LUANA CARVALHO CEZAR

**Zinco como terapia no modelo experimental de autismo induzido
pré-natalmente pelo ácido valpróico**

São Paulo

2016

LUANA CARVALHO CEZAR

Zinco como terapia no modelo experimental de autismo induzido pré-natalmente pelo ácido valpróico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

Co-orientador:

Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3403
FMVZ

Cezar, Luana Carvalho
Zinco como terapia no modelo experimental de autismo induzido pré-natalmente pelo ácido valpróico / Luana Carvalho Cezar. -- 2016.
127 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felício.

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten.

1. VPA. 2. Deficiência de zinco. 3. Modelo animal. 4. Comportamentos tipo-autista. 5. Dopamina. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Zinco como terapia no modelo experimental de autismo induzido pré-natalmente pelo ácido valproílico", protocolado sob o CEUA nº 1568180714, sob a responsabilidade de **Luciano Freitas Felício e equipe; Luana Carvalho Cezar; Maria Martha Bernardi; Thiago Berti Kirsten** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) em reunião de 19/08/2015.

We certify that the proposal "Zinc as a therapy in an experimental model of autism prenatally induced by valproic acid", utilizing 70 Heterogenics rats (25 males and 45 females), protocol number CEUA 1568180714, under the responsibility of **Luciano Freitas Felício and team; Luana Carvalho Cezar; Maria Martha Bernardi; Thiago Berti Kirsten** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/19/2015.

Vigência da Proposta: de 05/2015 a 08/2016

Área: Vpt Fmvz Usp

Procedência: Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP

Espécie: Rato heterogêneo

Gênero: Machos

idade: 90

N: 25

Linhagem: Wistar

Peso: 250

Procedência: Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP

Espécie: Rato heterogêneo

Gênero: Fêmeas

idade: 90

N: 45

Linhagem: Wistar

Peso: 200

São Paulo, 20 de agosto de 2015

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CEZAR, Luana Carvalho.

Título: **Zinco como terapia no modelo experimental de autismo induzido pré-natalmente pelo ácido valpróico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais, Rogerio Cezar (in memoriam) e
Maria de Lourdes, por todo o amor, dedicação e
ensinamento. Ao amor da minha vida, Caio
César Stevanovich, por estar sempre ao meu
lado. Vocês foram, são e serão para sempre a
base de tudo, sem a qual eu não seria nada.
Amo vocês.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fonte de conforto nos momentos de maior desespero, além de iluminar o meu caminho para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Ao meu pai Rogerio Cezar (in memoriam), apesar da ausência, você sempre esteve em meus pensamentos e todo o trabalho que tive, foi para que pudesse se orgulhar. Sinto muito que não possa estar aqui nesse momento tão importante da minha vida, mas agradeço todo o seu empenho em me educar e amar. Obrigada por ser tão exigente comigo, hoje eu percebo que se não fosse isso, nunca chegaria até aqui. Amo você pra sempre!

A minha mãe querida, Maria de Lourdes, por sempre estar ao meu lado, ser a melhor amiga e principalmente acreditar no meu potencial. Você a cada dia me ensina como ser uma pessoa mais forte, mostrando que uma mulher pode ser uma fortaleza sem perder a feminilidade. Obrigada por tudo mãe, amo você!

A minha irmã Liane Cezar, por compartilhar comigo todos os momentos da minha vida e da nossa família. Obrigada por tudo!

Ao meu noivo, Caio Cesar Stevanovich, amor da minha vida, aquele que transforma a minha existência em algo muito mais interessante e feliz. Sem você, esse trabalho não teria acontecido. Você me apoiou emocionalmente e financeiramente. Colaborou com sua inteligência e conhecimento científico em diversos aspectos nesse projeto, sempre com carinho e extrema dedicação. Obrigada por todos os inúmeros finais de semana, os dias e as horas que você dedicou me ajudando nos experimentos. Sempre quando eu pensava em desistir, você estava ali, segurando a minha mão e dizendo para seguir em frente que tudo iria dar certo. Eu te amo de tantas maneiras, seria difícil descrever em poucas linhas como um breve texto. Muito obrigada por estar incondicionalmente

ao meu lado, acreditando nos meus sonhos e apoiando minhas decisões. Obrigada por ser o melhor amigo e parceiro nos momentos bons e ruins. Espero sempre ser merecedora de todo esse amor e carinho. Eu amo você, sempre, e para sempre!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Freitas Felício, por me apoiar e dar o suporte necessário para a conclusão desse trabalho. Por me mostrar que independente da situação, devemos sempre agir com sabedoria e administrar o estresse. A sua ética e o seu carinho pela ciência me comovem, não poderia escolher mais ninguém em que pudesse me espelhar. Obrigada por sua amizade e pela compreensão. Há 6 anos tenho o prazer de conviver com você, desde a iniciação científica. E o senhor, sempre com muita paciência. Muito obrigada por abrir as portas do seu laboratório e me ensinar a ser uma cientista no sentido mais lato da palavra!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Thiago Berti Kirsten, por todos os ensinamentos, dedicação comigo e meu trabalho. Admiro sua disciplina e como conduz a sua vida profissional. Sem dúvidas você foi uma influência pra mim durante todas as etapas desse trabalho. Obrigada Thiago!

À Ana Paula Lima, pela sua amizade e paciência. As várias vezes que você me auxiliou em meus experimentos, mesmo nos finais de semana, passou horas trabalhando comigo no biotério. Obrigada por todos os momentos de descontração, por me ouvir e ensinar. Muito obrigada Paulinha, você foi fundamental para que eu conseguisse concluir esse trabalho!

Aos meus sogros, Priscila Navarrete e Fabiano Stevanovich, por todo o carinho e por sempre me ouvirem. Aos meus cunhados, Enrico, Nicholas e Juliana, por alegrarem a minha vida e pela amizade de vocês. Amo muito essa família, muito obrigada por tudo!

À Jullie Hernandes, por sua amizade e por estar sempre ao meu lado me ouvindo. Por todas as risadas, conselhos e ajuda quando necessário. Obrigada por participar sempre da minha vida. Adoro você amiga!

Aos meus amigos, Lianne Araújo, Ed Carlos, Elan Fernandes e Lucas Assis. Por todos os nossos bons momentos de descontração, e por mesmo longe, de alguma forma participarem da minha vida. Muito obrigada galera!

A equipe do laboratório, Marianne Klein, Carla Nappo, Amanda Nascimento e Julieta Ochoa. Obrigada pela parceria e amizade de vocês. Especialmente a Julieta, minha amiga querida, sempre ao meu lado ouvindo e auxiliando. Obrigada meninas!

À técnica Magali Caetano, por toda a ajuda durante o trabalho e pelos momentos de descontração no laboratório. Obrigada Maga!

Aos meus colegas da pós-graduação, Thaísa Sandini, Natalia Moreira, Everton Bertaglia, Daniel Gimenes e Thiago Reis, que contribuíram com alguma prática experimental, ou em discussões que enriqueceram o meu trabalho e pela amizade de vocês. Muito obrigada!

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do VPT, Herculano, Vagner e Nicole, pelos auxílios nos experimentos. Em especial a Nicole, que fez junto comigo as dosagens bioquímicas desse trabalho. Obrigada a todos!

Ao Prof. Dr. Bruno Cogliati, responsável pelo Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do VPT (LAPMOL). Agradeço por abrir as portas do seu laboratório e fornecer todos os equipamentos para a realização das técnicas de biologia molecular, desenvolvidas neste projeto. Obrigada por ser sempre tão atencioso comigo e meu trabalho.

À Isabel Pereira e Tereza Silva, pós-docs no LAPMOL, que me auxiliaram nas técnicas de biologia molecular deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos e dedicação.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP) e ao Departamento de Patologia (VPT), locais onde desenvolvi minha pesquisa com ótima infraestrutura.

Aos colaboradores do biotério, Prof.^a Dr.^a Claudia Mori, Mauro, Luciana, Idalina e Nelsinho. Obrigada por todo o auxílio prestado durante a experimentação e os cuidados com os animais. Ao Dennis, colega querido e prestativo que por diversas vezes me salvou do desespero. Obrigada.

A todos os professores do VPT, pelo ótimo convívio e aqueles que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento do trabalho. Em especial ao Prof. Dr. Jorge Flório, Prof.^a Dr.^a Helenice de Souza Spinosa e Prof.^a Cristina de Oliveira Massoco Salles. Muito obrigada!

A professora, Dr.^a Martha Bernardi, colaboradora nesse trabalho e em nosso grupo de pesquisa. Por seus ensinamentos e empenho na pesquisa. Muito obrigada!

As secretárias de pós-graduação da FMVZ e do VPT, Taís, Adriana e Milena. Obrigada pelo empenho em sempre resolver os problemas e também amizade de vocês.

A todos os funcionários da Biblioteca Virginie Buff D' Ápice (FMVZ-USP), em especial a Elza, por auxiliar na normalização e correções desse trabalho.

Aos ratos utilizados nesse trabalho, dos quais obtive os resultados. Eles colaboraram com a ciência, proporcionando avanços em nossos conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de auxílio financeiro para desenvolvimento do Mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento técnico desse trabalho.

A todos os familiares, amigos e colegas que de alguma maneira foram importantes para o desenvolvimento desse projeto, ou ainda colaboraram para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Obrigada.

*“Não existem sonhos impossíveis para aqueles
que realmente acreditam que o poder
realizador reside no interior de cada ser
humano, sempre que alguém descobre esse
poder algo antes considerado impossível se
torna realidade”*

Albert Einstein

RESUMO

CEZAR, L. C. **Zinco como terapia no modelo experimental de autismo induzido pré-natalmente pelo ácido valpróico.** [Zinc as a therapy in an experimental model of autism prenatally induced by valproic acid]. 2016. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O autismo é um transtorno complexo do desenvolvimento caracterizado por inúmeros prejuízos comportamentais, tais como perdas na comunicação, socialização e indução da inflexibilidade cognitiva. A reprodução de modelos experimentais de autismo é bastante importante no estudo desse transtorno. A exposição pré-natal ao VPA reproduz sintomas similares àqueles encontrados na condição humana de autismo. Apesar de o VPA ser considerado um provável teratôgeno em humanos, pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação, ou até mesmo, como ele é capaz de induzir o autismo. O VPA parece influenciar o metabolismo do zinco durante o período pré-natal, podendo comprometer o desenvolvimento fetal normal. Esse estudo foi dividido em duas partes: (1) reproduzir um modelo de autismo induzido por VPA pré-natal (400 mg/kg no GD 12,5) e (2) avaliar se a administração de zinco pré-natal (2 mg/kg 1h após) previne ou ameniza os prejuízos comportamentais e a expressão de TH-estriatal associados ao autismo causados pela exposição pré-natal ao VPA em ratos. Foram avaliados parâmetros reprodutivos, anormalidades comportamentais na comunicação (vocalização ultrassônica), comportamentos repetitivos e na cognição (labirinto em T) e interação social (comportamento de brincar), além de verificar o sistema dopaminérgico por meio da expressão proteica de TH-estriatal na prole masculina e feminina de ratas. O VPA causou danos reprodutivos, prejuízos na vocalização ultrassônica, comportamento repetitivo/restrito, inflexibilidade cognitiva, comprometimento na socialização com diminuição da brincadeira e redução nos níveis de TH-estriatal na prole masculina. A administração de zinco não foi capaz de impedir os danos reprodutivos causados pelo VPA, porém amenizou a inflexibilidade cognitiva e atenuou a brincadeira social, sem reestabelecer os níveis de TH-estriatal. A prole feminina foi menos afetada que a masculina, apresentando apenas a vocalização ultrassônica alterada. O zinco reestabeleceu esse dano. A redução da

TH-estriatal na prole masculina sugere que, possivelmente o fenótipo tipo-autista investigado no presente estudo, esteja relacionado a modificações funcionais no sistema dopaminérgico.

Palavras-chave: VPA. Deficiência de zinco. Modelo animal. Comportamentos tipo-autista. Dopamina.

ABSTRACT

CEZAR, L. C. **Zinc as a therapy in an experimental model of autism prenatally induced by valproic acid.** [Zinco como terapia no modelo experimental de autismo induzido pré-natalmente pelo ácido valpróico]. 2016. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Autism is a complex developmental disorder characterized by numerous behavioral impairments, such as communication, socialization and induction of cognitive inflexibility. Reproduction of experimental models of autism is an important tool in the study of this disorder. Prenatal exposure to VPA reproduces symptoms similar to those found in the human condition of autism. The VPA is known as a potential teratogen in humans and its mechanisms of action is not well understood. VPA appears to influence the zinc metabolism during the prenatal period, compromising normal fetal development. This study was done into two parts: (1st) obtain an autism model induced by prenatal VPA (400 mg/kg 12.5 GD) and (2nd) evaluate whether prenatal administration of zinc (2 mg/kg after 1h) prevents or reverses the behavioral impairments and protein striatal TH-expression associated with autism caused by prenatal exposure to VPA in rats. It was evaluated the reproductive parameters, abnormal behavior in the communication (ultrasonic vocalization test), repetitive behavior and cognitive capacity (T-maze test) and social interaction (play behavior test), and the evaluation of the dopaminergic system by quantification of TH-striatal expression in male and female offspring of rats. The VPA was able to cause reproductive damage, impairment in ultrasonic vocalization, repetitive/restricted behavior and cognitive inflexibility, impairment in socialization with decreased play behavior and reduction in striatal TH levels in male offspring. The zinc administration has not been able to prevent reproductive damage caused by VPA, but ameliorates the cognitive inflexibility and attenuated the social play behavior, without restoring TH-striatal levels. The offspring females were less affected as males, with alterations into ultrasonic vocalization only and zinc reestablished this damage. The reduction in striatal TH-male offspring suggests that the autistic-like phenotype, investigated in this study is, may be is related to functional modifications in the dopaminergic system.

Keywords: VPA. Deficiency zinc. Animal model. Behavior autistic-like. Dopamine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Sinais e sintomas observados em crianças com autismo	25
Figura 2 -	Os modelos animais por deficiência de Zn são distribuídos em: privação perinatal ao Zn (círculo azul), depleção aos níveis de Zn pós-natal (círculo vermelho), e homeostase de Zn alterada pela manipulação genética (círculo verde). As mesmas alterações comportamentais podem ser vistas em grupos diferentes	40
Figura 3 -	Na figura é possível verificar algumas alterações comportamentais em pacientes que sofreram deficiência de Zn durante o desenvolvimento	41
Figura 4 -	Lavado vaginal em ratas visto no microscópio óptico	49
Figura 5 -	Esquema da divisão dos grupos utilizados nesse trabalho, totalizando 40 machos e 40 fêmeas.....	50
Figura 6 -	Torção da cauda observada nos animais que receberam VPA pré-natalmente	52
Figura 7 -	Cromodacriorréia observada nos animais que receberam VPA pré-natalmente	52
Figura 8 -	Aparato utilizado para avaliação da vocalização ultrassônica, constituindo de microfone ultrassônico, filtro e software (Noldus®) para análise automatizada	58
Figura 9 -	Labirinto em T com barreiras que separam a área de partida e dois braços de livre escolha	60
Figura 10 -	Ilustração de dois filhotes jovens realizando o comportamento de brincar propriamente dito ou <i>pinning</i>	62
Figura 11 -	Delineamento dos três blocos de experimentos realizados, desde a determinação do dia de gestação (GD) zero das ratas, passando pelo tratamento com VPA, salina e zinco, as avaliações nas gestantes e, a partir do dia de vida pós-natal (PND) 2, avaliações na prole	67
Figura 12 -	Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO ₄ 1h após) nos parâmetros reprodutivos maternos e da prole de ratas.....	71

Figura 13 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO ₄) na vocalização ultrassônica da prole masculina de ratas	75
Figura 14 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 µg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO ₄) na avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T da prole masculina jovem de ratas no PND 29	77
Figura 15 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratas no PND 30	81
Figura 16 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO ₄) na expressão proteica de tirosina hidroxilase (TH; média da razão da densidade óptica em relação à β-actina) avaliada por western blotting no estriado da prole masculina jovem de ratas no PND 30	83
Figura 17 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO ₄) na vocalização ultrassônica de proles femininas de ratas	87
Figura 18 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 µg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO ₄) na avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T da prole feminina jovem de ratas no PND 29	89
Figura 19 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de brincar da prole feminina de ratas no PND 30	92
Figura 20 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO ₄) na expressão proteica de tirosina hidroxilase (TH; média da razão da densidade óptica em relação à β-actina) avaliada por western blotting no estriado da prole feminina jovem de ratas no PND 30	94
Quadro 1 - Períodos críticos de susceptibilidade indicado pelas evidências de diversos estudos epidemiológicos de fatores ambientais que demonstram uma associação com o transtorno do espectro autista	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nas vocalizações ultrassônicas da prole masculina de ratas no PND 11.....	74
Tabela 2 -	Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratas no PND 30.....	80
Tabela 3 -	Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nas vocalizações ultrassônicas da prole feminina de ratas no PND 11.....	86
Tabela 4 -	Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de brincar da prole feminina de ratas no PND 30	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Cl ⁻	cloro
DA	dopamina
DO	densidade óptica
DSM-V	Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais V
EP	erro padrão
EDTA	edetato de dissódico
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GABA	ácido gama-aminobutírico
GD	dia de gestação
HDAC	histona deacetilase
i.p	intraperitoneal
LPS	lipopolissacarídeo
NaCl	cloreto de sódio
PB	tampão fosfato
PBS	salina tampona
PCR	reação em cadeia da polimerase
PND	dia pós-natal
polyI:C	ácido polirribonucleotídico-polirribocitidílico
s.c	subcutânea
SAL	salina
SAL+Zn	salina pré-natal e pós-tratamento com zinco
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNC	sistema nervoso central
SNPs	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SVF	Síndrome do Valproato Fetal
TDAH	transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TEA	transtorno do espectro autista
TH	tirosina hidroxilase

TTBS	salina tamponada contendo <i>Tween</i> 20
USP	Universidade de São Paulo
VPA	ácido valpróico
VPA+SAL	ácido valpróico pré-natal e pós-tratamento com salina
VPA+Zn	ácido valpróico pré-natal e pós-tratamento com zinco
VPT	Departamento de Patologia
Zn	Zinco
ZnSO ₄	sulfato de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Autismo.....	24
1.2	Influência teratogênica no desenvolvimento fetal	30
1.3	Ácido Valpróico.....	32
1.4	Modelos experimentais para o estudo do autismo	33
1.5	Possíveis intervenções e tratamentos no transtorno do espectro autista	37
1.6	Zinco.....	38
1.7	Justificativa	42
2	OBJETIVO GERAL.....	45
2.1	Objetivos específicos.....	45
2.1.1	Bloco I: Estudar os efeitos do VPA pré-natal nos parâmetros reprodutivos, e possíveis alterações do zinco.....	45
2.1.2	Bloco II: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole masculina de ratos; e possível terapia com zinco	45
2.1.3	Bloco III: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole feminina de ratos; e possível terapia com zinco	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	Animais.....	48
3.2	Acasalamento.....	48
3.3	Drogas e soluções	49
3.3.1	Tratamento com VPA	51
3.3.2	Tratamento com Zn	53
3.4	Bloco I: Efeitos do VPA pré-natal nos parâmetros reprodutivos e possíveis alterações do zinco.....	53
3.4.1	Parâmetros reprodutivos maternos e da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal	54

3.4.2	Parâmetros reprodutivos maternos e da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	55
3.5	Bloco II: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole masculina de ratos; e possível terapia com zinco	55
3.5.1	Avaliação da comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	56
3.5.2	Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal	58
3.5.3	Avaliação da socialização e comportamento de brincar da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	60
3.5.4	Determinação dos níveis de TH no estriado da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	62
3.5.4.1	Expressão proteica de TH no estriado via western blotting da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	63
3.6	Bloco III: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole feminina de ratos; e possível terapia com zinco	65
3.7	Análise estatística.....	66
3.8	Delineamento experimental	66
4	RESULTADOS	69
4.1	Bloco I: Efeitos do VPA pré-natal nos parâmetros reprodutivos, e possíveis alterações do zinco.....	69
4.2	Bloco II: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole masculina de ratos; e possível terapia com zinco	72
4.2.1	Avaliação da comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole masculina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	72
4.2.2	Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole masculina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	76

4.2.3	Avaliação da socialização e comportamento de brincar da prole masculina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	77
4.2.4	Determinação dos níveis de TH no estriado da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	82
4.3	Bloco III: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole feminina de ratos; e possível terapia com zinco	83
4.3.1	Avaliação da comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole feminina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal	84
4.3.2	Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole feminina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal	88
4.3.3	Avaliação da socialização e comportamento de brincar da prole feminina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	89
4.3.4	Determinação dos níveis de TH no estriado da prole feminina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal.....	93
5	DISCUSSÃO	96
6	CONCLUSÕES	108
6.1	Considerações Finais	109
	REFERÊNCIAS.....	111

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é caracterizado como um distúrbio invasivo do desenvolvimento. Esse pode comprometer esferas comportamentais relacionadas com a interação social, comunicação, comportamento estereotipado e restrito (DSM-V, 2013). Os modelos experimentais de autismo em animais têm sido utilizados como abordagem estratégica em estudar a fisiopatologia desse transtorno.

Estudos clínicos envolvendo humanos conseguiu associar o uso de ácido valpróico (VPA) pré-natal com a desordem do espectro autista, uma vez que crianças receberam VPA pré-natal e apresentaram anormalidades fenotípicas semelhantes ao autismo (CHRISTIANSON; CHESLER; KROMBERG, 1994). Na literatura torna-se evidente o impacto do VPA pré-natal na prole de ratos e como a sua exposição apresenta uma incidência sete vezes maior para a ocorrência dos sintomas característicos do autismo (ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005; DUFOUR-RAINFRAY et al., 2011). O VPA é capaz de gerar alterações comportamentais e neuroanatômicas similares àquelas encontradas no autismo, por ocasionar danos em momentos críticos do desenvolvimento fetal e sendo capaz de reproduzir o fenótipo autista através de administração pré-natal (ROULLET; LAI; FOSTER, 2013).

Estudos demonstram que a hipozinquemia materna pode causar déficits no comportamento de aprendizagem e memória (YU et al., 2012). Dadas às circunstâncias da importância do zinco na maturação do cérebro das proles, esse projeto visou à utilização da suplementação de zinco pré-natal para prevenção do autismo. A suplementação de zinco pode reverter atrasos cognitivos e apoptose neural do hipocampo (YU et al., 2012). Levando esses achados em consideração, o zinco tem o potencial de reverter os danos encontrados no presente modelo de VPA pré-natal que são ligados ao autismo.

Esse trabalho visa uma possível interferência do VPA sobre os níveis disponíveis de zinco fetal. Até o momento, não há evidências que demonstrem o mecanismo pelo qual o VPA pré-natal atua nas proles e ainda como pode gerar tamanho impacto no neurodesenvolvimento.

Para a análise do VPA e zinco pré-natal no modelo de autismo experimental, os principais comportamentos associados a essa desordem foram avaliados,

incluindo a comunicação, socialização e indução da inflexibilidade cognitiva. Por fim, o estudo da TH estriatal pode compreender o mecanismo ligado ao autismo, já que ainda não se conhece sua exata etiologia. Além disso, esta abordagem poderá gerar novas possibilidades de intervenções clínicas.

1.1 Autismo

O autismo é um transtorno complexo do desenvolvimento caracterizado por inúmeros prejuízos comportamentais, incluindo especialmente a ruptura de processos fundamentais clássicos na interação social, comunicação (verbal e não verbal) e padrões limitados ou estereotipados de comportamentos e interesses (SCHWARTZMAN, 1995; KLIN, 2006; TAMANAHA; PERISSINOTO; CHIARI, 2008). Em 1943, Leo Kanner descreveu pela primeira vez o autismo, identificado em 11 crianças e denominou de distúrbios autísticos do contato afetivo (KANNER, 1943).

As manifestações comportamentais do autismo englobam uma ampla gama de alterações clínicas e variabilidade na sintomatologia. A **Figura 1** ilustra alguns dos sintomas que afetam indivíduos com autismo. Com a falta de homogeneidade das manifestações comportamentais e a consciência dos diferentes graus de acometimento e seguramente a interação entre múltiplos fatores etiológicos, tornou-se viável criar o termo “transtorno do espectro autista” (TEA) (DSM-V, 2013).

Algumas das classificações propostas no Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais (*Diagnostical and Statistical Manual For Mental Disorder*) (DSM-V, 2013) seriam de que indivíduos com um diagnóstico bem estabelecido de transtorno autista, transtorno de Asperger, síndrome de Rett, transtorno invasivo do desenvolvimento e ou transtorno global do desenvolvimento sem outra especificação devem receber o diagnóstico de TEA (DSM-V, 2013). É possível avaliar como critério de classificação o nível de gravidade e comprometimento do TEA em diferentes estados (leve, moderado e severo) (LEE; THOMAS; LEE, 2015). Para validar o diagnóstico, os indivíduos precisam apresentar no mínimo seis características comportamentais (FRAZIER et al., 2012; TAHERI; PERRY, 2012), sendo pelo menos dois sintomas na área de interação social, um na área de

comunicação, e um na área de comportamentos estereotipados (SILVA; MULICK, 2009).

Figura 1 - Sinais e sintomas observados em crianças com autismo

Fonte: Kirsten T. B. (2012).

As anormalidades comportamentais podem ser normalmente evidenciadas aos três anos de idade (FOMBONNE, 2005; KIM et al., 2014; KLIN, 2006). As formas mais graves do distúrbio podem ser detectadas com menos de 12 meses de vida e as formas mais sutis com mais de 24 meses (DSM-V, 2013). Os primeiros

sintomas incluem prejuízos em habilidades linguísticas e sociais (FRAZIER et al., 2012), porém algumas crianças com TEA evidenciam platôs e ou regressão no desenvolvimento (LEE; THOMAS; LEE, 2015).

