 2012).

Em nível biológico, o circuito orbitofrontal-estriado-amígdala apresenta prejuízos em seu funcionamento no autismo (BAHEVALIER; LOVELAND, 2006). Pesquisas mostram que os déficits sociais resultam de prejuízos na função recompensadora dos estímulos sociais (DAWSON *et al.*, 2005) e que há desregulação do sistema ocitocinérgico no autismo (MODI; YOUNG, 2011).

1.5 Isolamento neonatal e TEA

Estudos evidenciam que as relações sociais primárias influenciam no desenvolvimento dos filhotes, principalmente a relação com a mãe, que geralmente é o primeiro contato social da criança (LEVINE, 2001). Características da interação social entre criança e seus cuidadores podem ser importantes para o neurodesenvolvimento de indivíduos com alto risco para TEA (WAN *et al.*, 2012). Além disso, várias teorias sobre a gênese do autismo consideram a gestação e a relação mãe-bebê (BROWN *et al.*, 2018; YATES *et al.*, 2018).

Evidências também demonstram que características do ambiente pós-natal podem atuar como mediadores entre a predisposição genética para TEA e o desenvolvimento do endofenótipo do transtorno, modulando também a gravidade do endofenótipo apresentado (MANDY; LAI, 2016). Essa capacidade de modulação pode ser evidenciada também pela quantidade de indivíduos diagnosticados com TEA na infância que mostraram posterior melhora dos sintomas na vida adulta (15-25%) (GOH; PETERSON, 2012). Além disso, alguns sinais apresentados nos primeiros meses de vida parecem ser marcadores precoces do desenvolvimento de TEA, como redução do contato visual e da atenção para cenas sociais, prejuízos no engajamento social e comportamentos atípicos (ELSABBAGH *et al.*, 2012; CHAWARSKA *et al.*, 2013; JONES; KLIN, 2013; GREEN *et al.*, 2015).

Partindo da importância do comportamento social para o desenvolvimento do indivíduo e da significativa influência de alterações ambientais benéficas no endofenótipo de

TEA, estudos têm contribuído para o esclarecimento da relação entre transtornos do neurodesenvolvimento e ambiente pós-natal, supondo que prejuízos no ambiente social possam também exercer efeitos moduladores na gravidade do transtorno (BRENES *et al.*, 2016). Bebês prematuros que necessitaram de incubadora após o nascimento apresentaram alterações na estrutura cerebral e no neurodesenvolvimento semelhantes às alterações observadas no TEA, tornando indispensável o desenvolvimento de estudos que relacionam TEA e ambiente pós-natal (PINEDA *et al.*, 2014; LAGERCRANTZ, 2017).

Como o enriquecimento ambiental demonstra efeitos positivos na modulação do TEA (YANG *et al.*, 2011; REYNOLDS *et al.*, 2013), levando ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas para crianças com TEA que utilizam estímulos sensoriais (WOO *et al.*, 2015), o isolamento social, com conseqüente empobrecimento de estímulos sensoriais, produz alterações que devem ser consideradas nos transtornos do neurodesenvolvimento.

Estudos mostram que ratos criados em isolamento exibem diversos tipos de comportamentos estereotipados (SCHRIJVER *et al.*, 2002) e que o estresse precoce causado pelo isolamento social provoca alterações neuroquímicas e na morfologia neuronal que levam à maior suscetibilidade a transtornos do neurodesenvolvimento (REINWALD *et al.*, 2018). Outros dados também evidenciaram os efeitos comportamentais e neuroquímicos desse tipo de estresse (ROBBINS *et al.*, 1996; HALL, 1998) e a relação com sintomas da esquizofrenia que também podem ser observados no autismo (GEYER *et al.*, 1993).

Evidências têm utilizado protocolos diversos de isolamento social em animais para induzir comportamentos observados no autismo, visto que trata-se de um estresse que provoca alterações comportamentais a longo prazo produzidas nos primeiros eventos da vida. Animais separados das mães durante 180 minutos diários, do 2º ao 21º dia de vida, apresentaram comportamentos depressivos, déficits cognitivos e hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), prejuízos esses mantidos na vida adulta (AISA *et al.*, 2007), resultados também obtidos após realização de protocolo que propõe 180 minutos diários de isolamento social nos 14 primeiros dias de vida, acrescidos de aumento de peso corporal, insulina e glicemia (VARGAS *et al.*, 2016). O isolamento social precoce realizado nos nove primeiros dias de vida, durante uma hora por dia, também foi capaz de desencadear comportamentos observados no autismo na prole, como comportamentos repetitivos e sociabilidade prejudicada, além de estar associado a comportamentos ansiosos e depressivos e alterações neurológicas, como desregulação sináptica no hipocampo e prejuízos na neurogênese (WU *et al.*, 2014). Além disso, o isolamento por 90 minutos diários nos 11

primeiros dias de vida e por uma hora diariamente nos 9 primeiros dias pós-natais encontraram os mesmos resultados (BAHI *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2018).

Propor estudos com animais que possuem relevância clínica é fundamental, visto que trata-se de um espectro de transtornos humano (CRAWLEY, 2004) no qual o endofenótipo clínico é bastante heterogêneo e abrange diversos comportamentos (KAZDOBA *et al.*, 2016). Vários estudos já mostraram que a quantidade e qualidade dos cuidados maternos recebidos durante período pós-natal são capazes de influenciar comportamentos como agressividade, habilidades para criar vínculos sociais e desenvolvimento de psicopatologias diversas (JAFFEE; PRICE, 2012). Assim, dentro de uma perspectiva translacional, este estudo procurou induzir, ambientalmente, alguns endofenótipos e alterações neurofisiológicas observadas no TEA, com foco em comportamentos e habilidades sociais, utilizando um protocolo inovador de isolamento neonatal em roedores. O tratamento utilizado após a manipulação ambiental consistiu na administração de Risperidona, antipsicótico atípico de primeira escolha amplamente prescrito para minimizar sintomas do TEA, visto que é disponibilizado para a população pelo o Sistema Único de Saúde (SUS).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Diversos estudos já mostraram que animais manipulados em período neonatal apresentaram alterações comportamentais, neurofisiológicas e morfológicas nas fases seguintes do desenvolvimento. Desse modo, neste estudo, o insulto ambiental e os testes de sociabilidade foram realizados durante as fases de infância e adolescência dos animais, considerando a repercussão dos efeitos do isolamento neonatal já nos períodos iniciais de vida, bem como a fase do desenvolvimento em que o diagnóstico é realizado, o que ressalta a especificidade do presente estudo.

Fatores ambientais também estão envolvidos no TEA, destacando a importância de estudos pré-clínicos que considerem o papel do ambiente como mediador importante para desencadear o transtorno. O modelo mais utilizado, de indução do TEA por ácido valpróico durante a gestação de roedores, mesmo sendo bastante validado, possui limitações quanto a generalização, por ser restrito à administração desse fármaco em mulheres gestantes, dificultando a translação do modelo para diversas populações.

Considerando a complexidade do ambiente e do TEA, os endofenótipos relacionados à sociabilidade desse transtorno não se mostram tão complexos e evidentes nos modelos tradicionalmente utilizados. Partindo disso, utilizar uma indução genuinamente ambiental, mais focada em mecanismos motivacionais, é fundamental para auxiliar a compreensão do transtorno.

Considerando o valor translacional deste estudo, o insulto ambiental utilizado ainda pode contribuir com as investigações feitas acerca de quadros como depressão pós-parto, prejuízos na saúde mental de bebês prematuros que necessitam de incubadora e comportamentos atípicos em crianças que sofreram abandono por parte da mãe.

No tocante ao foco em comportamentos sociais, o TEA parece se diferenciar de outros transtornos em razão dos prejuízos nas habilidades sociais demonstrados já na primeira infância. Desse modo, focar em testes que buscam observar e medir esses comportamentos tão importantes para o desenvolvimento saudável, e que estão prejudicados no transtorno em

questão, é de extrema importância para o estudo do TEA, além de contribuir para a especificidade do transtorno em modelos animais.

Diante desses dados, propor modelos animais que abordam fatores de risco ambientais para reproduzir endofenótipos do autismo e investir em variados testes de sociabilidade pós indução podem elucidar fatores idiossincráticos do TEA.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Produzir endofenótipos e alterações neuroinflamatórias do TEA através do isolamento neonatal e avaliar os prejuízos nos comportamentos sociais utilizando testes de sociabilidade.

3.2 Objetivos Específicos

- Produzir endofenótipos de comportamentos semelhantes aos observados em humanos diagnosticados com autismo, utilizando o isolamento neonatal em ratos;
- Avaliar comportamentos como atividade locomotora, ajuda pró-social, empatia/contágio emocional e comportamento de brincar, que encontram-se alterados no TEA;
- Produzir e avaliar alterações no estresse oxidativo, neuroinflamação das células gliais e disfunção sináptica, induzidas pelo isolamento neonatal, no córtex pré-frontal;
- Avaliar os efeitos da Risperidona no tratamento dos sintomas induzidos pelo isolamento neonatal.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Animais

Como se trata de um estudo desenvolvimental e o protocolo foi iniciado logo após o nascimento, primeiramente, foram utilizados 16 animais *Rattus norvegicus*, de linhagem *Wistar*, sendo 8 machos e 8 fêmeas, para fins de reprodução e posterior utilização dos filhotes para experimentação. Ratos foram selecionados para este estudo devido sua predominância em estudos que mostram a relação entre prejuízos nos comportamentos sociais e TEA (WINSHWE *et al.*, 2018; HIRSCH *et al.*, 2020). Os animais eram provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número de registro 2891120318.

4.2 Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: Ketamina (Vetanarcol ®), Xilazina (Rompum ®) e Risperidona (Sandoz ®).

4.3 Protocolo Experimental

Os animais foram monitorados e manuseados desde o momento pré-cópula, passando pela gestação das fêmeas e pelo nascimento dos filhotes, a fim de realizar o acompanhamento das ninhadas para posterior distribuição dos animais entre os grupos, para garantir uma gestação saudável para as fêmeas e proporcionar a habituação dos animais aos experimentadores.

Em seguida, foram separados por casal, de modo que cada casal ocupava uma gaiola-viveiro, a fim de estimular o cruzamento. O dia em que foram postos juntos foi contabilizado como dia zero de gestação, sendo o dia seguinte considerado como o primeiro de gestação e assim sucessivamente. A partir daí, a gestação foi acompanhada sistematicamente. Neste estudo, as fêmeas eram inexperientes e jovens, estavam em fase de maturidade sexual e a produção dos filhotes ocorreu de forma empírica, visto que a duração do ciclo estral já é conhecida e bem estabelecida (de 4 a 5 dias), sendo realizado o acasalamento monogâmico. Desse modo, o macho era posto na gaiola da fêmea, permanecendo por até 7 dias, para garantir que a cópula ocorreu devidamente.

As fêmeas prenhas foram alojadas individualmente em gaiolas viveiro até o parto, sob condições ideais. Além disso, algumas estratégias foram utilizadas buscando reduzir a possibilidade de rejeição dos filhotes por parte da mãe, como manuseio da fêmea em períodos anteriores ao cruzamento e durante a gestação, evitar tocar os filhotes logo após o parto, quando ainda estão envoltos em sangue, e na presença da mãe, manuseio rápido dos filhotes para troca de caixa e enriquecimento da gaiola da fêmea preta com algodão, a fim de auxiliar na produção dos ninhinhos (NEVES, 2013).

Após o nascimento, os neonatos foram divididos, igualmente, em 4 grupos: grupo controle (CON), grupo isolamento neonatal (ISO), grupo isolamento neonatal salina (ISO + SAL) e grupo isolamento neonatal Risperidona (ISO + RIS) (TABELA 1). Para os testes de empatia/ contágio emocional e ajuda pró-social, foram utilizados 10 animais que não fizeram parte dos grupos experimentais, mas participaram dos testes. Foi realizado manuseio e monitoramento dos animais durante todo o protocolo, a fim de assegurar a saúde, reduzir o estresse e controlar alterações sobretudo no peso.

Durante todo o estudo, os animais foram mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12:12 horas (luz acesa das 7h às 19h), em ambiente com umidade e temperatura controladas (22-23°C), água e ração *ad libitum* e só saíram das gaiolas-viveiro para a realização dos experimentos e para serem pesados diariamente. Os procedimentos experimentais foram realizados durante a fase clara do ciclo.

Tabela 1. Grupos, número de animais e tratamento.

Grupo	Nº de animais	Tratamento
Controle	14	Manuseio
Isolamento neonatal	11	Isolamento neonatal (dia 1 ao 7 – 60 min; dia 11 ao 18 – 180 min), seguem em isolamento após desmame
Isolamento neonatal + Risperidona	14	Isolamento neonatal (dia 1 ao 7 – 60 min; dia 11 ao 18 – 180 min), seguem em isolamento após desmame + 3mg/kg de Risperidona v.o por 26 dias
Isolamento neonatal + salina	14	Isolamento neonatal (dia 1 ao 7 – 60 min; dia 11 ao 18 – 180 min), seguem em isolamento após desmame + 3mg/kg de salina com 0,9% de NaCl v.o por 26 dias

No sétimo dia de vida, foi realizada a sexagem dos filhotes de todos os grupos para padronização das ninhadas; machos e fêmeas fizeram parte deste estudo. Cada grupo era constituído, inicialmente, por 14 animais (8 fêmeas e 6 machos). Porém, como trata-se de um protocolo que interfere no desenvolvimento de um sistema imunológico saudável, ocorreu perda de animais, conforme o previsto (HOFER, 1975; GIORDANO *et al.*, 1984). Além disso, o protocolo de isolamento neonatal utilizado neste estudo é inovador e abrange desde o período pós-natal até a periadolescência, visto que não há um consenso acerca da duração do protocolo e dos dias de vida específicos em que é realizado (HALL, 1998).

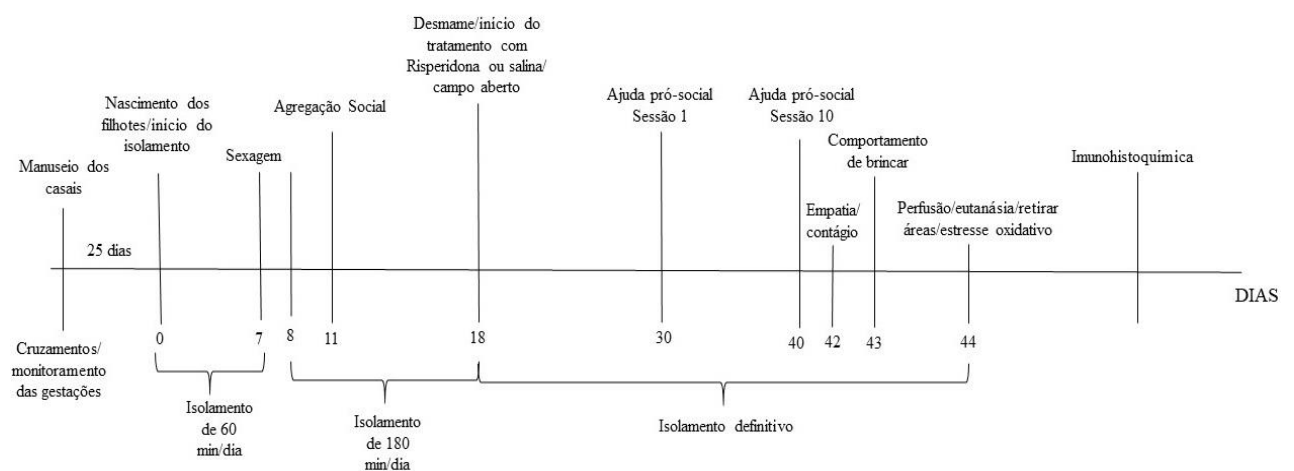
Nos grupos de isolamento neonatal, ainda no dia do nascimento, o protocolo de isolamento foi iniciado, após a primeira mamada, visto que consiste em um estudo de transtornos do desenvolvimento.

O isolamento ocorreu da seguinte forma: do dia zero (dia do nascimento) ao sétimo dia de vida, os animais foram isolados diariamente pelo período de 60 minutos, retornando depois para a caixa ninho; do oitavo ao décimo oitavo dia de vida, a duração do isolamento aumentou para 180 minutos diários. Após o desmame, que ocorreu em torno do décimo oitavo dia, os animais foram isolados definitivamente e permaneceram desse modo até o final do protocolo experimental, com 44 dias de vida, visto que trata-se de um protocolo de estresse crônico, focado nas fases de infância e periadolescência dos animais (ANDERSEN, 2003). Vale ressaltar que consiste em um isolamento sobretudo somestésico, contínuo e gradativo, que utilizou caixas-viveiro com grade, esterilizadas e sem cama (maravalha) (WU *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2018). O grupo controle não foi exposto ao estresse descrito.

No grupo isolamento de tratamento farmacológico, foi utilizado um antipsicótico atípico de segunda geração, usado como primeira escolha para minimizar sintomas do autismo (principalmente no Sistema Único de Saúde- SUS), a Risperidona. A dose utilizada correspondeu a 3mg/kg (UCHIDA *et al.*, 2007; GRANT; FITTON, 2012) dissolvidas em solução salina de 0,9% de NaCl contendo 1% de ácido acético, administrada via oral e diariamente, por gavagem, a partir do 18º dia de vida até o final do protocolo. O grupo isolamento solução salina foi tratado apenas com 0,9% de NaCl. A farmacoterapia utilizada neste estudo buscou preservar o valor translacional, considerando o modo como essas abordagens são utilizadas em humanos diagnosticados com TEA, onde o peso corporal e a fase do desenvolvimento possuem relevância para o ajuste da dose e a eficácia do tratamento.

Os testes de comportamento foram realizados durante e após o protocolo de isolamento social desenvolvido. Finalizados os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para a retirada do córtex pré-frontal e realização das análises do estresse oxidativo (n=6) (TBARS e Nitrito). Para as análises imunohistoquímicas (n=4/grupo), os animais foram anestesiados e perfundidos transcardiacamente com paraformaldeído a 4% em PBS (tampão fosfato 0,1 M contendo salina 0,9 %, pH 7,4). Os cérebros foram removidos, fixados em formol tamponado a 10% por 24 h e posteriormente crioprotetidos em sacarose a 30% em PBS a 4° C. Em seguida, foram feitos os cortes histológicos para análise da expressão de micróglia (IBA 1) e densidade de marcadores sinápticos (sinaptofisina) (FIGURA 2).

Figura 2. Desenho experimental.



4.4 Testes Comportamentais

Durante e após o isolamento neonatal e os tratamentos em seus respectivos grupos, os testes a seguir foram iniciados, avaliando funções específicas (TABELA 2). Todos os testes foram devidamente filmados e os vídeos posteriormente analisados.

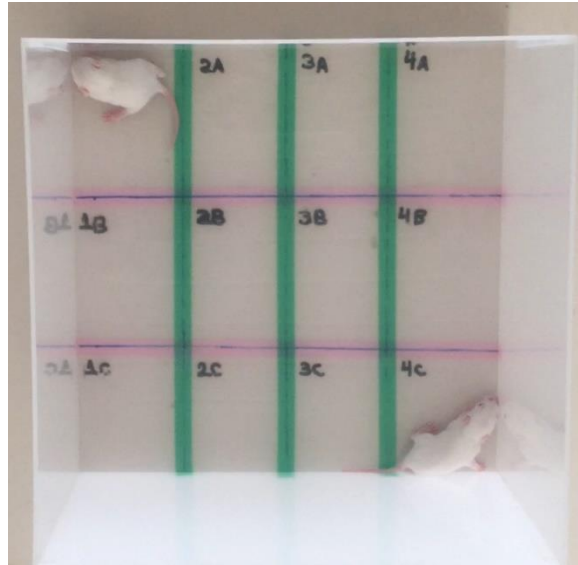
Tabela 2. Testes, parâmetros e funções avaliadas.

Testes	Parâmetros	Funções
Agregação Social	Latência para encontro, tempo de interação	Interação social precoce
Campo Aberto	Crossing, entradas na periferia, <i>grooming</i> , <i>rearing</i>	Atividade locomotora, ansiedade
Empatia/Contágio Emocional	<i>Freezing</i>	Empatia, comunicação social, medo condicionado
Ajuda pró-social	Interação com a caixa restritora, abertura da caixa e latência para abertura	Comportamento de ajuda, escolha social
Comportamento de brincar	Atacar, rolar, boxear, <i>rearing</i> , pular, perseguir, cheirar	Repertório de brincadeiras, interação social

4.4.1 Agregação Social (SCHANK; ALBERTS, 2000)

Trata-se de um parâmetro para avaliar interação social em idade precoce. Foi realizado no décimo primeiro dia de vida dos animais, fase em que a abertura dos olhos é recente e os animais são prioritariamente guiados pelo olfato. Consiste em colocar uma dupla de irmãos, do mesmo sexo, por cinco minutos, nas extremidades de uma arena de acrílico pré-aquecida a 30°C (simulando a temperatura da gaiola-viveiro), a fim de mensurar o período de latência para o encontro dos irmãos e, conseqüentemente, o tempo de interação após o encontro (FIGURA 3).

Figura 3. Arena da Agregação Social.



Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC).

4.4.2 Campo Aberto (HALL, 1934)

O teste do campo aberto foi utilizado para analisar o estado emocional dos animais. Foi realizado em uma arena quadrada (30 x 30 x 15cm) de acrílico, cercada e possui duração de cinco minutos. O tamanho da arena utilizada foi similar ao tamanho de uma arena para camundongos, visto que os animais deste estudo foram submetidos a testes nas fases de infância e adolescência, em que possuem tamanho e peso semelhantes aos de camundongos adultos. O piso da arena é dividido em nove quadrantes iguais (FIGURA 4), permitindo que a atividade locomotora e exploratória do animal seja mensurada pela quantificação dos cruzamentos (*crossings*) entre os quadrantes, além de possibilitar que as entradas na zona periférica sejam também mensurados, bem como explorações verticais (*rearings*) e comportamentos de auto-limpeza (*grooming*).

Figura 4. Arena do Campo Aberto

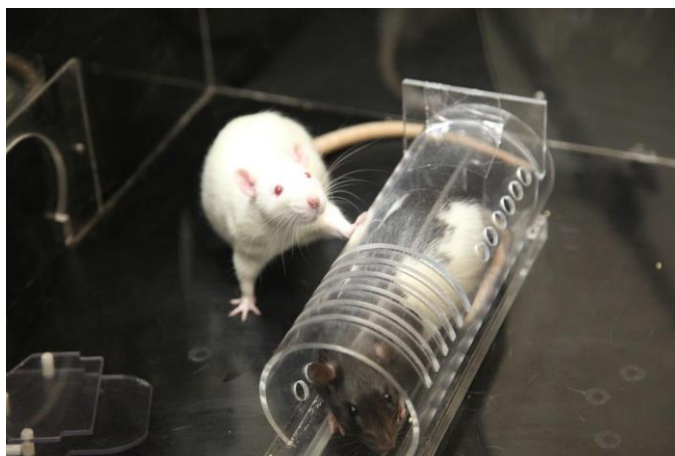


Fonte: Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC).

4.4.3 Ajuda Pró-Social (Bartal et al., 2011)

O aparato consiste em uma arena quadrada, similar a arena de campo aberto, contendo, em seu centro, uma caixa restritora, de acrílico e em formato cilíndrico, possuindo orifícios que permitem a ventilação interna. É fechada por uma porta que só pode ser aberta por fora (FIGURA 5). Essa caixa foi utilizada para aprisionar um animal, de modo que outro animal livre na arena possa libertá-lo, através da abertura da porta, que foi a medida de ajuda pró-social. Esse experimento requer uma sessão de habituação no dia que antecede o início do teste (duração de 10 minutos, com a caixa restritora vazia e sem porta), devido à sensibilidade do paradigma ao estresse, além de necessitar de, pelo menos, dez dias (uma sessão experimental/dia, logo dez sessões, cada uma durando 10 minutos) para que os animais aprendam o mecanismo de abertura da caixa restritora e demonstrem comportamento de ajuda ao libertar o coespecífico aprisionado.

Figura 5. Caixa restritora para ajuda pró-social.



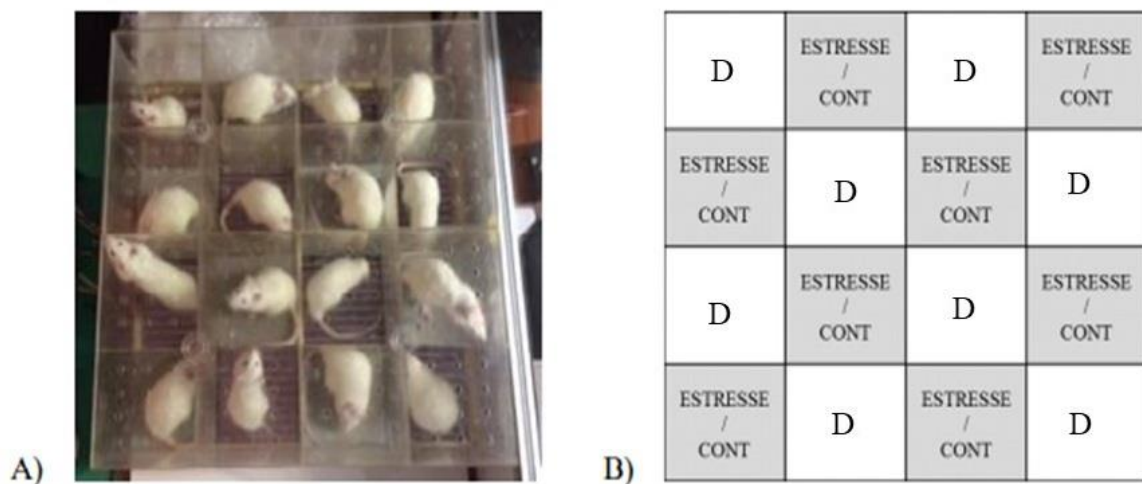
Fonte: Bartal e colaboradores, 2011.

