LUANA CARVALHO CEZAR

Autismo e sistema dopaminérgico: análises de diferenças sexuais, aspectos moleculares e comportamentais

> São Paulo 2022

LUANA CARVALHO CEZAR

Autismo e sistema dopaminérgico: análises de diferenças sexuais, aspectos moleculares e comportamentais

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

São Paulo 2022 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)

4257 FMVZ	Cezar, Luana Carvalho Autismo e sistema dopaminérgico: análises de diferenças sexuais, aspectos moleculares e comportamentais / Luana Carvalho Cezar. – 2022. 380 f. : il.
	Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2022.
	Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
	Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.
	Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felício.
	1. Ritalina. 2. Metilfenidato. 3. TEA. 4. Dopamina. 5. Neurodesenvolvimento. I. Título.
	iste estelentífice elektroniste este hilliotectóric Ocerile Melecer Ocerike, ODD 7070.0. de FM/7/1/0D



aculdade de Medicina Veterinária e Zootecni/

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Autismo e sistema dopaminérgico: análise de diferenças sexuais, aspectos moleculares e comportamentais", protocolada sob o CEUA nº 6508200217, sob a responsabilidade de **Luciano Freitas Felício** e equipe; Luana Carvaího Cezar - 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 - está 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, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/03/2017.

We certify that the proposal "Autism and dopaminergic system: analysis of sexual variables, molecular and behavioral ", utilizing 150 Heterogenics rats (50 males and 100 females), protocol number CEUA 6508200217, under the responsibility of Luciano Freitas Felicio and team; Luana Carvalho Cezar - 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as 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 (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/15/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 05/2017 a 05/2020 Área: Neurociência E Comportamento

Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMV2	Z USP					
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade:	90 a 160 dias	N:	50
Linhagem:	Wistar			Peso:	200 a 340 g		
Origem:	Biotério do Departamento de Patologia da FMV2	Z USP					
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade:	90 a 120 dias	N:	100
Linhagem:	wistar			Peso:	200 a 300 g		

Resumo: O autismo é um transtorno complexo do desenvolvimento caracterizado por inúmeros prejuízos comportamentais, tais como comunicação, socialização e indução da inflexibilidade cognitiva. No trabalho de mestrado desenvolvido anteriormente, nossos resultados revelaram alterações em diferentes categorias comportamentais induzidas por meio do VPA, confirmando o modelo experimental de autismo. Além disso, o estudo incluiu a hipoatividade do sistema dopaminérgico estriatal 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. O presente projeto foi remodelado de sua concepção original no intuito de verticalizar os estudos dos eventuais efeitos do VPA pré-natal no modelo de autismo em relação aos prejuízos no sistema dopaminérgico, uma vez que os resultados obtidos no mestrado foram bastante promissores. Esse trabalho tem como objetivo estudar os efeitos do VPA pré-natal no sistema dopaminérgico em um modelo de autismo, avaliando os aspectos comportamentais e moleculares nas proles masculina e feminina de ratas. Serão avaliados parâmetros reprodutivos, anormalidades comportamentais na comunicação (vocalização ultrassônica), comportamentos repetitivos e na cognição (labirinto em T) e interação social (comportamento de brincar), os comprometimentos centrais dopaminérgicos no por meio do western biot para a expressão proteica do transportador de dopamina (DAT) estriatal e no córtex na prole masculina e feminina de ratas, por meio de PCR em tempo real a expressão gênica dos receptores D1a e D2 no bulbo olfatório serão avaliadas e a determinação dos níveis de DA e turnover no estriado e substância negra via HPLC da prole de ratas expostas ao VPA pré-natal na prole masculina e feminina de ratas em um modelo de autismo. Contudo, apesar dos indícios de interação entre o efeito tóxico do VPA sobre o sistema dopaminérgico, poucos estudos são expressivos na área tendo sido feitos com número pequeno de sujeitos e sem controles apropriados.

Local do experimento: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

São Paulo, 19 de abril de 2017



Comissão de Ética no Uso de Animais

976-976

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

Roseli da Costa Gomes Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais de São Paulo

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária: Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 São Paulo(SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676/0904 / fax: 55 (11) 3032-2224 Horário de atendimento: 2ª a 6º dos 88 as 17h : e-mail: ceuavet@usp.hr CEUA N 6508200217

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CEZAR, Luana Carvalho.

Título: Autismo e sistema dopaminérgico: análises de diferenças sexuais, aspectos moleculares e comportamentais

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/___/____

Banca Examinadora

Prof. Dr	
Instituição:	Julgamento:
Prof. Dr	
Instituição:	Julgamento:
Prof. Dr	
Instituição:	Julgamento:
Prof. Dr	
Instituição:	Julgamento:
Prof. Dr	
Instituição:	Julgamento:

Aos meus pais, Rogerio Cezar (in memoriam) e Maria de Lourdes Cezar, por todo o amor e cuidado. À minha irmã, Liane Cezar, pelo companheirismo e amizade. Ao grande amor da minha vida, Caio Cesar Stevanovich, por toda sua dedicação, zelo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Sou grata à Deus, por guiar os meus caminhos naqueles momentos mais sombrios, autor da minha fé, permitiu-me perseverar no meu sonho e exercer minha profissão na mais reconhecida instituição da América Latina, a Universidade de São Paulo. Alcançar agora esse grande ideal de concluir o Doutorado em Ciências e conseguir contribuir com conhecimento a comunidade, é motivo de orgulho e realização em minha trajetória. **"Pois nada é impossível para Deus"—Lucas 1:37-38**

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ-USP, responsável pela minha formação e desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao Departamento de Patologia (VPT), local que trabalhei por mais de uma década e onde adquiri muito conhecimento acadêmico e pessoal.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -**CNPQ** (proc. 141273/2017-8) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP** (proc. 2017/04642-8) pela concessão de bolsas de auxílio financeiro para o desenvolvimento deste doutorado.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luciano Freitas Felício**, por acreditar e despertar o meu potencial, por apoiar e respeitar minhas ideias e influenciar minha paixão por Neurociências. De maneira especial, sou grata pela dedicação, orientação e oportunidade, obrigada por me ensinar ao seu próprio exemplo, como ser um profissional altamente qualificado com sabedoria e sensibilidade. Desde meu ingresso ao seu laboratório, longos 12 anos passaram-se, aprendi e amadureci. Muito obrigada por tudo, prô!

Agradeço aos professores **Dr. Thiago Berti Kirsten** e **Dra. Martha Bernardi**, colaboradores nesse trabalho, por todo o suporte, discussões científicas, ensinamentos e empenho pela sede de conhecimento. Muto obrigada por me auxiliar e influenciar na realização desse projeto.