A prevalência de indivíduos com TEA sofreu um aumento substancial desde sua descoberta. Por exemplo, nas décadas de 60 e 70 a frequência era de 4/10.000 indivíduos diagnosticados com autismo em todo o mundo (FOMBONNE, 2005). Entretanto, dados atuais confirmam que quase 70-100/10.000 crianças foram detectadas com autismo, ou seja, um em cada 100 pessoas são afetadas pelo TEA (SCHAAFSMA; PFAFF, 2014). De acordo com o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*), cerca de 1,5% (1/68 indivíduos) das crianças nos Estados Unidos possuem diagnóstico de TEA (CHRISTENSEN et al., 2016), enquanto estudos realizados na Ásia e Europa identificaram uma prevalência populacional média entre 1 e 2% de pessoas com o distúrbio (CHRISTENSEN et al., 2016). Possivelmente o aumento no número de casos de autismo deva-se as melhores condições de diagnóstico precoce, mudanças na prática de identificação da doença e incentivos financeiros subsidiados pelo governo para realizar diagnósticos (BLUMBERG et al., 2013; LEE; THOMAS; LEE, 2015).

O TEA é cerca de 4-5 vezes mais comum em indivíduos do sexo masculino (1 em 42) do que no sexo feminino (1 em 89) (BEDFORD et al., 2016). O gênero masculino indica um fator de risco poderoso e bem estabelecido para distúrbios do espectro autista (FRAZIER et al., 2014). Até o momento, definir a causa pela qual o autismo acomete mais indivíduos do sexo masculino tem sido uma tarefa desafiadora, uma vez que, os critérios diagnósticos e a grande maioria dos estudos que caracterizam o fenótipo do autismo são baseados no sexo masculino (FRAZIER et al., 2014). Avaliando a literatura é possível observar que poucos estudos exploraram alterações comportamentais nas fêmeas, em parte, por apresentarem mínimos sintomas e alterações (comportamentais, neuroanatômicas e expressão molecular) evidentes do autismo (KIRSTEN et al., 2012; LAI; LOMBARDO; BARON-COHEN, 2014; SCHWARZ et al., 2011), ou ainda pelo fato de fêmeas possuírem um fenótipo “tipo autista” dificilmente detectado (MANDY; CHILVERS; COMORBIDITY, 2012). O comprometimento em pessoas do sexo feminino com autismo parece apresentar-se de uma maneira muito mais severa do que o descrito no sexo masculino (MANDY; CHILVERS; COMORBIDITY, 2012). No entanto, evidências

revelam prováveis fatores etiológicos protetores em fêmeas, concluindo requerimento de um maior comprometimento genético para expressão do fenótipo TEA (FRAZIER et al., 2014).

É possível identificar numerosos estudos que associam o autismo a fatores genéticos, incluindo ainda mutações raras e interações entre múltiplos genes e diferentes *loci* (ABRAHAMS; GESCHWIND, 2008). Com uma heritabilidade em torno de 50 a 90% (SANDIN et al., 2014; HOMS et al., 2016), o autismo observado em gêmeos monozigóticos e o índice de concordância no diagnóstico foi de 82-92% contra 1-10% em gêmeos dizigóticos (BAILEY et al., 1995; FOLSTEIN; ROSEN-SHEIDLEY, 2001). Os estudos de gêmeos sugerem que a hereditariedade pode chegar a 70% para o autismo, e até 90% para o TEA (FOLSTEIN; ROSEN-SHEIDLEY, 2001). Em consequência de o TEA ser um distúrbio altamente heterogêneo, tem sido muito difícil elucidar um único gene contribuinte, ou ainda, resultados inconsistentes que sugerem uma ampla variedade de *loci* de susceptibilidade e uma complexa interação de genes com o ambiente (HALL; KELLEY, 2014). Regiões genômicas susceptíveis de conter *loci* para o autismo já foram identificadas nos cromossomos humanos: 1T, 2T, 5q, 6q, 7q, 13q, 15q, 17q, 22q, Xp e Xq (PERSICO; BOURGERON, 2006). Distúrbios genéticos bem estabelecidos parecem influenciar as causas do TEA, dentre eles, mutações em um único gene, síndrome do X frágil, síndrome de Rett, síndrome de Joubert, esclerose tuberosa, duplicações herdadas maternalmente do cromossomo 15q11-13 e a idade paterna avançada, que foi associada com o aumento de mutações pontuais nas células da linhagem germinativa (BELMONTE; BOURGERON, 2006; GESCHWIND, 2008; HOMS et al., 2016).

Alguns genes em potencial estão sendo ligados a estudos por contribuírem no desenvolvimento do TEA. Mutações genéticas nos genes *NLGN3* e *NLGN4* que afetam proteínas sinápticas são causa, ainda que rara, de autismo, retardo mental e outras síndromes neuropsiquiátricas (HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2014; PERSICO; BOURGERON, 2006; WALSH; MORROW; RUBENSTEIN, 2008). Localizado na região cromossomal 15q11-q13, o gene *GABRB3*, responsável por codificar a porção beta 3 do receptor GABA (ácido gama-aminobutírico) (SCHAAFSMA; PFAFF, 2014), tem sido apontado como forte candidato para o autismo (DELOREY et al., 2008), por contribuir para o fenótipo mais grave em casos de deleção (VEENSTRA-VANDERWEELE; COOK, 2004).

Durante o desenvolvimento, receptores GABA exercem um papel importante na proliferação, diferenciação e migração de células neurais no encéfalo embrionário (BARKER et al., 1998). Alterações em genes codificantes de GABA implicariam em efeitos na neurogênese e sinaptogênese, afetando o desenvolvimento tardio de circuitos cerebrais envolvidos em comportamentos complexos, como os observados no TEA (DELOREY et al., 2008). Genes ligados aos cromossomos sexuais parecem ter papéis fundamentais para o desenvolvimento do TEA. Os genes *MeCP2* associado a síndrome de Rett (WALSH; MORROW; RUBENSTEIN, 2008) e *FMR1* ao transtorno invasivo do desenvolvimento (LEE; THOMAS; LEE, 2015), são dois genes no cromossomo X envolvidos na etiologia do autismo “secundário”, aquele que ocorre em decorrência de uma síndrome (PERSICO; BOURGERON, 2006). As identificações das variações genéticas comuns tem sido outro avanço na pesquisa do autismo. Em vários estudos recentes de biomarcadores para o autismo, foi possível associar polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) ao TEA, aproximadamente 57 SNPs foram ligados ao distúrbio (ROBINSON; NEALE; HYMAN, 2015). Tal como o sugerido, interferências genéticas parecem colaborar para o desenvolvimento do TEA, porém, a escassez de achados replicáveis significativos de marcadores genéticos individuais tem sido uma tarefa desafiadora no momento de identificar alelos de risco para o autismo. Todos esses resultados conflitantes da literatura corroboram para a hipótese de exposições ambientais passíveis de induzir danos ao código genético.

Os fatores ambientais podem exercer um papel fundamental na etiologia do autismo, desviando assim o foco dos fatores puramente genéticos. A exposição a toxinas ambientais pode interferir no desenvolvimento encefálico em diferentes fases da embriogênese e ocasionar distúrbios neuropsiquiátricos (LYALL; SCHMIDT; HERTZ-PICCIOTTO, 2014). Alguns estudos sugerem que interferências no período pré-natal seriam suficientes para gerar o TEA (ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005). Estudos epidemiológicos apontam alguns fatores ambientais de risco como: infecções bacterianas e virais (OHKAWARA et al., 2015), uso de etanol (NANSON, 1992) exposição ao tabaco (TRAN et al., 2013), poluição do ar (WEISSKOPF; KIOUMOURTZOGLOU; ROBERTS, 2015), fatores na dieta incluindo obesidade materna (LI et al., 2016), agentes teratogênicos como talidomida (STRÖMLAND; PINAZO-DURÁN, 1994) e ácido valpróico (MOORE et al., 2000); capazes de prejudicar o cérebro fetal em desenvolvimento. Em especial, o uso de alguns

medicamentos durante o período gestacional foi intimamente ligado a defeitos no neurodesenvolvimento.

Medicamentos com propriedades teratogênicas foram descritos como fatores potenciais para induzir autismo durante o período pré-natal (NEWSCHAFER et al., 2007). Algumas drogas utilizadas por gestantes indiscriminadamente nas décadas de 50 a 70 aparecem como causadoras de malformações congênitas. Após o surgimento de um número considerável de casos na literatura, se fez necessário à utilização de ferramentas para melhor entender o mecanismo destas drogas. Introduzida na Europa, a talidomida, muito utilizada no tratamento da ansiedade, foi a primeira droga a ser descrita como teratogênica (LENZ; KNAPP, 1962). Estudos clínicos envolvendo pacientes expostos no período fetal à talidomida revelaram características de autismo nesses indivíduos, associando o medicamento a etiologia do TEA. A partir disso, outros teratogênicos em potencial foram detectados, o misoprostol, comercialmente empregado na prevenção de úlcera gástrica, foi responsável por centenas de abortos espontâneos ocasionados pela contração uterina (BANDIM et al., 2003). Os sobreviventes ao aborto induzido pelo misoprostol apresentam certas anomalias congênitas, incluindo, hipoplasia de nervos cranianos por vezes associado à síndrome de Mobius (DUFOUR-RAINFRAY et al., 2011). Pacientes portadores da síndrome de Mobius têm maior incidência em apresentar distúrbios do neurodesenvolvimento, especialmente o TEA (NEWSCHAFER et al., 2007). Finalmente, o VPA utilizado contra a epilepsia, pode ocasionar distúrbios do desenvolvimento neurológico, afetando principalmente as funções cognitiva e comportamental, semelhante àquelas encontradas no autismo. Certamente agentes teratogênicos exercem importante papel na etiologia do TEA, podendo implicar na modulação de alguns genes interferindo no desenvolvimento fetal normal, tornando-se ainda mais necessário seu estudo uma vez que muitas mulheres fazem uso dessas substâncias durante a gestação.

1.2 Influência teratogênica no desenvolvimento fetal

Durante o período gestacional, o corpo materno sofre diversas alterações e adaptações fisiológicas, incluindo, mudanças hormonais, metabólicas, bioquímicas e anatômicas, com o objetivo de favorecer o ambiente adequado para o desenvolvimento fetal (CARRARA; DUARTE, 1996). Ajustes funcionais decorrentes da resposta à carga fisiológica aumentada ocorrem para preconizar a relação entre mãe e feto. A troca entre o embrião e o organismo materno é controlada pela placenta, que exerce um papel fundamental nessa relação e que sofre mudanças em cada fase da gestação (BRENT, 2004).

Mudanças fisiológicas na gestação podem alterar a bioconversão de compostos químicos e influenciar os efeitos teratogênicos de alguns medicamentos afetando a farmacocinética, muitas vezes, em decorrência da motilidade gastrointestinal diminuída, concentração de albumina plasmática diminuída, volume de fluídos extracelular e plasmático aumentado e alterações na eliminação renal (BRENT et al., 1999; BRENT; BECKMAN, 1991; BRENT, 2004). A placenta exerce papel fundamental na interação do organismo materno com o feto, sua influência pode determinar a capacidade teratogênica de alguns medicamentos (CAVALLI; BARALDI; CUNHA, 2006).

É importante ainda ressaltar que a exposição teratogênica não inclui apenas o agente, mas também a dose de administração e o momento gestacional em que ocorre a exposição (BRENT; BECKMAN, 1991). Sendo assim, cada medicamento possui uma curva dose-resposta que corresponde a doses seguras sem risco teratogênico. Fármacos com potencial efeito teratogênico são capazes não só de atravessar a barreira placentária causando anomalias morfológicas e neurológicas no feto, mas também pode agir no momento da implantação e concepção do óvulo gerando abortos (BRENT, 2004).

Na literatura muitos trabalhos investigam o uso de antiepiléticos na gestação e o risco de malformações congênitas que esses medicamentos acarretam. Anomalias e malformações são facilmente encontradas em decorrência do uso de antiepiléticos, incluindo: defeitos no fechamento do tubo neural (espinha bífida), fenda facial ou no palato e ainda defeitos cardíacos congênitos (BRENT; BECKMAN, 1991; BRENT, 2004). Além dos efeitos físicos, déficits cognitivos e no

neurodesenvolvimento são observados em tratamentos pré-natais de anticonvulsivantes. Esses problemas podem incluir, além de autismo, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e dispraxia (BROMLEY et al., 2016).

O desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) é um processo complexo que pode ser susceptível a interferências teratogênicas em diferentes fases, incluindo: formação e fechamento do tubo neural, diferenciação e migração celular, formação de estruturas neuronais, sinaptogênese e mielinização (LYALL; SCHMIDT; HERTZ-PICCIOTTO, 2014). O **Quadro 1** demonstra alguns fatores ambientais de risco para o desenvolvimento do TEA em diferentes momentos da gestação. Em relação aos antiepilépticos utilizados por gestantes, o VPA destaca-se em gerar os sintomas do autismo em modelos experimentais. A seguir uma breve revisão sobre o VPA e seu papel na indução do autismo.

Quadro 1 - Períodos críticos de susceptibilidade indicado pelas evidências de diversos estudos epidemiológicos de fatores ambientais que demonstram uma associação com o transtorno do espectro autista

Trimestre	Primeiro									Segundo			Terceiro	
Semanas de Gestação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	16	20	22	28	38

Fases de maturação cerebral														
Neurogênese	1-20 semanas													
Imigração neuronal	1-16 semanas													
Maturação neuronal	1-24 semanas													
Fatores de risco														
Poluição do ar	1º, 2º e 3º trimestre													
Pesticidas			Dias 26-81											
Carência de vitaminas	1º mês													
Carência de ácido fólico	1º mês													
Infeção por rubéola	1-8 semanas													
Febre	1º e 2º trimestres													
Talidomida			Dias 20-24											
Ácido valpróico			Dias 22-28											

Fonte: Adaptação de Lyall et al. (2014)

1.3 Ácido Valpróico

O ácido valpróico (ácido 2-propil-pentanóico), também conhecido como valproato ou valproato de sódio, é amplamente utilizado como um anticonvulsivante desde 1974 (MEUNIER et al., 1963; RIMMER; RICHENS, 1985; ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005). Comercialmente o VPA (Depakene®) pode ser prescrito no tratamento de crises epiléticas (BEYDOUN; SACKELLARES; SHU, 1997), transtorno bipolar (estabilizador de humor) (KMETZ; MCELROY; COLLINS, 1997) e na profilaxia contra enxaqueca (FREITAG et al., 2002).

O mecanismo de ação do VPA não é totalmente conhecido (ORNOY, 2009). Seu efeito anticonvulsivo é atribuído ao aumento nos níveis de GABA no cérebro e ao bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes (DUFOUR-RAINFRAY et al., 2010). O GABA, principal neurotransmissor com atividade inibitória no cérebro é capaz de abrir através de ligantes, canais de Cl^- , causando hiperpolarização neuronal e consequentemente tornando as crises epiléticas reduzidas (MINNEMAN et al., 2006). Ao mesmo tempo, o VPA também é conhecido por afetar mecanismos epigenéticos por inibição da histona deacetilase (HDAC), enzima nuclear e citoplasmática responsável em diminuir os níveis de histonas nucleares H2A, H2B e H3 (GURVICH et al., 2005; DUFOUR-RAINFRAY et al., 2010). Exposição a drogas que possuem alto domínio na regulação gênica pode levar a modificações nos padrões de expressão a genes ligados ao neurodesenvolvimento, por exemplo. Certas alterações genéticas induzidas por fármacos, como o VPA, podem resultar em um desequilíbrio entre a excitação neuronal (sistema glutamatérgico) e inibição neuronal (sistema GABAérgico) no cérebro (FUKUCHI et al., 2009).

Como já mencionado, o VPA tem propriedades teratogênicas que promovem anormalidades comportamentais e alterações morfológicas fetais quando utilizado durante a gestação. A *American Food and Drug Administration* (FDA) classificou alguns fármacos que por meio do seu uso proporcionam risco durante a gestação, o VPA é uma droga de categoria D que exerce benefícios às mães, mas ao mesmo tempo pode ser prejudicial ao feto (ORNOY, 2009; DUFOUR-RAINFRAY et al., 2010). Esses tipos de fármacos atravessam a barreira placentária fazendo com que a concentração sérica materna e fetal se equiparem, e este contato pode

expor o embrião a três tipos de riscos: malformações congênitas, síndromes perinatais e transtornos no neurodesenvolvimento (DILIBERTI et al., 1984; IQBAL; SOHHAN; ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005; MAHMUD, 2001; ORNOY, 2009; SCHLICKMANN; FORTUNATO, 2013).

Estudos prospectivos e retrospectivos relacionam o uso de VPA a uma incidência de 1-2% no defeito do tubo neural, incluindo ainda espinha bífida e a somatória de alguns outros sinais e sintomas que deram origem a “Síndrome do Valproato Fetal” (SVF) (OMTZIGT et al., 1992; CLAYTON-SMITH; DONNAI, 1995; WILLIAMS et al., 2001). A SVF é caracterizada por anomalias crânio-facial, defeitos urogenitais, anomalias do sistema respiratório, esquelético e atraso no neurodesenvolvimento (WILLIAMS et al., 2001). Em especial, Moore et al. (2000) mostraram que 60% das crianças diagnosticadas com SVF exibiram algum dos sintomas autistas, e 11% desenvolveram todas as características básicas dos sinais do TEA (MOORE et al., 2000).

A exposição ao VPA em humanos durante os dias 20-24 de gestação, momento crítico da organogênese em que ocorre o fechamento do tubo neural e gênese do tronco cerebral (KEMPER; BAUMAN, 1998; RODIER, 2002), representa maior risco para desenvolvimento de distúrbios no neurodesenvolvimento, afetando principalmente funções cognitiva e comportamental, semelhantes àquelas encontradas no autismo (ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005; ORNOY, 2009; FAVRE et al., 2013;). Com base nesses dados, muitos estudos avaliam o potencial do VPA em causar danos neurológicos e como pode ser utilizado em um modelo animal de autismo. A seguir serão discutidos os modelos de autismo e como eles são reproduzidos.

1.4 Modelos experimentais para o estudo do autismo

Os modelos animais podem refletir diferentes aspectos comportamentais, neuropatológicos, moleculares e genéticos de diversos transtornos neuropsiquiátricos (SCHLICKMANN; FORTUNATO, 2013). Embora o TEA seja um transtorno complexo de grande heterogeneidade e sua fisiopatologia desconhecida, o modelo animal de autismo pode contribuir para o entendimento dessa síndrome e

possibilitar procedimentos que não seriam viáveis em humanos por razões éticas (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012; FAVRE et al., 2013). No entanto, os modelos experimentais utilizando animais possuem suas limitações e não podem simular integralmente uma doença humana (MARKRAM; RINALDI; MARKRAM, 2007; BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012).

A validação do modelo experimental de autismo é baseada nas características clínicas observadas em pacientes com autismo, ou seja, prejuízos comportamentais na comunicação (verbal e não verbal), interação social e estereotipias (WÖHR; SCATTONI, 2013). Diferentes testes comportamentais podem ser empregados para avaliar as esferas comprometidas do autismo. Particularmente camundongos e ratos são os mais utilizados em modelar desordens neuropsiquiátricas, por serem espécies sociais com vasto repertório de comportamentos (BISHOP; LAHVIS, 2011; WÖHR; SCATTONI, 2013).

Atualmente na literatura uma ampla gama de modelos experimentais de autismo está sendo proposto, incluindo: (1) modelos baseados em lesões encefálicas, (2) modelos baseados em animais modificados geneticamente, (3) modelos de infecção perinatal e (4) modelos que utilizam exposição a agentes tóxicos.

Os modelos utilizando lesões encefálicas geralmente ocorrem por meio de uma única lesão no período pós-natal. Como exemplo, Wolterink et al. (2001) demonstraram que lesões na amígdala no 7º dia pós-natal (PN7) foram capazes de gerar distúrbios tardios de comportamento em ratos, como prejuízos na interação social, como observado em pacientes com TEA. Camundongos mutantes que apresentam perda significativa das células de Purkinje apresentam fenótipo “tipo autista”, fornecendo um modelo experimental de comportamentos repetitivos (MARTIN; GOLDOWITZ; MITTLEMAN, 2010). Confirmando assim um papel potencial do cerebelo na produção de déficits motores e exploratórios como em autistas (PIERCE; COURCHESNE, 2001). Porém, muitas regiões encefálicas estão ligadas ao TEA, o que torna esse tipo de modelo limitado e pouco utilizado (KIM et al., 2016).

Entre os modelos genéticos, camundongos *knockout* para o gene *FMR1* são amplamente utilizados para investigação da Síndrome do X-frágil (KIM et al., 2016). Curiosamente, alguns estudos relatam que esses animais *knockout* para o gene *FMR1* exibem fenótipo similar ao encontrado no TEA, incluindo, interação

social diminuída, aumento de comportamentos repetitivos, ansiedade e hiperatividade (BERNARDET; CRUSIO, 2006).

A ativação imune materna é um fator de risco para o desenvolvimento fetal normal (GOLAN et al., 2005). Durante a gravidez, a ativação imune materna em roedores, conduz alterações no sistema imunológico da prole, além de resultar em fenótipos relacionados ao TEA (PATTERSON, 2011). As substâncias mais utilizadas para mimetizar uma infecção perinatal são: o lipopolissacarídeo (LPS) uma endotoxina presente na membrana de bactérias gram-negativas que é capaz de reproduzir uma infecção bacteriana, vírus influenza e ácido-policitidílico (PolyI:C - análogo sintético de RNA viral) (KIM et al., 2016). Geralmente esse modelo que reproduz uma infecção materna é realizado em roedores, e pode ser administrado pelas vias intraperitoneal, intravenosa, subcutânea e intranasal (BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012). O período gestacional, a dose e o número de administrações desses agentes infecciosos podem gerar alterações bastante heterogêneas entre os animais (PATTERSON, 2002; BOKSA, 2010). A infecção com a doença do vírus Borna pode causar características do TEA em animais, como: diminuição do comportamento de brincar (PLETNIKOV et al., 1999), comportamentos estereotipados e atividade exploratória desregulada (HORNIG et al., 1999). Em um estudo conduzido em nosso laboratório, foi possível desenvolver um modelo experimental de autismo em ratos a partir da exposição ao LPS (100 µg/kg, i.p.), que mimetiza uma infecção bacteriana, no dia 9,5 gestacional (GD) (KIRSTEN et al., 2010). A prole exposta pré-natalmente ao LPS apresentou prejuízos na interação social, diminuição na comunicação para/com suas mães, inflexibilidade cognitiva e menor demonstração de medo em situações potencialmente perigosas; sendo os machos mais afetados que as fêmeas, assim como ocorre no autismo (KIRSTEN et al., 2010, 2012). Além disso, esse modelo revelou redução dos níveis de tirosina hidroxilase (TH), dopamina (DA) e de seus metabólitos estriatais (KIRSTEN et al., 2012).

Finalmente, modelos de autismo que utilizam medicamentos são propostos para investigar os possíveis efeitos no desenvolvimento cerebral. Dentre os medicamentos citados na literatura por induzirem autismo, o modelo utilizando VPA oferece validade de face por promover aproximação com o quadro clínico do TEA (MABUNGA et al., 2015). Por meio de evidências, Rodier et al. (1997) desenvolveu um modelo animal de autismo por meio de ratos expostos pré-natalmente ao VPA.

Nesse estudo ratas prenhes receberam dose única de VPA (350 mg/kg) no GD 12 e foi possível observar alterações morfológicas e comportamentais que assemelharam-se às aquelas exibidas por pacientes com TEA (RODIER; BRYSON; WELCH, 1997). O período embrionário considerado como janela para ocasionar sintomas “tipo autista” em animais utilizando VPA, ocorre basicamente no 12º GD (KIM et al., 2011). Além disso, a dose, espécie animal ou via de administração podem interferir e ocasionar comportamentos distintos e por isso precisam ser levadas em consideração (MABUNGA et al., 2015).

Schneider e Przewlocki (2005) realizaram uma bateria de testes comportamentais com a exposição pré-natal ao VPA (800 mg/kg) em ratos no GD 12,5 (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005). Com os resultados desse trabalho, os autores demonstraram a validade do modelo VPA no estudo do autismo, uma vez que esses animais apresentaram interação social diminuída, comportamentos repetitivos aumentados, sinais precoces de prejuízos no neurodesenvolvimento como padrão alterado no crescimento físico e abertura dos olhos, além de respostas anormais ao estímulo doloroso (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005). A partir disso, muitos estudos replicaram esse modelo de autismo com o uso de VPA pré-natal em diferentes paradigmas. Diversas alterações comportamentais e morfológicas foram observadas em animais que receberam diferentes doses de VPA durante o período gestacional, incluindo: redução na preferência social (400 mg/kg) (KIM et al., 2011), redução nos níveis de serotonina no hipocampo (600 mg/kg) (DUFOR-RAINFRAY et al., 2010), aumento do comportamento “tipo ansiedade” ocasionado por prejuízos na ação inibitória da amígdala (600 mg/kg) (MARKRAM et al., 2008), migração anormal de neurônios TH-positivos e neurônios serotoninérgicos (800 mg/kg) (KUWAGATA et al., 2009). Fica claro que além dos prejuízos comportamentais, o modelo experimental utilizando VPA também possibilita avaliações morfológicas e moleculares ligadas ao autismo. Desta forma, os modelos experimentais asseguram ferramentas para o entendimento do TEA e sua etiologia, além de fornecer conhecimento para reverter ou melhorar essa condição.