4.4.4 Empatia/ Contágio Emocional (ROSALES et al.,2002)

Um aparato de medo condicionado adquirido por observação, chamado caixa de comunicação, foi utilizado para avaliar o compartilhamento de medo entre os animais. O aparato é composto por 16 compartimentos, separados por paredes de acrílico transparente. As paredes evitam que os animais tenham contato físico, mas conservam visão, audição e olfato, permitindo que o animal interaja com outros de compartimentos vizinhos (FIGURA 6). O piso é revestido por uma grade que emite choques, feita de aço inoxidável. No interior dos compartimentos dos animais observadores, os pisos são cobertos com EVA, ou seja, não transmite corrente elétrica. Um choque elétrico de 8 mA por 10 segundos é fornecido por um eletroestimulador acoplado à caixa de comunicação, com intervalos de 60 segundos, durante 1

hora. Após a habituação ao aparato, um animal observador foi exposto a um animal demonstrador que recebe choques, para que haja detecção de respostas emocionais ao desconforto do demonstrador, como o *freezing*. É realizado em sessão única com duração de 20 minutos.

Figura 6. Caixa de comunicação (A) e diagrama esquemático da disposição dos animais no aparato (B; D= demonstrador, animal que recebe o choque, ESTRESSE/CONT= animal que observa o outro levando choque).



Fonte: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA).

4.4.5 Comportamento de brincar (HOMBERG et al., 2007)

As brincadeiras são atividades motoras frequentes em animais saudáveis quando estão em grupo e foram mensuradas através da quantificação de comportamentos como atacar, rolar, boxear, *rearing* social, pular, perseguir e cheirar, que configuram o repertório de brincar dos animais (FIGURA 7). Para isso, os animais foram colocados em gaiolas com maravalha, separados por sexo, em grupos de seis animais/gaiola. Esses comportamentos foram observados e filmados na fase escura do ciclo dos animais, das 18 às 23h, visto que trata-se de animais de hábitos noturnos, no 43º dia de vida.

Figura 7. Comportamento de brincar (atacar e rolar).



Fonte: Hamilton e colaboradores, 2014.

4.5 Análise Histopatológica

Após a anestesia, os animais foram perfundidos através do coração, pelo ventrículo esquerdo, com salina gelada (8°-10°C), seguido de paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e pós-fixados com formol tamponado por 24 (vinte e quatro) horas. Após esse período, foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30%. O tecido foi cortado no criostato e montado em lâminas silanizadas. Os cortes histológicos de 10µm do córtex pré-frontal foram submetidos à análise da expressão de micróglia, através do marcador IBA 1 (Wako®) e densidade de marcadores sinápticos, através da sinaptofisina (abcam®).

O protocolo de imunohistoquímica utilizado segue os seguintes passos: recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio de ligações inespecíficas, incubação com anticorpo primário, ligação com o polímero *Dual Link System Envision + Dako®*, preparação do diaminobenzidina (DAB), desidratação e montagem das lâminas.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em tampão citrato pH 6.0 (10 mM) por 15 minutos, em banho maria (90°C). Após o banho, as lâminas foram colocadas para esfriar por 30 minutos, a fim de retornar a temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas três vezes em tampão fosfato-salino (PBS), 2 minutos por lavagem.

No bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas em solução de 10 % de metanol + 1,05 % de água oxigenada + PBS 1x (40 ml de metanol + 4,2 ml de água oxigenada + 400 ml de PBS (1x), em temperatura ambiente, por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS, 5 minutos por lavagem.

Para o bloqueio de ligações inespecíficas, as lâminas foram incubadas por 2 horas em solução de 10% de soro de cavalo + 1% de triton + PBS (1x) (40 ml de soro de cavalo +

4ml de triton + 400 ml de PBS (1x). Em seguida, o excesso da solução foi retirado das lâminas e a incubação em anticorpo primário foi iniciada. Para essa etapa, primeiramente, foi utilizada a *Dako Pen*®, caneta demarcadora, para delimitar a área das fatias. Após a demarcação, o anticorpo primário foi diluído em solução de bloqueio (soro de cavalo + triton + PBS (1x)). Para IBA 1 e sinaptofisina, a concentração utilizada foi de 1:250.

Posteriormente, as fatias foram cobertas com o anticorpo primário diluído (em média, 300 µl por lâmina) e permaneceram *overnight* em geladeira.

No dia seguinte, as lâminas foram retiradas da geladeira, para atingir temperatura ambiente, o anticorpo primário foi retirado e foram lavadas em PBS 3 vezes, sendo postas para secar em seguida. Como IBA 1 e sinaptofisina eram anti-*rabbit* e anti-*mouse*, respectivamente, a ligação foi feita com o polímero *Dual Link System Envision + Dako*® (em média, 300 µl por lâmina), por 30 minutos. Logo após, o polímero foi retirado, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, posteriormente secas e o DAB foi preparado. Para preparar o DAB, foram utilizados 1ml de substrato Buffon (tampão) + DAB + Chromger (1 gota) em ambiente escuro, pois o DAB é fotossensível. Para a revelação, o DAB foi colocado nas fatias até que atingissem a coloração castanha, em média por 2 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada, a fim de cessar a reação, e postas para secar. Para a montagem, foram mergulhadas em xilol e montadas com *entellan* (Merck, Alemanha).

Para a quantificação das células coradas, as lâminas foram visualizadas em um microscópio (Nikon Eclipse Ni) com aumento de 100x. Foram selecionadas 4 fatias de cada animal, aleatoriamente, e a quantificação das células coradas foi realizada em todas as imagens utilizando o software *Image J* (NIH, Bethesda, MD, EUA) com um *gride* de 1000, por densidade óptica. Foi calculada a média dos valores por animal, e os resultados expressos como número de células.

4.6 Análise do Estresse Oxidativo

4.6.1 Determinação da peroxidação lipídica

A atividade antioxidante foi medida pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DRAPER; HADELY,1990), um indicador de peroxidação lipídica. No dia do ensaio, 60 µL do homogenato (10% em tampão fosfato) de córtex e hipocampo foi introduzido em tubo de ensaio e centrifugado a 1200 rotações por minuto (rpm) 4°C por 30 minutos. Após a centrifugação, 100 µL de ácido perclórico a 35% foi adicionado para interromper a peroxidação e, centrifugado novamente a 5000 rpm 4°C por 10

minutos, o sobrenadante foi retirado e a este foi adicionado 50µl de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Posteriormente, levado ao banho de água por 30 minutos a uma temperatura variável de 95-100°C. A solução, foi retirada e colocada para esfriar a temperatura ambiente. Após esfriar, 150 µL da solução foi adicionada nos poços da placa de ELISA e foi feita a leitura em 535 nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de malonaldeído (MDA) padrão e os resultados foram expressos em concentração (µM).

4.6.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

Nesse ensaio, o reativo de Griess (N-1-naftiletlenodiamina a 0,1% em água bidestilada, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) revela a presença de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorbância em 540 nm (GREEN *et al.*, 1982). Para realização do ensaio, os homogenatos (10% em tampão fosfato) de córtex pré-frontal e hipocampo foram centrifugados a 12000 rpm por 15 min a 4°C e 100 µL de cada sobrenadante foi adicionado a 100 µL do reagente de Griess. Para o branco, foi utilizado 100 µL do tampão fosfato e 100 µL reagente de Griess. Após 10 minutos, foi feita a leitura das absorbâncias em 540nm. A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de nitrito padrão e os resultados foram expressos em concentração (µM). As leituras da absorbância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então foi feita a determinação da equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra.

4.7 Análise Estatística

Os registros das sessões experimentais, em formato de vídeo, foram analisados, primeiramente, através do software de rastreamento de campo aberto XploRat (MARTÍNEZ; GARCIA; MORATO; 2005).

As análises estatísticas foram realizadas pelo R Software (<https://r-project.org/>, versão 3.6.0). Inicialmente, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk, usando o pacote “stats”, para verificar se os dados apresentaram distribuição normal, a fim de determinar os testes estatísticos utilizados.

Com a presença de dois fatores, grupo e sexo, o teste estatístico utilizado foi a Análise de Variância de duas vias (Two-way ANOVA), usando o pacote “stats” (versão 3.6.0), com teste *post hoc* de Tukey (P<0,05) e os resultados foram expressados como mediana e

intervalos interquartílicos para os dados anormais. Para dados normais, os resultados foram mostrados em média e desvio padrão.

Para os resultados do estresse oxidativo e histopatológicos, com a presença do fator grupo, o teste estatístico utilizado foi a Análise de Variância de uma via (One-way ANOVA). Os resultados foram mostrados em média e desvio padrão.

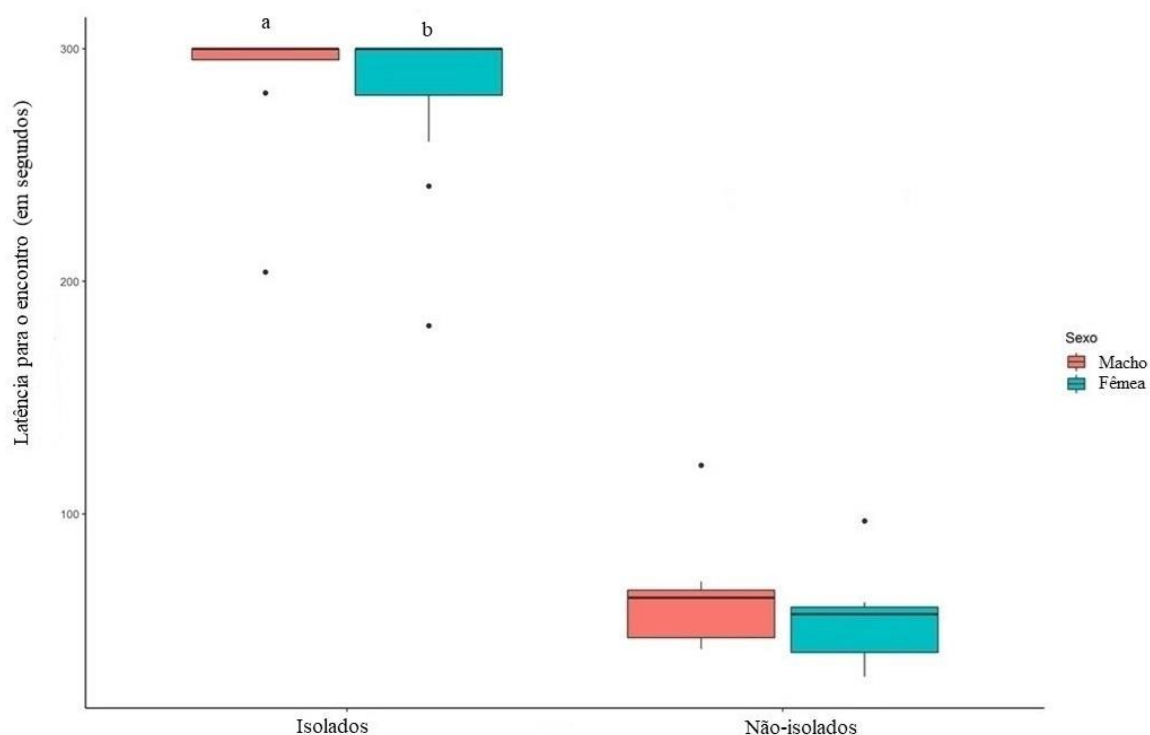
5. RESULTADOS

5.1 Efeito do isolamento neonatal sobre a latência para o encontro no teste de Agregação Social

Os resultados obtidos no teste de agregação social mostram que a latência para o encontro dos animais sofreu efeito significativo do isolamento neonatal (FIGURA 8).

O grupo isolado apresentou maior latência para o encontro quando comparado ao grupo não isolado (machos isolados: 300 [285,75 – 300]; fêmeas isoladas: 300 [260 – 300]; machos não-isolados: 64 [46,25 – 69,75]; fêmeas não-isoladas: 57 [40 – 61]; $P < 0,001$), demonstrando efeito do isolamento neonatal na diminuição da agregação social. Não houve diferença significativa entre os sexos dentro dos grupos. No entanto, as fêmeas mostraram tendência a redução da latência para o encontro quando comparadas aos machos.

Figura 8. Efeito do isolamento neonatal sobre a latência para o encontro no teste de Agregação Social.



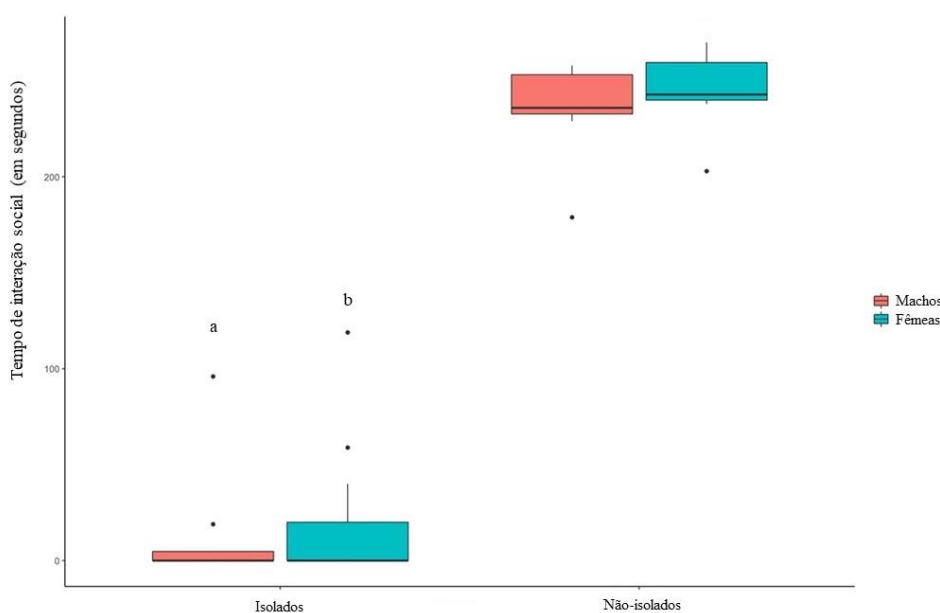
Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=26 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos não-isolados, b vs fêmeas não-isoladas, $P < 0,001$.

5.2 Efeito do isolamento neonatal sobre o tempo de interação social no teste de Agregação Social

Os resultados obtidos no teste de agregação social mostram que o tempo de interação social sofreu efeitos significativos do isolamento neonatal (FIGURA 9).

O grupo isolado apresentou menor tempo de interação social quando comparado ao grupo não isolado (machos isolados: 0 [0 – 14,25]; fêmeas isoladas: 0 [0 – 40]; machos não isolados: 236 [230,25 – 253,75]; fêmeas não-isoladas: 243 [239 – 260]; $P < 0,001$), demonstrando o efeito significativo do isolamento neonatal na diminuição do comportamento de agregação social dos animais. Não houve diferença significativa entre os sexos dentro dos grupos. No entanto, as fêmeas apresentaram tendência para maior tempo de interação social quando comparadas aos machos.

Figura 9. Efeito do isolamento neonatal sobre o tempo de interação social no teste de Agregação Social.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=26 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos não-isolados; b vs fêmeas não-isoladas, $P < 0,001$.

5.3 Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre o número de *crossings* no teste do Campo Aberto

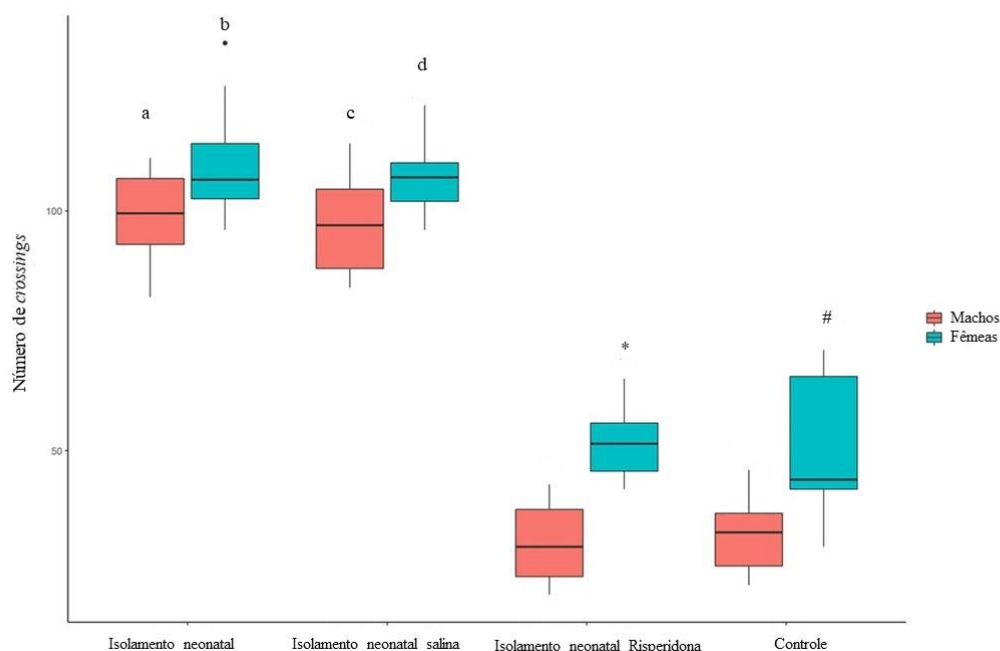
Os resultados obtidos no teste do campo aberto demonstram que houve alterações significativas na atividade locomotora dos animais, mais especificamente no número de *crossings*, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e do sexo (FIGURA 10).

Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou maior número de *crossings* quando comparados ao controle (machos isolamento neonatal: 99,5 [89,5 – 108,75]; fêmeas isolamento neonatal: 106,5 [101,5 – 122]; machos controle: 33 [26 – 40]; fêmeas controle: 44 [40 – 68]; $P < 0,001$), evidenciando hiperatividade locomotora.

O grupo isolamento neonatal salina também apresentou maior número de *crossings* quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 97 [86,5 – 107,25]; fêmeas isolamento neonatal salina: 107 [100 – 112]; machos isolamento neonatal Risperidona: 30 [21,5 – 40,75]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 51,5 [45,25 – 59,25]; $P < 0,001$), evidenciando a hiperatividade locomotora do grupo salina e o efeito da Risperidona na redução do número de *crossings*.

A variável sexo demonstrou efeito significativo nos grupos isolamento neonatal Risperidona e controle, dado que as fêmeas apresentaram número de *crossings* significativamente maior quando comparadas aos machos dentro dos grupos ($P < 0,01$).

Figura 10. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre o número de *crossings* no teste do Campo Aberto.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona, $P < 0,001$; * vs machos isolamento neonatal Risperidona, # vs machos controle, $P < 0,01$.

5.4 Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre o *self-grooming* no teste do Campo Aberto

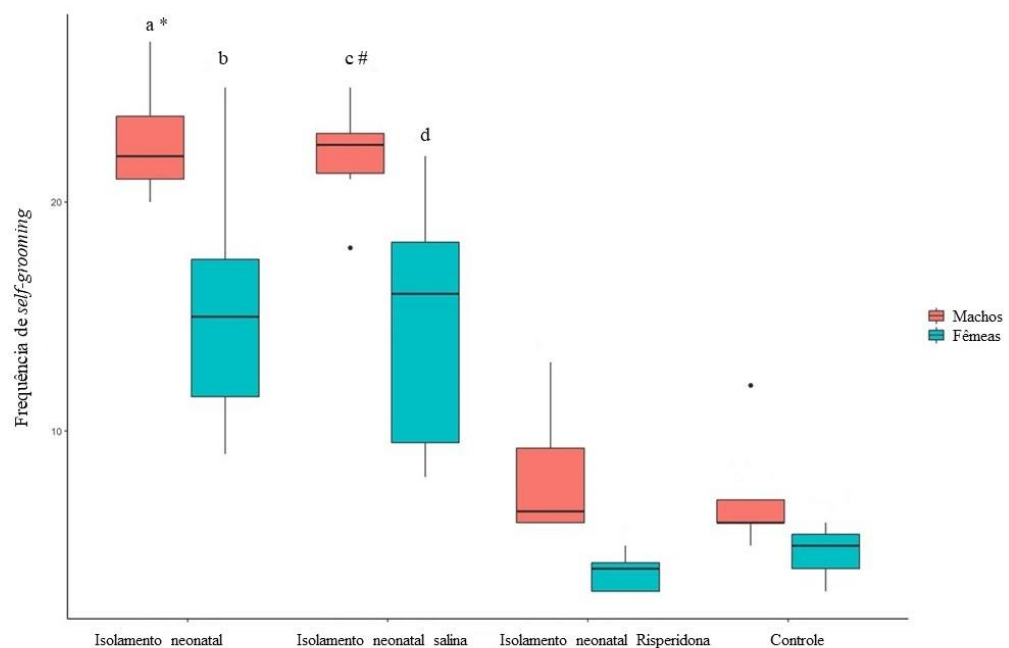
Os resultados obtidos no teste de campo aberto mostram que houve alterações significativas no comportamento de autolimpeza, o *self-grooming*, evidenciando efeito do isolamento neonatal e do sexo nessas alterações (FIGURA 11).

Sobre o efeito do isolamento, o grupo isolamento neonatal apresentou maior frequência de *self-grooming* quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 22 [20,75 – 24,75]; fêmeas isolamento neonatal: 15 [10,5 – 18,5]; machos controle: 6 [6 – 7]; fêmeas controle: 5 [4 – 6]; $P < 0,001$), evidenciando o efeito do isolamento neonatal no aumento do *self-grooming*.

O grupo isolamento neonatal salina também apresentou maior frequência de *self-grooming* quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 22,5 [20,25 – 23,5]; fêmeas isolamento neonatal salina: 16 [8,5 – 18,75]; machos isolamento neonatal Risperidona: 6,5 [6 – 10,75]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 4 [3 – 4,75]; $P < 0,001$), evidenciando o efeito da Risperidona na redução da frequência de *self-grooming*.

A variável sexo demonstrou efeito significativo nos grupos isolamento neonatal e isolamento neonatal salina, dado que os machos apresentaram maior frequência de *self-grooming* quando comparados às fêmeas dentro dos referidos grupos ($P < 0,01$).

Figura 11. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de *self-grooming* no teste do Campo Aberto.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona; $P < 0,001$; * vs fêmeas isolamento neonatal; # vs fêmeas isolamento neonatal salina, $P < 0,01$.

5.5 Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre o *rearing* no teste do Campo Aberto

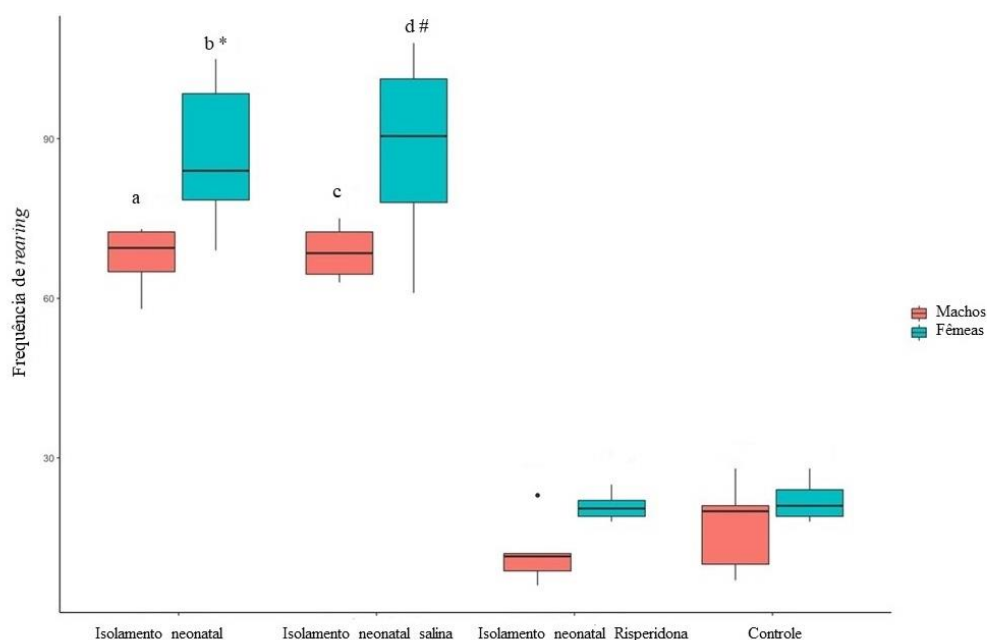
Os resultados obtidos no teste de campo aberto mostram que houve alterações significativas no comportamento de levantar-se sobre as patas posteriores sem qualquer apoio nas patas dianteiras como resposta de ansiedade, o *rearing*, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e da variável sexo nessas alterações (FIGURA 12).

Sobre o efeito do isolamento, o grupo isolamento neonatal apresentou maior frequência de *rearing* quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 69,5 [62,5 – 73]; fêmeas isolamento neonatal: 84 [77,5 – 99,5]; machos controle: 20 [9 – 22]; fêmeas controle: 21 [18 – 26]; $P < 0,001$), evidenciando o efeito do isolamento neonatal no aumento do *rearing* e, conseqüente, de respostas ansiosas.

O grupo isolamento neonatal salina também demonstrou aumento significativo da frequência de *rearing* quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 68,5 [63,75 – 73,5]; fêmeas isolamento neonatal salina: 90,5 [76 – 103,75]; machos isolamento neonatal Risperidona: 11,5 [7,5 – 14,75]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 20,5 [19 – 22], evidenciando o efeito da Risperidona na redução da frequência de *rearing*.

A variável sexo demonstrou efeito nos grupos isolamento neonatal e isolamento neonatal salina, dado que as fêmeas apresentaram maior frequência de *rearing* quando comparadas aos machos dentro dos referidos grupos ($P < 0,01$).

Figura 12. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de *rearing* no teste do Campo Aberto.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona, $P<0,001$; * vs machos isolamento neonatal; # vs machos isolamento neonatal salina, $P<0,01$.