Agradeço à equipe do Laboratório de Neurobiologia dos Comportamentos Reprodutivos, **Magali Caetano, Marianna Manes** e **Carlos Alves**. Muito obrigada pelo auxílio na realização desse trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do Departamento de Patologia, especialmente, **Vagner, Nicole,** *Milena e Adriana*, agradeço por todo o suporte para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao técnico de laboratório, Dennis Zanatto, colega prestativo sempre pronto a ajudar, e que inúmeras vezes salvou minha vida e os experimentos. Obrigada por tudo.

Ao **Prof. Dr. Jorge Flório**, pela colaboração e realização dos experimentos analíticos de HPLC. Obrigada por toda a compreensão, paciência, ensinamentos e conversas esclarecedoras.

À minha colega de laboratório de longa data, **Dra. Marianne Klein**, agradeço por ter cedido seu tempo e conhecimento para a realização das imunofluorescências desse trabalho. Obrigada por ser uma referência de profissional que admiro, por ser acessível e demonstrar amor pela ciência.

Agradeço a amizade e o auxílio técnico da **Dra. Ana Paula Lima**, que sempre colabora com as minhas ideias efusivas.

Ao **Prof. Dr. Bruno Cogliati**, responsável pelo Laboratório de Patologia Morfológica e Molecular do VPT (**LAPMOL**). Agradeço por fornecer as instalações de seu laboratório para a realização das técnicas de biologia molecular desse projeto. Muito obrigada por sempre abrir a porta do seu escritório, ser extremamente atencioso e gentil comigo e meu trabalho. Aos colaboradores do biotério, **Mauro, Luciana,** e **Nelsinho**, por todo o cuidado no manejo aos animais. Aos ratos, que colaboraram com a vida na execução dessa pesquisa, meu profundo respeito e gratidão.

A todos **os professores e mestres do VPT**, agradeço a contribuição na construção da minha formação, por serem fonte de inspiração na busca constante de conhecimento na ciência.

Aos meus **colegas de pós-graduação**, por colaborarem de alguma forma técnica, ou pelos almoços e ou momentos de descontração, atitudes que deixaram meus dias mais leves.

Agradeço, com imenso pesar, ao meu pai **Rogerio Cezar** (in memoriam), fundamental na construção do meu caráter, ambição e resiliência. Obrigada por toda dedicação e amor a mim aplicados, sem o qual jamais teria chegado até aqui. Tenho muita honra de ter realizado esse sonho que também era seu. Nunca haverá palavras no mundo para descrever minha gratidão e amor por você. Sua memória permanecerá para sempre viva norteando minhas escolhas.

Um muito obrigada à minha mãe **Maria de Lourdes**, minha metade, minha melhor amiga e confidente. Agradeço todo o seu esforço em me educar e amar, por nunca hesitar em me apoiar, seja emocionalmente, seja financeiramente. O meu amor por você é incondicional, minha gratidão é imensurável!

Agradeço minha irmã Liane Cezar, por todo o apoio e amizade, e mais importante, por ter me presenteado com a Manuela Cezar, minha sobrinha querida, meu raio de sol, sua existência tornou minha jornada mais feliz. Ao meu cunhado, Rodrigo Alvarez, por estar sempre ao meu lado, apoiando e proporcionando bons momentos. Sem a minha família, eu nada seria!

Ao **Caio Stevanovich**, meu marido, grande amor da minha vida, meu parceiro de todas as horas, quem jamais hesitou em me apoiar emocionalmente e

financeiramente. Muito obrigada por nunca ter soltado a aminha mão, por estar incondicionalmente ao meu lado, acreditando nos meus sonhos, apoiando minhas decisões e por trabalhar incansavelmente em todas as etapas desse trabalho. Essa tese jamais teria saído do papel sem a sua ajuda, serei profundamente grata, sempre! Eu amo você, sempre, e para sempre!

Agradeço a minha tia **Marina Carvalho** (in memoriam), infelizmente falecida vítima da COVID-19. Obrigada por acreditar sempre no meu potencial e demonstrar tanto orgulho, jamais esquecerei que o meu primeiro jaleco foi você que me presenteou. Você estará para sempre em minha memória!

Aos meus poucos e bons amigos, **Elan Fernandes, Jullie Hernandez, Lucas Assis, Ed Carlos** e **Lianne Araújo**. Agradeço por todos os anos compartilhados, pela alegria e amizade. Sinto imensa gratidão pela oportunidade de dividir essa conquista com todos vocês! Da faculdade para a vida!

Agradeço todos aqueles amigos que de alguma forma iluminaram o meu caminho, em especial, **Caio C2, Danda, Fátima, Ulisses** e **Jonatas**. Obrigada pela ajuda e por tornar meus dias mais felizes.

À minha segunda família, meu sogro **Fabiane Fonseca**, minha sogra **Priscila** Navarrete, meus cunhados, **Juliana Navarrete, Nicholas Navarrete** e **Enrico** Navarrete. Agradeço por me apoiarem sempre, pela amizade, amor e pelo acolhimento que recebi. Amo vocês.

Agradeço o **Dr. Acácio Fernandes Cardoso**, médico cardiologista, extremamente empático, profissional capacitado e talentoso. Muito obrigada por realizar o meu tratamento e me proporcionar a cura. Sua conduta sempre é impecável, exerce a medicina com maestria e humanidade, sem os seus cuidados não teria concluído essa tese.

"You, me, or nobody is gonna hit as life. But it ain`t about how hard you hit. It`s about how hard you can get hit and keep moving forward. That`s how winning is done!"