1.5 Possíveis intervenções e tratamentos no transtorno do espectro autista

O TEA é considerado um distúrbio de alta prevalência, entretanto essa condição não tem cura e poucas medicações trazem benefícios para a vida dos pacientes sem causar danos secundários (MCPHEETERS et al., 2011). A princípio, Lovaas (1987) sugeriu que crianças submetidas a intervenções intensivas usando análise comportamental aplicada poderiam experimentar um grau de melhoria em esferas comportamentais prejudicadas (interação social, comunicação e estereotipias) (LOVAAS, 1987). Contudo, esses dados são insuficientes para padronizar abordagens eficazes de intervenções comportamentais em pacientes com TEA, uma vez que os comportamentos ocorrem de maneira muito individualizada e com alto grau de variabilidade (MCPHEETERS et al., 2011). A intervenção comportamental precisa ser aplicada o mais cedo possível e devem ser adaptadas de acordo com as necessidades de cada paciente, mas a eficácia do tratamento será medida de acordo com os avanços do indivíduo, podendo ser ótimo em crianças com TEA moderado (SMITH; GROEN; WYNN, 2000; DAWSON et al., 2010; MCPHEETERS et al., 2011).

Embora o TEA seja definido como um distúrbio do neurodesenvolvimento, indivíduos portadores dessa condição podem também apresentar diversas condições clínicas concomitantes, tais como anormalidades gastrointestinais, crises epiléticas e convulsões, déficits de atenção, ansiedade, distúrbios do sono, alergias e problemas derivados das alterações imunológicas (ANGELIDOU et al., 2011; FRYE et al., 2013; SUKHODOLSKY et al., 2013; FRYE, 2015). Em relação ao tratamento farmacológico do autismo, poucos medicamentos estão aprovados pelo FDA para uso desses pacientes. Dentre as drogas antipsicóticas, por exemplo, cabe descartar risperidona, aripiprazol e haloperidol, que atuam principalmente sobre sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos. Esses medicamentos são utilizados no tratamento de sintomas do TEA, como irritabilidade, agressividade e estereotipias (WINK et al., 2010; MCPHEETERS et al., 2011). Esses medicamentos podem melhorar algumas condições do autismo como citado, porém desencadeiam efeitos colaterais como ganho de peso e sedação (MCPHEETERS et al., 2011).

Distúrbios gastrointestinais afetam até 91% das crianças com TEA, podendo causar obstipação, diarreia, alergias e intolerância alimentar (BRESNAHAN

et al., 2015; FRYE; ROSSIGNOL, 2016). Estudos recentes evidenciam que os trilhões de microrganismos que habitam o trato gastrointestinal humano, mais conhecido como microbiota entérica, são capazes de afetar funções metabólicas e imunológicas, modular a expressão gênica, além de interferir no cérebro em desenvolvimento e no comportamento (DIAZ HEIJTZ et al., 2011; NICHOLSON et al., 2012; ALENGHAT, 2015; FRYE; ROSSIGNOL, 2016;). Alguns autores têm destacado a importância da microbiota no TEA, como exemplo, um trabalho que verificou que crianças autistas possuíam certos grupos de bactérias aumentados quando comparado com o grupo controle (FINEGOLD et al., 2010; HSIAO et al., 2013). Após crianças com TEA receberem tratamento com vancomicina (um antibiótico glicopeptídico) via oral, é possível perceber melhorias impressionantes em aspectos comportamentais, cognitivos e gastrointestinais (FINEGOLD, 2008; FINEGOLD et al., 2010; FINEGOLD; DOWNES; SUMMANEN, 2012). Com a interrupção do tratamento, os pacientes com autismo, tratados previamente com vancomicina tiveram uma recaída no quadro clínico, concluindo que esse efeito possa ser atribuído a bactérias formadoras de esporos resistentes a antibióticos (FINEGOLD, 2011). Esse tipo de intervenção ainda está em nível experimental, e poucos trabalhos abordam esse tema dificultando a padronização do tratamento.

Até o presente momento pouco se sabe sobre o tratamento do autismo, padronização de medicamentos ou ainda uma forma de reverter os sintomas. Entretanto, de acordo com a literatura, a suplementação de zinco vem sendo descrita como possível agente reversor de alguns comportamentos “tipo-autista” experimentalmente. Na seção a seguir será tratado o papel do zinco no autismo e seus potenciais benefícios.

1.6 Zinco

O zinco é um elemento químico que desempenha um importante papel na manutenção do organismo. É capaz de interferir no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios e na síntese e degradação de ácidos graxos, além de estimular a atividade de mais de 300 enzimas (BRÄTTER et al., 1998). O zinco é um micronutriente necessário à diferenciação celular, reparação tecidual, imunidade,

expressão gênica e ainda intervém no desenvolvimento fetal (HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2014). O corpo humano adulto contém cerca de 2g de zinco armazenados no tecido muscular e ósseo, porém seu nível cerebral é admiravelmente elevado (HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2014). No SNC o zinco pode atuar em neurônios influenciando a plasticidade sináptica (XIE; SMART, 1994; LU et al., 2000), além de modular a resposta de alguns neurotransmissores (JAN et al., 2002; HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2014).

A deficiência de zinco pode acarretar diferentes prejuízos para o indivíduo, em especial durante o período gestacional. Alterações nos níveis séricos de zinco materno pré-natal implicam no crescimento do embrião, podendo até exercer efeitos teratogênicos e morte fetal (TASSABEHJI et al., 2008; MŁYNIEC et al., 2012). As complicações pós-natal a deficiência materna de zinco, podem gerar anormalidades comportamentais (HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2014). Estudos associam baixos níveis séricos de zinco a pacientes com TDAH, transtornos do humor, depressão, esquizofrenia e o TEA (GRABRUCKER, 2014; PFAENDER; GRABRUCKER, 2014). Proles de roedores que sofreram perturbação nos níveis séricos de zinco pré-natalmente, apresentaram prejuízos comportamentais como instabilidade emocional, ansiedade, aprendizado, memória e ainda alterações similares ao autismo (TAKEDA et al., 2007; WHITTLE; LUBEC; SINGEWALD, 2009; GAO et al., 2011; GRABRUCKER, 2014). A **Figura 2** mostra alterações comportamentais vistas pela deficiência de zinco em modelos animais utilizando roedores. Na **Figura 3** é possível ver essas alterações em humanos, incluindo aquelas que ocorrem no TEA.

A suplementação com zinco durante o período de desenvolvimento fetal tem sido testada como possível tratamento para o autismo. Kirsten et al. (2015a, b) verificou por meio de um efetivo modelo de autismo utilizando LPS pré-natal em ratos, que a suplementação com zinco foi suficiente em impedir prejuízos reprodutivos, na comunicação das proles, na socialização e na cognição (GALVÃO et al., 2015; KIRSTEN et al., 2015a,b).

A hipótese que explica esse fenômeno benéfico do zinco no contexto do LPS baseia-se no fato que, citocinas pró-inflamatórias produzidas a partir da exposição do organismo ao LPS induzem a produção da metalotioneína (MT), proteína ligante e capaz de sequestrar o zinco. A produção de MT pode resultar em

hipozinquemia materna e subsequente deficiência fetal de zinco, associada também a teratogênese e danos cognitivos na prole adulta (COYLE et al., 2009; CHUA et al., 2012).

Figura 2 - Os modelos animais por deficiência de Zn são distribuídos em: privação perinatal ao Zn (círculo azul), depleção aos níveis de Zn pós-natal (círculo vermelho), e homeostase de Zn alterada pela manipulação genética (círculo verde). As mesmas alterações comportamentais podem ser vistas em grupos diferentes

Fonte: adaptação Hagmeyer et al. (2014)

Figura 3 - Na figura é possível verificar algumas alterações comportamentais em pacientes que sofreram deficiência de Zn durante o desenvolvimento

Fonte: adaptação Hagmeyer et al. (2014)

A associação entre drogas e nutrientes como o zinco possibilitam interações, muitas vezes indesejáveis, permitindo aumento ou diminuição da ação do medicamento ou nutriente. Essas interações podem ocorrer de uma forma direta (entre o agente químico e o nutriente formando um complexo ou quelato), e aquela que acontece através da ação indireta da droga (influenciando o metabolismo do nutriente) (BUI et al., 1998). De modo geral, os efeitos indiretos de certos agentes químicos ocorrem sobre o nutriente reduzindo sua absorção, aumentando sua excreção ou desencadeando uma redistribuição de suas reservas nos tecidos (TAUBENECK et al., 1995). Bui et al. (1998) desenvolveu um trabalho sobre o efeito de doses tóxicas de VPA no metabolismo do zinco durante a gestação de roedores. Nesse experimento, ratas prenhes foram tratadas com dose única de VPA no 11,5 GD. Após 18h do tratamento, esses animais foram eutanasiados e o zinco materno

foi dosado. A porcentagem de zinco no fígado materno foi maior do que a disponível para os embriões em relação ao grupo controle (BUI et al., 1998). A hipótese é de que o VPA de uma forma indireta altera reservas teciduais de zinco após sua administração na mãe, induzindo uma resposta de fase aguda desse nutriente resultando no aumento da síntese de MT (DASTON et al., 1991; TAUBENECK et al., 1995). A MT no fígado reduz as concentrações de zinco no plasma materno e causa diminuição transitória da disponibilidade de zinco para o feto, que pode influenciar no metabolismo de Zn embrionário e conduzir a um desenvolvimento anormal (DASTON et al., 1991; TAUBENECK et al., 1995; BUI et al., 1998). No experimento de Bui et al. (1998), foi possível observar que a suplementação com zinco é capaz de modular os efeitos teratogênicos do VPA e evitar prejuízos para a prole (BUI et al., 1998).

Contudo, apesar dos indícios de interação entre o efeito tóxico do VPA sobre o metabolismo do zinco, poucos estudos são expressivos na área tendo sido feitos com número pequeno de sujeitos e sem controles apropriados.

1.7 Justificativa

O presente estudo contém duas fases, a primeira consiste em avaliar a resposta ao VPA e reproduzir o modelo experimental e suas diversas alterações fenotípicas. A segunda fase consiste em reverter o quadro utilizando o zinco pré-natal como forma preventiva. A escolha do tratamento materno com zinco para eventual prevenção/amenização dos danos causados pelo VPA baseia-se no fato que desafios farmacológicos podem alterar a homeostasia de alguns nutrientes como zinco (BUI et al., 1998).

Como já revisado neste trabalho, o zinco pode interferir em funções orgânicas importantes, a carência desse micronutriente está relacionada com aborto espontâneo, retardo mental, atrasos do crescimento intrauterino, anomalias congênitas e retardo mental (BRÄTTER et al., 1998). A deficiência de zinco também está associada a vários transtornos, em particular em pacientes portadores de distúrbios neurológicos que apresentam deficiência desse íon (PFAENDER; GRABRUCKER, 2014). Dessa forma, não é surpreendente que a deficiência de

zinco possa gerar disfunções neuronais, incluindo diversos transtornos do neurodesenvolvimento, como o autismo (LEAL et al., 2015).

Neste trabalho foi analisado o potencial do zinco em amenizar comportamentos tipo-autista em animais previamente tratados com VPA. Nesse contexto, poucos estudos avaliaram esse paradigma, apesar de que Kirsten et al. (2015b) observaram melhora na comunicação, socialização e interação social em um estudo utilizando um modelo experimental de autismo induzido por LPS e com suplementação de zinco (KIRSTEN, 2015b). O zinco tem o potencial de reverter os danos encontrados no presente modelo de VPA pré-natal que são ligados ao autismo. Os estudos tratando de suplementação de zinco são pouco conclusivos, fazendo necessária a investigação mais detalhada desse mecanismo.

Para avaliar o modelo comportamental de autismo induzido por VPA (400 mg/kg no GD 12,5), os principais comportamentos dessa desordem foram estudados; (1) a comunicação por meio do teste de vocalização ultrassônica; (2) interação social durante a infância verificada por meio do comportamento de brincar e (3) indução de comportamentos estereotipados e inflexibilidade cognitiva por meio do labirinto em T. Além disso, (4) o estudo do sistema dopaminérgico estriatal com a quantificação de TH foi analisado. Os parâmetros reprodutivos foram avaliados com o intuito de verificar os danos causados pelo VPA durante o período pré-natal. Nesse trabalho os filhotes machos e fêmeas foram estudados, a fim de confirmar o modelo experimental de autismo, uma vez que esse transtorno é mais prevalente em machos do que em fêmeas (FOMBONNE, 2005; KIRSTEN et al., 2010). Para verificar o papel da suplementação com zinco, os animais passaram pelos mesmos testes e procedimentos, com o intuito de avaliar a amenização dos comportamentos.

Com esse modelo experimental, foi possível verificar eventuais efeitos adversos de ocorrência em humanos, incluindo prejuízos comportamentais e cerebrais. A contribuição deste trabalho é engrandecida pelo fato de até hoje não existir terapia satisfatória contra o autismo. Tornando assim, necessários novos alvos e medicamentos para intervenções mais eficientes no TEA, somando ao fato de ser um transtorno de alta prevalência e complexa etiologia.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi dividido em duas partes, que consistem em: (1) reproduzir um modelo de autismo induzido por VPA pré-natal (400 mg/kg no GD 12,5) avaliando as alterações comportamentais e verificar a expressão de TH-estriatal na prole masculina e feminina de ratas; (2) avaliar se a administração de zinco pré-natal previne ou ameniza os prejuízos comportamentais e a expressão de TH-estriatal associados ao autismo causados pela exposição pré-natal ao VPA em ratos.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Bloco I: Estudar os efeitos do VPA pré-natal nos parâmetros reprodutivos, e possíveis alterações do zinco

- Estudar os efeitos da administração pré-natal de VPA e Zn nos parâmetros reprodutivos maternos de ratas.

2.1.2 Bloco II: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole masculina de ratos; e possível terapia com zinco

- Avaliação da exposição VPA pré-natal na comunicação (vocalização ultrassônica), comportamentos repetitivos e na capacidade cognitiva (labirinto em T) e na interação social (comportamento de brincar) na prole masculina de ratas.
- Avaliação, por meio do *Western Blotting* para TH do sistema dopaminérgico estriatal na prole masculina de ratas expostas pré-natalmente ao VPA.

- Estudar a terapia com zinco após exposição ao VPA na comunicação (vocalização ultrassônica), comportamentos repetitivos, na capacidade cognitiva (labirinto em T) e na interação social (comportamento de brincar) na prole masculina de ratas.
- Avaliação da terapia com zinco após exposição ao VPA, na expressão proteica da TH estriatal na prole masculina de ratas expostas pré-natalmente ao VPA.

2.1.3 Bloco III: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole feminina de ratos; e possível terapia com zinco

- Avaliação da exposição VPA pré-natal na comunicação (vocalização ultrassônica), comportamentos repetitivos e na capacidade cognitiva (labirinto em T) e na interação social (comportamento de brincar) na prole feminina de ratas.
- Avaliação, por meio do *Western Blotting* para TH, do sistema dopaminérgico estriatal na prole feminina de ratas expostas pré-natalmente ao VPA.
- Estudar a terapia com zinco após exposição ao VPA na comunicação (vocalização ultrassônica), comportamentos repetitivos e na capacidade cognitiva (labirinto em T) e na interação social (comportamento de brincar) na prole feminina de ratas.
- Avaliação da terapia com Zn após exposição ao VPA na expressão proteica da TH estriatal na prole feminina de ratas expostas pré-natalmente ao VPA.

**MATERIAL E
MÉTODOS**

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, com 90 dias de idade e peso corporal variando entre 200 e 340 gramas. Esses animais, provenientes do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, permaneceram em gaiolas-moradia de polipropileno (30 x 40 x 18 cm), forradas com maravalha (esterilizada e livre de resíduos). Os ratos foram mantidos em sala com aeração, exaustão, umidade entre 45 e 65% e temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, controlados automaticamente por meio de um aparelho de ar condicionado central, com ciclo de luz de 12 horas claro/ 12 horas escuro (07h00 – 19h00) e com acesso a água filtrada e ração (Nuvilab®, Nuvital company, São Paulo, Brasil) *ad libitum*. Os animais foram utilizados nesse estudo de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo nº 1568180714/2014). Essas diretrizes são baseadas nas normas do *National Institutes of Health* (Bethesda, MD). Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos de boas práticas de laboratório com métodos de garantia de qualidade.

3.2 Acasalamento

As ratas empregadas no acasalamento eram virgens e os ratos eram sexualmente experientes e da mesma linhagem, mas de ninhadas diferentes. Para o acasalamento, as ratas foram acondicionadas nas gaiolas-moradia dos machos ao final do período de luz (17h00 – 18h00), até duas ratas por macho, e lá mantidas durante o período noturno do ciclo de luz. O procedimento para a detecção da prenhez foi realizado no começo da manhã (7h00 – 8h00) do dia seguinte, por meio do lavado vaginal. Neste procedimento, uma pipeta plástica contendo salina (cloreto de sódio [NaCl] 0,9%) foi utilizada para lavagem rápida da entrada do canal vaginal

da rata, colhendo a secreção vaginal. A pipeta não pode ser introduzida na vagina da rata para evitar a pseudo-prenhez. Logo após esta etapa, o conteúdo líquido da pipeta foi colocado em uma lâmina de vidro e observado ao microscópio óptico procurando por espermatozoides junto ao material biológico da fêmea (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Considerou-se como GD 0 quando constatada a presença de espermatozoides no lavado vaginal (**Figura 4**) (BRIDGES et al., 1993). A partir deste momento, cada rata foi alocada individualmente em gaiolas-moradia, iguais as anteriormente mencionadas. No caso da ausência de espermatozoides, as etapas de pareamento de ratos e ratas e lavado vaginal foram repetidas nos dias seguintes até constatação de espermatozoides.

Figura 4 - Lavado vaginal em ratas visto no microscópio óptico

Fonte: Kirsten, T. B. (2012)

3.3 Drogas e soluções

Depois de confirmada a gestação, as ratas foram expostas ao VPA (400 mg/kg) no GD 12,5 ou solução salina para obtenção dos grupos experimental e controle. O primeiro grupo, o SAL+SAL, foi composto por filhotes das ratas que foram tratadas pré-natalmente com salina no GD 12,5 e que receberam outra dose

de salina 1 hora após (a salina está presente como veículo no VPA e também ao zinco). O segundo grupo, o VPA+SAL, foi composto por filhotes das ratas tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5 e que receberam uma dose de salina 1 hora após. O terceiro grupo, o VPA+Zn, foi composto por filhotes das ratas tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5 e que receberam uma dose de zinco 1 hora após. Por último, os filhotes do grupo SAL+Zn foram tratados pré-natalmente com salina no GD 12,5 e receberam outra dose de zinco 1 hora após (n = 5 gestantes para cada grupo e n = 10 filhotes cada grupo). Na **Figura 5** é possível visualizar a divisão dos grupos de forma resumida.

Figura 5 - Esquema da divisão dos grupos utilizados nesse trabalho, totalizando 40 machos e 40 fêmeas

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

3.3.1 Tratamento com VPA

Para reproduzir o modelo experimental de autismo, o valproato de sódio utilizado foi o Depacon® (ABBOTT Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Em cada ml da solução empregada contém valproato de sódio equivalente a 100 mg de ácido valpróico e excipiente: edetato dissódico (EDTA), água para injetáveis, hidróxido de sódio e ácido clorídrico. A dose utilizada de VPA foi de 400 mg/kg baseada em estudos que avaliaram os potenciais efeitos de dosagens moderadas (COHEN et al., 2013; CUSMANO; MONG, 2014; WELLMANN; VARLINSKAYA; MOONEY, 2014).

A dose de 400 mg/kg foi regulada a fim de diminuir a toxicidade e reabsorção de filhotes nas ratas, observado em doses de 500 e 600 mg/kg (FAVRE et al., 2013). Porém, apesar de ser empregada uma dose moderada nesse trabalho, foi possível observar efeitos tóxicos do VPA. A **Figura 6** revela nos grupos experimentais que receberam VPA torção da cauda e na **Figura 7** é possível observar cromodaciorréia, situações previamente relatadas pela literatura (FAVRE et al., 2013).

A solução de VPA foi administrada em ratas Wistar via i.p., no GD 12,5 para induzir comportamentos “tipo-autista” nas proles. A solução salina que foi administrada para o tratamento do grupo controle foi constituída por solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%. Esses animais receberam 0,2 ml/100g de solução salina também por via i.p. no GD 12,5. Esta etapa do trabalho ocorreu sempre durante à tarde (entre às 14h00 e às 16h00).

Figura 6 - Torção da cauda observada nos animais que receberam VPA pré-natalmente

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Figura 7 - Cromodaciorréia observada nos animais que receberam VPA pré-natalmente

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

3.3.2 Tratamento com Zn

As ratas gestantes foram tratadas com zinco 1 hora após a administração do VPA (como descrito anteriormente no item 3.3) para verificar se existe prevenção/amenização nos danos relacionados aos parâmetros reprodutivos, nos comportamentos associados ao autismo, além dos prejuízos encontrados no cérebro da prole que foram causados pelo VPA. Foi escolhido o tratamento com zinco 1 hora após a exposição ao VPA, baseado na hipótese de que o VPA de uma forma indireta altera reservas teciduais de zinco após sua administração na mãe induzindo uma resposta de fase aguda desse nutriente resultando no aumento da síntese de MT (DASTON et al., 1991; TAUBENECK et al., 1995). A MT no fígado reduz as concentrações de zinco no plasma materno e causa diminuição transitória da disponibilidade de zinco para o feto, que pode influenciar no metabolismo de zinco embrionário. Em relação à dose administrada nas gestantes, foi escolhido a dose de 2 mg/kg de sulfato de zinco (ZnSO₄) hepta-hidratado (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) em solução salina 0,9%, s.c. na nuca do animal, baseada nos estudos de Coyle et al. (2012) e Kirsten et al. (2015a). Uma injeção s.c. de zinco promove um aumento imediato e consistente dos níveis de zinco plasmático, que chega a quatro ou cinco vezes o nível normal após 2 horas da injeção, retornando estes valores aos níveis normais a partir de 12 horas após a injeção (SUMMERS; ROFE; COYLE, 2006). Não existem evidências que esses níveis plasmáticos de zinco resultem em um efeito negativo sobre a gravidez (CAREY et al., 2003). O restabelecimento dos níveis de zinco nesse tratamento após cerca de 12 horas coincide com o período total de excreção da droga.

3.4 Bloco I: Efeitos do VPA pré-natal nos parâmetros reprodutivos e possíveis alterações do zinco

Em um primeiro momento o estudo buscou verificar o impacto pré-natal do VPA diretamente nas ratas gestantes, a fim de explicar os efeitos do VPA sobre a gestação. Após verificar os prejuízos causados pelo VPA na prenhez, o estudo

investigou a possível terapia com zinco 1h após a exposição ao VPA com intuito de averiguar possíveis alterações/amenizações. Para isso, foi realizada a padronização da ninhada para os testes pós-natais, e também foram avaliados os parâmetros reprodutivos nas gestantes.

3.4.1 Parâmetros reprodutivos maternos e da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

O parto ocorreu naturalmente nas ratas de todos os grupos (SAL+SAL, VPA+SAL, VPA+Zn e SAL+Zn). O primeiro dia de vida dos filhotes foi definido como dia de vida pós-natal (PND) 1. No PND 1 nenhuma manipulação foi realizada (filhotes e progenitora), já que é fato conhecido que este é um período crítico de estresse para a mãe; manipulações podem acarretar em infanticídio e/ou canibalismo. No PND 2 (8h00 – 10h00), cada ninhada foi ajustada para quatro machos e quatro fêmeas, totalizando oito animais por ninhada. A diferença entre os gêneros foi verificada por meio da diferença visual da distância urogenital, maior nos machos que nas fêmeas (HOLSON et al., 2006).

Os filhotes permaneceram com suas respectivas mães até o PND 21, quando foi realizado o desmame (8h00 – 10h00). Os filhotes do sexo masculino e feminino foram separados. Os machos foram individualmente isolados e mantidos em gaiolas-moradia. Para cada um dos experimentos pós-natais realizados neste estudo foram utilizados apenas dois filhotes machos de cada ninhada para evitar efeitos individuais maternos na ninhada (PEREIRA; BERNARDI; GERARDIN, 2006). Foram avaliados sempre os mesmos filhotes para todos os testes, comportamental e molecular. Os animais dos diferentes grupos foram avaliados intercaladamente em todos os testes.

3.4.2 Parâmetros reprodutivos maternos e da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

Os parâmetros reprodutivos avaliados nas ratas gestantes e em suas respectivas proles (n = 5 gestantes por grupo) foram avaliados entre às 9h00 e às 11h00 e são descritos a seguir:

- Duração da gestação: foram quantificados o número total de dias de cada gestação a partir do seu início, no GD 0, até o dia em que os filhotes nasceram;
- Número total de filhotes nascidos: refere-se à quantidade de filhotes nascidos de cada rata prenhe, avaliado no PND 2 antes da padronização das ninhadas;
- Número de filhotes machos: refere-se à quantidade de filhotes do sexo masculino nascidos de cada rata prenhe, avaliado no PND 2 antes da padronização das ninhadas. A distinção entre machos e fêmeas foi realizada como descrito anteriormente no item 3.4.1;
- Número de filhotes fêmeas: refere-se à quantidade de filhotes do sexo feminino nascidas de cada rata prenhe, avaliado no PND 2 antes da padronização das ninhadas;
- Peso total da prole: cada conjunto de filhotes de uma ninhada foi pesado (peso em gramas) no PND 2, antes da padronização;

3.5 Bloco II: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole masculina de ratos; e possível terapia com zinco

Após a padronização da ninhada para a avaliação dos parâmetros reprodutivos nas gestantes, os filhotes foram submetidos aos testes comportamentais e análise molecular. Neste bloco, a prole masculina exposta pré-

natalmente ao VPA foi submetida a diversos testes comportamentais, que avaliaram sintomas associados ao autismo a fim de confirmar o modelo experimental. Para isso após a exposição pré-natal ao VPA nos ratos, foram analisados (1) a comunicação (vocalização ultrassônica), (2) os comportamentos repetitivos e a capacidade cognitiva (labirinto em T), (3) o comportamento de brincar e (4) o sistema dopaminérgico do estriado através da expressão proteica de TH.