5.6 Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de entradas na periferia no teste do Campo Aberto

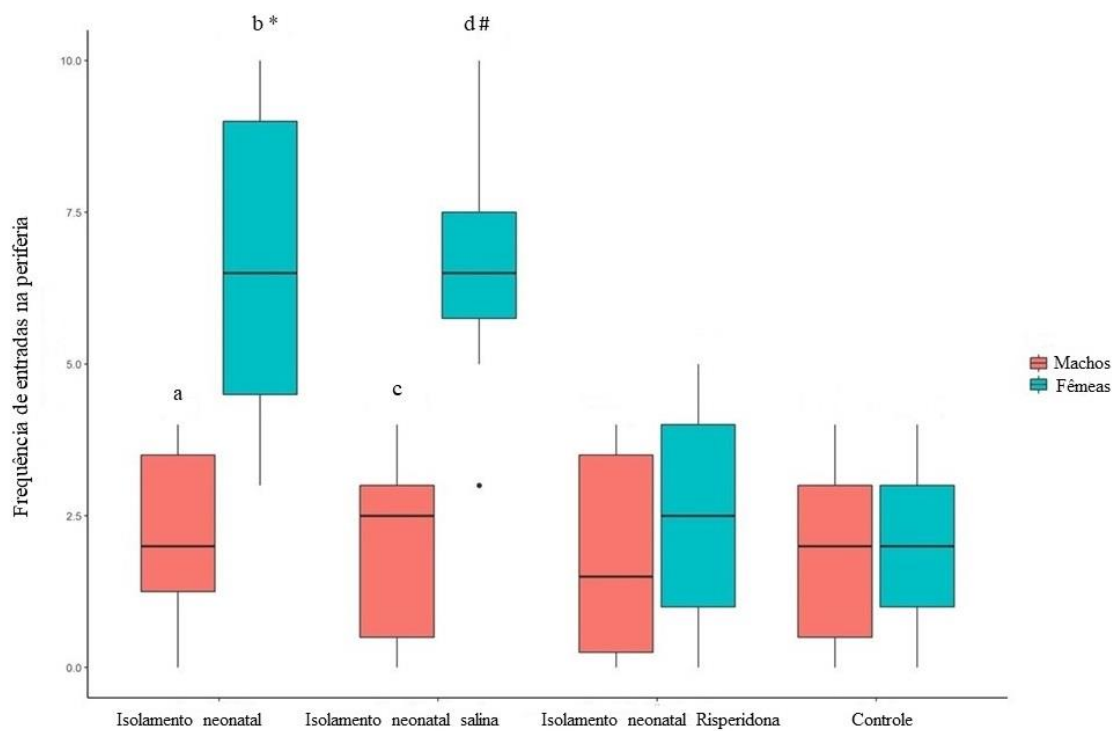
Os resultados obtidos no teste de campo aberto mostram que houve alterações significativas na frequência de entradas na periferia, evidenciando efeito do isolamento neonatal e da variável sexo nessas alterações (FIGURA 13).

Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou maior frequência de entradas na periferia quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 2 [0,75 – 4]; fêmeas isolamento neonatal: 6,5 [3,5 – 9]; machos controle: 2 [0 – 3]; fêmeas controle: 2 [1 – 3]; $P<0,001$), mostrando o efeito do isolamento neonatal no aumento de entradas na zona periférica e, conseqüentemente, de maior frequência de comportamentos ansiosos.

O grupo isolamento neonatal salina também mostrou aumento significativo da frequência de entradas na periferia quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 2,5 [0 – 3,25]; fêmeas isolamento neonatal salina: 6,5 [5,25 – 8,5]; machos isolamento neonatal Risperidona: 1,5 [0 – 4]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 2,5 [1 – 4]; $P<0,001$), evidenciando o efeito da Risperidona na redução da frequência de entradas na periferia.

A variável sexo demonstrou efeito nos grupos isolamento neonatal e isolamento neonatal salina, visto que as fêmeas apresentaram maior frequência de entradas na zona periférica quando comparadas aos machos dos referidos grupos ($P<0,001$), mostrando que as fêmeas apresentaram mais respostas relacionadas à ansiedade.

Figura 13. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de entradas na periferia no teste do Campo Aberto.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona; * vs machos isolamento neonatal; # vs machos isolamento neonatal salina, $P < 0,001$.

5.7 Efeito do isolamento neonatal e do sexo frequência de *freezing* no teste de Empatia/Contágio Emocional

Os resultados obtidos no teste de empatia/contágio emocional mostram que houve alterações significativas na frequência de comportamentos de congelamento ao ver outro animal em situação aversiva, o *freezing*, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e do sexo nessas alterações (FIGURA 14).

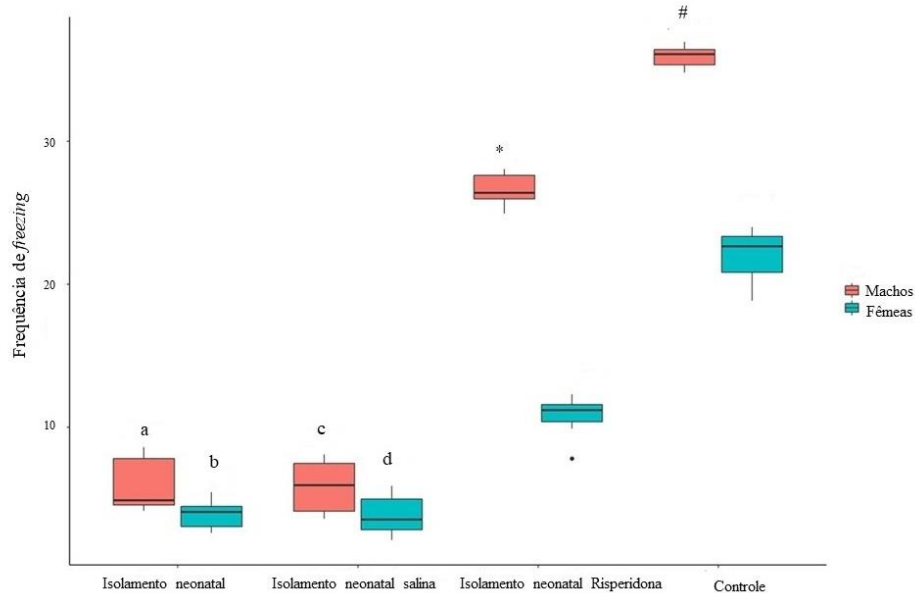
Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência de *freezing* quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 4,75 [4 – 7]; fêmeas isolamento neonatal: 3,25 [2,75 – 4]; machos controle: 35 [33 – 35]; fêmeas controle: 23 [20 – 25,75]; $P < 0,001$), evidenciando o efeito do isolamento na diminuição de *freezing* e, conseqüentemente, de comportamento que demonstra empatia.

O grupo isolamento neonatal salina também apresentou menor frequência de *freezing* quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 5,5 [3,25 – 6,75]; fêmeas isolamento neonatal salina: 3 [2,75 – 4,25]; machos

isolamento neonatal Risperidona: 26 [25,75 – 28]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 11 [9,75 – 11,75]; $P < 0,001$), evidenciando o efeito da Risperidona no aumento da frequência de *freezing* e, conseqüentemente, aumento de respostas de empatia/contágio emocional.

A variável demonstrou efeito significativo nos grupos isolamento neonatal Risperidona e controle, visto que os machos apresentaram maior frequência de *freezing* quando comparados às fêmeas dos referidos grupos ($P < 0,001$).

Figura 14. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de *freezing* no teste de Empatia/Contágio Emocional.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona; * vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona; # vs fêmeas controle, $P < 0,001$.

5.8 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de atacar do comportamento de brincadeira

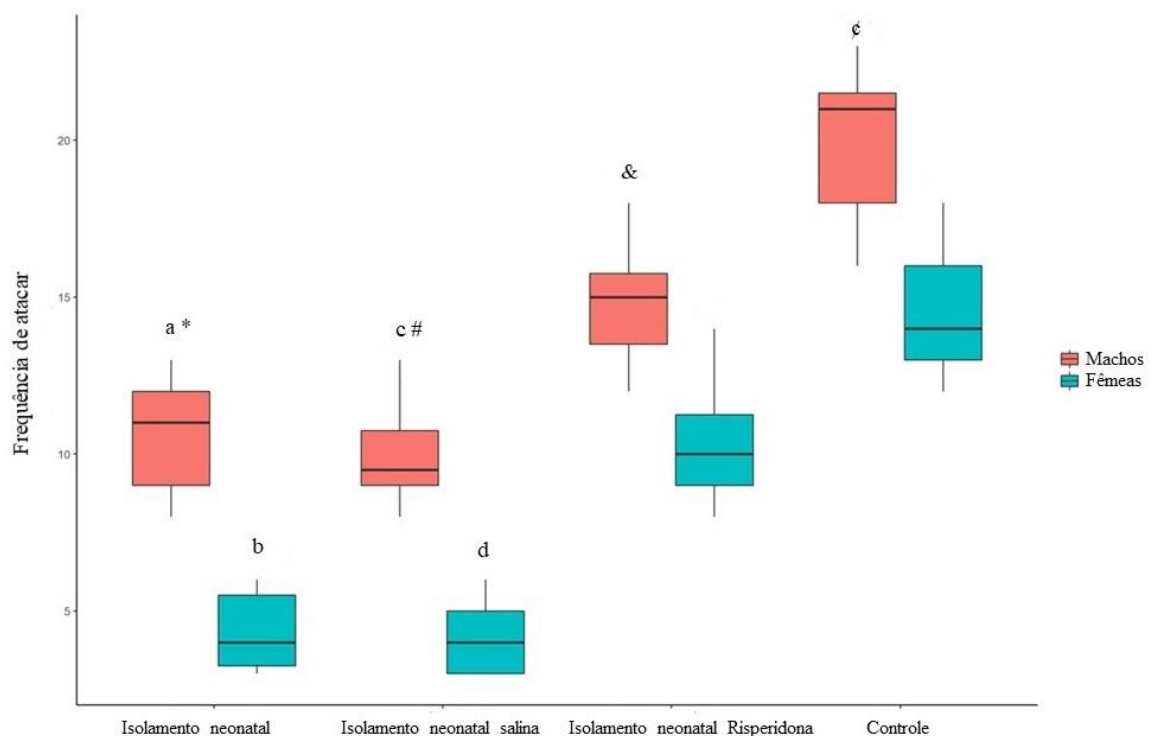
Os resultados obtidos na avaliação do comportamento de brincadeira mostram que houve alterações significativas na frequência de atacar, que consiste na ação em que um animal empurra o outro esfregando o focinho no dorso, evidenciando efeito do isolamento neonatal e da variável sexo nessas alterações (FIGURA 15).

Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência de atacar quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 11 [8,5 – 12,5]; fêmeas isolamento neonatal: 4 [3 – 6]; machos controle: 21 [18 – 22]; fêmeas controle: 14 [13 – 17]; $P < 0,001$). O grupo controle apresentou a maior frequência de atacar quando comparado aos outros grupos.

O grupo isolamento neonatal salina também apresentou menor frequência de atacar quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 9,5 [8,75 – 11,5]; fêmeas isolamento neonatal salina: 4 [3 – 5]; machos isolamento neonatal Risperidona: 15 [12,75 – 16,5]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 10 [9 – 11,75]), evidenciando o efeito da Risperidona no aumento desse comportamento de brincar.

A variável sexo demonstrou efeito significativo em todos os grupos, dado que os machos apresentaram maior frequência de atacar quando comparados às fêmeas dentro de todos os grupos ($P < 0,001$).

Figura 15. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de atacar no comportamento de brincadeira.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona; * vs fêmeas isolamento neonatal; # vs fêmeas isolamento neonatal salina; & vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona; ç vs fêmeas controle, $P < 0,001$.

5.9 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de rolar do comportamento de brincadeira

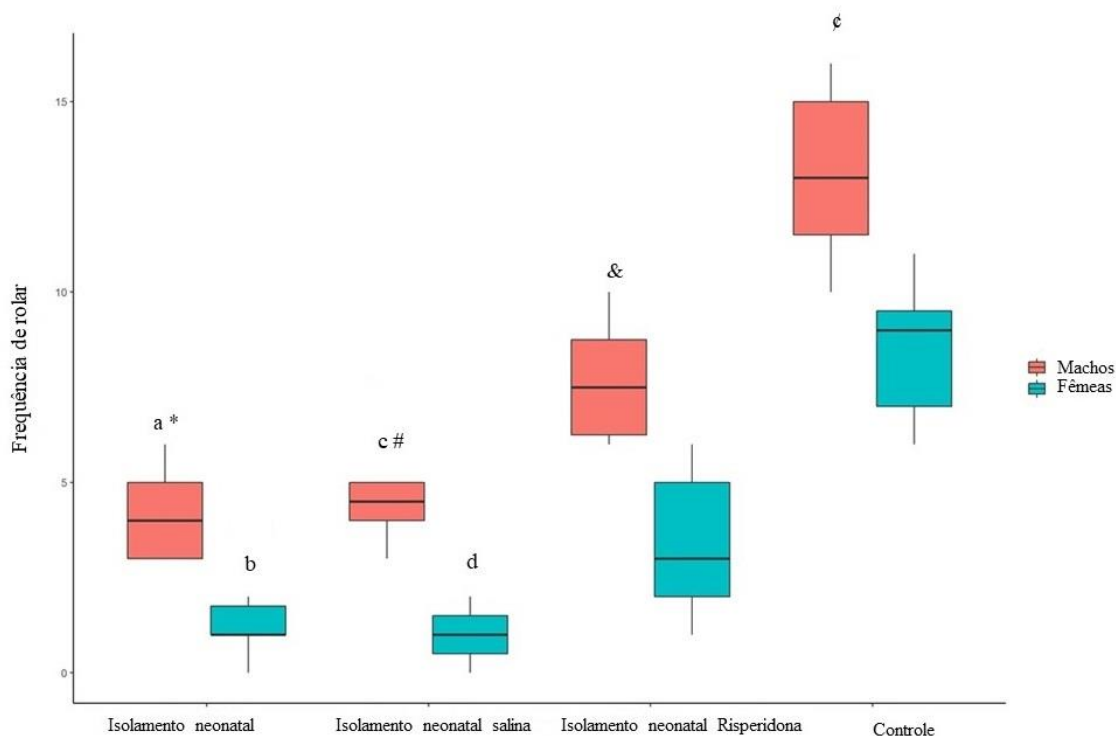
Os resultados obtidos na avaliação do comportamento de brincadeira mostram que houve alterações significativas na frequência de rolar, que consiste na ação em que dois animais rolam e tocam um com o outro, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e da variável sexo nessas alterações (FIGURA 16).

Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência de rolar quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 4 [3 – 5,5]; fêmeas isolamento neonatal: 1 [0,75 – 2,25]; machos controle: 13 [11 – 16]; fêmeas controle: 9 [7 – 10]; $P < 0,001$). O grupo controle apresentou a maior frequência de rolar quando comparado aos outros grupos.

O grupo isolamento neonatal salina também mostrou diminuição significativa na frequência de rolar quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 4,5 [3,75 – 5,5]; fêmeas isolamento neonatal salina: 1 [0 – 2]; machos isolamento neonatal Risperidona: 7,5 [6 – 9,25]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 3 [2 – 5], evidenciando o efeito da Risperidona no aumento da frequência desse comportamento de brincadeira.

A variável sexo demonstrou efeito em todos os grupos, dado que os machos apresentaram maior frequência de rolar quando comparados às fêmeas dentro de todos os grupos ($P < 0,001$).

Figura 16. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de rolar no comportamento de brincadeira.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona; * vs fêmeas isolamento neonatal; # vs fêmeas isolamento neonatal salina; & vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona; ç vs fêmeas controle, $P < 0,001$.

5.10 Efeito do isolamento neonatal na frequência de boxear do comportamento de brincadeira

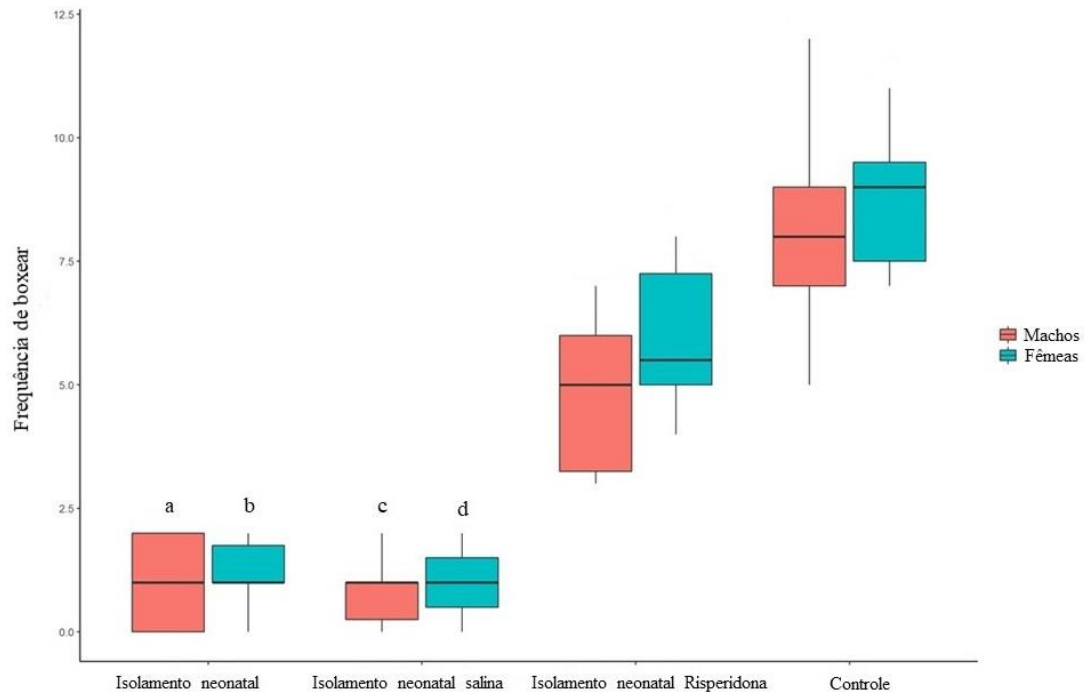
Os resultados obtidos na avaliação do comportamento de brincadeira mostram que houve alterações significativas na frequência de boxear, que ocorre quando dois animais ficam de pé um em frente ao outro realizando movimentos de boxear, evidenciando efeitos do isolamento neonatal nessas alterações (FIGURA 17).

Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência de boxear quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 1 [0 – 2]; fêmeas isolamento neonatal: 1 [0,75 – 2]; machos controle: 8 [6 – 9]; fêmeas controle: 9 [7 – 10]; $P < 0,001$). O grupo controle apresentou a maior frequência de boxear quando comparado aos outros grupos.

O grupo isolamento neonatal salina apresentou menor frequência de boxear quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona, demonstrando o efeito significativo da Risperidona no aumento da frequência do comportamento de boxear dos animais (machos isolamento neonatal salina: 1 [0-1,25]; fêmeas isolamento neonatal salina

1[0-2]; machos isolamento neonatal Risperidona: 5 [3 – 6,25]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 5,5 [5 – 7,75]; P<0,05). Não houve diferenças entre os sexos dentro dos grupos.

Figura 17. Efeito do isolamento neonatal sobre a frequência de boxear do comportamento de brincadeira.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle, P<0,001; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona, P<0,05.

5.11 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de *rearing* social do comportamento de brincadeira

Os resultados obtidos na avaliação do comportamento de brincadeira mostram que houve alterações na frequência de *rearing* social, que consiste em uma postura de exposição ventral frente a outro animal, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e do sexo nessas alterações, embora o isolamento não tenha exercido efeito significativo no *rearing* social (FIGURA 18).

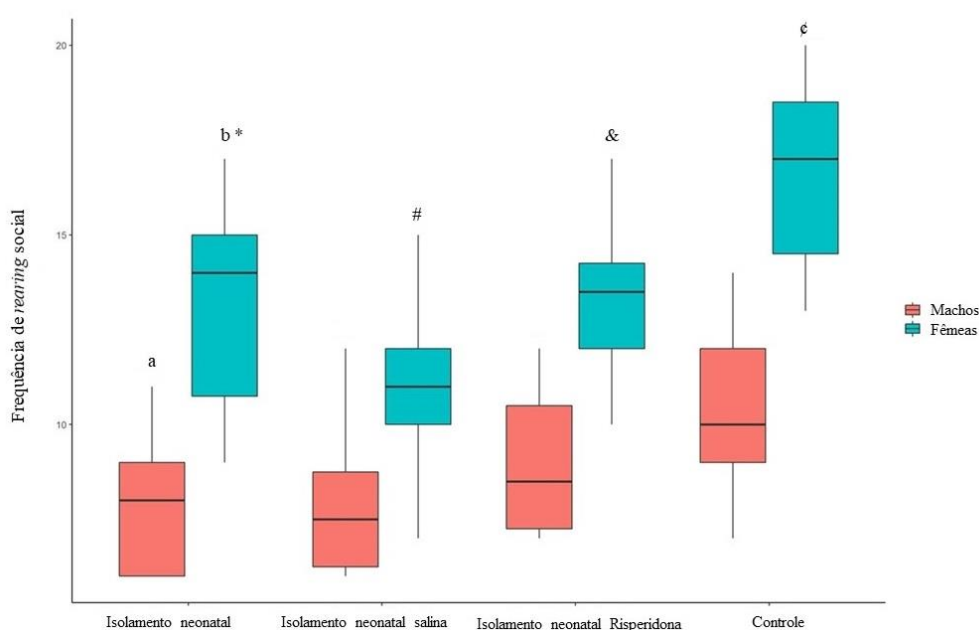
O grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência de *rearing* social quando comparado ao grupo controle, mas essa diferença não foi significativa (machos isolamento neonatal: 8 [6 – 10]; fêmeas isolamento neonatal: 14 [9,75 – 15,5]; machos

controle: 10 [9 – 13]; fêmeas controle: 17 [13 – 19]; $P < 0,21$). O grupo controle apresentou a maior frequência de *rearing* social quando comparado aos outros grupos.

O grupo isolamento neonatal salina também não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 7,5 [6 – 9,75]; fêmeas isolamento neonatal salina: 11 [9 – 13]; machos isolamento neonatal Risperidona: 8,5 [7 – 11,25]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 13,5 [12 – 14,75]; $P < 0,21$), evidenciando que a Risperidona não exerceu efeito significativo no *rearing* social.

A variável sexo demonstrou efeito em todos os grupos, dado que as fêmeas apresentaram maior frequência de *rearing* social quando comparadas aos machos em todos os grupos ($P < 0,001$).

Figura 18. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de *rearing* social do comportamento de brincadeira.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos ($n = 11$ a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: * vs machos isolamento neonatal; # vs machos isolamento neonatal salina; & vs machos isolamento neonatal Risperidona; ϵ vs machos controle, $P < 0,001$.

5.12 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de pular do comportamento de brincadeira

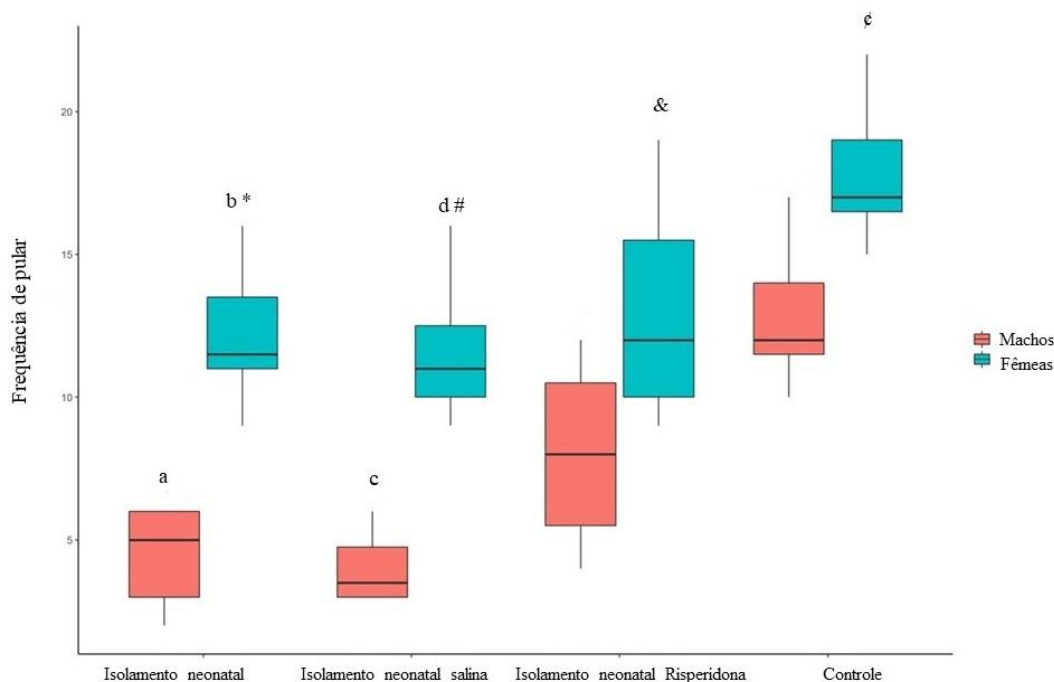
Os resultados obtidos na avaliação do comportamento de brincadeira mostram que houve alterações significativas na frequência de pular, que ocorre quando um animal executa uma sequência de saltos curtos junto com outro, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e do sexo nessas alterações (FIGURA 19).

Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência de pular quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 5 [2,5 – 6]; fêmeas isolamento neonatal: 11,5 [10,5 – 14,5]; machos controle: 12 [11 – 14]; fêmeas controle: 17 [16 – 19]; $P < 0,05$).

O grupo isolamento neonatal salina também apresentou menor frequência de pular quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 3,5 [3 – 5,25]; fêmeas isolamento neonatal salina: 11 [10 – 13]; machos isolamento neonatal Risperidona: 8 [4,75 – 11,25]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 12 [10 – 16,5]; $P < 0,05$), evidenciando o efeito da Risperidona no aumento desse comportamento de brincar.

A variável sexo demonstrou efeito em todos os grupos, dado que as fêmeas apresentaram maior frequência de pular quando comparadas aos machos em todos os grupos (fêmeas isolamento neonatal vs machos isolamento neonatal; fêmeas isolamento neonatal salina vs machos isolamento neonatal salina, $P < 0,01$; fêmeas isolamento neonatal Risperidona vs machos isolamento neonatal Risperidona; fêmeas controle vs machos controle, $P < 0,05$).

Figura 19. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de pular do comportamento de brincadeira.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle, $P < 0,05$; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona, $P < 0,05$; * vs machos isolamento neonatal; # vs machos isolamento neonatal salina, $P < 0,01$; & vs machos isolamento neonatal Risperidona; ç vs machos controle, $P < 0,05$.

5.13 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de perseguir do comportamento de brincadeira

Os resultados obtidos na avaliação do comportamento de brincadeira mostram que houve alterações significativas na frequência de perseguir, que ocorre quando um animal corre em direção a outro animal que se move no sentido oposto, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e do sexo nessas alterações (FIGURA 20).