Rocky Balboa

~

RESUMO

CEZAR, L. C. Autismo e sistema dopaminérgico: análises de diferenças sexuais, aspectos moleculares e comportamentais. [Autism and the dopaminergic system: analysis of sex differences, molecular and behavioral aspects]. 2022. 380 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O autismo é um transtorno complexo do desenvolvimento caracterizado por inúmeros prejuízos comportamentais. A exposição pré-natal em roedores ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) produz sintomas similares àqueles encontrados na condição humana no TEA. Resultados de trabalhos anteriores sugerem que o fenótipo tipoautista esteja relacionado a modificações funcionais do sistema dopaminérgico. O desafio farmacológico é uma estratégia potente capaz de acessar a atividade de neurotransmissores no SNC, e especialmente o uso de metilfenidato aumenta seletivamente a liberação de dopamina em circuitos cerebrais estriatais e corticais. Ainda, a administração prolongada do metilfenidato pode ocasionar mudanças estruturais cerebrais envolvendo dopamina, além de traduzir neuroplasticidade em alterações comportamentais. O presente trabalho avaliou aspectos comportamentais e moleculares de ratos expostos ao VPA pré-natal, além de verificar os efeitos do metilfenidato (5 mg/kg) agudo (GD 32) e prolongado (GD 21 - 32) e a hipótese da dopamina no autismo. Os resultados revelaram: (1) fenótipo comportamental autista induzido pelo VPA no GD 12,5 em machos Wistar; (2) diferenças sexualmente dimórficas comportamentais e neuroquímicas promovidos pelo VPA; (3) melhoras comportamentais obtidas com metilfenidato agudo ou prolongado; (4) transmissão dopaminérgica deficiente em diferentes regiões cerebrais de ratos adultos; (5) indução de ansiedade, anedonia e alterações no self-grooming em ratos Wistar expostos ao VPA no GD 12,5. O conjunto de dados sugere que o modelo de autismo em ratos pelo VPA pré-natal fornece, não apenas evidências empíricas para corroborar a hipótese da dopamina no autismo, mas também, um princípio translacional clínico no desenvolvimento de possíveis vias de tratamento para o transtorno em humanos.

Palavras-chave: ritalina, metilfenidato, TEA, dopamina, neurodesenvolvimento.

ABSTRACT

CEZAR, L. C. Autism and the dopaminergic system: analysis of sex differences, molecular and behavioral aspects. [Autismo e sistema dopaminérgico: análises de diferenças sexuais, aspectos moleculares e comportamentais]. 2022. 380 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Autism is a complex developmental disorder characterized by several behavioral impairments. In rodents, prenatal exposure to VPA (400 mg/kg in GD12,5) induces similar symptoms found in the human condition of autism spectrum disorder. Previous studies suggest the autistic-like phenotype is related to functional changes on the dopaminergic system. Pharmacological challenge is a potential strategy capable of accessing neurotransmitter activity in the CNS, especially the methylphenidate that selectively increases dopamine release in striatal and cortical circuits. Prolonged administration of methylphenidate can change brain structures involving dopamine, translating this neuroplasticity into behavioral changes. This work evaluated behavioral and molecular aspects of rats exposed to prenatal VPA and the effects of acute (GD 32) treatment of methylphenidate (5 mg/kg) and chronic (GD 21 -32) in the hypothesis of dopamine in autism. The results reveals: (1) VPA-induced autistic behavioral phenotype in GD 12.5 in male Wistar; (2) sexual dimorphic differences between males and females on behavioral and neurochemical changes induced by exposure to VPA; (3) behavioral improvements induced by acute or chronic methylphenidate treatment in rats exposed to prenatal VPA; (4) deficient dopamine signaling in different brain areas on adult rats; (5) and VPA prenatal exposure induces anxiety-like behavior, anhedonia and self-grooming behavior in both sexes. These data suggests that the autistic like model induced by VPA provides evidence to corroborate the hypothesis of dopamine in autism, but also, a clinical translational principle in the development of possible treatment routes for the disorder in humans.

Keywords: ritalin, methylphenidate, ASD, dopamine, neurodevelopment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sinais e sintomas característicos de indivíduos com TEA51
Figura 2	Desenvolvimento embrionário em humanos e roedores com períodos
críticos que	demonstra a associação de fatores ambientais e o TEA63
Figura 3	Consequências da exposição pré-natal ao VPA, alterações
morfológica	s semelhantes as exibidas no TEA70
Figura 4	Resumo das vias dopaminérgicas no cérebro73
Figura 5	Esquema dos sinais do TEA, com alterações do circuito
mesocortico	olímbico (MCL) levando a prejuízos sociais; e disfunções do circuito
nigroestriata	al (NES) acaba por promover comportamentos estereotipados75
Figura 6	Principais características e causas do aumento da 5-HT durante o
desenvolvin	nento cerebral77
Figura 7	Metilfenidato bloqueando os transportadores de dopamina (DAT) e
noradrenalii	na (NET), inibindo a recaptação das catecolaminas, causando aumento
nos níveis c	le DA extracelular e densidade de receptores de DA
Figura 8	Lavado vaginal em ratas visto no microscópio óptico97
Figura 9	Parâmetros observados no teste comportamento social: A) e B) passar
sob/sobre; (C) <i>pinning</i> ; D) perseguir; E) farejar103
Figura 10	Ilustração do teste de campo aberto106
Figura 11	Sequência da progressão cefalocaudal do self-grooming. Divisão do
animal em	cinco quadrantes: patas dianteiras (1), face/cabeça (2), corpo (3), patas
traseiras (4)	e genital/cauda (5)108
Figura 12	Sequência da progressão cefalocaudal do self-grooming induzido por
sacarose 1	0%. Divisão do animal em cinco quadrantes: patas dianteiras (b),
face/cabeça	a (c), corpo (e), patas traseiras (f), genital/cauda (d) e exploração vertical
(a)	
Figura 13	Ilustração do teste de labirinto em cruz elevado113
Figura 14	Ilustração do aparato caixa claro-escuro114
Figura 15	Esquema de corte sagital do cérebro de rato com todas as estruturas
em destaqu	e que foram utilizadas nesse estudo116
Figura 16	Esquema com todas as etapas da perfusão transcardíaca em ratos 123

Ilustração com as coordenadas do bregma para as secções utilizadas na Figura 17 imunofluorescência. Os cortes analisados começam no Bregma -4.20 mm até -6.84 ilustração com resumo da experimentação animal126 Figura 18 Figura 19 Linha do tempo com os experimentos realizados em machos e fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal e desafiados com metilfenidato agudo127 Figura 20 Linha do tempo com os experimentos realizados em machos e fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal e tratados com metilfenidato prolongado......128 Figura 21 Linha do tempo com os experimentos realizados em machos Wistar expostos ao VPA pré-natal. Imunofluorescência de neurônios TH⁺ imunorreativos131 Figura 22 Linha do tempo com os experimentos realizados em machos Wistar expostos ao VPA pré-natal......132 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) na Figura 23 vocalização ultrassônica da prole masculina de ratas durante o PND 11......137 Figura 24 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) na avaliação do comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole masculina de ratas no PND 29.....139 Figura 25 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no Figura 26 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg 45 minutos antes do teste) na atividade locomotora geral em campo aberto no PND 32 da prole masculina de ratas *Wistar* (n = 10 para todos os grupos)144 Figura 27 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de noradrenalina na prole masculina de ratas no PND 32.....147 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao Figura 28 desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de dopamina na prole masculina de ratas no PND 32.....148 Figura 29 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de serotonina na prole masculina de ratas no PND 32.....149 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao Figura 30 desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de noradrenalina na prole masculina de ratas no PND 32.....150