Ainda nesse bloco, as proles masculinas infantis de ratas foram avaliadas quanto à capacidade de o zinco pré-natal prevenir ou amenizar os prejuízos comportamentais causados pela exposição ao VPA. Para isso os mesmos testes foram aplicados, (1) a comunicação (vocalização ultrassônica), (2) os comportamentos repetitivos e a capacidade cognitiva (labirinto em T), (3) o comportamento de brincar e (4) o sistema dopaminérgico do estriado através da expressão proteica de TH.

3.5.1 Avaliação da comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

A comunicação prejudicada dos filhotes com suas mães, um típico sintoma do autismo (DSM-V, 2013), foi avaliada via vocalização ultrassônica no PND 11 dos filhotes expostos pré-natalmente ao VPA e zinco imediatamente após isolamento materno. Filhotes de roedores emitem vocalizações (frequência de banda de 30–50 kHz) quando isolados de suas mães, e essas vocalizações são consideradas indicativas de solicitação de interações maternas (INSEL; HILL; MAYOR, 1986; ISE et al., 2008). O PND 11 foi escolhido, pois (1) a produção de chamados ultrassônicos é relativamente independente da temperatura durante a segunda semana de vida, comparada à primeira semana, (2) é observada alta variabilidade de emissões de chamados entre a ninhada nesse dia, e (3) existem evidências substanciais de estabilidade intraindividual nas emissões de chamados nesse dia (BRUNELLI; HOFER, 1996; BRUNELLI et al., 1997; KIRSTEN et al., 2010, 2013). A metodologia empregada e os parâmetros avaliados no teste da vocalização ultrassônica no contexto do autismo foi a mesma que a empregada por Kirsten et al. (2015a). Imediatamente após o isolamento do filhote do ninho e da mãe, dois filhotes

machos e duas fêmeas de cada ninhada dos quatro grupos ($n = 10$ para cada grupo) foram individualmente colocados em gaiolas de polipropileno ($30 \times 20 \times 12$ cm) e conduzidos para a sala teste (com temperatura controlada, $22 \pm 2^\circ\text{C}$) separados da sala moradia. A vocalização ultrassônica foi detectada usando o aparelho Ultravox (version 2.0, Noldus Information Technology®, Leesburg, VA, USA) acoplado a um microfone ultrassônico ajustado para uma escala centrada em 40 kHz e colocado distante 8 cm do piso da gaiola (**Figura 8**). Esse aparelho permite o monitoramento automatizado das vocalizações ultrassônicas. Os testes foram realizados sempre entre às 9h00 e 11h00. Imediatamente após os 5 minutos de teste os filhotes eram devolvidos as respectivas gaiolas das mães e irmãos. Os parâmetros avaliados automaticamente pelo *software* em sessão de 5 minutos foram:

- Número de vocalizações: total de vocalizações ultrassônicas em 40 kHz emitidas pelos filhotes durante o período da avaliação;
- Duração total de vocalizações: tempo total em segundos de vocalizações ultrassônicas em 40 kHz emitidas pelos filhotes durante o período da avaliação;
- Duração média de vocalização: tempo médio em segundos de uma vocalização ultrassônica em 40 kHz emitida pelos filhotes durante o período da avaliação;
- Duração máxima de vocalização: tempo máximo em segundos de uma vocalização ultrassônica em 40 kHz emitida pelos filhotes durante o período da avaliação;
- Duração total de silêncio: tempo total em segundos em que o filhote passou em silêncio, isto é, não emitindo vocalizações ultrassônicas durante o período da avaliação;
- Duração média de silêncio: tempo médio em segundos em que o filhote passou em silêncio, isto é, não emitindo vocalizações ultrassônicas durante o período da avaliação;
- Duração máxima de silêncio: tempo máximo em segundos em que o filhote passou em silêncio, isto é, não emitindo vocalizações ultrassônicas durante o período da avaliação.

Figura 8 - Aparato utilizado para avaliação da vocalização ultrassônica, constituindo de microfone ultrassônico, filtro e software (Noldus®) para análise automatizada

Fonte: Imagem cedida por Thiago B Kirsten (2016)

3.5.2 Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

Comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva são alguns dos sintomas mais típicos de pacientes autistas (DSM-IV, 1994). Esses comportamentos foram avaliados usando o teste de alternância espontânea no labirinto em T. O teste foi baseado nos estudos de KIRSTEN (KIRSTEN et al., 2015a,b) no contexto do autismo experimental em ratos. Para tanto, no PND 29 os mesmos dois filhotes machos e duas fêmeas de cada ninhada de cada um dos grupos avaliados na vocalização ($n = 10$ para cada grupo) foram avaliados no aparato. O labirinto em T foi construído em madeira pintada de preto (tinta acrílica impermeável) com três braços em forma de T (90° de inclinação). Os braços têm 10 cm de largura e as paredes 30 cm de altura. Um dos braços tem uma área de partida de 20 cm de comprimento, separado por uma parede removível da continuação do braço. O

restante desse braço possui 45 cm de comprimento. Os outros dois braços de menor comprimento (esquerdo e direito) são os braços de livre escolha e possuem 40 cm de comprimento cada. A sala de teste usada foi uma sala pequena com iluminação fraca.

Para o teste, cada filhote foi mantido por 10 segundos na área de partida. Após isso, a barreira foi removida e o filhote explorou todo o labirinto por até 30 segundos. Assim que o filhote entrou em um dos braços de livre escolha, a barreira desse braço correspondente bloqueou o animal nesse braço por 30 segundos. Após isso, o animal foi recolocado na área de partida, iniciando outra sessão. Caso o filhote não entrasse em nenhum dos braços de livre escolha após os 30 segundos de exploração, aquela sessão foi reiniciada, com o animal sendo recolocado na área de partida. Foram realizadas cinco sessões para cada animal. Em cada uma das sessões, foi avaliado o primeiro braço de livre escolha visitado pelo filhote, isto é, se o animal entrou primeiro no braço direito ou esquerdo. O parâmetro analisado foi a frequência de alternância entre os braços esquerdo e direito, sempre com relação ao braço visitado na sessão anterior. Esse modelo é baseado na propensão natural do rato em alternar a escolha do braço visitado em cada sessão, ao longo de sucessivas sessões (DUDCHENKO, 2004). Portanto, quanto maior o escore de alternância entre os braços, mais normal foi considerado o comportamento do animal, e quanto menor a alternância, maior é a inflexibilidade cognitiva e o comportamento repetitivo. Para análise estatística, esses dados foram transformados em escores: 0 = nenhuma alternância entre os braços visitados, ou seja, repetição do mesmo lado visitado ao longo das cinco sessões; 1 = uma alternância entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 2 = duas alternâncias entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 3 = três alternâncias entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 4 = quatro alternâncias entre os braços visitados, ou seja, alternância entre os braços em todas as cinco sessões. Quando um animal foi exposto à primeira sessão do aparato, este estava sempre limpo com solução álcool/água 5 %, eliminando possíveis odores deixados por outros animais. A **Figura 9** ilustra o labirinto em T utilizado nesse estudo.

Figura 9 - Labirinto em T com barreiras que separam a área de partida e dois braços de livre escolha

Fonte: Cezar, L. C., (2016)

3.5.3 Avaliação da socialização e comportamento de brincar da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

Prejuízos na socialização e no comportamento de brincar são alguns dos sintomas mais típicos de pacientes autistas (DSM-V, 2013). Esses comportamentos foram avaliados nos ratos usando metodologia similar àquela empregada em nossos estudos prévios (KIRSTEN et al., 2015a,b,c). Após o desmame, no PND 21, dois filhotes machos e duas fêmeas de cada ninhada dos quatro grupos ($n = 10$ para cada grupo) foram isolados em gaiolas-moradia iguais as anteriormente citadas. O motivo do isolamento social foi para aumentar a motivação em iniciar o comportamento de brincar (PANKSEPP; BEATTY, 1980). O comportamento de brincar foi avaliado no PND 30, pois esse comportamento apresenta pico justamente

nesse período (PLETNIKOV et al., 1999). Para a avaliação da interação social, cada filhote isolado dos três grupos foi pareado com um filhote macho *naïve* que estava previamente agrupado, com diferença do peso de até 10 gramas entre a dupla pareada. Os filhotes agrupados *naïve* foram utilizados apenas para um pareamento. O filhote agrupado *naïve* era sempre inserido na gaiola-moradia do isolado, onde o experimento era realizado, e, portanto, os isolados são também denominados como residentes, e os agrupados como intrusos. Imediatamente antes do início do experimento, uma gaiola-moradia de um animal isolado e uma gaiola-moradia de agrupados *naïve* foi colocada na sala de observação por 5 minutos para aclimação. Após este período, foi realizado o pareamento e imediatamente a avaliação comportamental começou. As sessões foram de 10 minutos. Os testes foram realizados durante a tarde, entre as 11h00 e 15h00. O comportamento dos animais foi filmado e, ao final das sessões, analisado. Os seguintes parâmetros foram avaliados individualmente para os animais isolados dos quatro grupos:

- *Pinnings*: considerado como o comportamento de brincar propriamente dito, corresponde ao número de vezes que o filhote residente se deita de costas (com seu dorso encostado no chão) mostrando seu ventre para o intruso, que fica sobre ele, ocorrendo interação social entre ambos (**Figura 10**);
- *Darts*: número de vezes que o filhote se movimenta rapidamente, correndo em direção, em paralelo, ou se distanciando do intruso;
- Passar sobre/sob: corresponde ao número de vezes que o filhote passa por cima ou por baixo do intruso que pode estar parado ou em movimento;
- Perseguir: corresponde ao total de tempo (em segundos) que o filhote gasta perseguindo o intruso, ou seja, se movimenta em direção ao outro, quando o animal perseguido também está se movimentando;
- Farejar: corresponde ao total de tempo (em segundos) que o filhote gasta farejando o intruso, entendido pelo contato físico direto ou a partir de uma distância menor ou igual a cinco centímetros do focinho ao intruso;
- Levantar: corresponde ao número de vezes que o filhote se sustentava apenas pelas patas traseiras, de maneira a explorar a gaiola, sem qualquer tipo de interação ou contato com o intruso.

O *pinning* é considerado a brincadeira social; o *darts* e o passar sobre/sob são solicitações de brincadeira; o perseguir e o farejar são investigações sociais; e o levantar é um parâmetro de exploração não social (PLETNIKOV et al., 1999).

Figura 10 - Ilustração de dois filhotes jovens realizando o comportamento de brincar propriamente dito ou *pinning*

Fonte: Veenema et al. (2013)

3.5.4 Determinação dos níveis de TH no estriado da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

Depois da avaliação do comportamento de brincar (item 3.5.3) no PND 30, as proles masculinas e femininas de todos os grupos (SAL+SAL, VPA+SAL, VPA+Zn e SAL+Zn) foram decapitados e o encéfalo foi retirado. Após esse procedimento o estriado esquerdo e o direito foram rapidamente coletados sobre placa de gelo seco, formando assim um microambiente o mais frio possível. Os procedimentos de coleta duraram no máximo 3 minutos por animal. Essas regiões foram dissecadas com base nas seguintes coordenadas: estriado aproximadamente +2.28 a -1.32 mm anteroposterior (AP) relativo ao (PAXINOS; WATSON, 1998). A estrutura retirada foi então acondicionada em *ependorfs* e estocada a -80°C para posterior extração de proteínas num período de 90 dias.

3.5.4.1 *Expressão proteica de TH no estriado via western blotting da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal*

Os níveis de TH no estriado foram quantitativamente analisados como descrito por Kirsten (KIRSTEN et al., 2012, 2015a). As amostras de estriado de dois machos e duas fêmeas de cada ninhada foram utilizadas (n= 10). O método utilizado foi descrito por Rong e Baudry (1996). As estruturas foram descongeladas e homogeneizadas em homogeneizadores vidro-vidro com tampão fosfato-salina (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,27 mM, Na₂HPO₄ 8,06 mM) gelado adicionado de inibidores de proteases e fosfatase (*ammonium persulfate* [PMSF] 0,5 M; leupeptina 2,5 µg/ml; antipaína 2 µg/ml; NaF 30 mM; pirofosfato de sódio 20 mM; B-GP 5 mM) e EDTA 0,1 mM. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 30 segundos à 4° C. O sobrenadante foi reservado e estocado a -80° C para os ensaios de *western blot*. A concentração proteica do sobrenadante foi determinada usando-se uma solução para ensaio colorimétrico (Bio-Rad; Hercules, CA, USA) e ajustada na quantidade de 15 µg com o tampão de amostra (0,125 M tris-HCl; 4% de *sodium dodecyl sulfate* [SDS]; 20% v/v glicerol; 0,2 M de DTT; 0,02% de *bromophenol blue*; pH 6,8) e fervidas por 5 minutos a 95° C. As amostras foram aplicadas no gel de SDS-poliacrilamida 12% (acrilamida/bisacrilamida [5:1], 1% SDS) para que houvesse a separação das proteínas contidas na amostra. No mesmo gel foi adicionado o padrão. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de

corrida consistindo em 25 mM de tris-base; 0,192 M de glicina; 0,1% de SDS. A separação eletroforética foi feita em uma cuba para mini-gel (Mini-Protean 3; Bio-Rad®, Hercules, CA, USA) por aproximadamente 2 horas a 90 V. Ao final da corrida, as proteínas separadas e contidas no gel foram eletro-transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Biorad, Hercules, CA, EUA) por aproximadamente 2 horas a 80 V. Para a transferência foi usado um tampão contendo 25 mM de tris-base, 192 mM de glicina, 20% de metanol e água bidestilada. Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,5% Ponceau-S; 5% ácido tricloro acético e água bidestilada), lavadas com água bidestilada até retirar todo o excesso da solução corante e deixadas overnight a 4°C numa solução de salina tamponada contendo Tween 20 (TTBS; 0,01 M de Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 0,05% de Tween 20) com 0,5% de leite desnatado para bloquear ligações inespecíficas com o anticorpo. Após essa etapa, as membranas foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo anti tirosina hidroxilase (TH; Chemicon; 1:1.000) em TTBS. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes, 10 minutos cada, em TTBS e posteriormente incubadas por duas horas com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (Amersham®; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) diluído a 1: 2.000 em solução para incubação contendo 1% de leite desnatado em TTBS. Novamente as membranas foram lavadas em TTBS por três vezes de 10 minutos e a ligação específica do anticorpo com a proteína foi revelada utilizando o kit de quimioluminescência (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Finalmente, as bandas foram analisadas quanto à densidade óptica (DO) da imunorreatividade usando-se o programa Image J (NIH/USA). Como controle da quantidade de proteínas aplicada nos géis utilizou-se o anticorpo contra a proteína estrutural β -actina (Sigma®, St. Louis, MO, USA) nas mesmas membranas, seguindo o mesmo protocolo de incubação descrito acima. Como não houve variações na expressão de β -actina nas condições estudadas, a TH das bandas de todos os anticorpos foram primeiramente normalizadas em relação à banda correspondente de β -actina em cada experimento. Os dados foram normalizados fazendo-se a razão da TH da banda do anticorpo estudado sobre a DO da banda de β -actina correspondente. Após a normalização com a β -actina, o valor obtido para todos os grupos foi dividido pela média do controle.

3.6 Bloco III: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole feminina de ratos; e possível terapia com zinco

Os animais desse bloco sofreram o mesmo tratamento dos animais do item 3.5. Esse trabalho estudou as fêmeas, visando avaliar a resposta desses animais frente à exposição ao VPA; e possível tratamento e amenização com o uso do zinco. Após a padronização da ninhada para e também a avaliação dos parâmetros reprodutivos nas gestantes, os filhotes foram submetidos a testes comportamentais e análise molecular. Neste bloco, a prole feminina exposta pré-natalmente ao VPA, foi submetida a diversos testes comportamentais, que avaliaram sintomas associados ao autismo a fim de confirmar o modelo experimental. Para isso após a exposição pré-natal ao VPA nos ratos, foram analisados (1) a comunicação (vocalização ultrassônica), (2) os comportamentos repetitivos e a capacidade cognitiva (labirinto em T), (3) o comportamento de brincar e (4) o sistema dopaminérgico do estriado através da expressão proteica de TH.

Ainda nesse bloco, as proles femininas infantis de ratas foram avaliadas quanto à capacidade do zinco pré-natal prevenir ou amenizar os prejuízos comportamentais causados pela exposição ao VPA. Para isso os mesmos testes foram aplicados, (1) a comunicação (vocalização ultrassônica), (2) os comportamentos repetitivos e a capacidade cognitiva (labirinto em T), (3) o comportamento de brincar, (4) o sistema dopaminérgico do estriado através da expressão proteica de TH e o (5) peso dos encéfalos.

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram verificadas por meio do software GraphPad Prism 5.00 (GraphPad® Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para todos os dados foi estabelecido limite mínimo de significância de 95% ($p < 0,05$). Primeiramente verificou-se a homocedasticidade dos dados pelo teste de Bartlett ou teste F (para avaliação da distribuição Gaussiana) para então, criteriosamente empregar análises não-paramétricas e paramétricas. O teste estatístico empregado para análises de dados não-paramétricos entre os quatro grupos (SAL+SAL, VPA+SAL, VPA+Zn e SAL+Zn) foi o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Dunn. E para os dados paramétricos com análises dos quatros grupos foi utilizada a análise de variância ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão (EP) ou mediana (mínimo e máximo).

3.8 Delineamento experimental

No esquema abaixo é possível ter uma visão resumida de todos os testes empregados nesse trabalho.

Figura 11 - Delineamento dos três blocos de experimentos realizados, desde a determinação do dia de gestação (GD) zero das ratas, passando pelo tratamento com VPA, salina e zinco, as avaliações nas gestantes e, a partir do dia de vida pós-natal (PND) 2, avaliações na prole

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Para melhor compreensão do estudo, os resultados serão apresentados em blocos de acordo com os objetivos propostos no presente trabalho.

4.1 Bloco I: Efeitos do VPA pré-natal nos parâmetros reprodutivos, e possíveis alterações do zinco

Para a obtenção desses resultados ratas gestantes foram tratadas pré-natalmente com VPA, a fim de verificar os prejuízos desse fármaco sobre a mãe e a gestação com $n=5$ por grupo (SAL+SAL e VPA+SAL). Após verificar os prejuízos causados pelo VPA na prenhez, esse trabalho avaliou a possível terapia com Zn 1h após a exposição ao VPA com intuito de averiguar possíveis alterações/amenizações causadas pelo Zn com $n=5$ por grupo (SAL+Zn e VPA+Zn).

A **Figura 12** ilustra os efeitos da exposição do VPA e Zn pré-natais nos parâmetros reprodutivos maternos e da prole de ratas. De acordo com a análise estatística ANOVA de uma via (seguido pelo teste de Bonferroni), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à duração da gestação de ratas previamente tratadas com VPA e zinco pré-natalmente [$F(19) = 1$; $p = 0,04182$]. Entretanto foram encontradas diferenças em relação ao peso da ninhada no PND 2 [$F(19) = 7,9$; $p = 0,0018$]. A princípio o tratamento com VPA foi suficiente em gerar prejuízos no peso da ninhada quando comparado ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,001$). O tratamento com zinco após a exposição ao VPA não foi capaz de interferir na redução do peso da ninhada; SAL+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,001$).

Apesar do peso da ninhada sofrer alterações estatisticamente significantes ($p = 0,4182$) após o tratamento pré-natal com VPA e zinco, o número total de filhotes não sofreu nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos [$F(19) = 2,8$; $p = 0,0689$]. E ainda, o número de fêmeas [$F(19) = 1,4$; $p = 0,2709$] e o número de machos [$F(19) = 0,6$; $p = 0,6234$] não apresentaram qualquer diferença

estatisticamente significativa após a exposição pré-natal com VPA e tratamento com zinco (1h após).

Os resultados encontrados nas avaliações dos parâmetros reprodutivos demonstram que o tratamento com VPA (400 mg/kg) no GD 12,5 foi prejudicial a gestação interferindo no peso total da ninhada. Porém o pós-tratamento com ZnSO₄ (2 mg/kg) não foi suficiente para reverter ou diminuir esse prejuízo.

Figura 12 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO₄ 1h após) nos parâmetros reprodutivos maternos e da prole de ratas

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Os grupos representam os múltiplos tratamentos no GD 12,5 de ratas Wistar, SAL+SAL = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+SAL = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 5 gestantes para cada um dos grupos). **p<0,01 quando comparado ao grupo controle (SAL+SAL); (g) referente a gramas e Nº referente a número. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores são representados como média ± E.P.M.

4.2 Bloco II: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole masculina de ratos; e possível terapia com zinco

Nesse bloco foram analisados os dados das proles masculinas expostas pré-natalmente ao VPA (400 mg/kg) no GD 12,5 e o pós-tratamento com zinco. Para isso foram obtidos os grupos experimentais e controle (n=10). As proles masculinas foram avaliadas em relação à comunicação (vocalização ultrassônica), inflexibilidade cognitiva (labirinto em T) e socialização (comportamento de brincar). A análise da TH no estriado por meio do Western Blott verificou os prejuízos dopaminérgicos.

4.2.1 Avaliação da comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole masculina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

A **Tabela 1** mostra e a **Figura 13** ilustra os efeitos da exposição ao VPA e zinco na comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole masculina infante de ratas. A análise estatística de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn revelou diferenças significantes em todos os parâmetros avaliados. O número de vocalizações mostrou diferença estatística entre os grupos [KW= 33,36; p= 0,0001]. A exposição prévia ao VPA foi capaz de reduzir as vocalizações quando comparado ao controle; SAL+ SAL vs VPA+ SAL (p<0,0001) e ao grupo SAL+Zn vs VPA+SAL (p<0,001), porém o tratamento com o zinco não foi eficiente em reverter esse quadro demonstrando redução nos chamados ultrassônicos em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+Zn (p<0,001).

A análise da duração total de vocalizações demonstrou diferenças estatísticas significantes [KW=29,90; p=0001]. A comparação dos dados revelou que o grupo exposto ao VPA pré-natal diminuiu a duração total de vocalizações; SAL+SAL vs VPA+SAL (p<0,0001) e SAL+Zn vs VPA+SAL (p= 0,001), o pós-tratamento com zinco não foi capaz de interferir nos efeitos do VPA; SAL+SAL vs VPA+Zn (p<0,01).

A duração média de vocalização apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [KW=13,90; p=0,0030]. Os animais tratados pré-

natalmente com VPA diminuíram a duração média de vocalização em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,001$). Entretanto, o pós-tratamento com zinco não alterou estatisticamente o tempo médio de vocalização em relação a exposição com VPA (VPA+SAL vs VPA+Zn), mas não diferiu do grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL.

Em relação à duração máxima de vocalizações, foi possível verificar alterações estatisticamente significantes entre os grupos [KW=15,30; $p = 0,0016$]. O tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 foi capaz de diminuir o tempo máximo de vocalizações em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,01$) e SAL+Zn vs VPA+Zn ($p < 0,0001$). O pós-tratamento com zinco não alterou estatisticamente o tempo máximo de vocalização em relação a exposição com VPA (VPA+SAL vs VPA+Zn), mas não diferiu do grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL.

Da mesma maneira, foram encontradas diferenças quanto à duração total de silêncio [KW=29,50; $p = 0,0001$]. O VPA foi eficiente em aumentar a duração total de silêncio em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,0001$) e SAL+Zn vs VPA+SAL ($p < 0,01$). Por outro lado, o tratamento com zinco 1h após a exposição do VPA na prole masculina de ratas, não foi eficiente em intervir estatisticamente na duração total de silêncio mantendo as alterações causadas pelo VPA; SAL+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,01$).

Segundo a análise estatística a duração média de silêncio evidenciou alterações estatisticamente significantes [KW=32,10; $p = 0,0001$]. Os filhotes previamente expostos pré-natalmente ao VPA exibiram uma duração média de silêncio maior quando comparado ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,0001$) e SAL+Zn vs VPA+SAL ($p < 0,001$). Já o pós-tratamento com zinco não alterou estatisticamente o prejuízo no aumento da duração média do silêncio causado pela exposição ao VPA; SAL+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,001$). Na duração máxima de silêncio foi possível observar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [KW=17,80; $p = 0,0005$]. O tratamento pré-natal com VPA aumentou a duração máxima de silêncio de filhotes machos em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,0005$). Porém os filhotes tratados pré-natalmente com VPA e 1h após com zinco não exibiram melhora em relação ao aumento da duração máxima de silêncio; SAL+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,05$).

Esses resultados na avaliação da vocalização ultrassônica mostraram que o VPA pré-natal prejudicou a comunicação dos filhotes, ou seja, eles passaram mais

tempo sem chamar sua mãe quando estava em isolamento observados na diminuição da vocalização e maior tempo gasto em silêncio. O tratamento com zinco 1h após a exposição do VPA não conseguiu impedir todos os prejuízos causados na comunicação de machos. Apenas a duração média de vocalização e a duração máxima de vocalização não diferiram do grupo controle (SAL+SAL vs VPA+Zn).