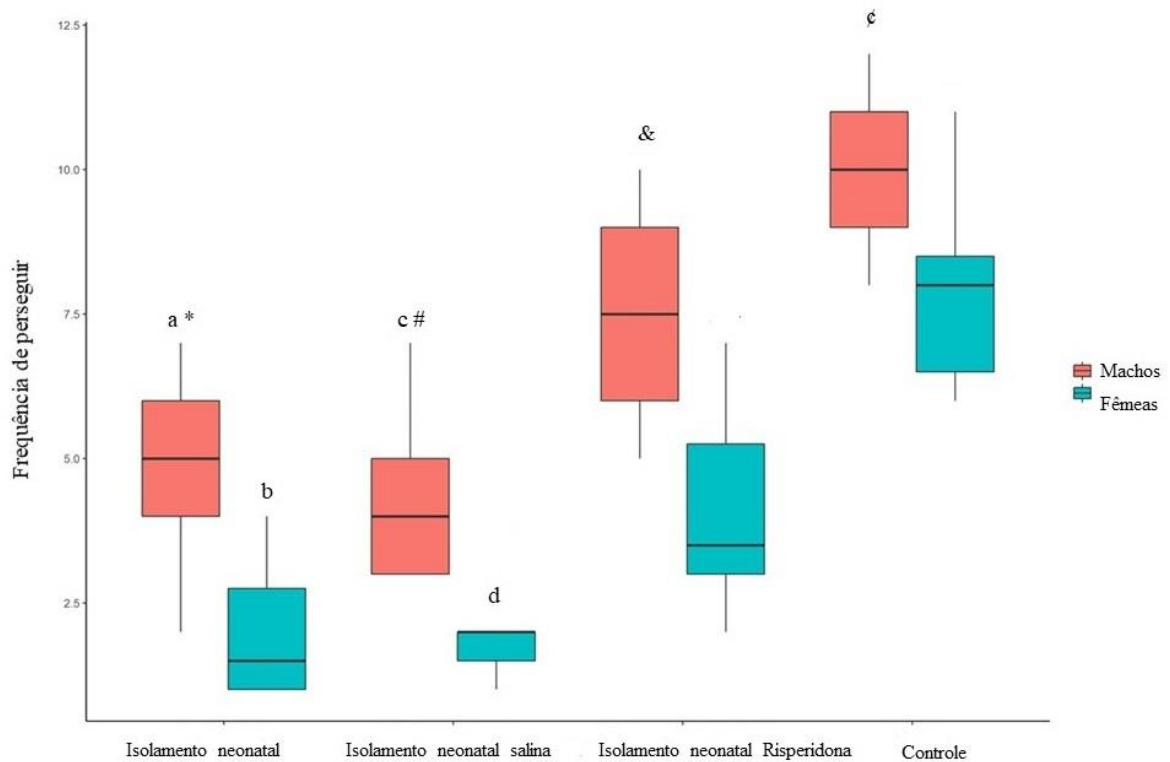
Sobre os efeitos do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência de perseguir quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 5 [3 – 6,5]; fêmeas isolamento neonatal: 1,5 [1 – 3,25]; machos controle: 10 [9 – 11]; fêmeas controle: 8 [6 – 9]; $P < 0,001$). O grupo controle apresentou a maior frequência de perseguir.

O grupo isolamento neonatal salina também mostrou menor frequência de perseguir quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento

neonatal salina: 4 [3 – 5,5]; fêmeas isolamento neonatal salina: 2 [1 – 2]; machos isolamento neonatal Risperidona: 7,5 [5,75 – 9,25]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 3,5 [3 – 5,75], $P < 0,05$), evidenciando o efeito da Risperidona no aumento desse comportamento de brincar.

A variável sexo demonstrou efeito dentro de todos os grupos, uma vez que os machos apresentaram maior frequência de perseguir quando comparados às fêmeas em todos os grupos ($P < 0,05$).

Figura 20. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de perseguir do comportamento de brincadeira.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle, $P < 0,001$; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona, $P < 0,05$; * vs fêmeas isolamento neonatal; # vs fêmeas isolamento salina; & vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona; ç vs fêmeas controle, $P < 0,05$.

5.14 Efeito do isolamento neonatal e do sexo na frequência de cheirar do comportamento de brincadeira

Os resultados obtidos na avaliação do comportamento de brincadeira mostram que houve alterações significativas na frequência de cheirar, que ocorre quando um animal

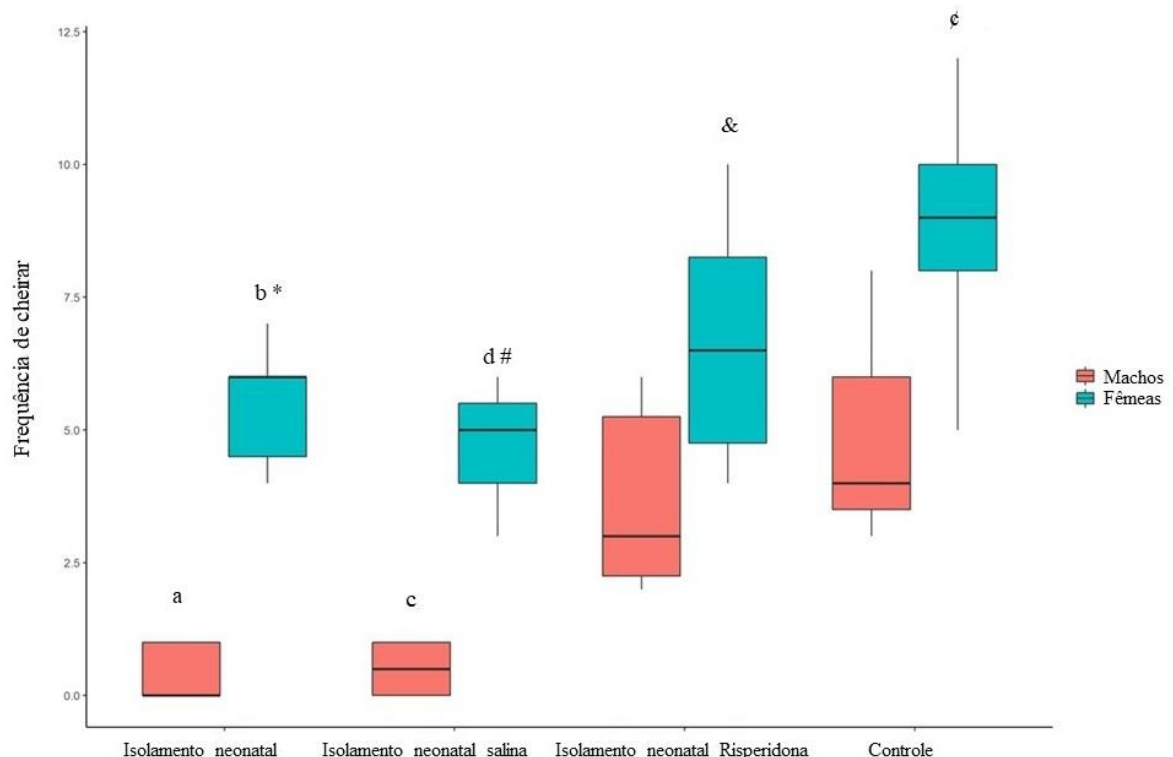
cheira a região anogenital de outro, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e do sexo nessas alterações (FIGURA 21).

Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência de cheirar quando comparado ao grupo controle (machos isolamento neonatal: 0 [0 – 1]; fêmeas isolamento neonatal: 6 [4 – 6,25]; machos controle: 4 [3 – 6]; fêmeas controle: 9 [7 – 10]; $P < 0,001$). O grupo controle apresentou a maior frequência de cheirar quando comparado aos outros grupos.

O grupo isolamento neonatal salina também apresentou menor frequência de cheirar quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (machos isolamento neonatal salina: 0,5 [0 – 1]; fêmeas isolamento neonatal salina: 5 [4 – 6]; machos isolamento neonatal Risperidona: 3 [2 – 6]; fêmeas isolamento neonatal Risperidona: 6,5 [4,25 – 8,75]; $P < 0,05$), evidenciando o efeito significativo da Risperidona no aumento da frequência deste comportamento de brincar.

A variável sexo demonstrou efeito significativo em todos os grupos, dado que as fêmeas apresentaram maior frequência de cheirar quando comparadas aos machos dentro de todos os grupos ($P < 0,05$).

Figura 21. Efeito do isolamento neonatal e do sexo sobre a frequência de cheirar do comportamento de brincadeira.



Os resultados estão representados como mediana e intervalos interquartílicos (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs machos controle; b vs fêmeas controle, $P<0,001$; c vs machos isolamento neonatal Risperidona; d vs fêmeas isolamento neonatal Risperidona, * vs machos isolamento neonatal; # vs machos isolamento salina; & vs machos isolamento neonatal Risperidona; ç vs machos controle, $P<0,05$.

5.15 Efeito do isolamento neonatal e da sessão na interação com a caixa restritora no teste de Ajuda Pró-social

Os resultados obtidos no teste de ajuda pró-social mostram que houve alterações significativas na frequência de interação com a caixa restritora, evidenciando efeito do isolamento neonatal e da sessão nessas alterações (FIGURA 22).

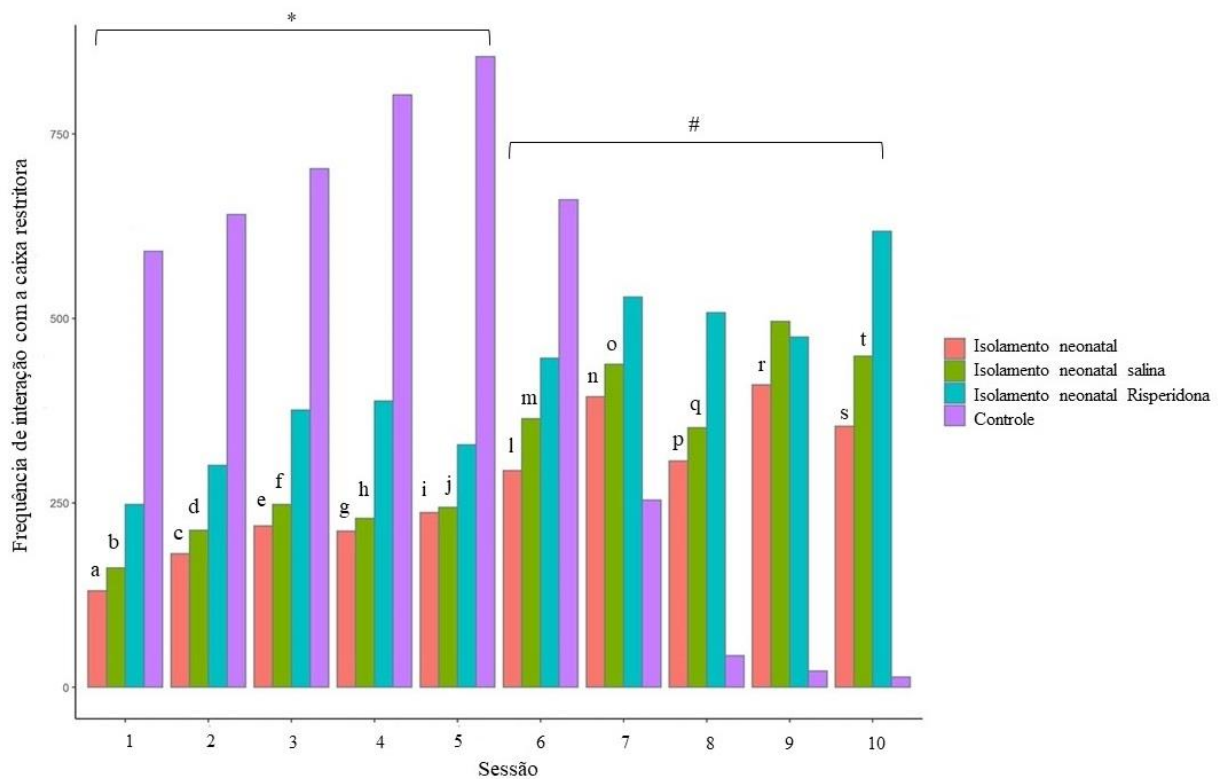
Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência significativa de interação com a caixa restritora quando comparado ao grupo controle (isolamento neonatal: $24,9 \pm 16,9$, controle: $32,8 \pm 29,4$; $P<0,001$).

O grupo isolamento neonatal salina também demonstrou menor frequência significativa de interação com a caixa quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (isolamento neonatal salina: $24,6 \pm 15,4$; isolamento neonatal Risperidona: $30,1 \pm 16,2$; $P<0,05$), evidenciando o efeito da Risperidona no aumento da interação com a caixa restritora.

A variável sessão demonstrou efeito na interação com a caixa. Nas sessões 1 a 5, houve maior interação com a caixa restritora quando comparadas com as sessões 6 a 10 ($P<0,001$). A partir da sessão 6, houve redução significativa da interação com a caixa restritora quando comparadas com as sessões de 1 a 5 ($P<0,001$). Assim, até a primeira abertura, a interação com a caixa é maior, demonstrando o interesse pela abertura e maior quantidade de tentativas para abrir. Após a primeira abertura, a interação com a caixa diminui, demonstrando o aprendizado do mecanismo de abertura da caixa.

No grupo controle, a frequência de interação com a caixa é significativamente maior quando comparado ao grupo isolamento neonatal da sessão 1 a sessão 6 ($P<0,001$). Em seguida, o grupo controle apresenta queda significativa na interação com a caixa (sessão 7 a sessão 10, $P<0,001$). Nos grupos isolamento, não foi observado padrão significativo de interação com a caixa restritora ao longo das sessões.

Figura 22. Efeito do isolamento neonatal e da sessão sobre a frequência de interação com a caixa restritora no teste de Ajuda Pró-social.



Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (n=11 a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs controle, c vs controle, e vs controle, g vs controle, i vs controle, l vs controle, n vs controle, p vs controle, r vs controle, s vs controle, $P < 0,001$; b vs isolamento neonatal Risperidona, d vs isolamento neonatal Risperidona, f vs isolamento neonatal Risperidona, h vs isolamento neonatal Risperidona, j vs isolamento neonatal Risperidona, m vs isolamento neonatal Risperidona, o vs isolamento neonatal Risperidona, q vs isolamento neonatal Risperidona, t vs isolamento neonatal Risperidona, $P < 0,05$; * vs #, $P < 0,001$.

5.16 Efeito do isolamento neonatal e da sessão na frequência de abertura da caixa restritora no teste de Ajuda Pró-social

Os resultados obtidos no teste de ajuda pró-social mostram que houve alterações significativas na frequência de abertura da caixa restritora, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e da sessão nessas alterações (FIGURA 23).

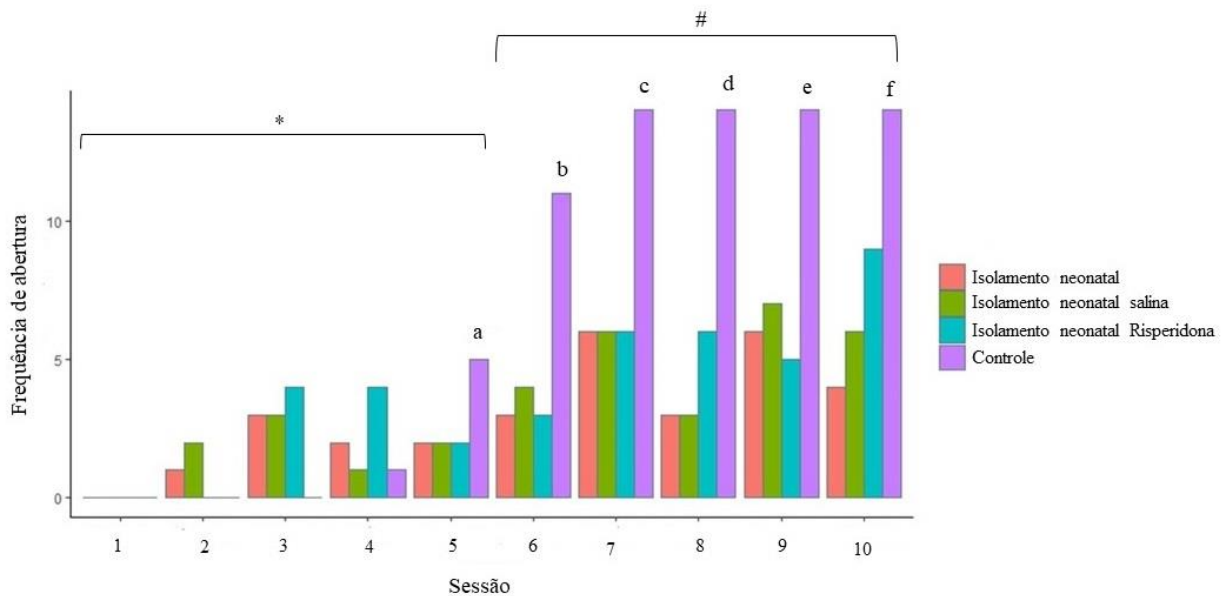
Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento apresentou menor frequência de abertura da caixa restritora quando comparado ao grupo controle (isolamento neonatal: $0,273 \pm 0,447$; controle: $0,521 \pm 0,501$; $P < 0,001$).

O grupo isolamento neonatal salina não apresentou diferença significativa na frequência de abertura quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (isolamento neonatal salina: $0,262 \pm 0,441$; isolamento neonatal Risperidona: $0,279 \pm 0,450$;

$P < 0,09$), evidenciando que a Risperidona não exerceu efeito sobre a frequência de abertura da caixa restritora.

No grupo controle, a frequência de abertura da caixa é significativamente maior quando comparado ao grupo isolamento neonatal da sessão 5 a sessão 10 ($P < 0,001$), demonstrando abertura sistemática ao longo das sessões. Nas sessões 1 a 3, não houve abertura. A partir da sessão 7 em diante, a frequência de abertura se mantém. Nos grupos isolamento, não foi observado padrão significativo de abertura ao longo das sessões. ($P < 0,001$).

Figura 23. Efeito do isolamento neonatal e da sessão sobre a frequência de abertura da caixa restritora no teste de Ajuda Pró-social.



Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=11$ a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey. Valores significativos: a vs isolamento neonatal; b vs isolamento neonatal, c vs isolamento neonatal, d vs isolamento neonatal, e vs isolamento neonatal, f vs isolamento neonatal, $P < 0,001$; * vs #, $P < 0,001$.

5.17 Efeito do isolamento neonatal e da sessão na latência para abertura da caixa restritora no teste de Ajuda Pró-social

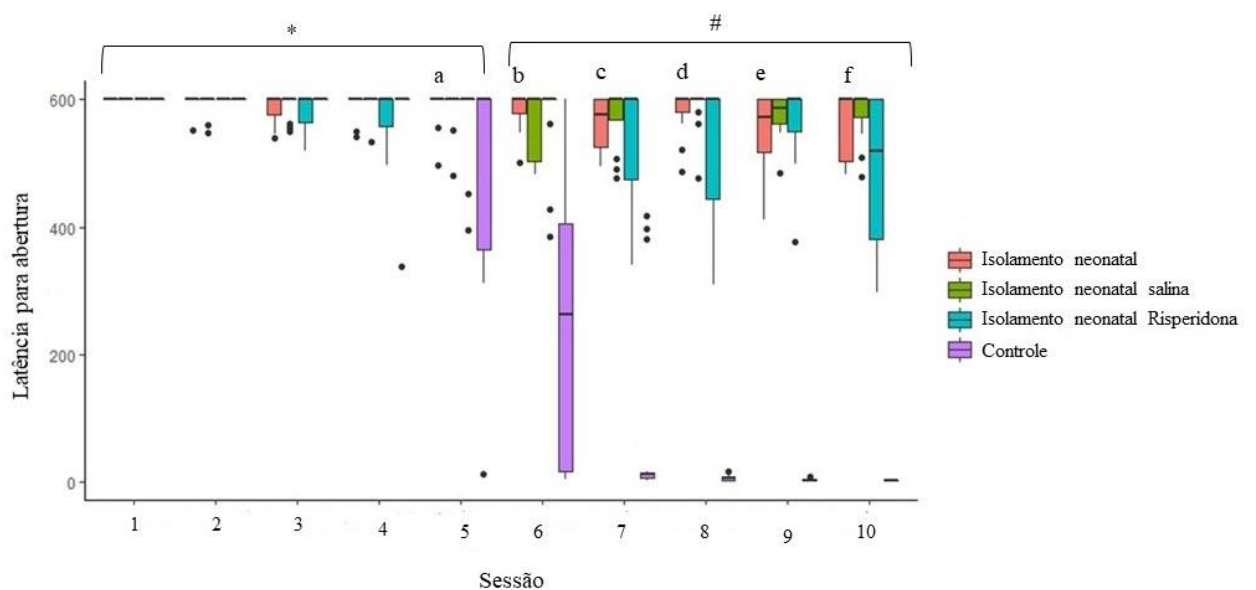
Os resultados obtidos no teste de ajuda pró-social mostram que houve alterações significativas na latência abertura da caixa restritora, evidenciando efeitos do isolamento neonatal e da sessão nessas alterações (FIGURA 24).

Sobre os efeitos do isolamento neonatal, o grupo isolamento apresentou maior latência para abertura da caixa restritora quando comparado ao grupo controle (isolamento neonatal: $579 \pm 39,1$; controle: 324 ± 83 ; $P < 0,001$), quando ocorreu abertura.

O grupo isolamento neonatal salina não apresentou diferença significativa na frequência de abertura quando comparado ao grupo isolamento neonatal Risperidona (isolamento neonatal salina: $584 \pm 33,3$; isolamento neonatal Risperidona: $562 \pm 77,1$; $P < 0,4$), evidenciando que a Risperidona não exerceu efeito sobre a frequência de abertura da caixa restritora.

A variável sessão demonstrou efeito na latência para abertura da caixa restritora. Nas sessões 1 e 2, não houve abertura significativa, portanto, não houve latência para abertura significativa. As sessões 5 e 6 mostram a latência para abertura diminuindo quando comparada as sessões anteriores. No grupo controle, a latência para abertura da caixa é significativamente menor quando comparado aos demais grupos a partir da sessão 7 ($P < 0,001$), demonstrando a abertura sistemática da caixa, bem como a queda significativa da latência ao longo das sessões. Nos grupos isolamento, não foi observado padrão significativo de latência para abertura ao longo das sessões.

Figura 24. Efeito do isolamento neonatal e da sessão sobre a latência para a abertura da caixa restritora no teste de Ajuda Pró-social.



Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=11$ a 14 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela Two Way ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Valores significativos: a vs, controle, b vs controle, c vs controle, d vs controle, e vs controle, f vs controle, * vs #, $P < 0,001$.

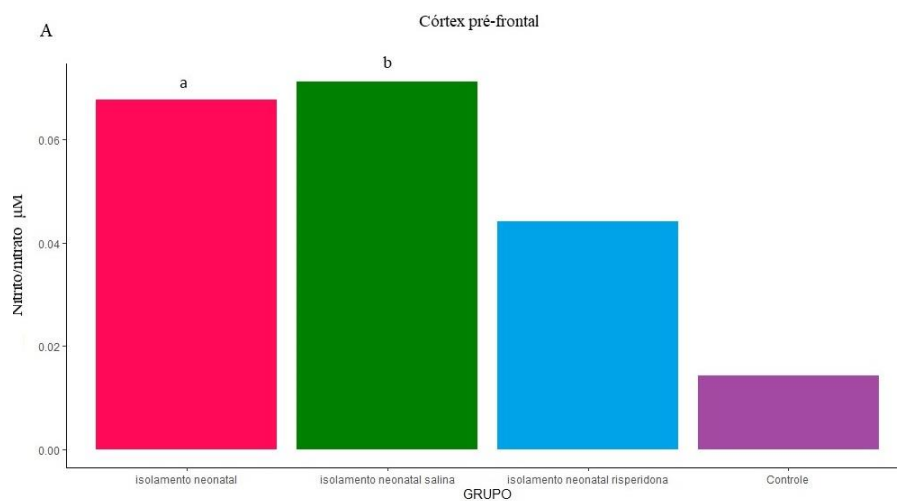
5.18 Efeito do isolamento neonatal sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal e do hipocampo

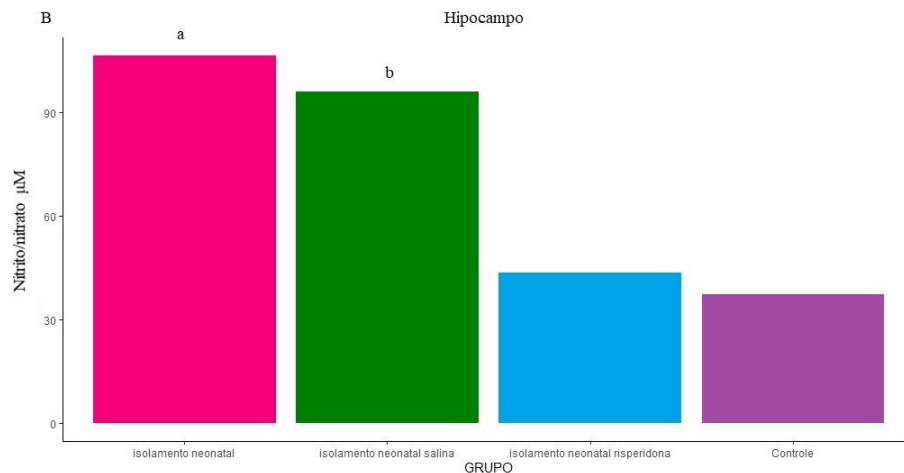
Os resultados obtidos através da dosagem de nitrito/nitrato nos tecidos do córtex pré-frontal e hipocampo mostram que houve alterações significativas nas concentrações de nitrito, evidenciando o efeito do isolamento neonatal e do tratamento com Risperidona (FIGURA 25 A e B).

Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento apresentou concentrações significativamente altas de nitrito quando comparado ao grupo controle no córtex pré-frontal (isolamento neonatal: $16,8 \pm 1,14$; controle: $5,16 \pm 1,22$, $P < 0,001$) e também no hipocampo (isolamento: $17,7 \pm 2,89$; controle: $6,20 \pm 0,694$, $P < 0,001$).

O grupo isolamento neonatal salina também apresentou concentrações significativamente altas quando comparado ao grupo tratado com Risperidona no córtex pré-frontal (isolamento neonatal salina: $17 \pm 1,65$; isolamento neonatal Risperidona: $7 \pm 1,16$, $P < 0,001$) e também no hipocampo (isolamento neonatal salina: $16 \pm 2,80$; isolamento neonatal Risperidona: $7,24 \pm 1,31$, $P < 0,001$), evidenciando o efeito da Risperidona na redução dos níveis de nitrito nas referidas áreas cerebrais.