Figura 33 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica de *DAT*, *DRD1*, *DRD2* e *TH* no estriado da prole masculina de ratas no PND 32

Figura 34 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica de *DRD1, DRD2 e TH* no córtex da prole masculina de ratas no PND 32

 Figura 41 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao Figura 42 tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de dopamina na prole masculina de ratas no PND 32171 Figura 43 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de Figura 44 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH estriatal da prole masculina de ratas Wistar no PND 32 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e Figura 45 tratamento prolongado com metilfenidato (12 dias de tratamento) na expressão gênica de DRD1, DRD2 e TH no córtex da prole masculina de ratas no PND 32......175 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) na Figura 46 vocalização ultrassônica da prole feminina de ratas durante o PND 11178 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) na Figura 47 avaliação do comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T nas fêmeas no PND 29.....180 Figura 48 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no Figura 49 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg 45 minutos antes do teste) na atividade locomotora geral em campo aberto durante o PND 32 na prole feminina de ratas......184 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao Figura 50 desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de noradrenalina na prole feminina de ratas no PND 32188 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao Figura 51 desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de dopamina na prole feminina de ratas no PND 32188

Figura 63 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao Figura 64 tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao Figura 65 tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de Figura 66 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica de DRD1 e DRD2 no estriado na prole feminina de ratas no **PND 32** Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao Figura 67 desafio farmacológico com metilfenidato prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica de DRD1 e DRD2 no córtex na prole feminina de ratas no **PND 32** Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos Figura 68 neurônios dopaminérgicos TH⁺ imunorreativos na área tegmental ventral e substância nigra em ratos no PND 35......213 Figura 69 Fotomicrografias do encéfalo de ratos para avaliação dos efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos neurônios dopaminérgicos TH⁺ imunorreativos no complexo VTA-SN no PND 35214 Figura 70 Fotomicrografias do encéfalo de ratos para avaliação dos efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos neurônios dopaminérgicos Figura 71 Fotomicrografias do encéfalo de ratos para avaliação dos efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos neurônios dopaminérgicos Avaliação do padrão de grooming espontâneo no PND 60 em machos Figura 72 Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina Figura 73Avaliação do padrão de grooming induzido pela sacarose 10% no PND61 em machos Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos).SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg......220

Figura 77 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis estriatais de noradrenalina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 79 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis estriatais de serotonina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 82 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis corticais de serotonina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 83 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis hipocampais de noradrenalina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 84 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis hipocampais de dopamina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 86 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis hipotalâmicos de noradrenalina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 88 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis hipotalâmicos de serotonina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 89 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de noradrenalina na PAG em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg
Figura 90 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos

níveis de dopamina na PAG em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os

grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Figura 91 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina na PAG em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 92 Avaliação do padrão de *grooming* espontâneo no PND 60 em fêmeas *Wistar* expostas ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg......242

Figura 93 Avaliação do padrão de *grooming* induzido pela sacarose 10% no PND 61 em fêmeas *Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg......244
Figura 94 Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado no PND 62 em fêmeas *Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; 0,9% pré-natal; 247

Figura 97 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de noradrenalina estriatal em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 99 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina estriatal em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os

grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos Figura 100 níveis de noradrenalina cortical em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Figura 101 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de dopamina cortical em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Figura 102 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina cortical em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos Figura 103 níveis de noradrenalina hipocampal em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Figura 104 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de dopamina hipocampal em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Figura 105 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina hipocampal em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos Figura 106 níveis de noradrenalina hipotalâmico em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Figura 107 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de dopamina hipotalâmico em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Figura 108 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina hipotalâmico em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos Figura 109 níveis de noradrenalina na PAG em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos Figura 110 níveis de dopamina na PAG em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos Figura 111 níveis de serotonina na PAG em fêmeas Wistar no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

LISTA DE TABELAS

Avaliação da exposição pré-natal ao VPA na vocalização ultrassônica na Tabela 1 prole masculina de ratas durante o PND 11. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas Wistar, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal Avaliação da exposição pré-natal ao VPA no comportamento Tabela 2 repetitivo/restritivo e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole masculina de ratas durante o PND 29138 Tabela 3 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA no comportamento social da prole masculina de ratas Wistar durante o PND 30. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5: SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).....141 Tabela 4 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg - 45 minutos antes do teste) na atividade locomotora geral em campo aberto no PND 32 da prole masculina de ratas *Wistar* (n = 10 para todos os grupos)142 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de Tabela 5 metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) nos níveis de

Tabela 8 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica no córtex da prole masculina de ratas *Wistar*. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET =

grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32155 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de Tabela 9 metilfenidato prolongadamente (5 mg/kg 10 dias de tratamento) no comportamento social de brincar no PND 30 da prole masculina de ratas Wistar. Os grupos representam SAL+SAL = salina 0,9% pré-natal e pós-tratamento com salina; VPA+SAL = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg e pós-tratamento com salina; SAL+MET = salina pré-natal e pós-tratamento com metilfenidato; VPA+MET = VPA Tabela 10 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente por 12 dias de tratamento na locomoção durante o PND 32 em ratos Wistar. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratados prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos)

Tabela 16Avaliação da exposição pré-natal ao VPA no comportamento
repetitivo/restritivo e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T nas fêmeas durante o
PND 29. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA
= salina; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos
os grupos)

Tabela 20Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal demetilfenidato(5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) nos níveis deneurotransmissores, metabólitos e *turnover* no córtex da prole feminina de ratasWistar. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD

Tabela 22Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e aodesafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) naexpressão gênica de DRD1 e DRD2 no córtex de ratas no PND 32 (n = 5 para todosos grupos)

Tabela 23Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal demetilfenidatoprolongadamente(5 mg/kg aos 10 dias de tratamento) nocomportamento social de brincar no PND 30 da prole feminina de ratas *Wistar* (n = 10para todos os grupos)198

Tabela 28Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal aometilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica

Tabela 29Avaliação do padrão de *grooming* espontâneo no PND 60 em machos*Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos).SALINA = salina0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg......219

Tabela 30 Avaliação do padrão de *grooming* induzido pela sacarose 10% no PND
61 em machos *Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos).
SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg.......221
Tabela 31 Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto

Tabela 33 Avaliação dos níveis de neurotransmissores no corpo estriado no PND 90 em machos Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg......227 Tabela 34 Avaliação dos níveis de neurotransmissores no córtex no PND 90 em machos Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = Tabela 35 Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipocampo no PND 90 em machos Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA Tabela 36 Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipotálamo no PND 90 em machos Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA Avaliação dos níveis de neurotransmissores na PAG no PND 90 em Tabela 37 machos Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg238