Tabela 1 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nas vocalizações ultrassônicas da prole masculina de ratas no PND 11

GRUPOS				
<u>Parâmetros</u>	<u>SAL+SAL</u>	<u>VPA+SAL</u>	<u>VPA+Zn</u>	<u>SAL+Zn</u>
Nº de vocalizações	295,0 ± 20,8	40,2 ± 5,1****#	127,7 ± 9,7**	185,2 ± 15,3
Duração total de vocalizações	65,4 ± 6,9	4,93 ± 0,9****#	23,0 ± 3,6*	37,9 ± 5,5
Duração total de silêncio	235,6 ± 6,9	295,3 ± 0,9****#	277,2 ± 3,6*	263,0 ± 5,7
Duração média vocalizando	0,22 ± 0,0	0,11 ± 0,0***	0,17 ± 0,0	0,19 ± 0,0
Duração média de silêncio	0,84 ± 0,0	8,80 ± 1,7****#	2,67 ± 0,5**	1,52 ± 0,1
Duração máxima de vocalização	1,22 ± 0,1	0,65 ± 0,2****#	1,06 ± 0,2	1,56 ± 0,2
Duração máxima de silêncio	11,8 ± 2,63	65,6 ± 9,62***	50,0 ± 15,0*	36,4 ± 9,2

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Legenda: SAL+SAL = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+SAL = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal zinco 1 hora após (n = 10 ratos por grupos). p < 0,01, **p > 0,001 e ***p < 0,0001 comparado com o grupo SAL+SAL e #p < 0,05, ##p > 0,001 e ###p < 0,0001 comparado com o grupo SAL+Zn; Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn. Os valores são representados como média ± E.P.M.

Figura 13 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO₄) na vocalização ultrassônica da prole masculina de ratas

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Os grupos representam os múltiplos tratamentos no GD 12,5 de ratas Wistar, SAL+SAL = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+SAL = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 10 ratos para cada um dos grupos). *p < 0,01, **p < 0,001 e ***p < 0,0001 comparando o grupo entre as chaves, (s) segundos e N° número. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn. Os valores são representados como média ± E.P.M.

4.2.2 Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole masculina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

A **Figura 14** ilustra os efeitos da exposição ao VPA e zinco pré-natais na avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T da prole masculina de ratas no PND 29. De acordo com a análise estatística Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste Dunn foram encontradas diferenças quanto à alternância entre os braços (KW=15,82, $p = 0,0012$). A exposição ao VPA no GD 12,5 reduziu a alternância entre os braços, comparado ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p=0,001$) e SAL+Zn vs VPA+SAL ($p=0,01$). O pós-tratamento com zinco não modificou o escore de alternância entre os braços nos animais em relação ao grupo VPA+SAL, mas não diferiu do grupo controle reestabelecendo o escore próximo ao observado no grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL.

Os resultados no teste do labirinto em T mostraram que o VPA pré-natal induziu maior repetição no braço visitado ao longo das sessões no labirinto, ou seja, induziu comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva nos filhotes. O pós-tratamento com zinco não interferiu estatisticamente nos efeitos do VPA; VPA+SAL vs VPA+Zn, entretanto o grupo VPA+Zn demonstrou uma alternância entre os braços visitados similar ao encontrado nos animais do grupo controle; SAL+SAL vs VPA+Zn.

Figura 14 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 µg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO₄) na avaliação do comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T da prole masculina jovem de ratas no PND 29

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Escores: 0 = nenhuma alternância entre os braços visitados; 1 = uma alternância entre os braços visitados; 2 = duas alternâncias entre os braços visitados; 3 = três alternâncias entre os braços visitados; e 4 = quatro alternâncias entre os braços visitados. SAL+Sal = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Sal = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal zinco 1 hora após; (n = 10 para todos os grupos). ** $p < 0,001$ comparado com o grupo SAL+Sal; * $p < 0,05$ comparado com o grupo SAL+Zn (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn). Os valores são representados como mediana (mínimo e máximo)

4.2.3 Avaliação da socialização e comportamento de brincar da prole masculina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

A **Tabela 2** mostra e a **Figura 15** ilustra os efeitos da exposição ao VPA e zinco pré-natais na socialização de proles masculinas de rato através do comportamento de brincar. De acordo com a análise estatística ANOVA de uma via seguido do pós-teste Bonferroni, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes. O tempo de perseguir revelou diferenças entre os grupos [$F(39) = 12,12$; $p=0,0001$]. O tratamento com VPA foi eficiente em alterar o

tempo de perseguir das proles masculinas de ratos quando comparado ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,0001$) e SAL+Zn vs VPA+SAL ($p < 0,0001$). O pós-tratamento com zinco não foi suficiente em alterar o tempo de perseguir quando ratos foram expostos ao VPA, demonstrou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo salina+zinco; SAL+Zn vs VPA+Zn ($p < 0,01$).

A análise estatística verificou diferenças estatísticas significantes na frequência de *darts* na prole masculina de ratos [$F(39) = 11,16$; $p = 0,0001$]. A exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 diminuiu a frequência de *darts* em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,0001$) e SAL+Zn vs VPA+SAL ($p < 0,001$). O pós-tratamento com zinco não foi eficiente em interferir no tratamento com VPA pré-natal, a frequência de *darts* manteve-se diminuída em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,001$).

Em relação à frequência de *pinning*, foi possível verificar alterações estatisticamente significantes entre os grupos [$F(39) = 12,43$; $p = 0,0001$]. O tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 foi capaz de diminuir a frequência de *pinning* quando comparado ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,0001$) e SAL+Zn vs VPA+SAL ($p < 0,01$). O pós-tratamento com zinco foi capaz de reverter a estatisticamente a frequência de *pinning* quando comparado ao grupo exposto somente ao VPA; VPA+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,05$). Mas apesar de amenizar as alterações no *pinning*, o zinco permaneceu com diferenças estatísticas em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,05$). O grupo SAL+Zn evidenciou diferença estatística na frequência de *pinning* quando comparado ao grupo salina; SAL+SAL vs SAL+Zn ($p < 0,05$).

Na avaliação da frequência de passar sob/sobre foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [$F(39) = 25,18$; $p = 0,0001$]. Os ratos foram tratados com VPA pré-natalmente exibiram uma frequência menor de passar sob/sobre em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,0001$) e SAL+Zn vs VPA+SAL ($p < 0,0001$). Todavia, o tratamento com zinco não foi eficiente em interferir nos efeitos do VPA pré-natal, e ainda evidenciou uma diminuição da frequência de passar sob/sobre em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,001$) e SAL+Zn vs VPA+Zn ($p < 0,0001$).

Quando os filhotes infantis de ratas foram avaliados em relação ao tempo de farejar, foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos [$F(39) = 29,52$; $p = 0,0001$]. Os ratos tratados pré-natalmente com o VPA diminuíram o tempo

farejando em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,0001$). Quando o uso do zinco (1h após) foi testado, o mesmo demonstrou melhora em relação aos efeitos previamente causados pelo VPA, aumentando o tempo de farejar; VPA+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,0001$). Entretanto, o tratamento com o zinco não foi suficiente em reverter totalmente os prejuízos, uma vez que exibiu uma diminuição no tempo de farejar estatisticamente significativo em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,05$).

Finalmente, quando testado a frequência de levantar em proles masculinas de ratas, foi possível verificar diferença estatística entre os grupos [$F(39) = 6,60$; $p = 0,0011$]. Nos filhotes tratados com VPA, não foi possível verificar diferença estatística entre o grupo salina, porém exibiu uma frequência menor de levantar em relação ao grupo salina+zinco; SAL+Zn vs VPA+ SAL. Em relação a avaliação do zinco após o tratamento pré-natal com VPA, verificou-se um aumento significativo na frequência de levantar em relação ao grupo VPA; VPA+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,01$). Porém, quando o tratamento com zinco foi comparado ao grupo salina, não foi possível verificar diferenças significantes na estatística.

Os resultados previamente expostos sobre a avaliação do comportamento de brincar demonstraram que a utilização do VPA pré-natal prejudicou a socialização da prole masculina de ratos. De forma geral o tratamento com VPA alterou o comportamento dos filhotes e diminuiu a brincadeira, solicitaram menos a brincadeira e tiveram uma investigação social menor. Quando o zinco como pós-tratamento do VPA foi avaliado em relação ao grupo controle SAL+SAL, o mesmo não conseguiu reestabelecer os prejuízos causados pelo VPA. Contudo, o tratamento com zinco possibilitou uma amenização em relação à brincadeira social (*pinning*) e à investigação social (farejar), quando comparados os grupos VPA+SAL vs VPA+Zn.

Avaliando os parâmetros do comportamento de brincar foi possível verificar que o tratamento com VPA e zinco não alterou a atividade exploratória, que aparentemente permaneceu intacta quando comparado ao controle.

Tabela 2 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratos no PND 30

<u>Parâmetros</u>	GRUPOS			
	<u>SAL+SAL</u>	<u>VPA+SAL</u>	<u>VPA+Zn</u>	<u>SAL+Zn</u>
Perseguir (s)	26,9 ± 1,8	13,6 ± 2,2***###	19,8 ± 2,5 [#]	29,6 ± 1,4
Darts	3,9 ± 0,4	0,6 ± 0,2***##	1,7 ± 0,5**	2,9 ± 0,4
Pinning	23,9 ± 1,5	10,5 ± 1,7***\$ [#]	17,0 ± 1,7*	17,2 ± 1,1*
Passar sobre/sob	12,9 ± 1,0	5,7 ± 0,8***###	8,0 ± 0,6***###	16,1 ± 1,2
Farejar (s)	54,4 ± 2,1	18,1 ± 1,3***\$\$###	41,8 ± 4,9*	46,9 ± 1,6
Levantar	10,3 ± 1,6	6,2 ± 0,6\$###	12,3 ± 2,2	15,5 ± 0,9

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Legenda: SAL+SAL = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+SAL = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 10 ratos por grupos). p < 0,01, **p > 0,001 e ***p < 0,0001 comparado com o grupo SAL+SAL e #p < 0,05, ##p > 0,001 e ###p < 0,0001 comparado com o grupo SAL+Zn; \$p < 0,05, \$\$p > 0,001 e \$\$\$p < 0,0001 comparado com o grupo VPA+Zn \$p < 0,05; ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores são representados como média ± E.P.M.

Figura 15 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de brincar da prole masculina de ratos no PND 30

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Os grupos representam os múltiplos tratamentos no GD 12,5 de ratos Wistar, SAL+SAL = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+SAL = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 10 ratos para cada um dos grupos). * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ comparando o grupo entre as chaves, (s) segundos e N° número. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores são representados como média $\pm$ E.P.M.

4.2.4 Determinação dos níveis de TH no estriado da prole de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

A **Figura 16** ilustra os efeitos da exposição ao VPA e zinco pré-natal nos níveis de TH no estriado da prole masculina infante de ratas. Segundo a análise estatística ANOVA de uma via seguida do pós-teste Bonferroni, foi possível verificar diferenças estatísticas quanto ao nível de TH estriatal [$F(39) = 10,73$; $p = 0,0001$]. O tratamento com VPA no GD 12,5 na prole masculina de ratas foi suficiente em diminuir estatisticamente os níveis de TH no estriado quando comparado ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p < 0,001$). Entretanto o pós-tratamento com zinco não foi capaz de impedir a diminuição nos níveis de TH no estriado, apresentando diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+Zn ($p < 0,0001$).

Os resultados revelam que o tratamento com VPA pré-natal prejudicou o sistema dopaminérgico estriatal da prole masculina de ratas. No entanto, o pós-tratamento com zinco não foi eficiente em amenizar ou reverter esse prejuízo causado pelo VPA, uma vez que, os níveis de TH estriatal mostraram-se diminuídos em relação ao grupo controle.

Figura 16 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO₄) na expressão proteica de tirosina hidroxilase (TH; média da razão da densidade óptica em relação à β -actina) avaliada por *western blotting* no estriado da prole masculina jovem de ratas no PND 30

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Os grupos representam os múltiplos tratamentos no GD 12,5 de ratas Wistar, SAL+Sal = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Sal = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 8 ratos para cada um dos grupos). *p < 0,01, **p < 0,001 e ***p < 0,0001 comparando o grupo entre as chaves. DO (Densidade óptica). ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores são representados como média $\pm$ E.P.M.

4.3 Bloco III: Estudar as alterações comportamentais e moleculares do VPA pré-natal como modelo de autismo na prole feminina de ratos; e possível terapia com zinco

Nesse bloco foram analisados os dados das proles femininas expostas pré-natalmente ao VPA (400 mg/kg) no GD 12,5, e o pós-tratamento com zinco. Para

isso foram obtidos os grupos experimentais e controle (n=10). As proles femininas foram avaliadas da mesma forma que as proles masculinas, em relação à comunicação (vocalização ultrassônica), inflexibilidade cognitiva (labirinto em T) e socialização (comportamento de brincar). A análise da TH no estriado por meio do *Western Blott* verificou os prejuízos dopaminérgicos.

4.3.1 Avaliação da comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole feminina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

A **Tabela 3** mostra e a **Figura 17** ilustra os efeitos da exposição ao VPA e Zn na comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole feminina infante de ratas. A análise estatística de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn revelou diferenças significantes em todos os parâmetros avaliados. O número de vocalizações mostrou diferença estatística entre os grupos [KW= 11,15; $p= 0,0110$]. A exposição prévia ao VPA foi capaz de reduzir as vocalizações quando comparado ao controle; SAL+ SAL vs VPA+ SAL ($p<0,01$). O pós-tratamento com zinco foi eficiente em amenizar o número de vocalizações, não apresentando diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

A análise da duração total de vocalizações demonstrou diferenças estatísticas significantes [KW=11,11; $p=0,0111$]. A comparação dos dados revelou que o grupo exposto ao VPA pré-natal diminuiu a duração total de vocalizações; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p<0,01$). O pós-tratamento com zinco foi capaz de reestabelecer os efeitos do VPA, não apresentando diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

A duração média de vocalização apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [KW=8,08; $p=0,0442$]. Os animais tratados pré-natalmente com VPA diminuíram a duração média de vocalização em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p<0,05$). Entretanto, o pós-tratamento com zinco alterou estatisticamente o tempo médio de vocalização, não apresentando diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.

Em relação à duração máxima de vocalizações, foi possível verificar alterações estatisticamente significantes entre os grupos [KW=15,30; $p=0,0016$]. O

tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 diminuiu o tempo máximo de vocalizações em relação ao grupo controle+zinco; SAL+Zn vs VPA+SAL ($p<0,001$). O pós-tratamento com zinco não alterou estatisticamente o tempo máximo de vocalização em relação à exposição com VPA (VPA+SAL vs VPA+Zn), mas não diferiu do grupo controle.

Da mesma maneira, foram encontradas diferenças quanto à duração total de silêncio [KW=10,86; $p=0,0125$]. O VPA foi eficiente em aumentar a duração total de silêncio em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p<0,001$). Por outro lado, o tratamento com zinco 1h após a exposição do VPA na prole feminina de ratas, foi eficiente em intervir estatisticamente na duração total de silêncio mantendo o nível igual ao controle.

Segundo a análise estatística a duração média de silêncio evidenciou alterações estatisticamente significantes [KW=10,97; $p=0,0119$]. Os filhotes previamente expostos pré-natalmente ao VPA exibiram uma duração média de silêncio maior quando comparado ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL ($p<0,01$). Já o pós-tratamento com zinco alterou estatisticamente o prejuízo da duração média do silêncio, mantendo-se igual ao grupo controle. Na duração máxima de silêncio não foi possível observar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [KW=6,62; $p=0,0849$]. O tratamento pré-natal com VPA não interferiu na duração máxima de silêncio de filhotes fêmeas em relação ao grupo controle. Os filhotes tratados pré-natalmente com VPA e 1h após com zinco, não exibiram diferenças em relação ao aumento da duração máxima de silêncio quando comparado ao grupo controle.

Esses resultados na avaliação da vocalização ultrassônica mostraram que o VPA pré-natal prejudicou a comunicação das fêmeas, ou seja, elas passaram a vocalizaram menos em isolamento, isto é, diminuíram a vocalização e permaneceram por mais tempo em silêncio. O tratamento com zinco 1h após a exposição do VPA conseguiu reestabelecer os prejuízos causados na comunicação das fêmeas, uma vez que seus níveis permaneceram iguais ao grupo controle.

Tabela 3 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nas vocalizações ultrassônicas da prole feminina de ratas no PND 11

<u>Parâmetros</u>	GRUPOS			
	<u>SAL+SAL</u>	<u>VPA+SAL</u>	<u>VPA+Zn</u>	<u>SAL+Zn</u>
Nº de vocalizações	327,2 ± 75,1	90,80 ± 27,9**	161,8 ± 29,1	149,8 ± 18,5
Duração total de vocalizações	68,2 ± 16,6	16,1 ± 6,3**	28,7 ± 7,0	35,5 ± 6,4
Duração total de silêncio	232,7 ± 16,6	284,3 ± 6,3**	271,4 ± 7,0	265,3 ± 6,5
Duração média vocalizando	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0 [#]	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Duração média de silêncio	1,3 ± 0,4	7,7 ± 2,2**	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,2
Duração máxima de vocalização	1,1 ± 0,1	0,6 ± 0,1 ^{##}	0,8 ± 0,0	2,6 ± 0,7
Duração máxima de silêncio	24,6 ± 11,1	53,4 ± 11,1	32,6 ± 11,9	50,0 ± 16,1

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Os grupos representam os múltiplos tratamentos no GD 12,5 de ratas Wistar, SAL+SAL = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+SAL = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 10 ratas para cada um dos grupos). *p < 0,01, **p > 0,001 e ***p < 0,0001 comparando o grupo entre as chaves, (s) segundos e Nº número. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn. Os valores são representados como média ± E.P.M.

Figura 17 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO₄) na vocalização ultrassônica de proles femininas de ratas

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Os grupos representam os múltiplos tratamentos no GD 12 de ratas Wistar, SAL+Sal = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Sal = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 10 ratas para cada um dos grupos). *p < 0,01, **p > 0,001 e ***p < 0,0001 comparando o grupo entre as chaves, (s) segundos e N° número. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunn. Os valores são representados como média ± E.P.M.

4.3.2 Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole feminina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

A **Figura 18** ilustra os efeitos da exposição ao VPA e zinco pré-natais na avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T da prole masculina de ratas no PND 29. De acordo com a análise estatística Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste Dunn não foram encontradas diferenças quanto à alternância entre os braços [KW=4,45, $p = 0,2167$]. A exposição ao VPA no GD 12,5 não modificou a alternância entre os braços, comparado ao grupo controle. O pós-tratamento com zinco não modificou o escore de alternância entre os braços nos animais em relação ao grupo

Os resultados no teste do labirinto em T mostraram que o VPA e zinco pré-natal mantiveram a alternância entre os braços visitados, similar ao encontrado nos animais do grupo controle no braço visitado ao longo das sessões no labirinto, ou seja, não induziu comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva nos filhotes.

Figura 18 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 µg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO₄) na avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T da prole feminina jovem de ratas no PND 29

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Escore: 0 = nenhuma alternância entre os braços visitados; 1 = uma alternância entre os braços visitados; 2 = duas alternâncias entre os braços visitados; 3 = três alternâncias entre os braços visitados; e 4 = quatro alternâncias entre os braços visitados. SAL+Sal = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Sal = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após; (n = 10 para todos os grupos). ** p < 0,001 comparado com o grupo SAL+Sal; * p < 0,05 comparado com o grupo SAL+Zn (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn). Os valores são representados como mediana (mínimo e máximo)

4.3.3 Avaliação da socialização e comportamento de brincar da prole feminina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

A **Tabela 4** mostra e a **Figura 19** ilustra os efeitos da exposição ao VPA e zinco pré-natais na socialização da prole feminina de ratas por meio do comportamento de brincar. De acordo com a análise estatística ANOVA de uma via seguido do pós-teste Bonferroni, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes. O tempo de perseguir revelou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [F(39)= 11,32; p=0,0001]. O tratamento com VPA não foi eficiente em alterar o tempo de perseguir das proles femininas de ratas quando comparado ao grupo controle; SAL+Sal vs VPA+Sal. O

pós-tratamento com zinco não alterou o tempo de perseguir, exibindo dados similares ao grupo controle .

A análise estatística verificou que não houve diferenças estatísticas significantes na frequência de *darts* na prole feminina de ratas [F(39)=1,58; p=0,02093]. A exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 e ao zinco não foi eficiente em alterar a frequência de *darts* quando comparado ao grupo controle.

Em relação à frequência de *pinning*, foi possível verificar alterações estatisticamente significantes entre os grupos [F(39) =10,67; p=0,0001]. O tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 não alterou a frequência de *pinning* quando comparado ao grupo controle. Curiosamente, o pós-tratamento com zinco foi capaz de estatisticamente aumentar a frequência de *pinning* quando comparado com todos os grupos; SAL+SAL vs VPA+Zn (p< 0,01), SAL+Zn vs VPA+Zn (p<0,0001) e VPA+SAL vs VPA+Zn (p<0,001).

Na avaliação da frequência de passar sob/sobre foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [F(39) =5,16; p= 0,0045]. Quando ratas foram tratadas com VPA pré-natalmente não exibiram alteração na frequência de passar sob/sobre em relação ao grupo controle. De acordo com isso, o tratamento com zinco não evidenciou nenhuma alteração na frequência de passar sob/sobre em relação ao grupo controle. O grupo utilizado como controle SAL+Zn, exibiu aumento da frequência de passar sob/sobre em relação ao grupo SAL+SAL (p<0,001) e VPA+Zn (p<0,01).

Quando as fêmeas infante de ratas foram avaliadas em relação ao tempo de farejar, foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos [F(39)=16,33; p=0,0001]. As ratas tratados pré-natalmente com o VPA aumentaram o tempo farejando em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL (p<0,0001). Quando o uso do zinco (1h após) foi testado, o mesmo também demonstrou aumento no tempo de farejar em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+Zn (p<0,0001). O grupo SAL+Zn também aumentou o tempo de farejar em relação ao grupo controle (p<0,0001).

Finalmente, quando testado a frequência de levantar em proles femininas de ratas, não foi possível verificar quaisquer diferenças estatísticas entre os grupos [F(39)=2,27; p=0,0962].

Os resultados previamente expostos sobre a avaliação do comportamento de brincar demonstraram que a utilização do VPA pré-natal nada prejudicou a

socialização da prole feminina de ratos. De forma geral o tratamento com VPA manteve a brincadeira, solicitação a brincadeira e investigação social. Quando o zinco como pós-tratamento do VPA foi avaliado em relação ao grupo controle SAL+SAL, o mesmo não diminuiu nenhum dos comportamentos analisados. Contudo, o tratamento com zinco possibilitou um aumento em relação à brincadeira social (*pinning*) e a investigação social (farejar), quando comparado ao grupo SAL+SAL.

Avaliando os parâmetros do comportamento de brincar foi possível verificar que o tratamento com VPA e zinco não alterou a atividade exploratória, que aparentemente permaneceu intacta nos grupos quando comparado ao controle.

Tabela 4 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de brincar da prole feminina de ratas no PND 30

<u>Parâmetros</u>	GRUPOS			
	<u>SAL+SAL</u>	<u>VPA+SAL</u>	<u>VPA+Zn</u>	<u>SAL+Zn</u>
Perseguir (s)	24,0 ± 1,2 [#]	17,0 ± 2,1 ^{###}	22,5 ± 2,3 ^{##}	32,5 ± 1,7
Darts	1,6 ± 0,4	0,9 ± 0,3	1,8 ± 0,4	0,8 ± 0,3
Pinning	17,8 ± 1,2	17,1 ± 1,6 ^{\$}	24,2 ± 1,1 ^{###}	13,5 ± 1,3
Passar sobre/sob	10,5 ± 0,7 ^{##}	12,6 ± 1,2	11,5 ± 0,5 [#]	15,6 ± 1,1
Farejar (s)	32,8 ± 1,4	46,2 ± 1,8 ^{***}	46,5 ± 1,8 ^{***}	47,7 ± 1,8 ^{***}
Levantar	12,7 ± 1,0	16,4 ± 1,8	17,9 ± 1,9	13,9 ± 1,1

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Os grupos representam os múltiplos tratamentos no GD 12 de ratas Wistar, SAL+SAL = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+SAL = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 10 ratas para cada um dos grupos). *p< 0,01, **p> 0,001 e ***p< 0,0001 comparando o grupo entre as chaves, (s) segundos e N° número. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores são representados como média ± E.P.M.

Figura 19 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de brincar da prole feminina de ratas no PND 30

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Os grupos representam os múltiplos tratamentos no GD 12 de ratas Wistar, SAL+SAL = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+SAL = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 10 ratas para cada um dos grupos). * $p < 0,01$, ** $p > 0,001$ e *** $p < 0,0001$ comparando o grupo entre as chaves, (s) segundos e N° número. ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores são representados como média $\pm$ E.P.M.

4.3.4 Determinação dos níveis de TH no estriado da prole feminina de ratas expostas ao VPA e zinco pré-natal

A **Figura 20** ilustra os efeitos da exposição ao VPA e zinco pré-natal nos níveis de TH no estriado da prole feminina infante de ratas. Segundo a análise estatística ANOVA de uma via seguida do pós-teste Bonferroni, não foi possível verificar diferenças estatísticas quanto ao nível de TH estriatal [$F(31) = 0,37$; $p = 0,7736$]. O tratamento com VPA no GD 12,5 na prole feminina de ratas não foi suficiente em interferir estatisticamente nos níveis de TH no estriado quando comparado ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+SAL. O pós-tratamento com zinco também não alterou os níveis de TH no estriado em relação ao grupo controle; SAL+SAL vs VPA+Zn.