Figura 25. Efeito do isolamento neonatal sobre a dosagem de nitrito/nitrato (NO_2/NO_3) em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal e do hipocampo.





Os resultados em A e B estão representados como média \pm desvio padrão (n=6 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela One Way ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Valores significativos: a vs controle, b vs isolamento neonatal Risperidona, $P < 0,001$.

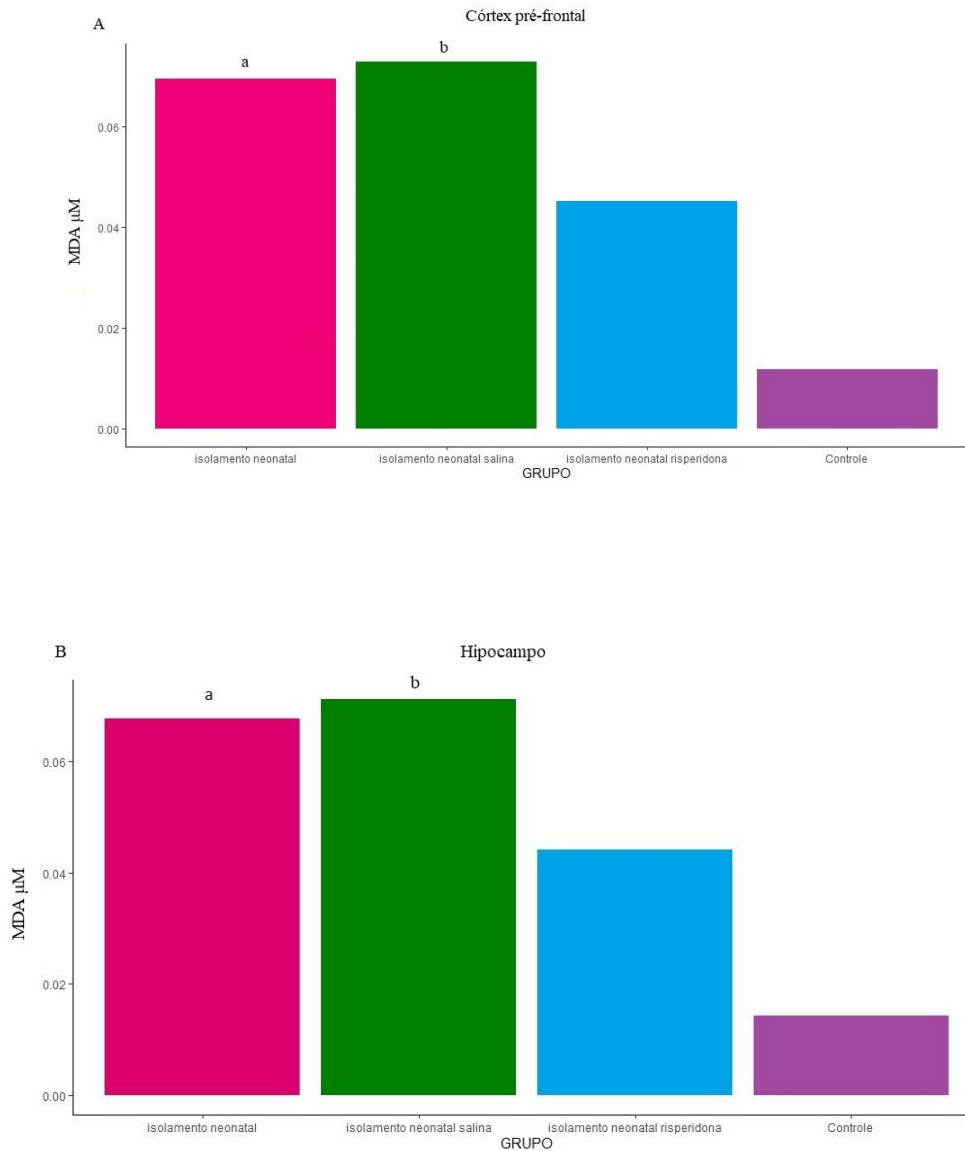
5.19 Efeito do isolamento neonatal sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal e do hipocampo

Os resultados obtidos através da dosagem de malondialdeído (MDA) nos tecidos do córtex pré-frontal e hipocampo mostram que houve alterações significativas nas concentrações de MDA, evidenciando o efeito do isolamento neonatal e do tratamento com Risperidona (FIGURA 26 A e B).

Sobre o efeito do isolamento neonatal, o grupo isolamento apresentou concentrações significativamente altas de MDA quando comparado ao grupo controle no córtex pré-frontal (isolamento neonatal: $0,0116 \pm 0,00117$; controle: $0,00195 \pm 0,000210$, $P < 0,001$) e no hipocampo (isolamento: $0,0113 \pm 0,000871$; controle: $0,00238 \pm 0,000770$, $P < 0,001$).

O grupo isolamento neonatal salina também apresentou concentrações significativamente altas de MDA quando comparado ao grupo tratado com Risperidona no córtex pré-frontal (isolamento neonatal salina: $0,0122 \pm 0,00301$; isolamento neonatal Risperidona: $0,00753 \pm 0,00127$, $P < 0,001$) e no hipocampo (isolamento neonatal salina: $0,0119 \pm 0,00238$; isolamento neonatal Risperidona: $0,00736 \pm 0,00129$, $P < 0,001$), evidenciando o efeito da Risperidona na redução da concentração de MDA nas referidas áreas cerebrais.

Figura 26. Efeito do isolamento neonatal sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal e do hipocampo.



Os resultados em A e B estão representados como média \pm desvio padrão (n=6 animais/grupo). A análise estatística foi realizada pela One Way ANOVA, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Valores significativos: a vs controle, b vs isolamento neonatal Risperidona, $P < 0,001$.

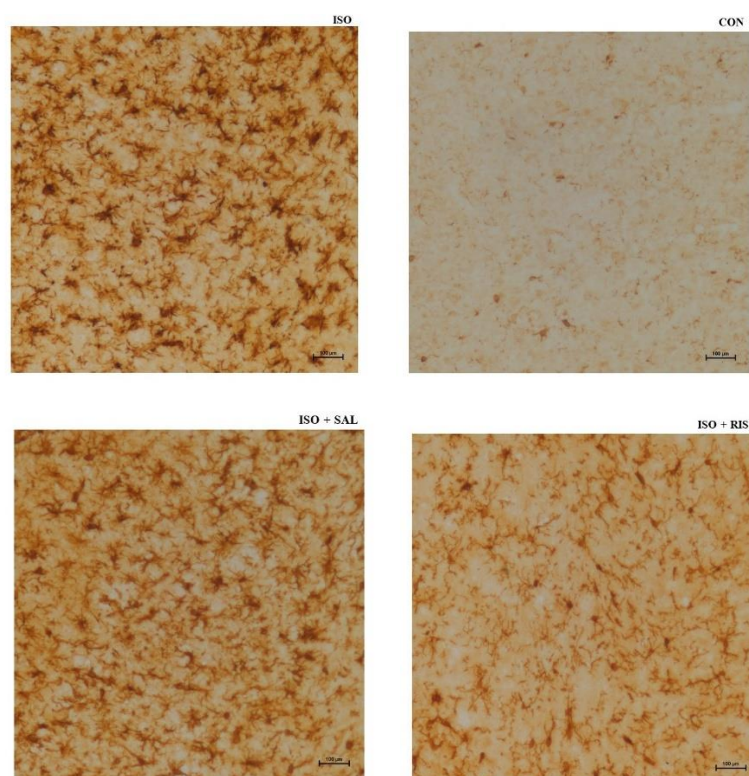
5.20 Efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de micróglia ativada em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal

Na avaliação da expressão de micróglia ativada através do marcador IBA 1, foi evidenciado o efeito do isolamento neonatal na quantidade de micróglia no córtex pré-frontal, bem como o efeito da Risperidona na expressão dessas células (FIGURAS 27 e 28).

O isolamento neonatal aumentou significativamente o número de micróglia ativas quando comparado aos animais do grupo controle (isolamento neonatal: $18,7 \pm 2,03$; controle: $1,40 \pm 0,0891$, $P < 0,001$), evidenciando o processo de neuroinflamação.

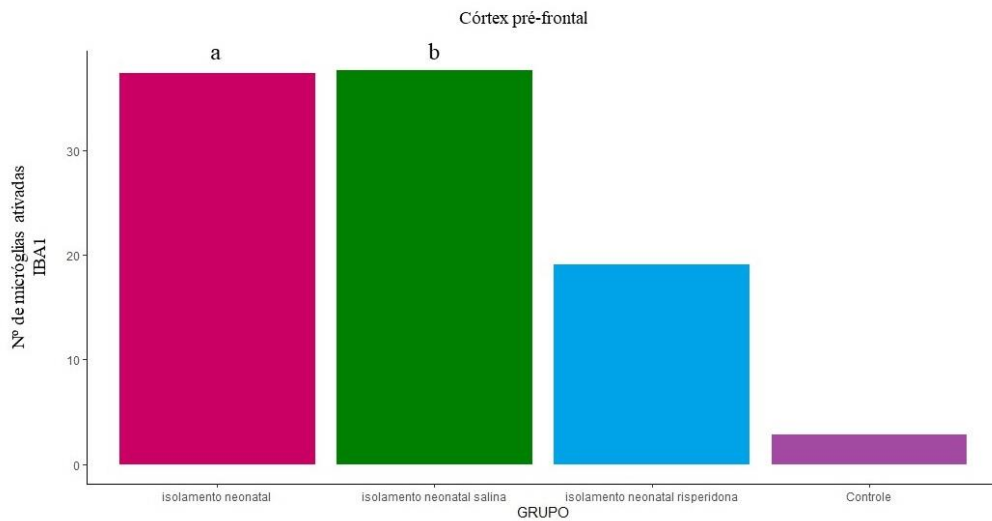
O grupo isolamento neonatal Risperidona demonstrou diminuição significativa do número de micróglia ativas quando comparado ao grupo isolamento neonatal salina (isolamento neonatal Risperidona: $9,52 \pm 0,989$; isolamento neonatal salina: $18,8 \pm 3,23$, $P < 0,001$), evidenciando o efeito da Risperidona na redução das micróglia.

Figura 27. Fotomicrografias, aumento de 100x, representativas do efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de micróglia ativas no córtex pré-frontal.



Os animais tiveram seus cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com imunomarcagem através do IBA 1 ($n=4$ animais/grupo, 4 fatias/animal). ISO (grupo isolamento neonatal), ISO + SAL (grupo isolamento neonatal salina), ISO + RIS (grupo isolamento neonatal Risperidona), CON (grupo controle). Visualização: microscópio Nikon Eclipse Ni, com aumento de 100x.

Figura 28. Efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de micróglia ativas no córtex pré-frontal.



Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=4$ animais/grupo, 4 fatias/animal). A análise estatística foi realizada pela One Way ANOVA, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey. Valores significativos: a vs controle, b vs isolamento neonatal Risperidona, $P<0,001$.

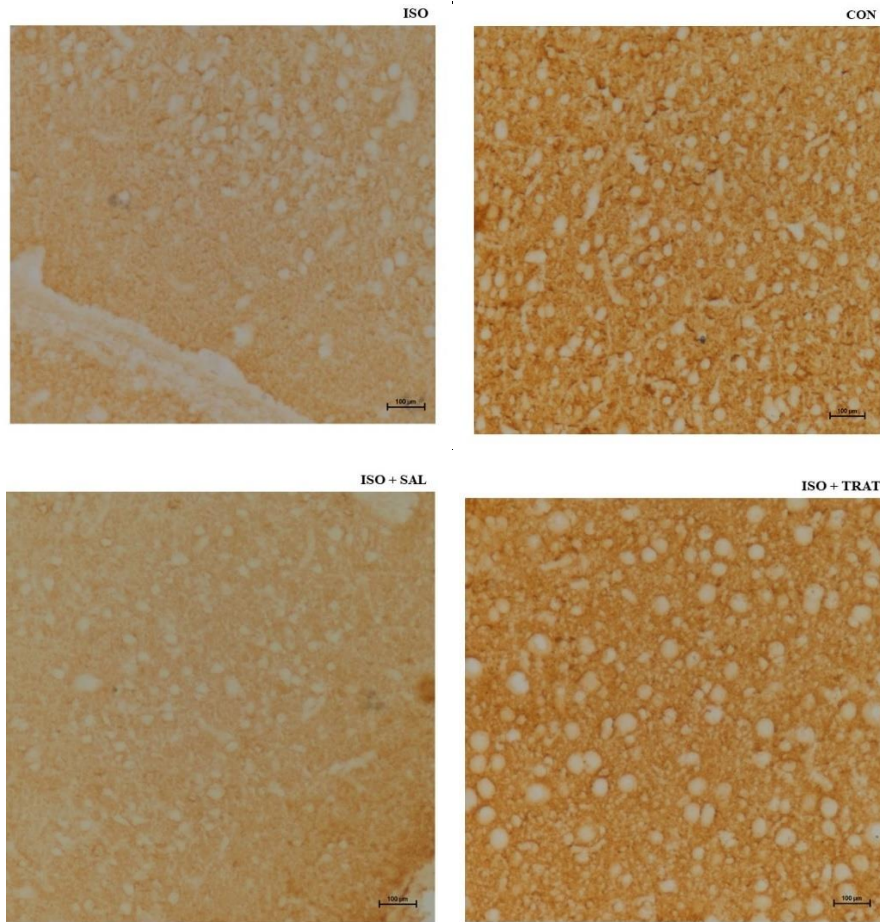
5.21 Efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de sinaptofisina em tecidos cerebrais do córtex pré-frontal

Na avaliação da expressão de sinaptofisina, foi evidenciado o efeito do isolamento neonatal na quantidade de sinaptofisina no córtex pré-frontal, bem como o efeito da Risperidona na expressão dessas células (FIGURAS 29 e 30).

O isolamento neonatal diminuiu significativamente a quantidade de sinaptofisina quando comparado ao animais do grupo controle (isolamento neonatal: $13,8 \pm 0,109$; controle: $46,2 \pm 0,581$, $P<0,001$), evidenciando alterações na transmissão sináptica.

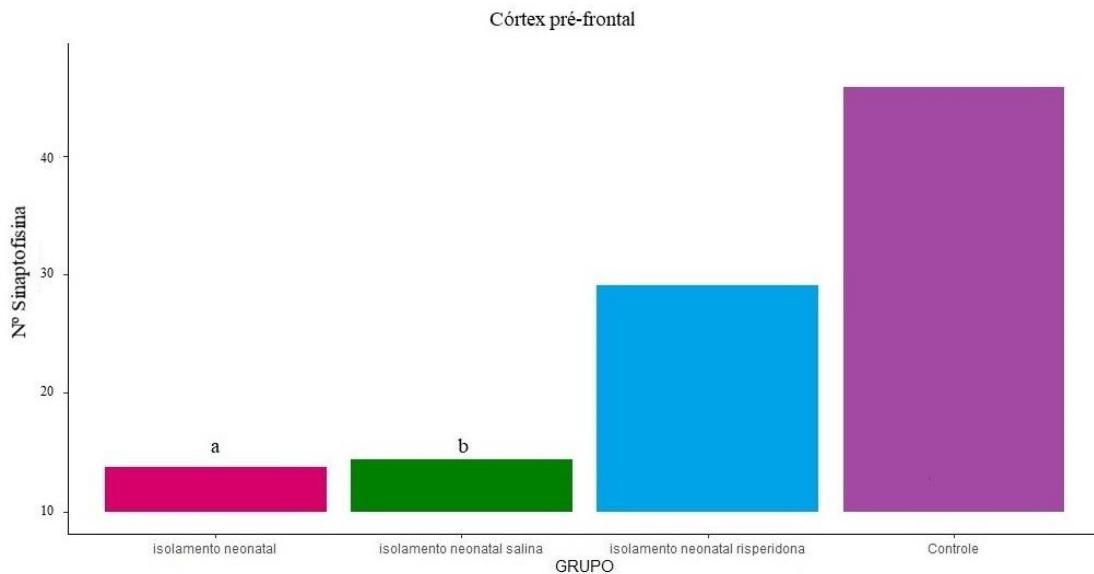
O grupo isolamento neonatal Risperidona demonstrou aumento significativo da quantidade de sinaptofisina quando comparado ao grupo isolamento neonatal salina (isolamento neonatal Risperidona: $27,4 \pm 0,314$; isolamento neonatal salina: $14,1 \pm 0,245$, $P<0,001$), evidenciando o efeito da Risperidona na transmissão sináptica.

Figura 29. Fotomicrografias, aumento de 100x, representativas do efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de sinaptofisina no córtex pré-frontal.



Os animais tiveram seus cérebros perfundidos para a realização da análise histológica com imunomarcção através da sinaptofisina (n=4 animais/grupo, 4 fatias/animal). ISO (grupo isolamento neonatal), ISO + SAL (grupo isolamento neonatal salina), ISO + RIS (grupo isolamento neonatal Risperidona), CON (grupo controle). Visualização: microscópio Nikon Eclipse Ni, com aumento de 100x.

Figura 30. Efeito do isolamento neonatal sobre a expressão de sinaptofisina no córtex pré-frontal.



Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (n=4 animais/grupo, 4 fatias/animal). A análise estatística foi realizada pela One Way ANOVA, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Valores significativos: a vs controle, b vs isolamento neonatal Risperidona, $P < 0,001$.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, mostramos alterações comportamentais induzidas pelo isolamento neonatal, tais como hiperatividade locomotora, presença de comportamentos repetitivos e estereotipados (*self-grooming*), aumento de comportamentos ansiosos, além da diminuição de

comportamentos de empatia, de ajuda e brincadeiras, alterações que estão presentes em humanos diagnosticados com TEA.

Diversos estudos trazem o isolamento social como indutor de endofenótipos de transtornos como Esquizofrenia e Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (ZUGNO *et al.*, 2013; FORD *et al.*, 2019). No entanto, ao descrever as alterações comportamentais após o estresse, esses estudos listam comportamentos tais como hiperatividade locomotora e prejuízos na interação social, que também podem ser observados no TEA (GROVE *et al.*, 2019), salientando a importância do presente estudo em investigar as possíveis relações desse estresse social com o TEA, buscando estabelecer as especificidades desse transtorno.

Alguns estudos buscaram investigar sintomas relacionados a categorias mais abrangentes, como a das síndromes psicóticas, que englobam Esquizofrenia e TEA, em detrimento de categorias nosográficas, como as que são propostas nos grandes manuais psiquiátricos, devido a similaridade da sintomatologia (MCCELLAN *et al.*, 1993). Além disso, o TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento que possui comorbidades com diversos outros transtornos, como TDAH e ansiedade, que dificultam o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, um prognóstico eficaz para pacientes diagnosticados (PELTON; CASSIDY, 2017).

Desse modo, partindo do pressuposto que vários transtornos psiquiátricos compartilham de sintomatologia semelhante, é aberto um espaço para desconstruir a noção engessada de que determinados transtornos necessitam da presença de uma quantidade de sintomas específicos para que receba um diagnóstico. É a partir dessa discussão que o construto “endofenótipo” surge como estratégia na tentativa de desvendar a etiologia de transtornos psiquiátricos. Um endofenótipo pode ser de natureza neurofisiológica, bioquímica, neuroanatômica, cognitiva ou neuropsicológica, incluindo dados de auto-relato e, para serem considerados úteis, devem permitir análise genética e possibilitar o desenvolvimento de modelos animais. Assim, os endofenótipos são possuem o propósito de abarcar o transtorno na sua totalidade, mas de contribuir com suas especificidades, para as variadas facetas e sintomas observados (GOTTESMAN; GOULD, 2003; KENDLER; NEALE, 2010).

Os prejuízos sociais do TEA fazem parte das especificidades do transtorno e podem ser diagnosticados na infância (MANDELL *et al.*, 2005; BOSL *et al.*, 2018; PIERCE *et al.*, 2019). Assim, o presente estudo focou em testes comportamentais que avaliaram a sociabilidade dos animais na infância e periadolescência (ANDERSEN, 2003), buscando compreender e comparar as particularidades do comportamento social no TEA.

O TEA possui etiologia multifatorial e pouco específica, que considera fatores genéticos e ambientais (PARDO; EBERTH, 2007). Cerca de 60% da etiologia do TEA é atribuída a fatores ambientais diversos, principalmente relacionados à gestação e ambiente pós-natal (FROEHLICH-SANTINO *et al.*, 2014; BENJAMIN *et al.*, 2019). Desse modo, os gatilhos ambientais são fundamentais para a compreensão do TEA em sua gênese e posterior tratamento de sintomas. No presente estudo, foi utilizado o isolamento neonatal, um fator genuinamente ambiental que consiste em separar os neonatos da mãe a partir do dia do nascimento, seguindo protocolo específico e inovador, para induzir endofenótipos do TEA. Trata-se de um estresse pós-natal que produziu prejuízos nas relações primárias dos animais com a mãe e os irmãos, necessárias para um neurodesenvolvimento saudável.

Existem vários protocolos de isolamento neonatal utilizados em estudos diversos, não havendo um consenso na literatura acerca da duração dessa manipulação ambiental (WU *et al.*, 2014; Bahi, 2016; TAN *et al.*, 2018). Neste estudo, foi utilizado um protocolo gradativo e longitudinal, em que o isolamento neonatal era realizado do dia zero (dia do nascimento) até o final dos testes comportamentais, em torno do 44º dia de vida, na fase de periadolescência dos animais, dando um caráter desenvolvimental a este estudo, visto que acompanha fases diferentes do desenvolvimento dos animais e fundamentais para o diagnóstico e acompanhamento dos sintomas no TEA. Além disso, trata-se de um estudo misto, que estabeleceu diferenças entre machos e fêmeas, visando contribuir para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas capazes de diagnosticar precocemente mulheres com TEA e, conseqüentemente, para a epidemiologia, que aponta a prevalência masculina do TEA, enquanto mulheres são subdiagnosticadas (RATTO *et al.*, 2018).

Além disso, este estudo considerou uma perspectiva translacional e a importância de implicações clínicas. Os modelos animais tradicionalmente utilizados, como a exposição *in utero* ao ácido valpróico (SCHNEIDER; PRZEWLOCKI, 2005), são restritos no tocante a generalização para populações diversas, comprometendo seu valor translacional. Neste estudo, o insulto ambiental utilizado contribuiu para investigações do ambiente de desenvolvimento pós-natal, estabelecendo relações do isolamento neonatal com quadros de depressão pós-parto, prejuízos na saúde mental de bebês prematuros que se desenvolveram em incubadoras de UTI neonatal e comportamentos atípicos em crianças que sofreram abandono por parte da mãe.

O presente estudo utilizou, como tratamento, um antipsicótico atípico frequentemente prescrito na prática clínica, disponibilizado no Sistema Único de Saúde para tratamento de sintomas de TEA, a Risperidona. Trata-se de um fármaco de primeira escolha,

antagonista dopaminérgico, especialmente de receptores D2, também atuando como antagonista de serotonina, que pode ser utilizado em crianças a partir dos cinco anos de idade, em doses que são ajustadas e graduadas segundo o peso corporal e tempo de administração (GOEL *et al.*, 2018). Este estudo buscou reproduzir as especificidades também quanto ao tratamento com Risperidona em humanos.

Com a importância do diagnóstico ainda em fases iniciais do desenvolvimento para TEA, avaliar o comportamento de agregação social em animais torna-se relevante para a compreensão do transtorno. Os comportamentos sociais adultos são afetados por alterações que ocorreram durante a constituição do sistema nervoso central, em período pré-natal e pós-natal. O filhote, em seus primeiros dias de vida, possui um contexto social composto pela mãe e pelos irmãos. Desse modo, a agregação social entre irmãos é um comportamento natural da espécie, onde os filhotes se aproximam uns dos outros, formando agrupamentos (EILAM; GOLANI, 1988). Esse comportamento possui relação com a termoregulação, visto que nessa fase do desenvolvimento há carência de pêlos, responsáveis pela manutenção da temperatura corporal e a orientação ocorre, principalmente, através do olfato (SCHANK; ALBERTS, 2000). Além disso, é um importante parâmetro para avaliar interação social em idade precoce, sendo um indicador do surgimento de atividades vinculadas ao contexto de grupo e precursor dos comportamentos de brincadeira (SCHANK, 2008).

O teste de agregação social foi realizado no décimo primeiro dia de vida dos animais (SCHANK; ALBERTS, 2000), que estavam divididos em dois grupos: isolados e não-isolados. Foram mensurados a latência para o encontro dos irmãos e o tempo de interação social entre eles. Os animais isolados apresentaram maior latência para o encontro e, conseqüentemente, menor tempo de interação social, quando comparados aos animais não-isolados, demonstrando assim o efeito do isolamento e prejuízos nesse comportamento social avaliado.

Este resultado contribui com estudos que mostram a possibilidade de realizar diagnóstico de TEA ainda na primeira infância, pois já nessa fase do desenvolvimento a criança apresenta comportamentos disfuncionais, como comportamentos repetitivos e estereotipados, hiperatividade locomotora e alterações no processamento de informações sociais (BOSL *et al.*, PIERCE *et al.*, 2019). A partir da avaliação de respostas comportamentais a estímulos externos ligados a emoções e ao ambiente social, como pouco contato visual, orientação pouco frequente para o próprio nome e menor sensibilidade às recompensas sociais, hipóteses diagnósticas de transtornos como TEA já podem ser levantadas (APA, 2013; BAON-COHEN; WHEELWRIGHT, 2003; LIEBAL *et al.*, 2008;

DEMURIE *et al.*, 2011). Além disso, apesar do sexo não ter apresentado resultados significativos neste parâmetro, as fêmeas demonstraram tendência a maior frequência de encontros e tempo de interação social, quando comparadas aos machos deste estudo.

Essa redução na capacidade de agregação social é um indicador precoce de déficit social, visto que quando os animais apresentam diminuição na frequência de encontros, bem como maior latência para se encontrar e conseqüente tempo de interação social menor, o comportamento de agregação social se apresenta alterado, indicando prejuízos nos comportamentos sociais (SCHANK, 2008). Desse modo, a partir dos resultados obtidos, podemos afirmar que o isolamento neonatal, precocemente, é capaz de prejudicar as interações sociais dos animais submetidos a este estresse, contribuindo para as investigações da sociabilidade no TEA.