Tabela 38Avaliação do padrão de grooming espontâneo no PND 60 em fêmeasWistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg.......243Tabela 39Avaliação do padrão de grooming induzido pela sacarose 10% no PND61 em fêmeas Wistar expostas ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos).SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg.......245Tabela 40Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirintoem cruz elevado no PND 62 em fêmeas Wistar expostas ao VPA pré-natal; (n = 10para todos os grupos).SALINA = salina 0,9% pré-natal; (n = 10

Avaliação dos níveis de neurotransmissores no estriado no PND 90 em Tabela 42 fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = Tabela 43 Avaliação dos níveis de neurotransmissores no córtex no PND 90 em fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = Tabela 44 Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipocampo no PND 90 em fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg257 Tabela 45 Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipotálamo no PND 90 em fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg259 Tabela 46 Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipotálamo no PND 90 em fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Resumo dos parâmetros avaliados durante o teste de vocalização
ultrassônica	
Quadro 2	Resumo dos parâmetros avaliados durante o teste do comportamento de
brincar	
Quadro 3	Resumo dos parâmetros avaliados durante o teste de campo aberto. 107
Quadro 4	Resumo dos parâmetros avaliados durante o teste de grooming
espontâneo	
Quadro 5	Resumo dos parâmetros avaliados durante o labirinto em cruz
elevado	
Quadro 6	Resumo dos parâmetros avaliados durante a caixa claro-escuro 114
Quadro 7	Resumo dos genes utilizados no PCR-RT121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-MT	3-Metoxitiramina
5-HIAA	Ácido 5-Hidroxiindolacético
5-HT	5-Hidroxitriptamina
5-HTP	5 Hidroxitriptofano
ALDH	Aldeído Desidrogenase
AMPARs	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiônico
CA	Campo Aberto
cAMP	Adenosina 3',5'-Monofosfato Cíclico
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCE	Caixa Claro-Escuro
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CI–	Cloro
CIHO ₄	Ácido Perclórico
CNVs	Copy Number Variation
COMT	Catecol-O-Metiltransferase
DA	Dopamina
DAT	Transportador de Dopamina
DBH	Dopamine-β-Hydroxylase
DHBA	3,4-dihidroxibenzilamina
DO	densidade óptica
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DOPAL	3,4-Diidroxifenilacetaldeído
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EDTA	Edetato de Dissódico
EP	Erro Padrão
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	U.S. Food and Drug Administration
Fe ²⁺	Ferro
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinário e Zootecnia
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico

GD	Dia de Gestação
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase-3 Beta
H ₃ PO ₄	Ácido Ortofosfórico
HDAC	Histona Deacetilase
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
HPLC-ED	High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical
Detection	
HSA	Ácido 1- Heptanosulfônico
HVA	Ácido Homovanílico
i.p	Intraperitoneal
L-DOPA	Levodopa
LPS	lipopolissacarídeo
MAO-B	Monoamina Oxidase B
MCL	Circuito Mesocorticolímbico
MET	Cloridrato de Metilfenidato
Na⁺	Sódio
$Na_2S_2O_5$	Metabissulfito de Sódio
NAA	N-acetil-aspartato
nAChRs	Nicotinic Acetylcholine Receptor α4
NaCl	Cloreto de Sódio
NaCl	cloreto de sódio
NES	Circuito Nigroestriatal
NET	Transportador de Noradrenalina
NMDARs	N-metil-D-aspartato
NOR	Noradrenalina
O ₂	Oxigênio
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PB	Tampão Fosfato
PBS	Salina Tampona
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PND	Dia Pós-Natal
polyI:C	ácido polirriboinosínico-polirribocitidílico
QI	Quociente de Inteligência
RNA	Ácido Ribonucleico

S.C	Subcutânea
SAL	Salina
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNC	Sistema Nervoso Central
SNc	Substância Nigra Pars Compacta
SNPs	Single nucleotide Polymorphism
SNr	Substância Nigra Pars Reticulada
SRY	Sex-determining Region on the Y chromosome
SVF	Síndrome do Valproato Fetal
TDAH	Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade
TDO	Transtorno Desafiador Opositivo
TEA	Transtorno do Espectro Autista
ТН	tirosina hidroxilase
ТОС	Transtorno Obsessivo-Compulsivo
TPH	Triptofano Hidroxilase
TTBS	Salina Tamponada Contendo Tween 20
USP	Universidade de São Paulo
UV-B	Raios Ultravioleta B
VMA	Ácido Vanil-Mandélico
VMAT2	Transportador Vesicular de Monoamina
VPA	Ácido Valpróico
VPA+SAL	ácido valpróico pré-natal e pós-tratamento com salina
VPA+MET	ácido valpróico pré-natal e pós-tratamento com metilfenidato
VPT	Departamento de Patologia
VTA	Área Tegmental Ventral
ZC	Zona Central
Zn	Zinco
ZnSO4	sulfato de zinco
ZP	Zona Periférica
SERT	Transportador de Serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E ENUNCIADO DO PROBLEMA	48
1.1	Autismo: origem, epidemiologia e fisiopatologia	50
1.2	Cérebro autista: características comportamentais e neurobiológicas	56
1.3	Desenvolvimento cerebral e a interferência de fatores ambientais no	
	TEA	62
1.4	Ácido Valpróico	65
1.5	Recursos comportamentais e moleculares no modelo experimental de	
	autismo em roedores induzido pelo VPA	68
1.6	Cérebro autista: a hipótese da dopamina	71
1.7	Cérebro autista: hiperserotonemia	76
1.8	Metilfenidato: possíveis intervenções farmacológicas no autismo	79
1.9	Autismo no sexo feminino: principais características do dimorfismo	
	sexual comportamental e molecular	83
1.10	Justificativa	86
2	OBJETIVO GERAL	90
2.1	Objetivos específicos	90
2.1 2.1.1	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n	90 o GD
2.1 2.1.1	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas	90 o GD 90
2.1 2.1.1 2.1.2	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida	90 o GD 90 ato (5
2.1 2.1.1 2.1.2	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD	90 o GD 90 ato (5 12,5)
2.1 2.1.1 2.1.2	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD	90 o GD 90 ato (5 12,5) 91
2.12.1.12.1.22.1.3	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 m	90 o GD 90 ato (5 12,5) 91 ng/kg)
2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 m em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5)	90 o GD 90 ato (5 12,5) 91 ng/kg) 91
 2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 m em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5) Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n	90 o GD 90 ato (5 12,5) 91 ng/kg) 91 o GD
 2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 m em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5) Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole feminina de ratas	90 o GD 90 ato (5 12,5) 91 og/kg) 91 o GD 92
 2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 m em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5) Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole feminina de ratas	90 o GD 90 ato (5 12,5) 91 ng/kg) 91 o GD 92 ato (5
 2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 	Objetivos específicos Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 m em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5) Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole feminina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD	90 o GD 90 ato (5 12,5) 91 ng/kg) 91 o GD 92 ato (5 12,5)
 2.1 2.1.1 2.1.2 2.1.3 2.1.4 2.1.5 	Objetivos específicos. Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole masculina de ratas. Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 m em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5) Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA n 12,5 na prole feminina de ratas Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenida mg/kg) em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD	90 o GD 90 ato (5 12,5) 91 ng/kg) 91 o GD 92 ato (5 12,5) 92