Os resultados revelam que o tratamento com VPA pré-natal nada prejudicou o sistema dopaminérgico estriatal da prole feminina de ratas. Assim como o pós-tratamento com zinco em nada prejudicou os níveis de TH estriatal em relação ao grupo controle.

Figura 20 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao zinco (2 mg/kg de ZnSO₄) na expressão proteica de tirosina hidroxilase (TH; média da razão da densidade óptica em relação à β -actina) avaliada por western blotting no estriado da prole feminina jovem de ratas no PND 30

Fonte: Cezar, L. C. (2016)

Os grupos representam os múltiplos tratamentos no GD 12,5 de ratas Wistar, SAL+SAL = salina pré-natal e salina 1 hora após; VPA+SAL = VPA pré-natal e salina 1 hora após; VPA+Zn = VPA pré-natal e zinco 1 hora após; SAL+Zn salina pré-natal e zinco 1 hora após (n = 8 ratos para cada um dos grupos). *p < 0,01, **p > 0,001 e ***p < 0,0001 comparando o grupo entre as chaves. DO (Densidade óptica). ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores são representados como média $\pm$ E.P.M.

5 DISCUSSÃO

O modelo experimental de autismo, por meio da exposição pré-natal ao VPA, reproduz os sintomas similares àqueles encontrados na condição humana. Na literatura é possível verificar que a administração de VPA em uma fase inicial da embriogênese é capaz de gerar comprometimento no desenvolvimento fetal (MARKRAM et al., 2008). Apesar de esse fármaco ser considerado um provável teratôgeno em humanos, pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação, ou até mesmo, como ele é capaz de induzir o autismo. Até o presente momento há pouca informação sobre a influência do VPA no metabolismo do zinco durante o período pré-natal.

O zinco pode interferir em funções orgânicas vitais, inclusive durante o período gestacional. Ele é capaz de atuar no crescimento fetal, reprodução e diferenciação celular, reparação tecidual e imunidade (BRÄTTER et al., 1998; HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2014). Mais de 300 enzimas são dependentes de zinco, e muitas delas expressam-se no SNC (JAN et al., 2002). Dessa forma, não é surpreendente que a deficiência de zinco possa gerar disfunções neuronais, incluindo diversos transtornos do neurodesenvolvimento, como o autismo (LEAL et al., 2015).

O efeito tóxico do VPA, relacionado ao zinco durante a gestação de ratas, pode ocorrer por meio da redução da absorção desse nutriente pela célula, a qual resulta a diminuição das suas reservas. Assim, o zinco não absorvido passa a circular livremente por mais tempo no organismo. Essa alteração no metabolismo do zinco, induzida pelo VPA, resulta em um aumento na síntese de MT, proteína de ligação de zinco que participa de diversas respostas ao stress oxidativo (ANDREWS, 2000). A MT nesse contexto causa redução nas concentrações plasmáticas de zinco materno ou ainda um efeito transitório de redução na disponibilidade de zinco para o feto (TAUBENECK et al., 1995; BUI et al., 1998). Assim, é possível que a suplementação com zinco em gestantes reduza o risco da deficiência transitória ao induzida pelo VPA. Apesar da indicação de que o zinco pré-natal tenha potencial efeito benéfico, principalmente quando associado a desordens neurológicas como o autismo, não existem estudos que demonstrem de forma satisfatória essa relação. Em um estudo foi demonstrado que a suplementação de zinco pode ser efetiva como

tratamento em um modelo de autismo utilizando LPS (KIRSTEN et al., 2012; KIRSTEN et al., 2013). Entretanto, não encontramos na literatura relatos sobre a possível amenização do autismo por meio do tratamento com zinco em um modelo experimental de autismo induzido pelo VPA.

No presente estudo o VPA foi utilizado como desafio farmacológico para reproduzir um modelo experimental de autismo em ratos. Os sinais e sintomas de um indivíduo autista, tais como prejuízos na comunicação, comportamentos repetitivos que denotam inflexibilidade cognitiva e socialização, foram avaliados com o intuito de verificar o funcionamento do modelo experimental de autismo no nosso laboratório. Além de reproduzir, de maneira robusta, o modelo experimental de autismo induzido por VPA pré-natal em ratos, este trabalho revelou a possível amenização do autismo com a utilização do zinco. Conforme os resultados apresentados, o VPA pré-natal na prole masculina (1) prejudicou a comunicação, reduzindo a quantidade de chamados ultrassônicos; (2) induziu comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva; (3) prejudicou a socialização e (4) diminuiu os níveis de TH do estriado. Assim, este estudo foi eficiente em reproduzir o modelo experimental de autismo por meio do VPA pré-natal na prole de ratas. Também neste estudo foi avaliada a amenização dos sintomas “tipo-autista” pelo tratamento com zinco após o VPA pré-natal. Os dados obtidos sugerem que esse tratamento, (1) reduziu os chamados ultrassônicos; (2) amenizou o comportamento repetitivo/restritivo e da inflexibilidade cognitiva; (3) atenuou o déficit de socialização, mas (4) não foi eficiente em reestabelecer os níveis de TH.

Quando verificamos os comportamentos das proles femininas, o tratamento pré-natal com VPA causou apenas prejuízos na comunicação, reduzindo a quantidade de chamados ultrassônicos. Dessa forma, foi possível confirmar que as fêmeas não apresentaram o fenótipo autista, uma vez que apenas uma das esferas comportamentais relacionadas ao autismo foi prejudicada.

Antes de avaliar a resposta amenizadora do zinco sobre os efeitos do VPA, era preciso verificar as alterações causadas por esse fármaco na gestação das ratas. Como esperado, o VPA (400 mg/kg no GD 12,5) prejudicou a gestação normal das ratas, reduzindo o peso da ninhada sem interferir no número de filhotes, comparado ao grupo controle. Porém o tratamento com zinco não foi eficiente em amenizar ou reverter esse prejuízo. Os efeitos tóxicos do VPA sobre a gestação são claros, uma vez que há perda pós-implantação, além de abortos e redução na taxa

de filhotes vivos (MEADOR, 2008). Os resultados encontrados nesse trabalho corroboram com dados previamente publicados sobre diferentes doses e efeitos tóxicos do VPA em relação ao peso corporal da mãe e das proles (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005; STANTON et al., 2007; KIM et al., 2011, 2014b). Em um estudo, quando ratas foram expostas ao VPA pré-natal no GD 12,5 em doses de 500 mg/kg a taxa de reabsorção embrionária chegou a 23.1%, enquanto que, em doses de 600 mg/kg a reabsorção embrionária chegou a 54.1% (FAVRE et al., 2013). Em nosso trabalho, preconizou-se a utilização do VPA em uma dose moderada de 400 mg/kg, pois quando realizamos um piloto, a dose administrada de 600 mg/kg gerou reabsorção embrionária de 90%. Em estudos com animais, todas as doses testadas de VPA (200-800 mg/kg) são capazes de alterar o neurodesenvolvimento em roedores (ROULLET; LAI; FOSTER, 2013), e ainda, o limite específico da dose para desenvolvimento de comportamentos “tipo autista” não foi claramente identificado, tornando viável a dose empregada no presente estudo.

A importância do papel do zinco durante a gestação vem sendo amplamente estudada na literatura, a fim de explicar os prejuízos associados à sua deficiência. O cérebro fetal, em decorrência da natureza do seu crescimento e desenvolvimento, parece ser particularmente vulnerável à deficiência de zinco materna (GRABRUCKER; BOECKERS; GRABRUCKER, 2016). Um estudo avaliando humanos identificou que dieta pobre em zinco durante a gestação causou partos prematuros e maior risco na redução de peso após o nascimento, quando comparado a uma dieta normal de zinco (SCHOLL et al., 1993). Assim como a má alimentação, fumo, álcool, resposta a situações de estresse e agentes farmacológicos são capazes de reduzir as concentrações maternas de zinco e subsequente redução na demanda de zinco para o feto, tornando a suplementação desse micronutriente essencial para mulheres durante a gestação (KING, 2000). Quando foi testada a aplicação de zinco em pacientes voluntários, gestantes reduziram complicações durante o período (KYNAST; SALING, 1986). Apesar do exposto, o uso do VPA pré-natal nesse estudo induziu teratogênese, e o pós-tratamento com zinco não foi eficiente em impedir a queda no desempenho reprodutivo, o que não é de acordo com o revisado na literatura a respeito à suplementação com zinco (KIRSTEN et al., 2015a,b).

Em relação aos testes realizados nas proles masculinas para confirmar o modelo de autismo induzido pelo VPA pré-natal, todos os resultados foram

favoráveis em afirmar que os animais exibiram um comportamento “tipo autista”. Todos os testes empregados nesse trabalho já foram anteriormente usados e validados em outros modelos animais para verificar os sintomas “tipo-autista” (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005; SCHNEIDER; TURCZAK; PRZEWŁOCKI, 2006; SCHNEIDER et al., 2008; BAMBINI-JUNIOR et al., 2011). Em relação ao teste de vocalização ultrassônica, alguns trabalhos consideraram esse método eficiente em avaliar a redução da comunicação dos filhotes com suas mães, revelando um fenômeno similar ao encontrado em pacientes com TEA (CRAWLEY, 2007; HARMON et al., 2008; KIRSTEN et al., 2015b). De acordo com os dados da vocalização ultrassônica de 40 kHz, que é a frequência emitida pelos filhotes quando estão separados de suas mães, é possível constatar o requerimento dos filhotes em relação à presença materna (WÖHR; SCHWARTING, 2008). Nos resultados avaliados no presente estudo as proles masculinas expostas ao VPA no GD 12,5 exibiram prejuízos na comunicação, reduzindo o número de chamados e aumentando o tempo em silêncio. Os chamados ultrassônicos são reduzidos em consequência do isolamento do filhote pré-natalmente exposto ao VPA e pelo fato do teste ocorrer no PND5, momento de maior susceptibilidade desses filhotes (FELIX-ORTIZ; FEBO, 2012). Walcott e colaboradores (2011) sugerem que esse efeito do VPA pré-natal em reduzir a comunicação dos animais está relacionado com alterações pós-natal na atividade sináptica e excitabilidade neural (WALCOTT; HIGGINS; DESAI, 2011).

Além de o zinco ter envolvimento funcional em várias vias de sinalizações e metabólicas no SNC, parece exercer papel essencial na migração e diferenciação neural, neurogênese e plasticidade sináptica (FREDERICKSON et al., 2000; TAKEDA; TAMANO, 2015). Em um experimento utilizando camundongos, gestantes passaram por dieta deficiente de zinco e quando suas proles foram testadas exibiram comprometimento no teste de vocalização ultrassônica (GRABRUCKER, 2014). Apesar da suplementação com zinco parecer benéfica, em nosso trabalho quando o zinco foi utilizado como pós-tratamento ao VPA não foi possível revelar melhora nos prejuízos da comunicação das proles masculinas.

O teste de alternância espontânea por meio do labirinto em T foi aplicado neste trabalho com o intuito de verificar comportamentos repetitivos e inflexibilidade cognitiva, sintomas também observados em pacientes com TEA (DSM-V, 2013). Animais que apresentam insistência de visita na mesma localização espacial em

um dos braços no labirinto em T, são discutidos experimentalmente como sintoma “tipo autista” (CRAWLEY, 2007; MACFABE et al., 2011). Portanto, segundo os dados avaliados no presente estudo, o VPA foi eficiente em gerar comportamentos repetitivos e inflexibilidade cognitiva em relação ao grupo controle. Nosso modelo experimental de autismo está de acordo com o já visto na literatura em relação à inflexibilidade cognitiva (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005; SCHNEIDER; TURCZAK; PRZEWŁOCKI, 2006; SCHNEIDER et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

Em relação ao tratamento com zinco no presente estudo, foi eficiente em reestabelecer alternância espontânea por meio do labirinto em T nos machos pré-natalmente tratados com VPA. Kirsten et al. (2015a) em um experimento utilizando LPS pré-natal mostraram por meio de um pós-tratamento com zinco, que ratos também reestabeleceram a alternância espontânea no labirinto em T (KIRSTEN et al., 2015a). O zinco é crucial para o desenvolvimento do cérebro, sua deficiência pré-natal pode resultar em prejuízos comportamentais e cognitivos mais tarde na vida, incluindo sinais e sintomas de autismo (GRABRUCKER; BOECKERS; GRABRUCKER, 2016).

Outro aspecto importante para a confirmação do modelo de autismo induzido pelo VPA pré-natal foi a avaliação do comportamento de brincar, teste capaz de medir o interesse social dos filhotes. Nesse trabalho o VPA pré-natal de forma geral diminuiu a expressão do comportamento de brincar, reduziu a solicitação da brincadeira e diminuiu a investigação social. A exposição ao VPA foi amplamente discutida na literatura, e seus efeitos interferem em padrões comportamentais que sugerem atrasos na maturação da interação social na fase inicial da vida de ratos, além de sistemas sensoriais com funcionamento perturbado (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005). Nossos resultados confirmam a existência de similaridades entre os padrões observados de alterações comportamentais em ratos e aqueles observados em pacientes com autismo.

Como os resultados apresentados demonstram alterações comportamentais na comunicação, socialização e cognição, fica confirmada a validade do nosso modelo animal utilizando VPA tal como inicialmente proposto no trabalho (DUFOUR-RAINFRAY et al., 2010; BAMBINI-JUNIOR et al., 2011; HARA et al., 2012; KIM et al., 2011).

Analisando a literatura, é plausível dizer que algumas interpretações são apenas especulativas e que poucos dados foram reproduzidos em relação ao

modelo de autismo induzido por VPA e pós-tratamento com zinco. Quando o zinco como pós-tratamento do VPA foi avaliado em relação ao grupo controle SAL+SAL, o mesmo não conseguiu reestabelecer os prejuízos causados pelo VPA. Contudo, o tratamento com zinco possibilitou uma amenização em relação à brincadeira social (*pinning*) e a investigação social (farejar) em relação ao grupo VPA+SAL.

Em nosso estudo, com a suplementação durante o período pré-natal, buscou-se avaliar se houve alteração de alguns prejuízos causados pelo VPA. O tratamento com zinco foi capaz de amenizar a inflexibilidade cognitiva e os prejuízos na brincadeira social, *pinning* e na investigação social, farejar o companheiro, em ratos do tipo autista resultantes do tratamento com VPA. Porém, o comprometimento dos padrões de vocalização desses animais não foi amenizado. O tratamento com zinco, utilizado neste estudo, corrobora a hipótese de que o VPA é capaz de atuar no metabolismo desse íon contribuindo para o desenvolvimento do autismo. Como a reversão dos sintomas foi parcial, estudos mais aprofundados são necessários para colaborar com entendimento dos aspectos funcionais desse modelo. Recentemente, estudos relatam que a deficiência de zinco ocorre frequentemente associada a distúrbios neuropsiquiátricos. Algumas hipóteses foram levantadas, dentre elas a de que, a deficiência de zinco pré-natal é capaz de influenciar uma via de sinalização nas sinapses glutamatérgicas que foi identificada em mutações genéticas associadas a pacientes com TEA (BOURGERON, 2009; HUGUET; EY; BOURGERON, 2013; PFAENDER; GRABRUCKER, 2014). Esses achados, sobre a ação do zinco, são consistentes e talvez sejam similares aos possíveis mecanismos pelos quais o VPA causa prejuízos cognitivos. Monti et al. (2009) sugerem que o desenvolvimento neuronal pode ser perturbado pelo VPA em estágios críticos embrionários, por meio de redução glutamatérgica e aumento da sinalização sináptica gabaérgica (MONTI; POLAZZI; CONTESTABILE, 2009). Outros estudos sugerem ainda, que o VPA durante o período pré-natal, perturba a diferenciação de interneurônios gabaérgicos, exibida pela perda de terminais pré-sinápticos morfológicamente reconhecíveis em cultura de neurônios corticais (IJIMA et al., 2016). Porém, esses achados permanecem obscuros e poucos foram reproduzidos. Apesar dos nossos resultados serem sugestivos de que o VPA possa interferir no metabolismo do zinco, mais estudos precisam ser realizados para corroborar melhor a hipótese, além de verificar a atuação de outras vias incluindo o sistema gabaérgico.

Uma vez estabelecido o modelo experimental de autismo pela exposição pré-natal ao VPA, confirmado pela presença de diversas alterações comportamentais similares às aquelas encontradas em pacientes com autismo, fatores envolvidos em mecanismos no SNC que pudessem ser associados à ação do VPA foram investigados. Para isso, foi avaliada a expressão proteica de TH no estriado desses animais. O TEA é um distúrbio do neurodesenvolvimento complexo, e possivelmente diversas áreas cerebrais e circuitos sinápticos essenciais estão envolvidos em sua patogênese (ROTHWELL, 2016). Em pacientes com autismo vias críticas envolvendo regiões encefálicas como os gânglios da base contidos no estriado, têm sido associadas a mudanças funcionais e estruturais que implicam em sintomas severos (LANGEN et al., 2009; ABRAMS et al., 2013; DELMONTE et al., 2012; ROTHWELL, 2016). Nos seres humanos, o complexo estriado inclui o núcleo caudado, putâmen e a região do estriado ventral conhecida como núcleo *accumbens* (ROTHWELL, 2016). Já nos roedores, o núcleo *accumbens* ocupa a porção ventral do estriado, enquanto que o núcleo caudado e o putâmen correspondem aproximadamente a sub-regiões medial e lateral do corpo estriado dorsal (GRAYBIEL, 2008). O comprometimento em neurônios estriatais está relacionado a sintomas em pacientes autistas, incluindo estereotipias, inflexibilidade cognitiva, anormalidades em respostas sensoriais e redução da resposta social (FUCCILLO, 2016).

Nossos resultados mostraram redução na expressão de TH estriatal nas proles masculinas tratadas pré-natalmente com VPA. A TH é considerada como o passo limitante na via de biossíntese de dopamina, o que explicaria o prejuízo do sistema dopaminérgico estriatal (BAKER et al., 2003; SAINO-SAITO et al., 2004). Com base nesses resultados a possibilidade do funcionamento do sistema dopaminérgico estriatal ter sido prejudicado no modelo de autismo induzido por VPA fica fortalecida. O sistema dopaminérgico também pode ser prejudicado em pacientes com autismo, em particular, o transportador de dopamina foi relatado como sendo significativamente mais elevado no córtex orbitofrontal (NAKAMURA et al., 2010).

Contudo, a dopamina tem mostrado ter um papel no desenvolvimento de neurônios no córtex cerebral, tais como neurônios GABA (OHTANI et al., 2003; CRANDALL et al., 2007). Em um experimento utilizando VPA pré-natal em ratos *Sprague-Dawley* no GD 9, filhotes aumentaram os níveis de serotonina no

hipocampo e de dopamina no córtex frontal (NARITA et al., 2002). Hara et al. (2015), demonstraram que o tratamento pré-natal com VPA não afetou os níveis de monoaminas e seus metabólitos no córtex pré-frontal e estriado. Apesar dos resultados avaliados no presente estudo em relação aos níveis diminuídos de TH estriatal em animais expostos ao VPA no GD 12,5, poucos relatos foram encontrados na literatura em relação a modelos experimentais de autismo por meio do VPA que avaliaram sistemas dopaminérgicos.

Ainda em concordância com o nosso estudo, outros modelos animais de autismo utilizando LPS têm demonstrado prejuízos no sistema dopaminérgico estriatal na prole adulta por meio de análises da TH, dopamina e seus metabólitos (KIRSTEN et al., 2010, 2012). A exposição pré-natal ao LPS prejudicou o sistema dopaminérgico, mas este efeito neuroquímico não foi acompanhado de alterações motoras, sugerindo provável processo de plasticidade adaptativa (KIRSTEN et al., 2010). Além disso, nesse mesmo estudo, foi verificado que os prejuízos de TH estriatal ocasionada pelo LPS foram revertidos pela suplementação de zinco (Kirsten et al., 2015a, b, c). Com esse achado de comprometimento dopaminérgico sendo replicado em diferentes modelos bem diferentes entre si, essa condição não parece ser restrita a modelos animais e deve estar relacionada mais intimamente com o autismo em humanos. Portanto, sugere-se a via dopaminérgica como provável responsável por induzir e até mesmo auxiliar no tratamento de pacientes autistas.

Quando nosso trabalho avaliou os níveis de TH estriatal em proles masculinas tratadas com zinco pré-natal após exposição de VPA, não foi possível observar alteração nesses animais em relação ao grupo SAL+SAL e VPA+SAL. Embora a expressão de TH não tenha sido melhorada nos animais VPA+Zn, esse trabalho verificou amenização da inflexibilidade cognitiva no labirinto em T, no qual esses animais exibiram um comportamento igual ao do grupo controle (SAL+SAL). Esse achado pode ser interpretado como indicador de que o pós-tratamento com zinco após exposição pré-natal ao VPA não teria sido capaz de reestabelecer o funcionamento satisfatório do sistema dopaminérgico. Por outro lado, a complexidade do funcionamento desse sistema está longe de ser contemplada apenas avaliando a expressão da proteína TH. Outros aspectos da transmissão dopaminérgica poderiam estar modificados de maneira compensatória minimizando a expressão dos comportamentos “tipo-autista”. Para melhor avaliar essa hipótese, estudos futuros serão realizados.

No último bloco de experimentos conduzidos no presente trabalho, foi verificada a resposta das fêmeas frente ao tratamento pré-natal ao VPA e ao zinco. O estudo nas fêmeas possibilita a confirmação do fenótipo “tipo-autista”, pois se sabe que o autismo é mais prevalente em machos do que em fêmeas (FOMBONNE, 2005; FRAZIER et al., 2014). Os resultados demonstraram que, ao contrário do que foi visto na prole masculina que apresentou prejuízos comportamentais relacionados com o autismo, as fêmeas expostas ao VPA pré-natal exibiram apenas uma diminuição da vocalização ultrassônica, enquanto os demais testes não demonstraram quaisquer alterações na socialização ou na flexibilidade cognitiva. Mesmo com prejuízos na comunicação, às proles femininas que receberam o pós-tratamento com o zinco reestabeleceram seu comportamento normal, ou seja, o zinco foi eficiente em reverter os prejuízos na comunicação causados pelo VPA.

O fato de o tratamento com zinco após a exposição ao VPA nas fêmeas ter aumentado o *pinning* no grupo VPA+Zn em relação a todos os grupos estudados; e o fato do grupo SAL+Zn ter passado mais tempo perseguindo, exibe um efeito do zinco na prole. Não encontramos qualquer relato desta natureza na literatura, portanto outros estudos precisam ser realizados para buscar uma explicação do mecanismo envolvido no efeito do zinco na prole feminina.

O VPA pré-natal apresentou um efeito sexualmente dimórfico, sendo mais severo nos machos. Nossos resultados corroboram com os achados na literatura, em modelos experimentais de autismo pelo VPA e também por outras substâncias (KIRSTEN et al., 2010; KIM et al., 2011).

Investigações anteriores do dimorfismo sexual nos sintomas de autismo têm sugerido alterações no comportamento repetitivo e sensorial (FRAZIER et al., 2012b). Entretanto, Mandy et al. (2012) sugerem que as fêmeas exibem comportamento repetitivo em expressões reduzidas quando comparadas aos machos, e maior comprometimento cognitivo particularmente no QI verbal (MANDY; CHILVERS; COMORBIDITY, 2012). As fêmeas parecem ser afetadas de uma forma diferente por agentes estressores durante o período pré-natal, e poucas vezes os prejuízos pós-natais são associados às características de autismo (MANDY; CHILVERS; COMORBIDITY, 2012).

Evidências indicam que genes nos cromossomos sexuais X e Y contribuem para diferenças sexuais no cérebro, em particular um gene do cromossomo Y intitulado de SRY (*Sex-determining Region on the Y chromosome*), que é candidato

em regular a função bioquímica dopaminérgica no cérebro masculino (XU et al., 2002; LOKE et al., 2015). A desregulação desse gene é capaz de gerar distúrbios no sistema dopaminérgico contribuindo para a susceptibilidade masculina em desenvolver distúrbios como o TEA (XU; BURGOYNE; ARNOLD, 2002; MCPHIE-LALMANSINGH et al., 2008; LOKE; HARLEY; LEE, 2015). Em nosso trabalho quando analisamos a expressão de TH nas proles femininas, não foi possível observar nenhuma alteração sugerindo a preservação dopaminérgica. Esses achados contribuem ainda para a ideia de que machos tem mais predisposição para distúrbios neurológicos associados à dopamina como o TEA (BIEDERMAN et al., 2006; SOLANTO et al., 2010; GABRIELE; SACCO; PERSICO, 2014; LAI; LOMBARDO; BARON-COHEN, 2014).