O TEA possui uma gama de comorbidades, tais como TDAH, transtornos de humor e de ansiedade, que dificultam o seu diagnóstico e o confunde com outros transtornos (ZUGNO *et al.*, 2013; FORD *et al.*, 2018). Desse modo, o presente estudo avaliou parâmetros fundamentais para TEA, que são frequentemente avaliados e considerados na prática clínica. Através do teste do campo aberto, este estudo avaliou a atividade locomotora e o estado emocional dos animais (HALL, 1934).

Os resultados obtidos no teste de campo aberto, através da quantificação do número de *crossings* (cruzamentos), mostraram que o isolamento neonatal foi capaz de induzir hiperatividade locomotora nos animais, corroborando estudos que investigaram os efeitos desse tipo de intervenção e a relacionaram com TEA (WU *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2018). A hiperatividade é um comportamento caracterizado por intensa agitação motora, com conseqüentes prejuízos na atenção e na concentração, característicos do TEA (APA, 2013). O tratamento com Risperidona se mostrou eficaz na melhora da hiperatividade dos animais isolados quando comparados com animais tratados com solução salina, visto que a Risperidona bloqueia a ação da dopamina, inibindo os receptores D2 (LAMY; ERICKSON, 2018).

Além dos efeitos do isolamento neonatal, o sexo também se mostrou determinante na atividade locomotora dos animais. As fêmeas apresentaram maior atividade locomotora quando comparadas aos machos em todos os grupos. Além disso, os machos mostraram ser mais sensíveis ao tratamento com Risperidona quando comparados às fêmeas, apresentando melhorias mais significativas. Esse resultado pode ser relacionado aos estudos que investigam TEA em mulheres, mostrando que mulheres com autismo apresentam as formas mais graves do transtorno (BEDFORD *et al.*, 2019). Ademais, a hiperatividade feminina é reforçada

socialmente, fazendo com que as mulheres desenvolvam estratégias para se camuflar e, assim, sobreviver com esse comportamento disfuncional (RATTO *et al.*, 2018).

Outros estudos investigam também a suscetibilidade masculina ao TEA relacionando neuroinflamação e diferenças sexuais, sugerindo que a prevalência masculina pode estar associada a quantidade de hormônios androgênicos no estágio inicial do desenvolvimento cerebral, mais especificamente na fase de divisão celular e de desenvolvimento de neurônios (QUARTIER *et al.*, 2018; CARLEZON *et al.*, 2019).

Ainda no teste do campo aberto, foram avaliados comportamentos relacionados ao estado emocional dos animais, como *self-grooming*, *rearing* e frequência de entradas na zona periférica.

O *self-grooming*, comportamento de auto-limpeza, é utilizado em diversos estudos sobre TEA como medida de comportamentos esterotipados e repetitivos, característicos do transtorno, além de estarem diretamente relacionados com ansiedade diante de estímulos novos. Os resultados deste estudo mostraram que o isolamento neonatal e o sexo produziram efeitos na frequência de *self-grooming*, visto que os animais do grupo isolamento neonatal apresentou maior frequência desse comportamento quando comparado ao grupo controle. Além disso, os machos que foram submetidos ao isolamento neonatal, praticaram mais *self-grooming* quando comparados às fêmeas.

Esse resultado corrobora estudos que utilizam esse estresse para investigar alterações comportamentais do tipo autismo-like (WU *et al.*, 2014), além de apresentar um prejuízo tão característico do TEA, como a alta frequência de comportamentos estereotipados (SCHRIJVER *et al.*, 2002). Além disso, os machos parecem ser mais sensíveis ao isolamento neonatal ao avaliarmos esse comportamento e compararmos com as fêmeas, ressaltando a importância da investigação de prejuízos comportamentais relacionados às diferenças de sexo no TEA.

A frequência de *rearing*, comportamento de levantar-se sobre as patas posteriores sem qualquer apoio nas patas dianteiras, também foi mensurada no teste do campo aberto. Trata-se de um comportamento relacionado à ansiedade dos animais quando expostos a ambientes desconhecidos. Neste estudo, o isolamento neonatal demonstrou efeitos no *rearing* dos animais, visto que o grupo isolamento neonatal apresentou maior frequência de *rearing* quando comparado ao controle. Esse resultado corrobora estudos que relacionam altos níveis de ansiedade e TEA, visto que transtornos de ansiedade constituem comorbidade bastante presente no TEA (SCHNEIDER; PRZEWLOCKI, 2005; WU *et al.*, 2014). Além disso, em todos os grupos submetidos ao isolamento, as fêmeas mostraram maior frequência de *rearing*

e não se apresentaram tão sensíveis ao tratamento com Risperidona quando comparadas aos machos, que demonstraram redução mais significativa desse comportamento.

As entradas na periferia foram mensuradas através do teste de campo aberto a fim de avaliar comportamentos relacionados a ansiedade. A alta frequência de entradas na zona periférica demonstra altos níveis de ansiedade, dado que os animais são expostos a um ambiente novo e tendem a buscar os cantos do aparato, para que possam encostar suas vibrissas, e se sentirem seguros para continuar explorando o ambiente (HALL, 1934).

Neste estudo, os resultados obtidos mostraram que o isolamento neonatal foi capaz de aumentar a frequência de entradas na periferia e que essa frequência foi maior em fêmeas, principalmente nos grupos isolamento neonatal e isolamento neonatal salina. Este resultado corrobora estudos que avaliam as entradas na zona periférica como preditor de comportamentos de ansiedade e os relacionam com TEA (WU *et al.*, 2014; BAHI, 2016; TAN *et al.*, 2018). Além disso, estudos comportamentais com fêmeas e grandes manuais diagnósticos mostram que transtornos de ansiedade são mais frequentes em mulheres (APA, 2013; RATTO *et al.*, 2018), reforçando o resultado obtido neste estudo.

Diante dos resultados obtidos no teste de campo aberto, podemos observar que, de modo geral, o isolamento neonatal aumentou a frequência dos comportamentos avaliados e as diferenças sexuais contribuíram para desencadear os prejuízos apresentados. Além disso, os prejuízos comportamentais desencadeados pelo isolamento neonatal que foram demonstrados no teste do campo aberto podem ser observados no TEA e são fundamentais para o estabelecimento de um diagnóstico seguro e preciso na prática clínica (APA, 2013; NYE; BRICE, 2005; MILLWARD *et al.*, 2008; REICHOW; VOLKMAR, 2010; REICHOW; STEINER; VOLKMAR, 2013).

A Risperidona demonstrou seu efeito na diminuição dos parâmetros avaliados pelo teste do campo aberto, sendo eficaz, principalmente, na redução da atividade locomotora e de comportamentos de ansiedade. Este achado corrobora estudos que utilizam a Risperidona no tratamento desse sintomas (HUNSINGER *et al.*, 2000).

O processamento de informações emocionais e sociais, bem como a posterior demonstração delas através de comportamentos, também encontra-se prejudicado no TEA e é onde as avaliações concentram seu foco atualmente, visto que são os aspectos sociais que diferenciam o TEA de transtornos de sintomatologia semelhante (APA 2013; VOLKMAR; REICHOW, 2013). Partindo disso, este estudo avaliou comportamentos de empatia/contágio emocional e ajuda pró-social, utilizando aparatos específicos.

A empatia/contágio emocional envolve processos psicológicos, que variam de acordo com o ambiente, a espécie e seu desenvolvimento. Desse modo, trata-se da capacidade de experienciar as reações emocionais ao observar o outro, compartilhando desse estado (PANKSEPP; LAHVIS, 2011; SHAMAY-TSOORY, 2011), ou seja, envolve respostas emocionais emitidas automaticamente, que resultam em uma expressão emocional semelhante naquele que observa (PRESTON; DE WAAL, 2002). Essa definição está relacionada com a possível presença de neurônios-espelho nas interações sociais, associados ao aprendizado de novas habilidades, imitação e percepção da intenção dos outros (GALLESE *et al.*, 2007; RIZZOLATTI; FABBRI-DESTRO, 2010). Neste estudo, a empatia/contágio emocional foi avaliada mediante o processo de medo condicionado, onde o *freezing* (congelamento), resposta defensiva emitida pelo animal quando em situação aversiva, constitui evidência de comportamento empático quando emitida pelo observador ao ver outro exposto à estimulação aversiva (LANGFORD *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o isolamento neonatal e o sexo influenciaram a frequência de *freezing* dos animais na avaliação da empatia/contágio emocional. O grupo isolamento neonatal apresentou menor frequência de *freezing* quando comparado ao grupo controle, ou seja, o isolamento neonatal prejudicou a capacidade empática dos animais. Além disso, os machos apresentaram maior frequência de *freezing* quando comparados às fêmeas. Este resultado sugere que as fêmeas, ao expressarem em menor frequência comportamentos relacionados à empatia/contágio emocional no paradigma utilizado, podem apresentar maiores prejuízos no processamento de informações emocionais.

A Risperidona exerceu efeito no aumento de respostas de empatia no teste de empatia/contágio emocional, contribuindo para uma melhora significativa nesse comportamento, evidenciando que o tratamento contribui para aumento de comportamentos empáticos e corroborando estudos que utilizam este antipsicótico para sintomas de TEA (HUNSINGER *et al.*, 2000).

Em uma perspectiva translacional, este resultado pode estar relacionado com estudos que mostram que mulheres com TEA apresentam as formas mais graves do transtorno, principalmente em relação aos prejuízos na sociabilidade (BEDFORD *et al.*, 2019; RATTO *et al.*, 2018). Além disso, nos mais diversos tipos de estudo, principalmente em pré-clínicos, ainda é pouco comum utilizar fêmeas como sujeitos experimentais. Os estudos de TEA priorizam o uso de machos, sob a justificativa da prevalência do transtorno. Entretanto, a prevalência quanto ao sexo pode ser questionada quando as ferramentas diagnósticas utilizadas são construídas a partir de dados oriundos de estudos com machos e as demandas e

pressões sociais sobre o sexo feminino podem ensinar mulheres a sobreviver com os sintomas (BEDFORD *et al.*, 2019).

Os comportamentos de brincadeira são fundamentais para o desenvolvimento saudável dos indivíduos e encontram-se prejudicados no TEA, onde aparecem em frequências menores e com variabilidade restrita. As atividades lúdicas e brincadeiras são ferramentas bastante utilizadas na prática clínica para auxiliar no diagnóstico de TEA. Desse modo, o presente estudo avaliou os principais comportamentos de brincadeira apresentados pelos roedores, que são eles: atacar, rolar, boxear, *rearing*, pular, perseguir e cheirar (MEANEY; STEWART, 1981). Vale ressaltar que esses comportamentos foram observados na fase escura dos animais, fase de maior atividade dos roedores.

Os resultados deste estudo mostraram que o isolamento neonatal foi capaz de alterar a frequência dos comportamentos de brincar dos animais, machos e fêmeas, uma vez que os animais submetidos ao referido estresse social apresentaram redução desses comportamentos quando comparados com animais não-isolados.

As interações sociais são fundamentais para o desenvolvimento saudável dos indivíduos e ocorrem em maior frequência na adolescência, tanto em humanos como em roedores, aspecto considerado neste estudo. Em roedores, essas interações são bastantes sensíveis a fatores ambientais (VARLINSKAYA; SPEAR, 2008), sofrendo prejuízos significativos com o isolamento neonatal. Desse modo, as alterações nos comportamentos de brincar dos animais devem ser consideradas como evidências de que o desenvolvimento do sistema nervoso central foi prejudicado pelo isolamento neonatal. Além disso, estudos anteriores mostram que animais submetidos a intervenções ambientais demonstram prejuízos comportamentais a longo prazo e os comportamentos de brincar na infância e na adolescência podem ser preditores de alterações comportamentais e fisiológicas na idade adulta, como menor receptividade sexual em fêmeas e menor frequência de comportamentos sexuais em machos (PADOIN *et al.*, 2001; BENETTI *et al.*, 2007).

Estudos mostram que o estresse da mãe em período gestacional provoca a redução de comportamentos de brincadeira em machos (WARD; STEHM, 1991), estabelecendo uma relação entre o comportamento da mãe que tem seus filhotes isolados e a diminuição das brincadeiras destes animais, visto que, no período do isolamento, a mãe não fornece aos filhotes os cuidados que eles necessitam para desenvolver de modo saudável e o contato com os irmãos também é interrompido, prejudicando a sociabilidade dos animais e, posteriormente, os comportamentos de brincadeira. Desse modo, este estudo demonstrou que

o isolamento neonatal priva os animais da oportunidade de brincar, acarretando alterações nos comportamentos sociais.

Sobre os efeitos do sexo nos comportamentos de brincadeira, machos isolados apresentaram maior frequência em atacar, rolar e perseguir, enquanto as fêmeas mostraram maior frequência de *rearing*, pular e cheirar, com tendência para demonstrar aumento no boxear.

A sociabilidade pode ser concebida como um processo que agrupa reconhecimento social, interesse pelo contato social e, conseqüentemente, formação de vínculo. Partindo disso, existem hipóteses que relacionam o autismo com déficits na cognição social e na teoria da mente e outras que focam na relevância dos fatores motivacionais para o TEA. A hipótese motivacional aponta prejuízos em fatores comportamentais, como orientação social, função de recompensa, busca por interação e manutenção social, e evolutivos, como adaptação e aptidão individual para cooperar com o grupo (Chevallier *et al.*, 2012).

O presente estudo utilizou um paradigma de comportamento de ajuda para avaliar a escolha social dos animais, decorrente da ajuda fornecida a outro animal (BARTAL *et al.*, 2011). A frequência de interação com a caixa restritora, assim como a abertura dela e a latência para essa abertura foram avaliadas como medidas de comportamento de ajuda que, conseqüentemente, envolvem empatia e altruísmo, comportamentos que se encontram prejudicados no TEA. Além disso, esses parâmetros forneceram resultados relacionados a aprendizagem dos animais (BARTAL *et al.*, 2011).

A interação com a caixa restritora foi utilizada como medida de interesse pelo contato social, visto que o animal que estava livre na arena, para libertar o que estava aprisionado, precisava tocar na caixa restritora, para explorar e, conseqüentemente, através de tentativa e erro, realizar a abertura. Neste estudo, os animais submetidos ao isolamento neonatal apresentaram menor frequência de interação com a caixa restritora e ausência de padrão de interação ao longo das sessões de teste, sugerindo diminuição do interesse pelo contato social. Os animais não isolados apresentaram resultados que corroboram o estudo de Bartal e colaboradores (2011), no qual a frequência de interação é maior nas primeiras sessões, com queda significativa após a aprendizagem do mecanismo de abertura e conseqüente libertação do animal aprisionado.

A abertura da caixa restritora, e conseqüente libertação do animal aprisionado por outro que estava livre na arena do aparato, foi avaliada também como medida de interesse pelo contato social. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os grupos submetidos ao isolamento neonatal apresentaram menor frequência de abertura da caixa e ausência de

padrão de abertura ao longo das sessões de teste, ou seja aberturas irregulares. Esses achados sugerem uma diminuição do interesse pelo contato social. Além disso, os animais controle apresentaram abertura sistemática ao longo das sessões, dado que seguem abrindo nas sessões seguintes a partir da sessão em que realizam a primeira abertura (BARTAL *et al.*, 2011).

A latência para abertura foi avaliada como medida de interesse social e aprendizagem, visto que, para realizar a abertura, os animais tinham que previamente aprender o mecanismo dessa abertura por tentativa e erro, razão pela qual o teste exige mais de uma sessão. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os grupos submetidos ao isolamento neonatal apresentaram maior latência para a abertura da caixa restritora, quando a realizavam, visto que a abertura por parte desses animais não era sistemática. Esses dados sugerem que o isolamento neonatal afetou fortemente o interesse social dos animais e também a aprendizagem do mecanismo de abertura, quando comparados aos resultados de animais não isolados.

Sobre a estratégia terapêutica adotada para tratar os sintomas produzidos pelo isolamento neonatal, de modo geral, a Risperidona se mostrou eficaz na diminuição dos prejuízos causados pelo isolamento. Esse efeito demonstrado corrobora estudos que mostram a eficácia desse tratamento para Autismo (LAMY; ERICKSON, 2018; GOEL *et al.*, 2018). Estudos que relacionam neuroinflamação, TEA e Risperidona sugerem que este antipsicótico exerce efeito anti-inflamatório, reforçando os achados acerca da eficácia da Risperidona na diminuição dos sintomas (CHOI *et al.*, 2014). No entanto, são vários os efeitos adversos provocados pela Risperidona, como o ganho de peso em curto espaço de tempo, contribuindo para o desenvolvimento de outras doenças, como a obesidade e hiperglicemia, além de sedação, tontura, tremores e constipação. Em alguns casos, a Risperidona pode causar discinesia tardia, síndrome neuroléptica maligna e risco aumentado de ideação suicida (GRANT; FITTON, 2012; UCHIDA *et al.*, 2007).

Investir em estratégias terapêuticas que visam a estimulação sensorial e do funcionamento psíquico, como arteterapia e psicoterapia, parecem ser um caminho interessante para o tratamento do TEA, dado que já possuem evidências no que tange a redução da gravidade do transtorno, além de produzir benefícios neurofisiológicos e moleculares para aqueles que são diagnosticados. Além disso, a psicoterapia familiar, fundamentada em estratégias da psicoeducação, visam fornecer informações acerca do transtorno e busca integrar família e paciente, a fim de construir modos de aceitar e lidar com os comportamentos e emoções do paciente com TEA (SOLOMON; CHUNG, 2012; LAI; LOMBARDO; BARON-COHEN, 2013).

O TEA pode ser considerado como um conjunto de fatores heterogêneos que fazem parte do desenvolvimento neurológico e psicológico, caracterizado por dificuldades na comunicação social, comportamentos e interesses repetitivos, incomuns e restritos. As alterações comportamentais observadas no TEA se relacionam com um desenvolvimento neural atípico (LAI; LOMBARDO; BARON-COHEN, 2013). Diversos estudos buscaram demonstrar padrões morfológicos no TEA, como alterações no córtex frontal, corpo estriado e hipocampo, além de disfunções da excitabilidade neuronal. No entanto, trata-se de um transtorno que não possui marcadores neurofisiológicos e moleculares específicos (VAN DEN BERGH *et al.*, 2017; CAUDLE, 2015; CARLISI *et al.*, 2017).

O estresse nas fases iniciais da vida influencia comportamentos afetivos e cognitivos, prejudicando o desenvolvimento saudável dos indivíduos (KAMBALI *et al.*, 2019). Diversos estudos sugerem mecanismos de ação do isolamento neonatal, sendo as hipóteses epigenéticas e as de neuroinflamação as mais exploradas.

Hipóteses epigenéticas consideram a ação de fatores ambientais somada às predisposições genéticas, reforçando a ideia de que alterações epigenéticas durante o desenvolvimento podem ser causa primária do TEA (ARNDT *et al.*, 2005; GARDENER; SPIELGEMAN; BUKA, 2011; MAMIDALA *et al.*, 2013). Nas hipóteses neuroinflamatórias, processos de inflamação são avaliados a partir das citocinas pró-inflamatórias presentes no cérebro, como IL6, bem como a ativação de células da glia, e do estresse oxidativo (ABBRUZZO *et al.*, 2019).

Processos neuroinflamatórios no córtex pré-frontal estão relacionados com diversas disfunções cognitivas e, conseqüentemente, comportamentais, estando presentes em variados transtornos neuropsiquiátricos, como TEA. Partindo disso, o presente estudo avaliou a expressão de micróglia ativadas em tecidos cerebrais de córtex pré-frontal através da imunomarcagem com IBA1, visto que essas células constituem as unidades imunológicas do cérebro e, quando ativadas, são evidência de neuroinflamação. Os resultados mostraram que o isolamento neonatal foi capaz de aumentar a quantidade de micróglia ativadas, evidenciando a ocorrência de neuroinflamação. Esse resultado corrobora e fortalece achados da literatura que relacionam TEA a neuroinflamação, e conseqüente aparecimento de sintomas clássicos (PRATA *et al.*, 2017; REED *et al.*, 2019).

A ativação microglial pode desempenhar papel importante na patogênese do TEA, pois pode representar uma resposta do sistema neuroimune a distúrbios sinápticos, neuronais ou da rede neuronal, bem como contribui com achados acerca de anormalidades genéticas e alterações ambientais capazes de afetar várias células cerebrais (VARGAS *et al.*, 2005;

MORGAN *et al.*, 2010). Além disso, outros estudos já relacionaram isolamento neonatal com ativação microglial no córtex pré-frontal e outros diversos marcadores neuroinflamatórios (CLAYPOOLE *et al.*, 2017; CHEEPSUNTHORN *et al.*, 2001). Logo, os achados deste estudo corroboram resultados já descritos na literatura.

Os resultados deste estudo também mostraram que a Risperidona reduziu a ativação microglial, mesmo que essa redução não seja significativa em relação ao grupo controle. Desse modo, a Risperidona foi capaz de melhorar a neuroinflamação no córtex pré-frontal, causada pelo isolamento neonatal. Esse resultado corrobora dados que mostraram que este antipsicótico pode exercer efeito neuroprotetor e atenuador do processo inflamatório de transtornos neuropsiquiátricos como o TEA e outras doenças que acometem o sistema nervoso central, como a isquemia cerebral (QUINCOZES-SANTOS *et al.*, 2010; YAN *et al.*, 2014).

Além da ativação microglial, o presente estudo avaliou o efeito do isolamento neonatal no estresse oxidativo no córtex pré-frontal e no hipocampo. Os resultados mostraram que o isolamento neonatal foi capaz de aumentar o estresse oxidativo nessas áreas cerebrais, fortalecendo a hipótese da neuroinflamação. Esses achados corroboram diversos estudos que relacionam aumento do estresse oxidativo, inflamação e TEA, principalmente no córtex pré-frontal e hipocampo (FRUSTACI *et al.*, 2012; CHAUHAN; CHAUHAN, 2006).

O dano oxidativo pode desempenhar papel fundamental no esclarecimento dos biomarcadores que estão envolvidos na patogênese do TEA. Quando tomado em conjunto com outros marcadores de neuroinflamação, o estresse oxidativo possui relação com alterações lipídicas da membrana, inflamação, prejuízos na resposta imune e no metabolismo energético e excitotoxicidade, levando a sintomas clínicos observados no TEA (CHAUHAN; CHAUHAN, 2006).

A Risperidona também foi capaz de reduzir o estresse oxidativo causado pelo isolamento neonatal, demonstrando o efeito antioxidante desde antipsicótico. Este resultado também corrobora achados que mostraram que a Risperidona pode atenuar o estresse oxidativo (GARABADU *et al.*, 2015; NOTO *et al.*, 2015).

Estudos variados buscaram estabelecer a relação do TEA com mecanismos de disfunção sináptica, levantando a hipótese de que existe um desequilíbrio excitatório-inibitório que culmina nos sintomas comumente observados nos pacientes diagnosticados (VAN SPRONSEN *et al.*, 2010; SUDHOF, 2008; DE LA TORRE-UBIETA *et al.*, 2016). Partindo disso, neste estudo, a sinaptofisina no córtex pré-frontal também foi mensurada. Trata-se de uma glicoproteína de vesículas sinápticas que está presente nos

neurônios, que participa da transmissão sináptica e sua presença permite a quantificação das sinapses neuronais (EASTWOOD *et al.*, 2001).

O isolamento neonatal foi capaz de reduzir a expressão de sinaptofisina no córtex pré-frontal, evidenciando, assim, a diminuição das sinapses neuronais e, conseqüentemente, prejuízos cognitivos e comportamentais. O mecanismo de redução das sinapses ainda não está claro, visto que pode ter ocorrido por diversas razões, como morte neuronal e diminuição da neurogênese e da neuroplasticidade. Este resultado corrobora estudos que mostraram que, no TEA, a transmissão sináptica está prejudicada e essa disfunção está intrinsecamente relacionada a patogênese do transtorno (MIYAKE *et al.*, 2012; GILMAN *et al.*, 2011). Além disso, esse resultado abre caminhos para fortalecer a relação entre neuroinflamação, disfunção sináptica e TEA.

Assim como nos demais resultados bioquímicos, a Risperidona demonstrou efeitos significativos no aumento da expressão de sinaptofisina no pré-frontal. Esse resultado vai de encontro aos achados que mostraram que a Risperidona é capaz de exercer melhora na disfunção sináptica presente em varios transtornos neuropsiquiátricos (DELLOTÉRIE *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2017).

A partir dos resultados apresentados neste estudo, podemos concluir que o isolamento neonatal é uma intervenção ambiental que pode ser utilizada para a indução de endofenótipos dos principais comportamentos observados no TEA, como hiperatividade locomotora, ansiedade, menor frequência e variabilidade de comportamentos de brincadeira e prejuízos na empatia, no interesse pelo contato com o outro e na aprendizagem, que o diferenciam de outros transtornos neuropsiquiátricos. Além disso, estes resultados evidenciam a importância da experiência precoce e das relações sociais primárias para a modulação de comportamentos sociais, desde a infância até a senilidade e os aspectos histopatológicos e bioquímicos considerados neste estudo focaram nos processos neuroinflamatórios e na disfunção sináptica que são comumente descritos em estudos sobre TEA.

Como todo e qualquer estudo, este também apresenta limitações e fragilidades. No tocante ao controle experimental do método, para garantir a precisão da gestação das fêmeas, realizar o lavado ou esfregaço vaginal e assim, acompanhar o ciclo estral de modo mais fidedigno, é um aspecto importante para a robustez do método. Além disso, o presente estudo carece do desenvolvimento de um grupo experimental tratado apenas com Risperidona, a fim de estabelecer, com maior clareza, os efeitos deste antipsicótico na melhora dos sintomas causados pelo isolamento neonatal.

Sobre os testes comportamentais realizados, avaliar mais parâmetros também pode ser interessante para o presente estudo. Como o TEA é um transtorno multifacetado, avaliar o filtro sensorio-motor através do teste de inibição pré-pulso, a sensibilidade a dor, bem como comportamentos depressivos são aspectos que podem enriquecer este trabalho, além de abranger mais aspectos presentes no TEA.

No tocante as análises histopatológicas e bioquímicas, uma gama de biomarcadores em áreas cerebrais diversas podem ser utilizados para dar robustez ao presente estudo. Aprofundar mais ainda as análises no córtex pré-frontal e ventro-medial, que estão profundamente envolvidos com comportamentos sociais e hipocampo são essenciais para a compreensão do papel dos fatores ambientais na patogênese do TEA. Imunomarcção de astrócitos e citocinas pró-inflamatórias e *golgi-cox* poderão contribuir para o estudo da relação entre isolamento neonatal, neuroinflamação e TEA. Além disso, estabelecer as especificidades entre TEA e receptores de ocitocina e vasopressina podem enriquecer o método utilizado neste estudo.