em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5)93
2.1.7	Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD
	12,5 na prole masculina de ratas com maturidade sexual93
2.1.8	Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD
	12,5 na prole feminina de ratas com maturidade sexual94
3	MATERIAL E MÉTODOS96
3.1	Animais
3.2	Experimentação com os animais96
3.2.1	Acasalamento96
3.2.2	Tratamento farmacológico com ácido valpróico98
3.2.3	Tratamento farmacológico com Metilfenidato98
3.3	Testes comportamentais99
3.3.1	Avaliação da comunicação por meio do teste de vocalização ultrassônica nas
	proles de ratas expostas ao VPA no GD 12,5100
3.3.2	Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no
	labirinto em T na prole de ratas expostas ao VPA pré-natal no GD 12,5 e a
	administração pós-natal com metilfenidato101
3.3.3	Avaliação da socialização e comportamento de brincar da prole de ratas
	expostas ao VPA no GD 12,5 e a administração pós-natal com metilfenidato
3.3.4	Avaliação da atividade geral em campo aberto da prole de ratas expostas ao
	VPA pré-natal e administração pós-natal com metilfenidato105
3.3.5	Avaliação do comportamento repetitivo de grooming espontâneo em ratos
	Wistar tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5 durante o PND 60107
3.3.6	Avaliação do comportamento de grooming induzido por sacarose em ratos
	Wistar tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5 durante o PND 61110
3.3.7	Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em
	cruz elevado no PND 62 na prole de ratas Wistar tratadas pré-natalmente
	com VPA no GD 12,5111
3.3.8	Avaliação do comportamento na caixa claro-escuro (CCE) no PND 62 na
	prole de ratas Wistar tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5 113

3.4	Estud	Estudo molecular do encéfalo dos ratos						
3.4.1	Eutan	Eutanasia e coleta dos encetalos com as areas de interesse						
3.4.2	Deterr de ra metilfe eficiêr	Determinação dos níveis de DA, 5-HT, NA e <i>turnover</i> no encéfalo da prole de ratas Wistar expostas ao VPA no GD 12,5 e com tratamento de metilfenidato de forma aguda ou prolongada via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)						
3.4.3	Avaliação da expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado córtex via RT-PCR em ratos expostos ao VPA no GD 12,5 e ao tratamen com metilfenidato1							
	3.4.3.1	Coleta do material118						
	3.4.3.2	Extração do RNA total pelo método TRIZOL119						
	3.4.3.3	Quantificação do RNA total119						
	3.4.3.4	PCR em tempo real (PCR-RT)120						
	3.4.3.5	Quantificação relativa do PCR-RT pelo método 2-ΔΔCt120						
3.4.4	Modulação de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral e da substância negra após exposição pré-natal com VPA no GD 12,5 por meio da imunofluorescência							
	3.4.4.1	Perfusão Transcardíaca122						
	3.4.4.2	Microtomia e processamento histológico123						
	3.4.4.3	Imunofluorescência indireta124						
	3.4.4.4	Quantificação da imunofluorescência125						
3.5 3.5.1	Delineamento Experimental							
	3.5.1.1 metilfeni VPA pré	Experimento 1 - Avaliação dos efeitos do desafio farmacológico com dato (5 mg/kg no PND 32) na prole masculina de ratas expostas ao -natal						

3.5.2.1 Experimento 1 - Avaliação dos efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg no PND 32) na prole feminina de ratas expostas ao VPA pré-natal 129

4.1.1.1 Avaliação da comunicação no PND 11 por meio da vocalização ultrassônica na prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5.....135

4.1.2 Experimento 2 - Avaliação comportamental e neuroquímica dos efeitos do tratamento farmacológico prolongado (5 mg/kg PND 21 ao PND 32) com metilfenidato na prole masculina de ratas expostas ao VPA pré-natal.....157

4.2.1.1 Avaliação da comunicação no PND 11 por meio da vocalização ultrassônica na prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 176

4.2.2 Experimento 2 - Avaliação comportamental e neuroquímica dos efeitos do tratamento farmacológico prolongado (5 mg/kg PND 21 ao PND 32) com metilfenidato na prole feminina de ratas expostas ao VPA pré-natal 195

4.3 PARTE III – Efeitos da exposição ao VPA no GD 12,5 na prole masculina e feminina de ratas em diferentes fases do desenvolvimento comportamental e no SNC

- 4.3.1 Experimento 1: avaliação da modulação de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral e substância *nigra* por meio da imunofluorescência após exposição pré-natal com VPA no GD 12,5......212

4.3.2.1 Avaliação do padrão de grooming espontâneo no PND 60 em machos Wistar tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5......217

4.3.2.2 Avaliação do padrão de grooming induzido pela sacarose 10% no PND 61 em machos Wistar tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5 219

4.3.3.1 Avaliação do padrão de grooming espontâneo no PND 60 em ratas Wistar tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5......241

4.3.3.2 Avaliação do padrão de grooming induzido pela sacarose 10% no PND 61 na prole de ratas tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5...243

4.3.3.5 Avaliação do grooming espontâneo e induzido por sacarose 10% entre os grupos estudados de ratas Wistar SALINA e VPA.......249

	4.3.3.6 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no estriado via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal
	4.3.3.7 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no córtex via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal
	4.3.3.8 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no hipocampo via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal
	4.3.3.9 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no hipotálamo via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal
	4.3.3.9 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no PAG via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal
5	DISCUSSÃO266
5.1	Alterações comportamentais e dopaminérgicas do modelo de autismo induzido pelo VPA pré-natal
5.2	Diferenças sexualmente dimórficas comportamentais e moleculares de
5.3	ratas em um modelo de autismo induzido por VPA pré-natal
	metilfenidato
5.4	Alterações comportamentais e neuroquímicas do VPA pré-natal (400 mg/kg no GD 12,5) em ratos machos e fêmeas durante a maturidade
	sexual
6	CONCLUSÕES
6.1	Alterações comportamentais e neuroquímicas do VPA pré-natal (400 mg/kg no GD 12,5) em ratos machos e fêmeas durante a maturidade
	sexual