O fato do tratamento com VPA ter diminuído a expressão de TH na prole masculina fala a favor da hipótese dessa síndrome comportamental ter sido induzida por meio de alteração dopaminérgica e ou alteração na transmissão dopaminérgica. A hipoatividade do sistema dopaminérgico (KIRSTEN et al., 2012, 2015a) ou ainda a hiperatividade (BARON-COHEN et al., 2000; BACHEVALIER; LOVELAND, 2006), é um mecanismo sugerido como potencial para o surgimento de desordens como o TEA (BARON-COHEN et al., 2000; BACHEVALIER; LOVELAND, 2006). Nesse aspecto, o presente trabalho sugere uma hipoatividade do sistema dopaminérgico, fato consistente em relação a um modelo de autismo utilizado em nosso laboratório, no qual esse transtorno foi induzido por meio de um desafio imunológico (LPS no GD 9,5) (KIRSTEN et al., 2010, 2012, 2013, 2015b,c). Assim é possível, que tanto no modelo de autismo induzido por VPA, quanto por LPS, às vias bioquímicas funcionalmente alteradas sejam similares. Entretanto, no modelo de autismo utilizando LPS pré-natal, o pós-tratamento com zinco melhorou diversos sintomas “tipo-autista”, incluindo a melhora parcial nos níveis de TH estriatal (KIRSTEN et al., 2015b). Essa melhora, induzida pelo tratamento com zinco, não foi observada no presente estudo. Essa diferença sugere que os modelos de autismo induzidos por VPA e LPS diferem pelo menos na resposta ao zinco. Desse modo, é possível que haja também diferença qualitativa ou quantitativa em aspectos funcionais nesses modelos, incluindo o grau de acometimento do TEA. Bui et al. (1998) sugerem que é fundamental considerar a dose da substância farmacológica estressora administrada capaz de causar uma redução transitória nos níveis de zinco materno, ou seja, se a dose farmacológica não for eficiente em gerar uma resposta de fase aguda na mãe,

não é possível alterar os níveis de zinco (BUI et al., 1998). É possível que no presente trabalho o VPA administrado no GD 12,5 pode não ter alterado o zinco a níveis suficientes a gerar *per se* alterações comportamentais nos filhotes. Sugere-se como estudos futuros uma investigação mais ampla para melhor compreender o papel do VPA no metabolismo do zinco.

Concluindo, foi demonstrado no presente estudo, que a exposição ao VPA pré-natal induziu um fenótipo autista em proles masculinas. Isso foi observado por meio da redução na comunicação, na socialização e a indução da inflexibilidade cognitiva. Na prole feminina os prejuízos foram bem menos expressivos, o que corrobora com a eficiência do modelo experimental de autismo. Além disso, é possível que o tratamento com VPA tenha prejudicado funcionalmente o sistema dopaminérgico estriatal, especificadamente pela redução nos níveis de TH, alterando assim a síntese de dopamina. A administração do zinco como pós-tratamento ao VPA no GD 12,5 amenizou a inflexibilidade cognitiva e reestabeleceu a brincadeira social, porém manteve o prejuízo na comunicação e na expressão de TH. Possivelmente o fenótipo tipo autista, investigado no presente estudo, esteja relacionado a modificações funcionais no sistema dopaminérgico.

6 CONCLUSÕES

As conclusões em relação à administração do VPA no GD 12,5 em ratos são:

- Segundo avaliações nos parâmetros reprodutivos o tratamento foi prejudicial à gestação interferindo no peso total da ninhada.
- Prejudicou a comunicação dos filhotes machos, ou seja, eles passaram mais tempo sem chamar sua mãe quando estavam em isolamento, observados na diminuição da vocalização e maior tempo gasto em silêncio.
- Induziu maior repetição no braço visitado ao longo das sessões no labirinto nos animais, ou seja, induziu comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva nos filhotes machos.
- A avaliação do comportamento de brincar na prole masculina demonstrou que de forma geral, o tratamento com VPA causou redução da brincadeira social, diminuiu a solicitação social e reduziu a investigação social.
- O tratamento com VPA pré-natal prejudicou o sistema dopaminérgico estriatal da prole masculina de ratas.
- O tratamento com VPA foi capaz de prejudicar a comunicação nas fêmeas, porém não induziu inflexibilidade cognitiva e não alterou o comportamento social.

Em relação à suplementação com zinco 1h após a administração do VPA no GD 12,5 em ratos, as conclusões são:

- Segundo avaliações nos parâmetros reprodutivos o tratamento com zinco não amenizou a gestação reduzindo o peso total da ninhada.

- Não amenizou o prejuízo na comunicação dos filhotes machos, ou seja, eles passaram mais tempo sem chamar sua mãe quando estavam em isolamento, observados na diminuição da vocalização e maior tempo gasto em silêncio.
- O grupo VPA+Zn demonstrou uma alternância entre os braços visitados similar ao encontrado nos animais do grupo controle, amenizando a indução da inflexibilidade cognitiva.
- O tratamento com zinco possibilitou uma amenização em relação à brincadeira social (*pinning*) e à investigação social (farejar), quando comparando o grupo VPA+SAL, amenizando o prejuízo social.
- O pós-tratamento com zinco não foi eficiente em amenizar ou reverter esse prejuízo causado pelo VPA, uma vez que, os níveis de TH estriatal mostraram-se diminuídos em relação ao grupo controle.
- O tratamento com zinco foi capaz de amenizar o prejuízo causado na comunicação das fêmeas.

6.1 Considerações Finais

Nossos resultados revelaram alterações em diferentes categorias comportamentais induzidas por meio do VPA, confirmando o modelo experimental de autismo. Além disso, o presente estudo inclui a hipoatividade do sistema dopaminérgico como um possível aspecto que leva a causa do TEA. O estabelecimento do modelo experimental com VPA e os achados em relação ao sistema dopaminérgico significam mais um passo para entender o autismo, uma vez que seu exato mecanismo ainda é desconhecido. Entretanto, o nosso tratamento com zinco não foi suficiente em tratar todos os sinais do autismo, amenizando apenas a indução da inflexibilidade e a brincadeira social.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, B. S.; GESCHWIND, D. H. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. **Nature Reviews, Genetics**, v. 9, n. 5, p. 341–55, 2008.
- ABRAMS, D. A.; LYNCH, C. J.; CHENG, K. M.; PHILLIPS, J.; SUPEKAR, K.; RYALI, S.; UDDIN, L. Q.; MENON, V. Underconnectivity between voice-selective cortex and reward circuitry in children with autism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 29, p. 12060–12065, 2013.
- ALENGHAT, T. Epigenomics and the microbiota. **Toxicologic pathology**, v. 43, n. 1, p. 101–106, 2015.
- ANDREWS, G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 95–104, 2000.
- ANGELIDOU, A.; ALYSANDRATOS, K.-D.; ASADI, S.; ZHANG, B.; FRANCIS, K.; VASIADI, M.; KALOGEROMITROS, D.; THEOHARIDES, T. C. Brief report: “allergic symptoms” in children with Autism Spectrum Disorders. More than meets the eye? **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 41, n. 11, p. 1579–1585, 2011.
- ARNDT, T. L.; STODGELL, C. J.; RODIER, P. M. The teratology of autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 189–199, 2005.
- BACHEVALIER, J.; LOVELAND, K. A. The orbitofrontal-amygdala circuit and self-regulation of social-emotional behavior in autism. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 30, n. 1, p. 97–117, 2006.
- BAILEY, A.; LE COUTEUR, A.; GOTTESMAN, I.; BOLTON, P.; SIMONOFF, E.; YUZDA, E.; RUTTER, M. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. **Psychological Medicine**, v. 25, n. 1, p. 63–77, 1995.
- BAKER, H.; KOBAYASHI, K.; OKANO, H.; SAINO-SAITO, S. Cortical and striatal expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neonatal and adult mice. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4–5, p. 507–18, 2003.
- BAMBINI-JUNIOR, V.; RODRIGUES, L.; BEHR, G. A.; MOREIRA, J. C. F.; RIESGO, R.; GOTTFRIED, C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. **Brain Research**, v. 1408, p. 8–16, 2011.
- BANDIM, J. M.; VENTURA, L. O.; MILLER, M. T.; ALMEIDA, H. C.; COSTA, A. E. S. Autism and Möbius sequence: an exploratory study of children in northeastern Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 61, n. 2A, p. 181–185, 2003.
- BARKER, J. L.; BEHAR, T.; LI, Y. X.; LIU, Q. Y.; MA, W.; MARIC, D.; MARIC, I.; SCHAFFNER, A. E.; SERAFINI, R.; SMITH, S. V.; SOMOGYI, R.; VAUTRIN, J. Y.;

- WEN, X. L.; XIAN, H. GABAergic cells and signals in CNS development. **Perspectives on Developmental Neurobiology**, v. 5, n. 2–3, p. 305–22, 1998.
- BARON-COHEN, S.; RING, H. A.; BULLMORE, E. T.; WHEELWRIGHT, S.; ASHWIN, C.; WILLIAMS, S. C. The amygdala theory of autism. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 3, p. 355–64, 2000.
- BEDFORD, R.; JONES, E. J. H.; JOHNSON, M. H.; PICKLES, A.; CHARMAN, T.; GLIGA, T. Sex differences in the association between infant markers and later autistic traits. **Molecular Autism**, v. 7, n. 21, p. 1–11, 2016.
- BELMONTE, M. K.; BOURGERON, T. Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 1221–5, 2006.
- BERNARDET, M.; CRUSIO, W. E. Fmr1 KO mice as a possible model of autistic features. **The Scientific World Journal**, v. 20, n. 6, p. 1164–1176, 2006.
- BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; TRINDADE, M. O. Sobre o Autismo, Neuroinflamação e Modelos Animais para o Estudo de Autismo: Uma Revisão. **Revista Neurociências**, v. 20, n. 1, p. 117–127, 2012.
- BEYDOUN, A.; SACKELLARES, J. C.; SHU, V. Safety and efficacy of divalproex sodium monotherapy in partial epilepsy: a double-blind, concentration-response design clinical trial. Depakote Monotherapy for Partial Seizures Study Group. **Neurology**, v. 48, n. 1, p. 182–188, 1997.
- BIEDERMAN, J.; ARNSTEN, A. F. T.; FARAONE, S. V.; DOYLE, A. E.; SPENCER, T. J.; WILENS, T. E.; WEISS, M. D.; SAFREN, S. A.; CULPEPPER, L. New developments in the treatment of ADHD. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 67, n. 1, p. 148–159, 2006.
- BISHOP, S. L.; LAHVIS, G. P. The autism diagnosis in translation: shared affect in children and mouse models of ASD. **Autism Research: official journal of the International Society for Autism Research**, v. 4, n. 5, p. 317–335, 2011.
- BLUMBERG, S. J.; BRAMLETT, M. D.; KOGAN, M. D.; SCHIEVE, L. A.; JONES, J. R.; LU, M. C. Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged U.S. children: 2007 to 2011–2012. **National Health Statistics Reports**, v. 65, n. 1, p. 1–11, 2013.
- BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010.
- BOURGERON, T. A synaptic trek to autism. **Current opinion in neurobiology**, v. 19, n. 2, p. 231–234, 2009.
- BRÄTTER, P.; BLASCO, I. N.; NEGRETTI DE BRÄTTER, V. E.; RAAB, A. Speciation as an analytical aid in trace element research in infant nutrition. **The Analyst**, v. 123, n. 5, p. 821–826, 1998.
- BRENT, R. L. Environmental causes of human congenital malformations: the pediatrician's role in dealing with these complex clinical problems caused by a

multiplicity of environmental and genetic factors. **Pediatrics**, v. 113, n. 4 Suppl, p. 957–968, 2004.

BRENT, R. L.; BECKMAN, D. A. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, an embryopathic class of drugs with unique properties: information for clinical teratology counselors. **Teratology**, v. 43, n. 6, p. 543–546, 1991.

BRENT, R. L.; CHAMBERS, C. D.; CHERNOFF, G. F.; JONES, K. L.; MILLER, R. K. Pregnancy outcome following gestational exposure to organic solvents: a response. **Teratology**, v. 60, n. 6, p. 328–331, 1999.

BRESNAHAN, M.; HORNIG, M.; SCHULTZ, A. F.; GUNNES, N.; HIRTZ, D.; LIE, K. K.; MAGNUS, P.; REICHBORN-KJENNERUD, T.; ROTH, C.; SCHJØLBERG, S.; STOLTENBERG, C.; SURÉN, P.; SUSSE, E.; LIPKIN, W. I. Association of maternal report of infant and toddler gastrointestinal symptoms with autism: evidence from a prospective birth cohort. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 5, p. 466–74, 2015.

BRIDGES, R. S.; FELICIO, L. F.; PELLERIN, L. J.; STUER, A. M.; MANN, P. E. Prior parity reduces post-coital diurnal and nocturnal prolactin surges in rats. **Life sciences**, v. 53, n. 5, p. 439–445, 1993.

BROMLEY, R. L.; CALDERBANK, R.; CHEYNE, C. P.; ROONEY, C.; TRAYNER, P.; CLAYTON-SMITH, J.; GARCÍA-FIÑANA, M.; IRWIN, B.; MORROW, J. I.; SHALLCROSS, R.; BAKER, G. A.; UK EPILEPSY AND PREGNANCY REGISTER. Cognition in school-age children exposed to levetiracetam, topiramate, or sodium valproate. **Neurology**, 2016.

BRUNELLI, S. A.; HOFER, M. A. Development of ultrasonic vocalization responses in genetically heterogeneous National Institute of Health (N:NIH) rats. II. Associations among variables and behaviors. **Developmental Psychobiology**, v. 29, n. 6, p. 517–528, 1996.

BRUNELLI, S. A.; VINOCUR, D. D.; SOO-HOO, D.; HOFER, M. A. Five generations of selective breeding for ultrasonic vocalization (USV) responses in N:NIH strain rats. **Developmental Psychobiology**, v. 31, n. 4, p. 255–65, 1997.

BUI, L. M.; TAUBENECK, M. W.; COMMISSO, J. F.; URIU-HARE, J. Y.; FABER, W. D.; KEEN, C. L. Altered zinc metabolism contributes to the developmental toxicity of 2-ethylhexanoic acid, 2-ethylhexanol and valproic acid. **Toxicology**, v. 126, n. 1, p. 9–21, 1998.

CAREY, L. C.; BERBÉE, P. L.; COYLE, P.; PHILCOX, J. C.; ROFE, A. M. Zinc treatment prevents lipopolysaccharide-induced teratogenicity in mice. **Birth defects research. Part A, Clinical and Molecular Teratology**, v. 67, n. 4, p. 240–5, 2003.

CARRARA, H. H. A.; DUARTE, G. Semiologia obstétrica. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 88–103, 1996.

CAVALLI, R. de C.; BARALDI, C. de O.; CUNHA, S. P. da. Transferência placentária de drogas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 9, p. 557–564, 2006.

CHRISTENSEN, D. L.; BAIO, J.; VAN NAARDEN BRAUN, K.; BILDER, D.; CHARLES, J.; CONSTANTINO, J. N.; DANIELS, J.; DURKIN, M. S.; FITZGERALD,

- R. T.; KURZIUS-SPENCER, M.; LEE, L.-C.; PETTYGROVE, S.; ROBINSON, C.; SCHULZ, E.; WELLS, C.; WINGATE, M. S.; ZAHORODNY, W.; YEARGIN-ALLSOPP, M.; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries** (Washington, D.C. : 2002), v. 65, n. 3, p. 1–23, 2016.
- CHRISTIANSON, A. L.; CHESLER, N.; KROMBERG, J. G. Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 36, n. 4, p. 361–369, 1994.
- CHUA, J. S. C.; COWLEY, C. J.; MANAVIS, J.; ROFE, A. M.; COYLE, P. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in neurodevelopmental damage that is ameliorated by zinc in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 2, p. 326–336, 2012.
- CLAYTON-SMITH, J.; DONNAI, D. Fetal valproate syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 32, n. 9, p. 724–727, 1995.
- COHEN, O. S.; VARLINSKAYA, E. I.; WILSON, C. A.; GLATT, S. J.; MOONEY, S. M. Acute prenatal exposure to a moderate dose of valproic acid increases social behavior and alters gene expression in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 740–750, 2013.
- COYLE, P.; TRAN, N.; FUNG, J. N. T.; SUMMERS, B. L.; ROFE, A. M. Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. **Behavioural Brain Research**, v. 197, n. 1, p. 210–218, 2009.
- CRANDALL, J. E.; MCCARTHY, D. M.; ARAKI, K. Y.; SIMS, J. R.; REN, J.-Q.; BHIDE, P. G. Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex. **The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 14, p. 3813–3822, 2007.
- CRAWLEY, J. N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. **Brain Pathology**, v. 17, n. 4, p. 448–459, 2007.
- CUSMANO, D. M.; MONG, J. A. In utero exposure to valproic acid changes sleep in juvenile rats: a model for sleep disturbances in autism. **Sleep**, v. 37, n. 9, p. 1489–1499, 2014.
- DASTON, G. P.; OVERMANN, G. J.; TAUBENECK, M. W.; LEHMAN-MCKEEMAN, L. D.; ROGERS, J. M.; KEEN, C. L. The role of metallothionein induction and altered zinc status in maternally mediated developmental toxicity: comparison of the effects of urethane and styrene in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 450–63, 1991.
- DAWSON, G.; ROGERS, S.; MUNSON, J.; SMITH, M.; WINTER, J.; GREENSON, J.; DONALDSON, A.; VARLEY, J. Randomized, controlled trial of an intervention for toddlers with autism: the Early Start Denver Model. **Pediatrics**, v. 125, n. 1, p. 17–23, 2010.

DELMONTE, S.; BALSTERS, J. H.; MCGRATH, J.; FITZGERALD, J.; BRENNAN, S.; FAGAN, A. J.; GALLAGHER, L. Social and monetary reward processing in autism spectrum disorders. **Molecular Autism**, v. 3, n. 1, p. 7, 2012.

DELOREY, T. M.; SAHBAIE, P.; HASHEMI, E.; HOMANICS, G. E.; CLARK, J. D. Gabrb3 gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: A potential model of autism spectrum disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 187, p. 207–220, 2008.

DIAZ HEIJTZ, R.; WANG, S.; ANUAR, F.; QIAN, Y.; BJÖRKHOLM, B.; SAMUELSSON, A.; HIBBERD, M. L.; FORSSBERG, H.; PETTERSSON, S. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 7, p. 3047–52, 15 fev. 2011.

DILIBERTI, J. H.; FARNDON, P. A.; DENNIS, N. R.; CURRY, C. J. The fetal valproate syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 19, n. 3, p. 473–481, 1984.

DSM-V. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. In: (Ed.) **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5. ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.

DUDCHENKO, P. A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 699–709, 2004.

DUFOUR-RAINFRAY, D.; VOUREC'H, P.; LE GUIQUET, A. M.; GARREAU, L.; TERNANT, D.; BODARD, S.; JAUMAIN, E.; GULHAN, Z.; BELZUNG, C.; ANDRES, C. R.; CHALON, S.; GUILLOTEAU, D. Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: A model for autism. **Neuroscience Letters**, v. 470, n. 1, p. 55–59, 2010.

DUFOUR-RAINFRAY, D.; VOUREC'H, P.; TOURLET, S.; GUILLOTEAU, D.; CHALON, S.; ANDRES, C. R. Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 5, p. 1254–1265, 2011.

FAVRE, M. R.; BARKAT, T. R.; LAMENDOLA, D.; KHAZEN, G.; MARKRAM, H.; MARKRAM, K. General developmental health in the VPA-rat model of autism. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, n., p. 88-95, 2013.

FELIX-ORTIZ, A. C.; FEBO, M. Gestational valproate alters BOLD activation in response to complex social and primary sensory stimuli. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

FINEGOLD, S. M. State of the art; microbiology in health and disease. Intestinal bacterial flora in autism. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 367–368, 2011.

FINEGOLD, S. M. Therapy and epidemiology of autism-clostridial spores as key elements. **Medical Hypotheses**, v. 70, n. 3, p. 508–511, 2008.

FINEGOLD, S. M.; DOWD, S. E.; GONTCHAROVA, V.; LIU, C.; HENLEY, K. E.; WOLCOTT, R. D.; YOUN, E.; SUMMANEN, P. H.; GRANPEESHEH, D.; DIXON, D.; LIU, M.; MOLITORIS, D. R.; GREEN, J. A. Pyrosequencing study of fecal microflora

- of autistic and control children. **Anaerobe**, v. 16, n. 4, p. 444–453, 2010.
- FINEGOLD, S. M.; DOWNES, J.; SUMMANEN, P. H. Microbiology of regressive autism. **Anaerobe**, v. 18, n. 2, p. 260–262, 2012.
- FOLSTEIN, S. E.; ROSEN-SHEIDLEY, B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. **Nature Reviews. Genetics**, v. 2, n. 12, p. 943–955, 2001.
- FOMBONNE, E. Epidemiology of Autistic Disorder and Other Pervasive Developmental Disorders. **Journal Clinical Psychiatry**, v. 66, p. 3–8, 2005. Supplement 10.
- FRAZIER, T. W.; GEORGIADES, S.; BISHOP, S. L.; HARDAN, A. Y. Behavioral and cognitive characteristics of females and males with autism in the Simons Simplex Collection. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 53, n. 3, p. 329–340, 2014.
- FRAZIER, T. W.; YOUNGSTROM, E. A.; SPEER, L.; EMBACHER, R.; LAW, P.; CONSTANTINO, J.; FINDLING, R. L.; HARDAN, A. Y.; ENG, C. Validation of proposed DSM-5 criteria for autism spectrum disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 28–40, 2012.
- FREDERICKSON, C. J.; SUH, S. W.; SILVA, D.; FREDERICKSON, C. J.; THOMPSON, R. B. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1471S–83S, maio 2000.
- FREITAG, F. G.; COLLINS, S. D.; CARLSON, H. A.; GOLDSTEIN, J.; SAPER, J.; SILBERSTEIN, S.; MATHEW, N.; WINNER, P. K.; DEATON, R.; SOMMERVILLE, K.; DEPAKOTE ER MIGRAINE STUDY GROUP. A randomized trial of divalproex sodium extended-release tablets in migraine prophylaxis. **Neurology**, v. 58, n. 11, p. 1652–9, 2002.
- FRYE, R. E. Metabolic and mitochondrial disorders associated with epilepsy in children with autism spectrum disorder. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 47, n. NOVEMBER 2014, p. 147–157, 2015.
- FRYE, R. E.; ROSSIGNOL, D. A. Identification and Treatment of Pathophysiological Comorbidities of Autism Spectrum Disorder to Achieve Optimal Outcomes. **Clinical Medicine Insights. Pediatrics**, v. 10, p. 43–56, 2016.
- FRYE, R. E.; ROSSIGNOL, D.; CASANOVA, M. F.; BROWN, G. L.; MARTIN, V.; EDELSON, S.; COBEN, R.; LEWINE, J.; SLATTERY, J. C.; LAU, C.; HARDY, P.; FATEMI, S. H.; FOLSOM, T. D.; MACFABE, D.; ADAMS, J. B. A review of traditional and novel treatments for seizures in autism spectrum disorder: findings from a systematic review and expert panel. **Frontiers in Public Health**, v. 1, p. 31, 2013.
- FUCCILLO, M. V. Striatal circuits as a common node for autism pathophysiology. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. 27, p. 1–19, 2016.
- FUKUCHI, M.; NII, T.; ISHIMARU, N.; MINAMINO, A.; HARA, D.; TAKASAKI, I.; TABUCHI, A.; TSUDA, M. Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. **Neuroscience Research**, v. 65, n. 1, p. 35–

43, 2009.

GABRIELE, S.; SACCO, R.; PERSICO, A. M. Blood serotonin levels in autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **European Neuropsychopharmacology**: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology, v. 24, n. 6, p. 919–929, 2014.

GALVÃO, M. C.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; CARVALHO, V. M.; BERNARDI, M. M.; KIRSTEN, T. B. Prenatal zinc reduces stress response in adult rat offspring exposed to lipopolysaccharide during gestation. **Life Sciences**, v. 120, p. 54–60, 2015.

GAO, H.-L.; XU, H.; XIN, N.; ZHENG, W.; CHI, Z.-H.; WANG, Z.-Y. Disruption of the CaMKII/CREB signaling is associated with zinc deficiency-induced learning and memory impairments. **Neurotoxicity Research**, v. 19, n. 4, p. 584–591, 2011.

GESCHWIND, D. H. Autism : many genes , common pathways ? **Cell**, Cambridge, v. 135, n. 3, p. 391–395, 2008.

GOLAN, H. M.; LEV, V.; HALLAK, M.; SOROKIN, Y.; HULEIHEL, M. Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 6, p. 903–917, 2005.

GRABRUCKER, A. M. A role for synaptic zinc in ProSAP/Shank PSD scaffold malformation in autism spectrum disorders. **Developmental Neurobiology**, v. 74, n. 2, p. 136–146, 2014.

GRABRUCKER, S.; BOECKERS, T. M.; GRABRUCKER, A. M. Gender Dependent Evaluation of Autism like Behavior in Mice Exposed to Prenatal Zinc Deficiency. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, n. 37, p. 1–15, 2016.

GRAYBIEL, A. M. Habits, rituals, and the evaluative brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, p. 359–387, 2008.

GURVICH, N.; BERMAN, M. G.; WITTNER, B. S.; GENTLEMAN, R. C.; KLEIN, P. S.; GREEN, J. B. A. Association of valproate-induced teratogenesis with histone deacetylase inhibition in vivo. **FASEB Journal**: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 19, n. 9, p. 1166–1168, 2005.

HAGMEYER, S.; HADERSPECK, J. C.; GRABRUCKER, A. M. Behavioral impairments in animal models for zinc deficiency. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 443–448, 2014.

HALL, L.; KELLEY, E. The contribution of epigenetics to understanding genetic factors in autism. **Autism**: the international journal of research and practice, v. 18, n. 8, p. 872–881, 2014.

HARA, Y.; MAEDA, Y.; KATAOKA, S.; AGO, Y.; TAKUMA, K.; MATSUDA, T. Effect of Prenatal Valproic Acid Exposure on Cortical Morphology in Female Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 118, n. 4, p. 543–546, 2012.

HARA, Y.; TAKUMA, K.; TAKANO, E.; KATASHIBA, K.; TARUTA, A.; HIGASHINO, K.; HASHIMOTO, H.; AGO, Y.; MATSUDA, T. Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model. **Behavioural Brain Research**,

v. 289, p. 39–47, 2015.

HARMON, K. M.; CROMWELL, H. C.; BURGDORF, J.; MOSKAL, J. R.; BRUDZYNSKI, S. M.; KROES, R. A.; PANKSEPP, J. Rats selectively bred for low levels of 50 kHz ultrasonic vocalizations exhibit alterations in early social motivation. **Developmental Psychobiology**, v. 50, n. 4, p. 322–31, 2008.