7 CONCLUSÃO

O isolamento neonatal foi capaz de induzir endofenótipos de TEA em roedores, apresentando também diferenças sexuais. Foram observados alterações na atividade locomotora, aumento da frequência de comportamentos relacionados à ansiedade, diminuição da frequência e da variabilidade dos comportamentos de brincadeira e prejuízos na empatia, no interesse pelo contato social e na aprendizagem.

Também foram observados aumento da expressão de micróglia ativada e do estresse oxidativo, bem como diminuição na sinaptofisina, evidenciando neuroinflamação e disfunção sináptica acarretadas pelo isolamento neonatal.

A abordagem terapêutica mais utilizada, o tratamento com Risperidona, se mostrou eficaz na minimização dos efeitos do isolamento neonatal, tanto a nível comportamental como bioquímico e histopatológico. No entanto, mais estudos acerca da etiologia e dos possíveis gatilhos capazes de desencadear o TEA precisam ser desenvolvidos, a fim de proporcionar estratégias terapêuticas mais específicas, menos invasivas e com menos efeitos adversos.

O protocolo de isolamento neonatal desenvolvido aqui pode ser utilizado para investigar o papel de fatores ambientais na gênese do TEA, além de ressaltar a validade translacional deste estudo, com amplas possibilidades de generalização para populações diversas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISA, B., TORDERA, R., LASHERAS, B. DEL RIO, J. & RAMIREZ, M. J. Effects of maternal separation on hypothalamic–pituitary–adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. **Neuroscience**, v. 154, n. 4, p. 1218-1226, 2008.

AMARAL, D. G., SCHUMANN, C. M., & NORDAHL, C. W. Neuroanatomy of autism. **Trends in neurosciences**, 31(3), 137-145. 2008.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**, 5. 2013.

ANDERSEN, Susan L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity?. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1-2, p. 3-18, 2003.

ARDINGER, H. H., ATKIN, J. F., BLACKSTON, R. D., ELSAS, L. J., CLARREN, S. K., LIVINGSTONE, S., ... & MAJEWSKI, F. Verification of the fetal valproate syndrome phenotype. **American journal of medical genetics**, 29(1), 171-185. 1988.

ARNDT, T. L., STODGELL, C. J., & RODIER, P. M. The teratology of autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 23(2-3), 189-199. 2005.

BACHMANN, S. O., SLEDZIOWSKA, M., CROSS, E., KALBASSI, S., WALDRON, S., FANGLI, C., ... & RANSON, A. Behavioral training rescues motor deficits in *Cyfp1* haploinsufficiency mouse model of autism spectrum disorders. **Translational psychiatry**, 9(1), 29. 2019.

BAHEVALIER J. & LOVELAND K.A. The orbitofrontal-amygdala circuit and self-regulation of socialemotional behavior in autism. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 30:97–117. 2006.

BAHI, A. Hippocampal BDNF overexpression or microR124a silencing reduces anxiety-and autism-like behaviors in rats. **Behavioural brain research**, 326, 281-290. 2017.

BAIO, J. Prevalence of Autism Spectrum Disorders: Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 Sites, United States, 2008. Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries. Volume 61, Number 3. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2012.

BAIO, J.; WIGGINS, L., CHRISTENSEN, D. L., MAENNER, M. J., DANIELS, J., WARREN, Z., ... & DURKIN, M. S. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2014. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 67, n. 6, p. 1, 2018.

BANNERMAN, D. M., RAWLINS, J. N. P., McHUGH, S. B., DEACON, R. M. J., YEE, B. K., BAST, T., ... & FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 28(3), 273-283, 2004.

BANSAL, A., WEECH, S., & BARNETT-COWAN, M. (2019). Movement-Contingent Time Flow in Virtual Reality Causes Temporal Recalibration. **Scientific reports**, 9(1), 4378. 2019.

BAON-COHEN S. & WHEELWRIGHT S. The Friendship Questionnaire: An investigation of adults with Asperger syndrome or high-functioning autism, and normal sex differences. **Journal of Autism and Developmental Disorders**. 33:509–517. [PubMed: 14594330]. 2003

BARTAL, I. B. A., DECETY, J., & MASON, P. Empathy and pro-social behavior in rats. **Science**, 334(6061), 1427-1430. 2011.

BARTZ, J.A.; HOLLANDER, E. Oxytocin and experimental therapeutics in autism spectrum disorders. **Progress in brain research**, v. 170, p. 451-462. 2008.

BAUMAN, M. L., & KEMPER, T. L. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. **International journal of developmental neuroscience**, 23(2-3), 183-187. 2005.

BEDFORD, S. A., PARK, M. T. M., DEVENYI, G. A., TULLO, S., GERMANN, J., PATEL, R., ... & CRAIG, M. C. (2019). Large-scale analyses of the relationship between sex, age and intelligence quotient heterogeneity and cortical morphometry in autism spectrum disorder. **Molecular psychiatry**, 1. 2019.

BENETTI, F., ANDRADE DE ARAUJO, P., LUIZ SANVITTO, G. & LUCION, A. B. Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. **Developmental psychobiology**, 49(3), 258-264. 2007.

BOSL, W. J., TAGER-FLUSBERG, H., & NELSON, C. A. (2018). EEG analytics for early detection of autism spectrum disorder: a data-driven approach. **Scientific reports**, 8(1), 6828. 2018.

BRENES, J. C., LACKINGER, M., HOGLINGER, G. U., SCHRATT, G., SCHWARTING, R. K., & WOHR, M. Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats. **Journal of Comparative Neurology**, 524(8), 1586-1607. 2016.

BROMLEY, R. L., MAWER, G., CLAYTON-SMITH, J., BAKER, G. A., & LIVERPOOL AND MANCHESTER NEURODEVELOPMENT GROUP. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. **Neurology**, 71(23), 1923-1924. 2008.

BROWN, A. S., CHESLACK-POSTAVA, K., RANTAKOKKO, P., KIVIRANTA, H., HINKKA-YLI-SALOMÄKI, S., MCKEAGUE, I. W., ... & SOURANDER, A. Association of maternal insecticide levels with autism in offspring from a national birth cohort. **American Journal of Psychiatry**, 175(11), 1094-1101. 2018.

CARLISI, C. O., NORMAN, L., MURPHY, C. M., CHRISTAKOU, A., CHANTILUKE, K., GIAMPIETRO, V., ... & RUBIA, K. Disorder-specific and shared brain abnormalities during

vigilance in autism and obsessive-compulsive disorder. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, 2(8), 644-654, 2017.

CASANOVA, M. F., VAN KOOTEN, I. A., SWITALA, A. E., VAN ENGELAND, H., HEINSEN, H., STEINBUSCH, H. W., ... & SCHMITZ, C. Minicolumnar abnormalities in autism. **Acta neuropathologica**, 112(3), 287. 2006.

CAUDLE, W. M. Vulnerability of synapses in the frontal cortex of mice developmentally exposed to an insecticide: Potential contribution to neuropsychiatric disease. **Neurotransmitter (Houston, Tex.)**, v. 2, n. 1, 2015.

CHAWARSKA, K., MACARI, S., & SHIC, F. Decreased spontaneous attention to social scenes in 6-month-old infants later diagnosed with autism spectrum disorders. **Biological psychiatry**, 74(3), 195-203. 2013.

CHAUHAN, A. & CHAUHAN, V. Oxidative stress in autism. **Pathophysiology**, v. 13, n. 3, p. 171-181, 2006.

CHEEPSUNTHORN, P., RADOV, L., MENZIES, S., REID, J., & CONNOR, J. R. Characterization of a novel brain-derived microglial cell line isolated from neonatal rat brain. **Glia**, 35(1), 53-62, 2001.

CHERSKOV, A., POHL, A., ALLISON, C., ZHANG, H., PAYNE, R. A., & BARON-COHEN, S. Polycystic ovary syndrome and autism: A test of the prenatal sex steroid theory. **Translational psychiatry**, 8(1), 136. 2018

CHEVALLIER C., MOLESWORTH C. & HAPPÉ F. Diminished social motivation negatively impacts reputation management: Autism Spectrum Disorders as a case in point. **PLoS One** 7, e31107. [PubMed: 22303483]. 2012.

CHEVALLIER C., GRÈZES J., MOLESWORTH C., BERTHOZ S. & HAPPÉ F. Brief Report: Selective Social Anhedonia in High Functioning Autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**. 10.1007/s10803-011-1364-0. 2012.

CHEVALLIER, C., KOHLS, G., TROIANI, V., BRODKIN, E. S. & SCHULTZ, R. T. The social motivation theory of autism. **Trends in Cognitive Sciences**, 16(4), 231-239. 2012.

CHRISTIANSON, A. L.; CHESTER, N. & KROMBERG, J.G.R. Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 36, n. 4, p. 361-369, 1994.

CLAYPOOLE, L. D.; ZIMMERBERG, B.; WILLIAMSON, L. L. Neonatal lipopolysaccharide treatment alters hippocampal neuroinflammation, microglia morphology and anxiety-like behavior in rats selectively bred for an infantile trait. **Brain, behavior, and immunity**, v. 59, p. 135-146, 2017.

COURCHESNE, E., MOUTON, P. R., CALHOUN, M. E., SEMENDEFERI, K., AHRENS-BARBEAU, C., HALLET, M. J., ... & PIERCE, K. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. **Jama**, 306(18), 2001-2010. 2011.

COURCHESNE, E., PIERCE, K., SCHUMANN, C. M., REDCAY, E., BUCKWALTER, J. A., KENNEDY, D. P., & MORGAN, J. Mapping early brain development in autism. **Neuron**, 56(2), 399-413. 2007.

CRAWLEY, J. N. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. **Mental retardation and developmental disabilities research reviews**, 10(4), 248-258. 2004.

CRESON, T., ROJAS, C., HWAUN, E., VAISSIERE, T., KILINC, M., HOLDER, J. L., ... & RUMBAUGH, G. Re-expression of SynGAP Protein in Adulthood Improves Translatable Measures of Brain Function and Behavior in a Model of Neurodevelopmental Disorders. **bioRxiv**, 474965. 2018.

DAUTENHAHN, K. & WERRY, I. Towards interactive robots in autism therapy: Background, motivation and challenges. **Pragmatics & Cognition**, v. 12, n. 1, p. 1-35, 2004.

DAWSON G., WEBB S. J., WIJSMAN E., SCHELLENBERG G., ESTES A., MUNSON J. & FAJA S. Neurocognitive and electrophysiological evidence of altered face processing in

parents of children with autism: implications for a model of abnormal development of social brain circuitry in autism. **Development of Psychopathology**. 2005; 17:679–697. [PubMed: 16262987]. 2005.

DE ANGELIS, M., PICCOLO, M., VANNINI, L., SIRAGUSA, S., DE GIACOMO, A., SERRAZZANETTI, D. I., ... & FRANCAVILLA, R. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. **PloS one**, 8(10), e76993. 2013.

DE LA TORRE-UBIETA, L., WON, H., STEIN, J. L., & GESHWIND, D. H. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. **Nature medicine**, 22(4), 345, 2016.

DELLOTIERIE, D., RUIZ, G., BROCARD, J., SCHWEITZER, A., ROUCARD, C., ROCHE, Y., ... & ANDRIEUX, A. Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. **Psychopharmacology**, 208(1), 131, 2010.

DEMURIE E., ROEYERS H., BAEYENS D. & SONUGA-BARKE E. Common alterations in sensitivity to type but not amount of reward in ADHD and autism spectrum disorders. **Journal of Child Psychology and Psychiatry** 52:1164–1173. 2011

DENEAULT, E., FAHEEM, M., WHITE, S. H., RODRIGUES, D. C., SUN, S., WEI, W., ... & KWAN, V. CNTN5-/+ or EHMT2-/+ human iPSC-derived neurons from individuals with autism develop hyperactive neuronal networks. **eLife**, 8, e40092. 2019.

DILIBERTI J., FARNDON P., DENNIS N. & CURRY C. The fetal valproate syndrome. **American Journal of Medical Genetics** 19(3):473-81. 1984.

DOLSKE, M.C., SPOLLEN, J., MC KAY, S., LANCASHIRE, E., & TOLBERT, L. A preliminary trial of ascorbic acid as supplemental therapy for autism. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 17, n. 5, p. 765-774, 1993.

DURAND, C. M., BETANCUR, C., BOECKERS, T. M., BOCKMANN, J., CHASTE, P., FAUCHEREAU, F., ... & SPONHEIM, E. Mutations in the gene encoding the synaptic

scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. **Nature genetics**, **39**(1), 25. 2007.

DRAPER, H. H., & HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In **Methods in enzymology** (Vol. 186, pp. 421-431). Academic press, 1990.

EASTWOOD, S.L.; HARRISON, P.J. Synaptic pathology in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and mood disorders. A review and a Western blot study of synaptophysin, GAP-43 and the complexins. **Brain research bulletin**, v. 55, n. 5, p. 569-578, 2001.

EILAM, D. & GOLANI, I. The ontogeny of exploratory behavior in the house rat (*Rattus rattus*): the mobility gradient. **Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology**, v. 21, n. 7, p. 679-710, 1988.

ELSABBAGH, M., DIVAN, G., KOH, Y. J., KIM, Y. S., KAUCHALI, S., MARCÍN, C., & YASAMY, M. T. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. **Autism Research**, **5**(3), 160-179. 2012.

EMMANOUIL-NIKOLOUSSI, E. N., FOROGLOU, N. G., KERAMEOS-FOROGLOU, C. H., & THLIVERIS, J. A. Effect of valproic acid on fetal and maternal organs in the mouse: a morphological study. **Morphologie**, **88**(280), 41-45. 2004.

FAHERTY, C. J.; KERLEY, D.; SMEYNE, R. J. A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. **Developmental Brain Research**, v. 141, n. 1-2, p. 55-61, 2003.

FORD, T. C.; CREWETHER, D. P.; ABU-AKEL, A. Psychosocial deficits across autism and schizotypal spectra are interactively modulated by excitatory and inhibitory neurotransmission. **Autism**, p. 1362361319866030, 2019.

FRIAS, C. P., LIANG, J., BRESSER, T., SCHEEFHALS, L., VAN KESTEREN, M., VAN DORLAND, R., ... & WIERENGA, C. J. Semaphorin4D induces inhibitory synapse formation by rapid stabilization of presynaptic boutons via MET co-activation. **Journal of Neuroscience**, 0215-19. 2019.

FROEHLICH-SANTINO, W., TOBON, A. L., CLEVELAND, S., TORRES, A., PHILLIPS, J., COHEN, B., & SMITH, K. (2014). Prenatal and perinatal risk factors in a twin study of autism spectrum disorders. **Journal of Psychiatric Research**, *54*, 100-108. 2014.

FUENTEALBA, C. R., FIEDLER, J. L., PERALTA, F. A., AVALOS, A. M., AGUAYO, F. I., MORGADO-GALLARDO, K. P., & ALIAGA, E. E. Region-specific reduction of BDNF protein and transcripts in the hippocampus of juvenile rats prenatally treated with sodium valproate. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, *12*, 2019.

GALLESE, V.; EAGLE, M. N. & MIGONE, P. Intentional attunement: Mirror neurons and the neural underpinnings of interpersonal relations. **Journal of the American psychoanalytic Association**, v. 55, n. 1, p. 131-175, 2007.

GARCIA-PEÑAS, J. J. Autismo, epilepsia y patología del lóbulo temporal. **Revista de Neurología**, *48*, 35-45. 2009.

GARDENER, H., SPIEGELMAN, D., & BUKA, S. L. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. **Pediatrics**, peds-2010. 2011.

GEYER, M. A., WILKINSON, L. S., HUMBY, T., & ROBBINS, T. W. Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, *34*(6), 361-372. 1993.

GILBERT, J. & MAN, H.Y. Fundamental elements in autism: from neurogenesis and neurite growth to synaptic plasticity. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, p. 359, 2017.

GIORDANO, A. L.; SIEGEL, H. I. & ROSENBLATT, J. S. Effects of mother-litter separation and reunion on maternal aggression and pup mortality in lactating hamsters. **Physiology & behavior**, v. 33, n. 6, p. 903-906, 1984.

GOEL, R., HONG, J. S., FINDLING, R. L., & Ji, N. Y. An update on pharmacotherapy of autism spectrum disorder in children and adolescents. **International review of psychiatry**, *30*(1), 78-95, 2018.

GOGOLLA, N., LEBLANC, J. J., QUAST, K. B., SÜDHOF, T. C., FAGIOLINI, M., & HENSCH, T. K. Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. **Journal of neurodevelopmental disorders**, 1(2), 172. 2009.

GOH, S.; PETERSON, B. S. Imaging evidence for disturbances in multiple learning and memory systems in persons with autism spectrum disorders. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 54, n. 3, p. 208-213, 2012.

GONCHAR, Y., WANG, Q., & BURKHALTER, A. H. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. **Frontiers in neuroanatomy**, 2, 3. 2008.

GOTTESMAN, I. I. & GOULD, T.D. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. **American journal of psychiatry**, v. 160, n. 4, p. 636-645, 2003.

GRANT, S. & FITTON, A. Risperidone. **Drugs**, v. 48, n. 2, p. 253-273, 1994.

GREEN, S. A.; HERNANDEZ, L., TOTTENHAN, N., KRASILEVA, K., BOOKHEIMER, S. Y., & DAPRETTO, M. Neurobiology of sensory overresponsivity in youth with autism spectrum disorders. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 8, p. 778-786, 2015.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., & TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, 126(1), 131-138, 1982.

GROVE, J.; RIPKE S., ALS, T. D., MATTHEISEN, M., WALTERS, R. K., WON, H., ... & AWASHTI, S. Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. **Nature genetics**, v. 51, n. 3, p. 431, 2019.

GU, X., ZHOU, T. J., ANAGNOSTOU, E., SOORYA, L., KOLEVZON, A., HOF, P. R., & FAN, J. Heightened brain response to pain anticipation in high-functioning adults with autism spectrum disorder. **European Journal of Neuroscience**, 47(6), 592-601. 2018.

GUANG, S., PANG, N., DENG, X., YANG, L., HE, F., WU, L., ... & PENG, J. Synaptopathology Involved in Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in cellular neuroscience**, *12*, 470, 2018.

GUASTELLA, A. J., EINFELD, S. L., GRAY, K. M., RINEHART, N. J., TONGE, B. J., LAMBERT, T. J., & HICKIE, I. B. Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. **Biological psychiatry**, *67*(7), 692-694. 2010.

GUO, Z., XIE, H. Q., ZHANG, P., LUO, Y., XU, T., LIU, Y., ... & ZHAO, B. Dioxins as potential risk factors for autism spectrum disorder. **Environment international**, *121*, 906-915. 2018.

GRUSON-WOOD, J. F. Autism, Expert Discourses, and Subjectification: A Critical Examination of Applied Behavioural Therapies. **Studies in Social Justice**, *10*(1). 2016.

HA, H. T., LEAL-ORTIZ, S., LALWANI, K., KIYONAKA, S., HAMACHI, I., MYSORE, S. P., ... & KIM, S. A. Shank and zinc mediate an AMPA receptor subunit switch in developing neurons. **Frontiers in molecular neuroscience**, *11*, 405. 2018.

HADJKACEM, I., AYADI, H., TURKI, M., YAICH, S., KHEMEKHEM, K., WALHA, A., & GHRIBI, F. Prenatal, perinatal and postnatal factors associated with autism spectrum disorder. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, *92*(6), 595-601. 2016.

HALL, C. S. Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. **Journal of Comparative Psychology**, *17*(1), 89. 1934.

HALL, F. S. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. **Critical Reviews™ in Neurobiology**, *12*(1-2). 1998.

HASHEMI, E., ARIZA, J., ROGERS, H., NOCTOR, S. C., & MARTÍNEZ-CERDEÑO, V. The number of parvalbumin-expressing interneurons is decreased in the medial prefrontal cortex in autism. **Cerebral cortex**, *27*(3), 1931-1943. 2017.

HIRSCH, M. M., DECKMANN, I., SANTOS-TERRA, J., STAEVIE, G. Z., FONTES-DUTRA, M., CARELLO-COLLAR, G., ... & GONÇALVES, M. C. Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acid-induced animal model of autism. **Neuropharmacology**, 107930, 2020.

HOFER, M. A. Survival and recovery of physiologic functions after early maternal separation in rats. **Physiology & behavior**, v. 15, n. 4, p. 475-480, 1975.

HOMBERG, J. R., SCHIEPERS, O. J., SCHOFFELMEER, A. N., CUPPEN, E., & VANDERSCHUREN, L. J. Acute and constitutive increases in central serotonin levels reduce social play behaviour in peri-adolescent rats. **Psychopharmacology**, v. 195, n. 2, p. 175, 2007.

HOSON R. & LEE A. Hello and Goodbye: A Study of Social Engagement in Autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders** 28:117–127. [PubMed: 9586774]. 1998.

HUTSLER, J. J., & ZHANG, H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. **Brain research**, 1309, 83-94. 2010.

IBRAHIM, K., EILBOTT, J. A., VENTOLA, P., HE, G., PELPHREY, K. A., MCCARTHY, G., & SUKHODOLSKY, D. G. (2019). Reduced Amygdala-Prefrontal Functional Connectivity in Children with Autism Spectrum Disorder and Co-Occurring Disruptive Behavior. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, 2019.

ICHINOHE, N., SANGI, T., SASAKI, T., MINAMIMOTO, T., & KOHSAKA, S. I. Segmented iba1-positive processes of microglia in autism model marmosets. **Frontiers in cellular neuroscience**, 13, 344, 2019.

INGIOSI, A. M., SCHOCH, H., WINTLER, T., SINGLETARY, K. G., RIGHELLI, D., ROSER, L. G., ... & PEIXOTO, L. Shank3 modulates sleep and expression of circadian transcription factors. **eLife**, 8, e42819. 2019.

INFANTE, M., SEARS, B., RIZZO, A. M., MARIANI CERATI, D., CAPRIO, M., RICORDI, C., & FABBRIO, A.. Omega-3 PUFAs and vitamin D co-supplementation as a safe-

effective therapeutic approach for core symptoms of autism spectrum disorder: case report and literature review. **Nutritional neuroscience**, p. 1-12, 2018.

INGRAM, J. L., STODGELL, C. J., HYMAN, S. L., FIGLEWICZ, D. A., WEITKAMP, L. R., & RODIER, P. M. Discovery of allelic variants of HOXA1 and HOXB1: genetic susceptibility to autism spectrum disorders. **Teratology**, 62(6), 393-405. 2000.

IZUMA K., MATSUMOTO K., CAMERER C.F. & ADOLPHS R. Insensitivity to social reputation in autism. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The USA**, 108:17302–17307. 2011.

JAFFEE, S. R. & PRICE, T. S. The implications of genotype–environment correlation for establishing causal processes in psychopathology. **Development and Psychopathology**, v. 24, n. 4, p. 1253-1264, 2012.

JANECKA, M., HANSEN, S. N., MODABBERNIA, A., BROWNE, H. A., BUXBAUM, J. D., SCHENDEL, D. E., ... & GRICE, D. E. Parental Age and Differential Estimates of Risk for Neuropsychiatric Disorders: Findings From the Danish Birth Cohort. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**. 2019.

JI, N. Y., & FINDLING, R. L. An update on pharmacotherapy for autism spectrum disorder in children and adolescents. **Current opinion in psychiatry**, 28(2), 91-101. 2015.

JONES, W. & KLIN, A.. Attention to eyes is present but in decline in 2–6-month-old infants later diagnosed with autism. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 427, 2013.

KAIDANOVICH-BEILIN, O., LIPINA, T., VUKOBRADOVIC, I., RODER, J., & WOODGETT, J. R. Assessment of social interaction behaviors. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, (48). 2011.

KAMBALI, M. Y., ANSHU, K., KUTTY, B. M., MUDDASHETTY, R. S., & LAXMI, T. R. Effect of early maternal separation stress on attention, spatial learning and social interaction behaviour. **Experimental brain research**, 1-18, 2019.

KANG, D.W., ADAMS, J. B., GREGORY, A. C., BORODY, T., CHITTICK, L., FASANO, A., ... & POLLARD, E. L.. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 10, 2017.

KANNER L. Autistic disturbances of affective contact. **Pathology**, 34. 1943.

KAZDOBA, T. M.; LEACH, P. T. & CRAWLEY, J. N. Behavioral phenotypes of genetic mouse models of autism. **Genes, Brain and Behavior**, v. 15, n. 1, p. 7-26, 2016.

KELLER, R., BASTA, R., SALERNO, L., & ELIA, M. Autism, epilepsy, and synaptopathies: a not rare association. **Neurological Sciences**, 38(8), 1353-1361, 2017.

KENDLER, K. S., & NEALE, M. C. Endophenotype: a conceptual analysis. **Molecular psychiatry**, 15(8), 789-797, 2010.

KIM, J. W.; HONG, J. Y.; BAE, S. M. Microglia and autism spectrum disorder: Overview of current evidence and novel immunomodulatory treatment options. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 246, 2018.

KIRKHAM, P. 'The line between intervention and abuse'—autism and applied behaviour analysis. **History of the Human Sciences**, 30(2), 107-126. 2017.

KIRSTEN T. B., TARICANO M., MAIORKA P.C., PALERMO-NETO J. & BERNARDI M. M. Pre-natal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, 17:240-51. 2010.

KIRSTEN, T. B., CHAVES-KIRSTEN, G. P., CHAIBLE, L. M., SILVA, A. C., MARTINS, D. O., BRITTO, L. R., & BERNARDI, M. M. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of Neuroscience Research**, 90(10), 1903-1912. 2012.

KISHIDA, K. T., DE ASIS-CRUZ, J., TREADWELL-DEERING, D., LIEBENOW, B., BEAUCHAMP, M. S., & MONTAGUE, P. R. Diminished single-stimulus response in

vmPFC to favorite people in children diagnosed with Autism Spectrum Disorder. **Biological psychology**. 2019.

KLAUCK, S. M. Genetics of autism spectrum disorder. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, n. 6, p. 714, 2006.

KLIN A., JONES W., SCHULTZ R., VOLKMAR F. & COHEN D. Visual Fixation Patterns During Viewing of Naturalistic Social Situations as Predictors of Social Competence in Individuals With Autism. **Archives of General Psychiatry**, 59:809– 816. [PubMed: 12215080]. 2002.

KOYAMA, R. & IKEGAYA, Y. Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders. **Neuroscience research**, v. 100, p. 1-5, 2015.