6.2	Os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5	
	mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD	
	12,5) foram:	303
6.3	Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5	
	mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD	
	12,5) foram:	303
6.4	Os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD	
	12,5 na prole feminina de ratas foram:	304
6.5	Os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5	
	mg/kg) em ratas tratadas pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD	
	12,5) foram:	304
6.6	Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5	
	mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD	
	12,5) foram:	305
6.7	Os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD	
	12,5 em ratos com maturidade sexual foram:	305
6.8	Os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD	
	12,5 em ratas com maturidade sexual foram:	306
6.9	Considerações finais	307
REFER	ÊNCIAS	310

Revisão BIBLIOGRÁFICA

1 INTRODUÇÃO E ENUNCIADO DO PROBLEMA

O autismo é um transtorno do desenvolvimento descrito a primeira vez por Leo Kanner em 1943 (KANNER, 1943). Trata-se de uma síndrome caracterizada por vários prejuízos comportamentais, incluindo especialmente déficits na interação social, comunicação e padrões estereotipados de comportamento (KLIN, 2006; ERGAZ; WEINSTEIN-FUDIM; ORNOY, 2016; DONOVAN; BASSON, 2017; TAKUMI *et al.*, 2020; FETIT *et al.*, 2021).

Dados atuais confirmam que aproximadamente 1 em cada 100 pessoas são afetadas pelo transtorno do espectro autista (TEA) (SCHAAFSMA; PFAFF, 2014; THORNTON *et al.*, 2021). Esse transtorno ocupa o terceiro lugar entre os distúrbios do desenvolvimento, a frente das malformações congênitas e da síndrome de Down (MOHAMMADI *et al.*, 2020). O TEA é cerca de 4 à 5 vezes mais comum em indivíduos do sexo masculino do que no sexo feminino (BEDFORD *et al.*, 2016). Assim, o gênero masculino indica um fator de risco poderoso e bem estabelecido para o autismo (FRAZIER *et al.*, 2014).

Embora numerosos estudos associem o autismo a fatores genéticos, a escassez de achados replicáveis sugere que alterações genéticas não explicam totalmente o autismo. A exposição a toxinas ambientais pode interferir no desenvolvimento encefálico em diferentes fases da embriogênese e ocasionar distúrbios neuropsiquiátricos (ABRAHAMS; GESCHWIND, 2008; LYALL; SCHMIDT; HERTZ-PICCIOTTO, 2014b). 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 que incluem obesidade materna (FRYE; ROSSIGNOL, 2016), agentes teratogênicos como talidomida (RODIER *et al.*, 1996) e especialmente o ácido valpróico (VPA), o qual, além de prejudicar o cérebro fetal durante o período gestacional, está ligado a defeitos no neurodesenvolvimento (MOORE *et al.*, 2000a).

O VPA, também conhecido como valproato de sódio, é amplamente utilizado como anticonvulsivante (ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005; MEUNIER *et al.*, 1963; RIMMER; RICHENS, 1985). O mecanismo de ação do VPA não é totalmente conhecido (ORNOY, 2009a). 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). 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). O tratamento pré-natal com VPA representa maior risco para desenvolvimento de distúrbios no neurodesenvolvimento, afetando principalmente funções cognitiva e comportamental, o que pode resultar em alterações semelhantes àquelas encontradas no autismo (ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005; ORNOY, 2009b; 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 (SCHNEIDER; TURCZAK; PRZEWŁOCKI, 2006a).

Levando em conta o potencial efeito do VPA pré-natal em gerar sintomas tipoautismo em ratos e a falta de estudos que revelem a etiologia do autismo e possíveis tratamentos, durante projetos anteriores, estudamos os efeitos do VPA pré-natal em ratos. Ainda nesse trabalho, avaliamos os efeitos do tratamento com zinco 1h após a exposição pré-natal com VPA no GD 12,5. O efeito tóxico do VPA relacionado ao do 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 teciduais (TAUBENECK *et al.*, 1995; BUI *et al.*, 1998). Assim, é possível que a suplementação com zinco em gestantes reduza o risco da deficiência transitória desse nutriente induzida pelo VPA.

Com os achados, foi demonstrado que a exposição ao VPA pré-natal induziu um fenótipo autista em proles masculinas, por (1) prejudicar a comunicação, reduzindo a quantidade de chamados ultrassônicos; (2) induzir comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva; (3) prejudicar a socialização e (4) diminuir os níveis de tirosina hidroxilase (TH) do estriado. A administração do zinco (2mg/kg) como póstratamento 1 hora após 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. Assim, 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. Enquanto, nas proles femininas, o tratamento pré-natal com VPA não foi capaz de gerar um fenótipo comportamental do tipo autista, tampouco de alterar os níveis de TH. Assim, não houve evidência sugestiva de alteração da função dopaminérgica nas fêmeas. Uma vez que o sistema dopaminérgico é um marcador em potencial para o tratamento de sintomas associados com o autismo (HARA *et al.*, 2016), este projeto visa aprofundar o estudo dos efeitos do VPA pré-natal no modelo de autismo em relação aos prejuízos no sistema dopaminérgico. Por meio desse trabalho, pretendese investigar a atividade dopaminérgica além dos aspectos comportamentais desse modelo de autismo em ratos previamente expostos ao VPA.

1.1 Autismo: origem, epidemiologia e fisiopatologia

Leo Kanner (1943) descreveu pela primeira vez a síndrome comportamental do contato afetivo como autismo (KANNER, 1943). Devido à um espectro mais amplo de manifestações de sinais e sintomas, o Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais (*Diagnostical and Statistical Manual For Mental Disorder*) tornou o advento do termo "Transtorno do Espectro Autista" (DSM-V, 2013).