HOLSON, J. F.; NEMEC, M. D.; STUMP, D. G.; KAUFMAN, L. E.; LINDSTÖM, P.; VARSHO, J. Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. In: HOOD, R. D. (Ed.). **Developmental and Reproductive Toxicology: a practical approach**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006. p. 329-424.

HOMS, A.; CODINA-SOLÀ, M.; RODRÍGUEZ-SANTIAGO, B.; VILLANUEVA, C. M.; MONK, D.; CUSCÓ, I.; PÉREZ-JURADO, L. A. Genetic and epigenetic methylation defects and implication of the ERMN gene in autism spectrum disorders. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 7, p. 855-865, 2016.

HORNIG, M.; WEISSENBOCK, H.; HORSCROFT, N.; LIPKIN, W. I. An infection-based model of neurodevelopmental damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 21, p. 12102–12107, 1999.

HSIAO, E. Y.; MCBRIDE, S. W.; HSIEN, S.; SHARON, G.; HYDE, E. R.; MCCUE, T.; CODELLI, J. A.; CHOW, J.; REISMAN, S. E.; PETROSINO, J. F.; PATTERSON, P. H.; MAZMANIAN, S. K. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. **Cell**, Cambridge, v. 155, n. 7, p. 1451–1463, 2013.

HUGUET, G.; EY, E.; BOURGERON, T. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 14, p. 191–213, 2013.

IJIMA, Y.; BEHR, K.; IJIMA, T.; BIEMANS, B.; BISCHOFBERGER, J.; SCHEIFFELE, P. Distinct Defects in Synaptic Differentiation of Neocortical Neurons in Response to Prenatal Valproate Exposure. **Scientific Reports**, v. 6, n. 27, p. 1-14, 2016.

INSEL, T. R.; HILL, J. L.; MAYOR, R. B. Rat pup ultrasonic isolation calls: possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 24, n. 5, p. 1263–1267, 1986.

IQBAL, M. M.; SOHHAN, T.; MAHMUD, S. Z. The effects of lithium, valproic acid, and carbamazepine during pregnancy and lactation. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v. 39, n. 4, p. 381–392, 2001.

ISE, S.; NAGANO, N.; OKUDA, S.; OHTA, H. Corticotropin-releasing factor modulates maternal separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups via activation of CRF1 receptor. **Brain research**, v. 1234, n. 9, p. 59–65, 2008.

JAN, H.-H.; CHEN, I.-T.; TSAI, Y.-Y.; CHANG, Y.-C. Structural role of zinc ions bound to postsynaptic densities. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, n. 3, p. 525–534, 2002.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **The Nervous Child**, v. 2, p. 217–250, 1943.

KEMPER, T. L.; BAUMAN, M. Neuropathology of infantile autism. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 57, n. 7, p. 645–652, 1998.

KIM, K. C.; GONZALES, E. L.; LÁZARO, M. T.; CHOI, C. S.; BAHN, G. H.; YOO, H. J.; SHIN, C. Y. Clinical and neurobiological relevance of current animal models of autism spectrum disorders. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 24, n. 3, p. 207–243, 2016.

KIM, K. C.; KIM, P.; GO, H. S.; CHOI, C. S.; YANG, S.-I.; CHEONG, J. H.; SHIN, C. Y.; KO, K. H. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. **Toxicology Letters**, v. 201, n. 2, p. 137–142, 2011.

KIM, Y. S.; FOMBONNE, E.; KOH, Y.-J.; KIM, S.-J.; CHEON, K.-A.; LEVENTHAL, B. L. A Comparison of DSM-IV Pervasive Developmental Disorder and DSM-5 Autism Spectrum Disorder Prevalence in an Epidemiologic Sample. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 53, n. 5, p. 500–508, 2014.

KING, J. C. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 5 Suppl, p. 1334–1343, 2000.

KIRSTEN, T. B. **Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais**. 2012. 195 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; BERNARDES, S.; SCAVONE, C.; SARKIS, J. E.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Lipopolysaccharide exposure induces maternal hypozincemia, and prenatal zinc treatment prevents autistic-like behaviors and disturbances in the striatal dopaminergic and mtor systems of offspring. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–18, 2015a.

KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; CHAIBLE, L. M.; SILVA, A. C.; MARTINS, D. O.; BRITTO, L. R. G.; DAGLI, M. L. Z.; TORRÃO, A. S.; PALERMONETO, J.; 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**, v. 90, n. 10, p. 1903–12, 2012.

KIRSTEN, T. B.; GALVÃO, M. C.; REIS-SILVA, T. M.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; BERNARDI, M. M. Zinc prevents sickness behavior induced by lipopolysaccharides after a stress challenge in rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015b.

KIRSTEN, T. B.; LIPPI, L. L.; BEVILACQUA, E.; BERNARDI, M. M. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: relevance to autism. **PloS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1-10, 2013.

KIRSTEN, T. B.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat

model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. **Life Sciences**, v. 130, p. 12–17, 2015c.

KIRSTEN, T. B.; TARICANO, M.; MAIORKA, P. C.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 4, p. 240–251, 2010.

KLIN, A. Autismo e síndrome de Asperger : uma visão geral Autism and Asperger syndrome : an overview. **Revista Brasileira de Psiquiatria** v. 28, n. Supl I, p. 3–11, 2006.

KMETZ, G. F.; MCELROY, S. L.; COLLINS, D. J. Response of kleptomania and mixed mania to valproate. **The American Journal of Psychiatry**, v. 154, n. 4, p. 580–591, 1997.

KUWAGATA, M.; OGAWA, T.; SHIODA, S.; NAGATA, T. Observation of fetal brain in a rat valproate-induced autism model: a developmental neurotoxicity study. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 4, p. 399–405, 2009.

KYNAST, G.; SALING, E. Effect of oral zinc application during pregnancy. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 21, n. 3, p. 117–123, 1986.

LAI, M.; LOMBARDO, M. V.; BARON-COHEN, S. Autism. **Lancet** v. 383, n. 8, p. 896–910, 2014.

LANGEN, M.; SCHNACK, H. G.; NEDERVEEN, H.; BOS, D.; LAHUIS, B. E.; DE JONGE, M. V.; VAN ENGELAND, H.; DURSTON, S. Changes in the developmental trajectories of striatum in autism. **Biological Psychiatry**, v. 66, n. 4, p. 327–333, 2009.

LEAL, S. S.; CRISTÓVÃO, J. S.; BIESEMEIER, A.; CARDOSO, I.; GOMES, C. M. Aberrant zinc binding to immature conformers of metal-free copper-zinc superoxide dismutase triggers amorphous aggregation. **Metallomics: integrated biometal science**, v. 7, n. 2, p. 333–346, 2015.

LEE, P. F.; THOMAS, R. E.; LEE, P. A. Approach to autism spectrum disorder: using the new DSM-V diagnostic criteria and the CanMEDS-FM framework. **Médecin de Famille Canadien**, v. 61, n. 5, p. 421–424, 2015.

LENZ, W.; KNAPP, K. Thalidomide embryopathy. **Archives of Environmental Health**, v. 5, p. 100–105, 1962.

LI, M.; FALLIN, M. D.; RILEY, A.; LANDA, R.; WALKER, S. O.; SILVERSTEIN, M.; CARUSO, D.; PEARSON, C.; KIANG, S.; DAHM, J. L.; HONG, X.; WANG, G.; WANG, M.-C.; ZUCKERMAN, B.; WANG, X. The Association of Maternal Obesity and Diabetes With Autism and Other Developmental Disabilities. **Pediatrics**, v. 137, n. 2, p. 1-15, 2016.

LOKE, H.; HARLEY, V.; LEE, J. The International Journal of Biochemistry Biological factors underlying sex differences in neurological disorders. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 65, p. 139–150, 2015.

LOVAAS, O. I. Behavioral treatment and normal educational and intellectual

functioning in young autistic children. **Journal of Consulting and Clinical Psychology**, v. 55, n. 1, p. 3–9, 1987.

LU, Y. M.; TAVERNA, F. A.; TU, R.; ACKERLEY, C. A.; WANG, Y. T.; RODER, J. Endogenous Zn(2+) is required for the induction of long-term potentiation at rat hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. **Synapse** (New York, N.Y.), v. 38, n. 2, p. 187–197, 2000.

LYALL, K.; SCHMIDT, R. J.; HERTZ-PICCIOTTO, I. Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. **International Journal of Epidemiology**, v. 43, n. 2, p. 443–464, 2014.

MABUNGA, D. F. N.; GONZALES, E. L. T.; KIM, J.-W.; KIM, K. C.; SHIN, C. Y. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 285–300, 2015.

MACFABE, D. F.; CAIN, N. E.; BOON, F.; OSSENKOPP, K. P.; CAIN, D. P. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 217, n. 1, p. 47–54, 2011.

MANDY, W.; CHILVERS, R.; COMORBIDITY, H. Á. Sex Differences in Autism Spectrum Disorder : Evidence from a Large Sample of Children and Adolescents. **Journal of Autism and Developmental Disorders** v. 42, n. 7, p. 1304–1313, 2012.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. .; TANNO, A. . Determination of The Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. **Brazilian Journal Biology**, v. 62, n. 4, p. 609–614, 2002.

MARKRAM, H.; RINALDI, T.; MARKRAM, K. The intense world syndrome--an alternative hypothesis for autism. **Frontiers in Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 77–96, 2007.

MARKRAM, K.; RINALDI, T.; LA MENDOLA, D.; SANDI, C.; MARKRAM, H. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, v. 33, n. 4, p. 901–912, 2008.

MARTIN, L. A.; GOLDOWITZ, D.; MITTLEMAN, G. Repetitive behavior and increased activity in mice with Purkinje cell loss: a model for understanding the role of cerebellar pathology in autism. **The European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 544–55, 2010.

MCPHEETERS, M. L.; WARREN, Z.; SATHE, N.; BRUZEK, J. L.; JEROME, R. N.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. A Systematic Review of Medical Treatments for Children With Autism Spectrum Disorders abstract. **Pediatrics**, 2011.

MCPHIE-LALMANSINGH, A. A.; TEJADA, L. D.; WEAVER, J. L.; RISSMAN, E. F. Sex chromosome complement affects social interactions in mice. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 4, p. 565–70, set. 2008.

MEADOR, K. J. Effects of in utero antiepileptic drug exposure. **Epilepsy Currents**, v. 8, n. 6, p. 143–147, 2008.

- MEUNIER, H.; CARRAZ, G.; NEUNIER, Y.; EYMARD, P.; AIMARD, M. Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. **Thérapie**, v. 18, p. 435–458, 1963.
- MINNEMAN, K. P.; WECKER, L.; LAMER, J.; BRODY, T. M. (Ed.); MATHEUS, A. A. **Brody farmacologia humana**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 27, p. 311.
- MŁYNYEC, K.; DAVIES, C. L.; BUDZISZEWSKA, B.; OPOKA, W.; RECZYŃSKI, W.; SOWA-KUĆMA, M.; DOBOSZEWSKA, U.; PILC, A.; NOWAK, G. Time course of zinc deprivation-induced alterations of mice behavior in the forced swim test. **Pharmacological Reports**: PR, v. 64, n. 3, p. 567–575, 2012.
- MONTI, B.; POLAZZI, E.; CONTESTABILE, A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. **Current Molecular Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 95–109, 2009.
- MOORE, S. J.; TURNPENNY, P.; QUINN, A.; GLOVER, S.; LLOYD, D. J.; MONTGOMERY, T.; DEAN, J. C. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, n. 7, p. 489–497, 2000.
- NAKAMURA, K.; SEKINE, Y.; OUCHI, Y.; TSUJII, M.; YOSHIKAWA, E.; FUTATSUBASHI, M.; TSUCHIYA, K. J.; SUGIHARA, G.; IWATA, Y.; SUZUKI, K.; MATSUZAKI, H.; SUDA, S.; SUGIYAMA, T.; TAKEI, N.; MORI, N. Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. **Archives of General Psychiatry**, v. 67, n. 1, p. 59–68, 2010.
- NANSON, J. L. Autism in fetal alcohol syndrome: a report of six cases. **Alcoholism, clinical and Experimental Research**, v. 16, n. 3, p. 558–65, 1992.
- NARITA, N.; KATO, M.; TAZOE, M.; MIYAZAKI, K.; NARITA, M.; OKADO, N. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: Putative animal models for autism. **Pediatric Research**, v. 52, n. 4, p. 576–579, 2002.
- NEWSCHAFER, C.; CROEN, L. A.; DANIELS, J.; GIARELLI, E.; GREYER, J. K.; LEVY, S. E.; MANDELL, D. S.; MILLER, L. A.; PINTO-MARTIN, J.; REAVEN, J.; REYNOLDS, A. M.; RICE, C. E.; SCHENDEL, D.; WINDHAM, G. C. The epidemiology of autism spectrum disorders. **Annual Review of Public Health**, v. 28, p. 235–258, 2007.
- NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; KINROSS, J.; BURCELIN, R.; GIBSON, G.; JIA, W.; PETTERSSON, S. Host-gut microbiota metabolic interactions. **Science** (New York, N.Y.), v. 336, n. 6086, p. 1262–7, 8 jun. 2012.
- OHKAWARA, T.; KATSUYAMA, T.; IDA-ETO, M.; NARITA, N.; NARITA, M. Maternal viral infection during pregnancy impairs development of fetal serotonergic neurons. **Brain & Development**, v. 37, n. 1, p. 88–93, 2015.
- OHTANI, N.; GOTO, T.; WAEBER, C.; BHIDE, P. G. Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. **The Journal of Neuroscience**: the official journal of the Society for Neuroscience, v. 23, n. 7, p. 2840–2850, 2003.
- OMTZIGT, J. G.; LOS, F. J.; GROBBEE, D. E.; PIJPERS, L.; JAHODA, M. G.;

- BRANDENBURG, H.; STEWART, P. A.; GAILLARD, H. L.; SACHS, E. S.; WLADIMIROFF, J. W. The risk of spina bifida aperta after first-trimester exposure to valproate in a prenatal cohort. **Neurology**, v. 42, n. 4 Suppl 5, p. 119–25, 1992.
- ORNOY, A. Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 1–10, 2009.
- PANKSEPP, J.; BEATTY, W. W. Social deprivation and play in rats. **Behavioral and neural biology**, v. 30, n. 2, p. 197–206, 1980.
- PATTERSON, P. H. Maternal infection and immune involvement in autism. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 389–394, 2011.
- PATTERSON, P. H. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, n. 1, p. 115–8, 2002.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998.
- PEREIRA, O. C. M.; BERNARDI, M. M.; GERARDIN, D. C. C. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? **Life Sciences**, v. 78, n. 24, p. 2767–2771, 2006.
- PERSICO, A. M.; BOURGERON, T. Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 7, p. 349–358, 2006.
- PFAENDER, S.; GRABRUCKER, A. M. Characterization of biometal profiles in neurological disorders. **Metallomics: integrated biometal science**, v. 6, n. 5, p. 960–977, 2014.
- PIERCE, K.; COURCHESNE, E. Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 8, p. 655–664, 2001.
- PLETNIKOV, M. V.; RUBIN, S. A.; VASUDEVAN, K.; MORAN, T. H.; CARBONE, K. M. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. **Behavioural Brain Research**, v. 100, n. 1–2, p. 43–50, 1999.
- RIMMER, E. M.; RICHENS, A. An update on sodium valproate. **Pharmacotherapy**, v. 5, n. 3, p. 171–184, 1985.
- ROBINSON, E. B.; NEALE, B. M.; HYMAN, S. E. Genetic research in autism spectrum disorders. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 27, n. 6, p. 685–691, 2015.
- RODIER, P. M. Converging evidence for brain stem injury in autism. **Development and Psychopathology**, v. 14, n. 3, p. 537–557, 2002.
- RODIER, P. M.; BRYSON, S. E.; WELCH, J. P. Minor malformations and physical measurements in autism: data from Nova Scotia. **Teratology**, v. 55, n. 5, p. 319–325, 1997.

- RONG, Y.; BAUDRY, M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 2, p. 662–668, 1996.
- ROTHWELL, P. E. Autism spectrum disorders and drug addiction: Common Pathways, Common Molecules, Distinct Disorders? **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. 5, p. 1–12, 2016.
- ROULLET, F. I.; LAI, J. K. Y.; FOSTER, J. A. In utero exposure to valproic acid and autism - A current review of clinical and animal studies. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 36, p. 47–56, 2013.
- SAINO-SAITO, S.; SASAKI, H.; VOLPE, B. T.; KOBAYASHI, K.; BERLIN, R.; BAKER, H. Differentiation of the dopaminergic phenotype in the olfactory system of neonatal and adult mice. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 479, n. 4, p. 389–398, 2004.
- SANDIN, S.; LICHTENSTEIN, P.; KUJA-HALKOLA, R.; LARSSON, H.; HULTMAN, C. M.; REICHENBERG, A. The familial risk of autism. **JAMA**, v. 311, n. 17, p. 1770–1777, 2014.
- SCHAAFSMA, S. M.; PFAFF, D. W. Frontiers in Neuroendocrinology Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 3, p. 255–271, 2014.
- SCHLICKMANN, E.; FORTUNATO, J. J. O uso de ácido valproico para a indução de modelos animais de autismo: Uma revisão. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 62, n. 2, p. 153–159, 2013.
- SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005.
- SCHNEIDER, T.; ROMAN, A.; BASTA-KAIM, A.; KUBERA, M.; BUDZISZEWSKA, B.; SCHNEIDER, K.; PRZEWŁOCKI, R. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 6, p. 728–740, 2008.
- SCHNEIDER, T.; TURCZAK, J.; PRZEWŁOCKI, R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Issues for a therapeutic approach in autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 1, p. 36–46, 2006.
- SCHOLL, T. O.; HEDIGER, M. L.; SCHALL, J. I.; FISCHER, R. L.; KHOO, C. S. Low zinc intake during pregnancy: its association with preterm and very preterm delivery. **American Journal of Epidemiology**, v. 137, n. 10, p. 1115–1124, 1993.
- SCHWARTZMAN, J. S. Neurobiologia do autismo infantil. In: SCHWARTZMAN, J. S.; ASSUMPÇÃO, F.B. **Autismo infantil**. São Paulo: Memnon, 1995. p. 179-210
- SCHWARZ, E.; GUEST, P. C.; RAHMOUNE, H.; WANG, L.; LEVIN, Y.; INGUDOMNUKUL, E.; RUTA, L.; KENT, L.; SPAIN, M.; BARON-COHEN, S.; BAHN, S. Sex-specific serum biomarker patterns in adults with Asperger's syndrome. **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 12, p. 1213–1220, 2011.

SILVA, M.; MULICK, J. Diagnosticando o transtorno autista: aspectos fundamentais e considerações práticas. **Psicologia Ciência e Profissão**, v. 29, n. 1, p. 116–131, 2009.

SMITH, T.; GROEN, A. D.; WYNN, J. W. Randomized trial of intensive early intervention for children with pervasive developmental disorder. **American Journal of Mental Retardation**: AJMR, v. 105, n. 4, p. 269–85, jul. 2000.

SOLANTO, M. V.; MARKS, D. J.; WASSERSTEIN, J.; MITCHELL, K.; ABIKOFF, H.; ALVIR, J. M. J.; KOFMAN, M. D. Efficacy of meta-cognitive therapy for adult ADHD. **The American Journal of Psychiatry**, v. 167, n. 8, p. 958–968, 2010.

STANTON, M. E.; PELOSO, E.; BROWN, K. L.; RODIER, P. Discrimination learning and reversal of the conditioned eyeblink reflex in a rodent model of autism. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 1, p. 133–140, 2007.

STRÖMLAND, K.; PINAZO-DURÁN, M. D. Optic nerve hypoplasia: comparative effects in children and rats exposed to alcohol during pregnancy. **Teratology**, v. 50, n. 2, p. 100–11, 1994.

SUKHODOLSKY, D. G.; BLOCH, M. H.; PANZA, K. E.; REICHOW, B. Cognitive-behavioral therapy for anxiety in children with high-functioning autism: a meta-analysis. **Pediatrics**, v. 132, n. 5, p. 1341–1350, 2013.

SUMMERS, B. L.; ROFE, A. M.; COYLE, P. Prenatal zinc treatment at the time of acute ethanol exposure limits spatial memory impairments in mouse offspring. **Pediatric Research**, v. 59, n. 1, p. 66–71, 2006.

TAHERI, A.; PERRY, A. Exploring the proposed DSM-5 criteria in a clinical sample. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 42, n. 9, p. 1810–7, set. 2012.

TAKEDA, A.; TAMANO, H. Regulation of extracellular Zn(2+) homeostasis in the hippocampus as a therapeutic target for Alzheimer's disease. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 19, n. 8, p. 1051–1058, 2015.

TAKEDA, A.; TAMANO, H.; KAN, F.; ITOH, H.; OKU, N. Anxiety-like behavior of young rats after 2-week zinc deprivation. **Behavioural Brain Research**, v. 177, n. 1, p. 1–6, 2007.

TAMANHA, A. C.; PERISSINOTO, J.; CHIARI, B. M. Uma breve revisão histórica sobre a construção dos conceitos do Autismo Infantil e da síndrome de Asperger A brief historic review of the conceptions of Autism and Asperger syndrome. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia** v. 13, n. 3, p. 296–299, 2008.

TASSABEHJI, N. M.; CORNIOLA, R. S.; ALSHINGITI, A.; LEVENSON, C. W. Zinc deficiency induces depression-like symptoms in adult rats. **Physiology & Behavior**, v. 95, n. 3, p. 365–369, 2008.

TAUBENECK, M. W.; DASTON, G. P.; ROGERS, J. M.; GERSHWIN, M. E.; ANSARI, A.; KEEN, C. L. Tumor necrosis factor-alpha alters maternal and embryonic zinc metabolism and is developmentally toxic in mice. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 4, p. 908–919, 1995.

- TRAN, P. L.; LEHTI, V.; LAMPI, K. M.; HELENIUS, H.; SUOMINEN, A.; GISSLER, M.; BROWN, A. S.; SOURANDER, A. Smoking during pregnancy and risk of autism spectrum disorder in a Finnish National Birth Cohort. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 266–274, 2013.
- TUNG, E. W.; WINN, L. Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: A role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube. **Molecular Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 979–987, 2011.
- VEENEMA, A. H.; BREDEWOLD, R.; DE VRIES, G. J. Sex-specific modulation of juvenile social play by vasopressin. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 11, p. 2554–2561, 2013.
- VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; COOK, E. H. Molecular genetics of autism spectrum disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 9, n. 9, p. 819–832, 2004.
- WALCOTT, E. C.; HIGGINS, E. A.; DESAI, N. S. Synaptic and Intrinsic Balancing during Postnatal Development in Rat Pups Exposed to Valproic Acid in Utero. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 37, p. 13097–13109, 2011.
- WALSH, C. A.; MORROW, E. M.; RUBENSTEIN, J. L. R. Essay Autism and Brain Development. **Cell**, v. 135, n. 3, p. 396–400, 2008.
- WEISSKOPF, M. G.; KIOUMOURTZOGLOU, M.-A.; ROBERTS, A. L. Air Pollution and Autism Spectrum Disorders: Causal or Confounded? **Current Environmental Health Reports**, v. 2, n. 4, p. 430–439, 2015.
- WELLMANN, K. A.; VARLINSKAYA, E. I.; MOONEY, S. M. D-Cycloserine ameliorates social alterations that result from prenatal exposure to valproic acid. **Brain Research Bulletin**, v. 108, p. 1–9, 2014.
- WHITTLE, N.; LUBEC, G.; SINGEWALD, N. Zinc deficiency induces enhanced depression-like behaviour and altered limbic activation reversed by antidepressant treatment in mice. **Aminoacids**, v. 36, n. 1, p. 147–58, 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**, v. 43, n. 3, p. 202–206, 2001.
- WINK, L. K.; PLAWECKI, M. H.; ERICKSON, C. A.; STIGLER, K. A.; MCDOUGLE, C. J. Emerging drugs for the treatment of symptoms associated with autism spectrum disorders. **Expert opinion on Emerging Drugs**, v. 15, n. 3, p. 481–494, 2010.
- WÖHR, M.; SCATTONI, M. L. Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: Current standards and new developments. **Behavioural Brain Research**, v. 251, p. 5–17, 2013.
- WÖHR, M.; SCHWARTING, R. K. W. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 310–30, abr. 2008.
- WOLTERINK, G.; DAENEN, L. E.; DUBBELDAM, S.; GERRITS, M. A.; VAN RIJN, R.; KRUSE, C. G.; VAN DER HEIJDEN, J. A.; VAN REE, J. M. Early amygdala

damage in the rat as a model for neurodevelopmental psychopathological disorders. **European Neuropsychopharmacology**: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology, v. 11, n. 1, p. 51–59, 2001.

XIE, X.; SMART, T. G. Modulation of long-term potentiation in rat hippocampal pyramidal neurons by zinc. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 427, n. 5–6, p. 481–486, 1994.

XU, J.; BURGOYNE, P.; ARNOLD, A. Sex differences in sex chromosome gene expression in mouse brain. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 12, p. 1409–1419, 2002.

YU, S.-H.; CHO, D.-C.; KIM, K.-T.; NAM, K.-H.; CHO, H.-J.; SUNG, J.-K. The neuroprotective effect of treatment of valproic Acid in acute spinal cord injury. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 51, n. 4, p. 191–198, 2012.

ZHANG, Y.; SUN, Y.; WANG, F.; WANG, Z.; PENG, Y.; LI, R. Downregulating the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway attenuates the susceptibility to autism-like phenotypes by decreasing oxidative stress. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 7, p. 1409–1419, 2012.