LAGERCRANTZ, H. Are extremely preterm born children with autism the victims of too much isolation in the incubator?. **Acta Paediatrica**, v. 106, n. 8, p. 1246-1247, 2017.

LAI, M., LOMBARDO, M.V. & BARON-COHEN S. Autism. **The Lancet**, 383, 896-910, 2014.

LAMMERT, C. R., FROST, E. L., BOLTE, A. C., PAYSOUR, M. J., SHAW, M. E., BELLINGER, C. E., ... & LUKENS, J. R. Cutting edge: critical roles for microbiota-mediated regulation of the immune system in a prenatal immune activation model of autism. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 3, p. 845-850, 2018.

LAMY, Martine; ERICKSON, Craig A. Pharmacological management of behavioral disturbances in children and adolescents with autism spectrum disorders. **Current problems in pediatric and adolescent health care**, v. 48, n. 10, p. 250-264, 2018.

LANGFORD, D. J., CRAGER, S. E., SHEHZAD, Z., SMITH, S. B., SOTOCINAL, S. G., LEVENSTADT, J. S., ... & MOGIL, J. S. Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science*, 312(5782), 1967-1970, 2006.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the rat. **Physiology & Behavior**, 73(3), 255-260. 2001.

LI, Y.J.; ZHANG, X. & LI, Y. M. Antineuroinflammatory therapy: potential treatment for autism spectrum disorder by inhibiting glial activation and restoring synaptic function. **CNS spectrums**, p. 1-9, 2019.

LIEBAL K., COLOMBI C., ROGERS S. J., WARNEKEN F. & TOMASELLO M. Helping and cooperation in children with autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, 38:224–238. [PubMed: 17694374]. 2008.

LORES-ARNAIZ, S., BUSTAMANTE, J., ARISMENDI, M., VILAS, S., PAGLIA, N., BASSO, N., ... & ARNAIZ, M. L. Extensive enriched environments protect old rats from the aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production. **Behavioural brain research**, 169(2), 294-302. 2006.

MAMIDALA, M. P., POLINEDI, A., PTV, P. K., RAJESH, N., VALLAMKONDA, O. R., UDANI, V., & RAJESH, V. Prenatal, perinatal and neonatal risk factors of Autism Spectrum Disorder: a comprehensive epidemiological assessment from India. **Research in Developmental Disabilities**, 34(9), 3004-3013. 2013.

MANDELL, D. S., NOVAK, M. M., & ZUBRITSKY, C. D. Factors associated with age of diagnosis among children with autism spectrum disorders. **Pediatrics**, 116(6), 1480-1486. 2005.

MANDY, W. & LAI, M. C. Annual Research Review: The role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 57, n. 3, p. 271-292, 2016.

MARKRAM, H., RINALDI, T., & MARKRAM, K. The intense world syndrome-an alternative hypothesis for autism. **Frontiers in neuroscience**, 1, 77 -96. 2007.

MARTINEZ, R., GARCIA, A. M. B., & MORATO, S. Role of vivarium illumination in rat behavior in the elevated plus-maze. **Estudos de Psicologia (Natal)**, 10(2), 239-245. 2005.

MCCLELLAN, Jon M.; WERRY, John S.; HAM, Mark. A follow-up study of early onset psychosis: comparison between outcome diagnoses of schizophrenia, mood disorders, and personality disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 23, n. 2, p. 243-262, 1993.

MEANEY, M. J.; STEWART, J. A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). **Animal Behaviour**, v. 29, n. 1, p. 34-45, 1981.

MELTZER, A. & VAN DE WATER, J. The role of the immune system in autism spectrum disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 284, 2017.

MEYER U., YEE B.K. & FELDON J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? **Neuroscientist**,13:241-56. 2007.

MILLWARD, C., FERRITER, M., CALVER, S. J., & CONNELL-JONES, G. G. Gluten-and casein-free diets for autistic spectrum disorder. **The Cochrane Library**. 2008.

MIYAKE, K., HIRASAWA, T., KOIDE, T., & KUBOTA, T. Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases. In **Neurodegenerative diseases** (pp. 91-98). Springer, New York, NY, 2012.

MODI, M.E. & YOUNG, L.J. The oxytocin system in drug discovery for autism: Animal models and novel therapeutic strategies. **Hormones and Behavior**, 10.1016/j.yhbeh.2011.12.010. 2011.

MOHAMMED, A.H., ZHU, S. W., DARMOPIL, S., HJERLING-LEFFLER, J., ERNFORS, P., WINBLAD, B., ... & BOGDANOVIC, N.. Environmental enrichment and the brain. In: **Progress in brain research**, p. 109-133, Elsevier, 2002.

MONTEIRO, P.; FENG, G.. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 147, 2017.

MORGAN, J. T., CHANA, G., PARDO, C. A., ACHIM, C., SEMENDEFERI, K., BUCKWALTER, J., ... & EVERALL, I. P. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. **Biological psychiatry**, 68(4), 368-376, 2010.

MUDY, P. & NEAL, A. Neural plasticity, joint attention, and a transactional social-orienting model of autism. **International Review of Research in Mental Retardation**, 23:139–168. 2001.

NADEBAUM, C., ANDERSON, V. A., VAJDA, F., REUTENS, D. C., BARTON, S., & WOOD, A. G. Language skills of school-aged children prenatally exposed to antiepileptic drugs. **Neurology**, 76(8), 719-726. 2011.

NAKANO T., KYOKO T., YUUKI E., YUI Y., TAKAHIRO Y., YOSHIKI N., OHTA H, KATO N. & KITAZAWA S. Atypical gaze patterns in children and adults with autism spectrum disorders dissociated from developmental changes in gaze behaviour. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, 277:2935–2943. 2010.

NEVES, S. M. P. Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da. **São Paulo: Universidade de São Paulo**, 2013.

NG, E., GEORGIU, J., AVILA, A., TROUGHT, K., MUN, H. S., HODGSON, M., ... & WONG, A. H. Mice lacking Neuronal Calcium Sensor-1 show social and cognitive deficits. **Behavioural Brain Research**, 112420, 2019.

NICOLINI, C., & FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Experimental Neurology** In press. 2017.

NITHIANANTHARAJAH, J.; HANNAN, A. J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 697, 2006.

NYE, C., & BRICE, A. Combined vitamin B6-magnesium treatment in autism spectrum disorder. **The Cochrane Library**. 2005.

O'REILLY, Christian; LEWIS, John D.; ELSABBAGH, Mayada. Is functional brain connectivity atypical in autism? A systematic review of EEG and MEG studies. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0175870, 2017.

OSTERLING J. A., DAWSON G. & MUNSON J. A. Early recognition of 1-year-old infants with autism spectrum disorder versus mental retardation. **Development of Psychopathology**, 14:239–251. [PubMed: 12030690]. 2002.

PADOIN, M. J., CADORE, L. P., GOMES, C. M., BARROS, H. M. T., & LUCION, A. B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behavioral neuroscience**, 115(6), 1332, 2001.

PAGANI, M., BERTERO, A., LISKA, A., GALBUSERA, A., SABBIONI, M., BARSOTTI, N., ... & GOZZI, A. Deletion of autism risk gene Shank3 disrupts prefrontal connectivity. **Journal of Neuroscience**, 2529-18, 2019.

PAGANI, M., DE FELICE, A., MONTANI, C., GALBUSERA, A., PAPALEO, F., & GOZZI, A. Acute and repeated intranasal oxytocin differentially modulate brain-wide functional connectivity. **Neuroscience**, 2020.

PANKSEPP, J. B.; LAHVIS, G.P. Rodent empathy and affective neuroscience. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 9, p. 1864-1875, 2011.

PARDO, C. A., & EBERHART, C. G. The neurobiology of autism. **Brain Pathology**, 17(4), 434-447. 2007.

PARKER, W., HORNIK, C. D., BILBO, S., HOLZKNECHT, Z. E., GENTRY, L., RAO, R., ... & NEVISON, C. D. The role of oxidative stress, inflammation and acetaminophen exposure from birth to early childhood in the induction of autism. **Journal of International Medical Research**, 45(2), 407-438, 2017.

PATTERSON, P. H. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. **Current Opinion in Neurobiology**, 12(1), 115-118. 2002.

PAULA, C.; FOMBONNE, E.; GADIA, C.; TUCHMAN, R. & ROSANOFF, M. Autism in Brazil: perspectives from science and society. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 2-5, 2011.

PELTON, M. K., & CASSIDY, S. A. Are autistic traits associated with suicidality? A test of the interpersonal-psychological theory of suicide in a non-clinical young adult sample. **Autism research**, 10(11), 1891-1904. 2017.

PEÑAGARIKANO, O., ABRAHMS, B. S., HERMAN, E. I., WINDEN, K. D., GDALYAHU, A., DONG, H., ... & GOLSHANI, P. Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. **Cell**, 147(1), 235-246, 2011.

PIERCE K., CONANT D. HAZIN R., STONER R. & DESMOND J. Preference for geometric patterns early in life as a risk factor for autism. **Archives of General Psychiatry**, 68:101–109. 2011.

PIERCE, K., GAZESTANI, V. H., BACON, E., BARNES, C. C., CHA, D., NALABOLU, S., ... & COURCHESNE, E. Evaluation of the Diagnostic Stability of the Early Autism Spectrum Disorder Phenotype in the General Population Starting at 12 Months. **JAMA pediatrics**. 2019.

PINEDA, R. G., NEIL, J., DIERKER, D., SMYSER, C. D., WALLENDORF, M., KIDOKORO, H., ... & VAN ESSEN, D. C. Alterations in brain structure and neurodevelopmental outcome in preterm infants hospitalized in different neonatal intensive care unit environments. **The Journal of pediatrics**, 164(1), 52-60, 2014.

PRATA, J., SANTOS, S. G., ALMEIDA, M. I., COELHO, R., & BARBOSA, M. A. Bridging Autism Spectrum Disorders and Schizophrenia through inflammation and biomarkers-pre-clinical and clinical investigations. **Journal of neuroinflammation**, 14(1), 179, 2017.

PRESTON, S. D. & DE WAAL, F. B. M. Empathy: Its ultimate and proximate bases. **Behavioral and brain sciences**, v. 25, n. 1, p. 1-20, 2002.

QUARTIER, A., CHATROUSSE, L., REDIN, C., KEIME, C., HAUMESSER, N., MAGLOTT-ROTH, A., ... & PITON, A. Genes and pathways regulated by androgens in human neural cells, potential candidates for the male excess in autism spectrum disorder. **Biological psychiatry**, 84(4), 239-252. 2018.

QUATTROCKI, E., & FRISTON, K. Autism, oxytocin and interoception. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 47, 410-430, 2014.

QUINCOZES-SANTOS, A., BOBERMIN, L. D., TONIAL, R. P. L., BAMBINI-JUNIOR, V., RIESGO, R., & GOTTFRIED, C. Effects of atypical (risperidone) and typical (haloperidol) antipsychotic agents on astroglial functions. **European archives of psychiatry and clinical neuroscience**, 260(6), 475-481, 2010.

RATTO, A. B., KENWORTHY, L., YERYS, B. E., BASCOM, J., WIECKOWSKI, A. T., WHITE, S. W., ... & SCARPA, A. What about the girls? Sex-based differences in autistic traits and adaptive skills. **Journal of autism and developmental disorders**, 48(5), 1698-1711. 2018.

REED, M. D., YIM, Y. S., WIMMER, R. D., KIM, H., RYU, C., WELCH, G. M., ... & HUH, J. R IL-17a promotes sociability in mouse models of neurodevelopmental disorders. *Nature*, 1-5, 2019.

REICHOW, B., & VOLKMAR, F. R. Social skills interventions for individuals with autism: Evaluation for evidence-based practices within a best evidence synthesis framework. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, 40(2), 149-166. 2010.

REICHOW, B., STEINER, A. M., & VOLKMAR, F. Cochrane review: social skills groups for people aged 6 to 21 with autism spectrum disorders (ASD). **Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal**, 8(2), 266-315. 2013.

REINWALD, J. R., BECKER, R., MALLIEN, A. S., FALFAN-MELGOZA, C., SACK, M., VON HOHENBERG, C. C., ... & TOLLENS, F. Neural mechanisms of early-life social stress as a developmental risk factor for severe psychiatric disorders. **Biological psychiatry**, 84(2), 116-128, 2018.

REYNOLDS, S.; URRUELA, M. & DEVINE, D. P. Effects of environmental enrichment on repetitive behaviors in the BTBR T+ tf/J mouse model of autism. **Autism Research**, v. 6, n. 5, p. 337-343, 2013.

RIBY D.M. & HANCOCK P.J.B. Viewing it differently: Social scene perception in Williams syndrome and autism. **Neuropsychologia**, 46:2855–2860. [PubMed: 18561959]. 2008.

RINALDI, T., PERRODIN, C., & MARKRAM, H. Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic acid animal model of autism. **Frontiers in neural circuits**, 2, 4. 2008.

RIZZOLATTI, G. & FABBRI-DESTRO, M. Mirror neurons: from discovery to autism. **Experimental brain research**, v. 200, n. 3-4, p. 223-237, 2010.

RIOS, C. & ANDRADA, B. C. The changing face of autism in Brazil. **Culture, Medicine, and Psychiatry**, v. 39, n. 2, p. 213-234, 2015.

ROBERT, E., & ROSA, F. Valproate and birth defects. **The Lancet**, 322(8359), 1142. 1983.

ROBBINS, T. W., JONES, G. H., & WILKINSON, L. S. Behavioural and neurochemical effects of early social deprivation in the rat. **Journal of Psychopharmacology**, 10(1), 39-47. 1996.

ROSALES, V. P., IKEDA, K., HIZAKI, K. O., NARUO, T., NOZOE, S. I., & ITO, G. Emotional stress and brux-like activity of the masseter muscle in rats. **The European Journal of Orthodontics**, 24(1), 107-117, 2002.

ROSSI, C., ANGELUCCI, A., CONSTANTIN, L., BRASCHI, C., MAZZANTINI, M., BABBINI, F., ... & CALEO, M. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the

enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, 24(7), 1850-1856, 2006.

SAGHAZADEH, A., ATAEINIA, B., KEYNEJAD, K., ABDOLALIZADEH, A., HIRBOD-MOBARAKEH, A., & REZAEI, N. Anti-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. **Cytokine**, 123, 154740, 2019.

SALE, A., CENNI, M. C., CIUCCI, F., PUTIGNANO, E., CHIERZI, S., & MAFFEI, L. Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. **PLoS One**, 2(11), e1160, 2007.

SCHAFFER, S. T., PAQUOLA, A. C., STERN, S., GOSSELIN, D., KU, M., PENA, M., ... & MARCHETTO, M. C. Pathological priming causes developmental gene network heterochronicity in autistic subject-derived neurons. **Nature neuroscience**, 22(2), 243. 2019.

SCHANK, J. C. The development of locomotor kinematics in neonatal rats: an agent-based modeling analysis in group and individual contexts. **Journal of Theoretical Biology**, v. 254, n. 4, p. 826-842, 2008.

SCHANK, J.C. & ALBERTS, J. R. The developmental emergence of coupled activity as cooperative aggregation in rat pups. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1459, p. 2307-2315, 2000.

SCHLEIDER, L. B. L., MECHOULAM, R., SABAN, N., MEIRI, G., & NOVACK, V. Real life Experience of Medical Cannabis Treatment in Autism: Analysis of Safety and Efficacy. **Scientific reports**, 9(1), 200. 2019.

SCHNEIDER, T., & PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, 30(1), 80-89. 2005.

SCHRIJVER, N. C., BAHR, N. I., WEISS, I. C., & WÜRBEL, H. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 73(1), 209-224. 2002.

SCHULTZ, R. Developmental deficits in social perception in autism: the role of the amygdala and fusiform face area. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 23:125–141. [PubMed: 15749240]. 2005.

SHAMAY-TSOORY, S. G. The neural bases for empathy. **The Neuroscientist**, v. 17, n. 1, p. 18-24, 2011.

SILVERMAN, J. L., TOLU, S. S., BARKAN, C. L., & CRAWLEY, J. N. Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP. **Neuropsychopharmacology**, 35(4), 976-989. 2010.

SIMONOFF, E., PICKLES, A., CHARMAN, T., CHANDLER, S., LOUCAS, T., & BAIRD, G. Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, 47(8), 921-929. 2008.

SMITH S. E. P, LI J., GARBETT K, MIRNICS K. & PATTERSON P.H. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. **Journal of Neuroscience**, 27:10695-702. 2007.

SOLOMON, A. H. & CHUNG, B. Understanding autism: How family therapists can support parents of children with autism spectrum disorders. **Family process**, v. 51, n. 2, p. 250-264, 2012.

STRATI, F., CAVALIERI, D., ALBANESE, D., DE FELICE, C., DONATI, C., HAYEK, J., ... & DE FILIPPO, C. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. **Microbiome**, 5(1), 24, 2017.

SÜDHOF, T. C. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 903-911, 2008.

SUN, H., TAKESIAN, A. E., WANG, T. T., LIPPMAN-BELL, J. J., HENSCH, T. K., & JENSEN, F. E. Early seizures prematurely unsilence auditory synapses to disrupt thalamocortical critical period plasticity. **Cell reports**, 23(9), 2533-2540. 2018.

SWEETEN, T. L., POSEY, D. J., SHEKHAR, A., & MC DOUGLE, C. J. The amygdala and related structures in the pathophysiology of autism. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, *71*(3), 449-455, 2002.

TAN, T., WANG, W., XU, H., HUANG, Z., WANG, Y. T., & DONG, Z. Low-frequency rTMS ameliorates autistic-like behaviors in rats induced by neonatal isolation through regulating the synaptic GABA transmission. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, *12*, 46, 2018.

TOMOVA, A., HUSAROVA, V., LAKATOSOVA, S., BAKOS, J., VLKOVA, B., BABINSKA, K., & OSTATNIKOVA, D. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. **Physiology & behavior**, *138*, 179-187, 2015.

TUCHMAN, R., & RAPIN, I. Epilepsy in autism. **The Lancet Neurology**, *1*(6), 352-358. 2002.

TUCHMAN, R., & CUCCARO, M. Epilepsy and autism: neurodevelopmental perspective. **Current neurology and neuroscience reports**, *11*(4), 428-434. 2011.

TURBÉ, H.; WAECKEL, L. & DECHELOTTE, B. Overview of prospects for inflammation pathways in autism spectrum disorders. **L'Encéphale**, 2019.

TURK, J., BAX, M., WILLIAMS, C., AMIN, P., ERIKSSON, M., & GILLBERG, C. Autism spectrum disorder in children with and without epilepsy: impact on social functioning and communication. **Acta Paediatrica**, *98*(4), 675-681. 2009.

UCHIDA, S., KATO, Y., HIRANO, K., KAGAWA, Y., & YAMADA, S. Brain neurotransmitter receptor-binding characteristics in rats after oral administration of haloperidol, risperidone and olanzapine. **Life sciences**, *80*(17), 1635-1640, 2007.

VAN DEN BERGH, B. R., VAN DEN HEUVEL, M. I., LAHTI, M., BRAEKEN, M., DE ROOIJ, S. R., ENTRINGER, S., ... & SCHWAB, M. Prenatal developmental origins of

behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 2017.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromolecular medicine**, v. 10, n. 2, p. 128-140, 2008.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G. & GAGE, F. H. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191, 2000.

VAN SPRONSEN, M.; HOOGENRAAD, C. C. Synapse pathology in psychiatric and neurologic disease. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 10, n. 3, p. 207-214, 2010.

VARGAS, J., JUNCO, M., GOMEZ, C., & LAJUD, N. Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with postweaning social isolation in rats. **PloS one**, 11(9), e0162665, 2016.

VARGAS, D. L., NASCIMBENE, C., KRISHNAN, C., ZIMMERMAN, A. W., & PARDO, C. A. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, 57(1), 67-81, 2005.

VARLINSKAYA, E. I. & SPEAR, L. P. Social interactions in adolescent and adult Sprague–Dawley rats: impact of social deprivation and test context familiarity. **Behavioural brain research**, v. 188, n. 2, p. 398-405, 2008.

VELMESHEV, D., SCHIRMER, L., JUNG, D., HAEUSSLER, M., PEREZ, Y., MAYER, S., ... & KRIEGSTEIN, A. R. Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. **Science**, 364(6441), 685-689. 2019.

VISMARA, L. A., & ROGERS, S. J. Behavioral treatments in autism spectrum disorder: what do we know?. **Annual review of clinical psychology**, 6, 447-468. 2010.

VOLKMAR, F. R., & REICHOW, B. Autism in DSM-5: progress and challenges. **Molecular Autism**, 4(1), 13. 2013.

VORHEES, C. V. Behavioral teratogenicity of valproic acid: selective effects on behavior after prenatal exposure to rats. **Psychopharmacology**, 92(2), 173-179. 1987.

VORSTMAN, J. A., PARR, J. R., MORENO-DE-LUCA, D., ANNEY, R. J., NURNBERGER Jr, J. I., & HALLMAYER, J. F. Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. **Nature Reviews Genetics**, 18(6), 362, 2017.

WAN, M. W., GREEN, J., ELSABBAGH, M., JOHNSON, M., CHARMAN, T., PLUMER, F., & BASIS Team. Parent–infant interaction in infant siblings at risk of autism. **Research in developmental disabilities**, 33(3), 924-932, 2012.

WARD, I. L.; STEHM, K. E. Prenatal stress feminizes juvenile play patterns in male rats. **Physiology & behavior**, v. 50, n. 3, p. 601-605, 1991.

WARWICK, A. & ALVIN, J.. **Music therapy for the autistic child**. Oxford University Press, 1991.

WHITE, S. W., OSWALD, D., OLLENDICK, T., & SCAHILL, L. Anxiety in children and adolescents with autism spectrum disorders. **Clinical Psychology Review**, 29(3), 216-229. 2009.

WILLIAMS, G., KING, J., CUNNINGHAM, M., STEPHAN, M., KERR, B., & HERSH, J. H. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Developmental medicine and child neurology*, 43(3), 202-206, 2001.

WIN-SHWE, T. T., NWAY, N. C., IMAI, M., LWIN, T. T., MAR, O., & WATANABE, H. Social behavior, neuroimmune markers and glutamic acid decarboxylase levels in a rat model of valproic acid-induced autism. **The Journal of toxicological sciences**, 43(11), 631-643, 2018.

WÖHR, M., ORDUZ, D., GREGORY, P., MORENO, H., KHAN, U., VÖRCKEL, K. J., ... & SCHWALLER, B. Lack of parvalbumin in mice leads to behavioral deficits relevant to all human autism core symptoms and related neural morphofunctional abnormalities. **Translational psychiatry**, 5(3), e525. 2015.

WONG, H. H. L & SMITH, R. G. Patterns of complementary and alternative medical therapy use in children diagnosed with autism spectrum disorders. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 36, n. 7, p. 901-909, 2006.

WOO, C. C., DONNELLY, J. H., STEINBERG-EPSTEIN, R., & LEON, M. Environmental enrichment as a therapy for autism: a clinical trial replication and extension. *Behavioral neuroscience*, 129(4), 412, 2015.

WU, X., BAI, Y., TAN, T., LI, H., XIA, S., CHANG, X., ... & DONG, Z. Lithium ameliorates autistic-like behaviors induced by neonatal isolation in rats. **Frontiers in behavioral neuroscience**, 8, 234. 2014.

WU, L., FENG, X., LI, T., SUN, B., KHAN, M. Z., & HE, L. Risperidone ameliorated A β 1-42-induced cognitive and hippocampal synaptic impairments in mice. **Behavioural brain research**, 322, 145-156, 2017.

XU, X., ROBY, K. D., & CALLAWAY, E. M. Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. **Journal of Comparative Neurology**, 518(3), 389-404. 2010.

YAMAMURO, T., SENZAKI, K., IWAMOTO, S., NAKAGAWA, Y., HAYASHI, T., HORI, M., ... & URAYAMA, O. Neurogenesis in the dentate gyrus of the rat hippocampus enhanced by tickling stimulation with positive emotion. **Neuroscience research**, 68(4), 285-289, 2010.

YAN, B. C., PARK, J. H., AHN, J. H., KIM, I. H., PARK, O. K., LEE, J. C., ... & PARK, J. H. Neuroprotection of posttreatment with risperidone, an atypical antipsychotic drug, in rat and gerbil models of ischemic stroke and the maintenance of antioxidants in a gerbil model of ischemic stroke. **Journal of neuroscience research**, 92(6), 795-807, 2014.

YANG, M., PERRY, K., WEBER, M. D., KATZ, A. M., & CRAWLEY, J. N. Social peers rescue autism-relevant sociability deficits in adolescent mice. **Autism Research**, 4(1), 17-27, 2011.

YATES, N. J., TESIC, D., FEINDEL, K. W., SMITH, J. T., CLARKE, M. W., WALE, C., ... & WYRWOLL, C. S. Vitamin D is crucial for maternal care and offspring social behaviour in rats. **Journal of Endocrinology**, 237(2), 73-85. 2018.

YU, W., YEN, Y. C., LEE, Y. H., TAN, S., XIAO, Y., LOKMAN, H., ... & JE, H. S. Prenatal selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) exposure induces working memory and social recognition deficits by disrupting inhibitory synaptic networks in male mice. **Molecular brain**, 12(1), 29. 2019.

YUI, K., KAWASAKI, Y., YAMADA, H., & OGAWA, S. Oxidative stress and nitric oxide in autism spectrum disorder and other neuropsychiatric disorders. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)**, 15(5), 587-596, 2016.

ZHAO, H., WANG, Q., YAN, T., ZHANG, Y., XU, H. J., YU, H. P., ... & ZHOU, H. Maternal valproic acid exposure leads to neurogenesis defects and autism-like behaviors in non-human primates. **Translational psychiatry**, 9(1), 1-13, 2019.

ZHOU, Y., QIU, L., STERPKA, A., WANG, H., CHU, F., & CHEN, X. Comparative Phosphoproteomic Profiling of Type III Adenylyl Cyclase Knockout and Control, Male, and Female Mice. **Frontiers in cellular neuroscience**, 13. 2019.

ZUGNO, A. I., DE MIRANDA, I. M., BUDNI, J., VOLPATO, A. M., LUCA, R. D., DEROZA, P. F., & MASTELLA, G. A. Effect of maternal deprivation on acetylcholinesterase activity and behavioral changes on the ketamine-induced animal model of schizophrenia. **Neuroscience**, 248, 252-260. 2013.