O TEA é uma condição complexa do neurodesenvolvimento (DSM-5), sendo relacionado a rupturas do cérebro em desenvolvimento, afetando a percepção do indivíduo ao mundo e a socialização (MAILLOUX *et al.*, 2011; THYE *et al.*, 2018). O TEA é caracterizado em humanos por traços comportamentais fenotípicos altamente heterogêneos (TAKUMI *et al.*, 2020a), incluindo especialmente déficits em processos clássicos fundamentais na interação social, comunicação (verbal e não verbal) e padrões limitados ou estereotipados de comportamentos e interesses (**Figura 1**), com vários graus de gravidade (KOGAN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2015; LORD; BISHOP, 2015). Os critérios diagnósticos devem estar presentes na primeira infância (36 meses) e interferir na função cotidiana do indivíduo de formas mais sutis ou mais severas (TAHERI; PERRY, 2012; LEE; THOMAS; LEE, 2015a;). Para validar o diagnóstico do TEA, no mínimo seis características comportamentais precisam ser identificadas (FRAZIER *et al.*, 2012), englobando duas alterações na interação social, uma na comunicação e uma na flexibilidade cognitiva (FOMBONNE, 2005; KLIN, 2006; KIM *et al.*, 2014a;).



Figura 1 Sinais e sintomas característicos de indivíduos com TEA

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Atualmente de acordo com a *National Autism Association* cerca de 1% da polução mundial (75.000.000 de indivíduos) é acometida pelo TEA (ZABLOTSKY *et al.*, 2015; SHENOUDA *et al.*, 2022;). Desde o início do monitoramento, os dados apontam aumento substancial da população autista (ZABLOTSKY *et al.*, 2015; SHENOUDA *et al.*, 2022;). De acordo com o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*), cerca de 1,4% das crianças (1/44) nos Estados Unidos possuem diagnóstico de TEA (MAENNER *et al.*, 2021). Possivelmente o aumento da prevalência dos casos de TEA, sejam em decorrência de mudanças nos critérios diagnósticos, conscientização entre as comunidades leigo e cientifica, melhorando a prática de identificação, além da precisão diagnóstica melhorada (KODAK; BERGMANN, 2020; MORALES HIDALGO; VOLTAS MORESO; CANALS SANS, 2021).

As diferenças na incidência e expressão do fenótipo TEA é cerca de 4-5 vezes mais comum em indivíduos do sexo masculino (1 em 27) do que no sexo feminino (1 em 116), embora essa proporção em casos graves de autismo sejam aumentadas em 11 homens para 1 mulher (HALLADAY *et al.*, 2012; FRAZIER *et al.*, 2014; PINARES-GARCIA *et al.*, 2018; WILLIAMS; COPPOLINO; PERREAULT, 2021a).

Recentemente, foi sugerido que a razão de homens e mulheres com TEA é menor do que anteriormente proposto, sendo descrito que cerca 3-1 mais comum no sexo masculino (LOOMES; HULL; MANDY, 2017). A variação de gênero indica um fator de risco poderoso e bem estabelecido, sendo o autismo expresso de maneira muito mais robusta em homens (FRAZIER *et al.*, 2014; ALAERTS; SWINNEN; WENDEROTH, 2016).

O dimorfismo sexual na expressão do TEA, interferem na gravidade dos sintomas e comprometimento na memória, flexibilidade cognitiva, fluência verbal e comunicação social (VAN DEN EEDEN *et al.*, 2003; OBER; LOISEL; GILAD, 2008; WILLIAMS; COPPOLINO; PERREAULT, 2021a). Os indivíduos do sexo masculino com TEA expressam maior prejuízo em habilidades de comunicação/interação social, agressividade, hiperatividade e estereotipias, já no sexo feminino, o controle verbal é reduzido, habilidades motoras finas são aumentadas, dificuldade em internalizar e expressar emoções, mas são mais sociáveis (WERLING; GESCHWIND, 2013a). Comparados com as mulheres, os homens com TEA apresentam mais agressividade, hiperatividade, redução do comportamento pró-social e aumento dos comportamentos repetitivos/restritos (VAN DEN EEDEN *et al.*, 2003;OBER; LOISEL; GILAD, 2008; WERLING; GESCHWIND, 2013b; WILLIAMS; COPPOLINO; PERREAULT, 2021a).

Até o presente momento poucos estudos exploraram as diferenças de gênero no TEA. Em parte, mecanismos moleculares e celulares no sexo masculino contribuem para a progressão do TEA, contudo, no sexo feminino mudanças neurológicas mais drásticas de sinalização neuronal são necessárias para a expressão do fenótipo autista (HEBERT *et al.*, 2013; LI; SHI; KIROUAC, 2014). Todavia, evidências sugerem fatores etiológicos protetores limitantes ao gênero do indivíduo, concluindo requerimento de um maior comprometimento genético para expressão do fenótipo TEA em mulheres (FRAZIER *et al.*, 2014).

Embora a causa do autismo permaneça desconhecida, numerosos estudos apontam uma combinação de fatores genéticos, que incluem interações entre múltiplos genes e diferentes *loci* (DEVLIN; SCHERER, 2012; ABRAHAMS *et al.*, 2013; DE LA TORRE-UBIETA *et al.*, 2016;).Em relação as causas ambientais para o TEA, infecções pré-natais e agentes teratogênicos são os mais descritos (KIRSTEN *et al.*, 2012; CEZAR *et al.*, 2018). Estudos com gêmeos estimam heritabilidade para o TEA em torno de 64-91% (TAKUMI *et al.*, 2020a), sendo o índice de concordância para gêmeos monozigóticos entre 60- 90% (BAILEY *et al.*, 1995; IMAMURA *et al.*, 2020),

contra 1-10% em gêmeos dizigóticos (SANDIN *et al.*, 2014; IMAMURA *et al.*, 2020;). As modificações genéticas mais comumente descritas incluem: rearranjos cromossômicos, mutação de um único par de bases e variações no número de cópias (DEVLIN *et al.*, 2012; DE LA TORRE-UBIETA *et al.*, 2016;).

As alterações genéticas trazem consequências que afetam a função sináptica (comunicação e estrutura), regulação transcricional, remodelação da cromatina e imunidade, o que possibilita o fenótipo do TEA (BOURGERON, 2015; KRUMM et al., 2015; SUN et al., 2016). Em decorrência da grande inomogeneidade do TEA, um único gene comum contribuinte tem sido difícil de identificar, sendo associado a apenas 1% de toda a população com autismo (BOURGERON, 2015). Em exemplo, diferentes regiões cromossômicas foram identificadas em humanos portadores do TEA, como 1T, 2T, 5q, 6q, 7q, 13q, 15q, 17q, 22q, Xp e Xq (PERSICO; NAPOLIONI, 2013). Ainda, anormalidades cromossômicas envolvendo duplicações maternas na sequência genética 15q11-q13 foram detectadas em 1% dos casos de autismo (SCHROER et al., 1998; GESCHWIND, 2008a;). Além disso, distúrbios genéticos bem definidos influenciam a etiológica do autismo, dentre elas, síndrome do X frágil, esclerose tuberosa, síndrome de Rett, síndrome de Joubert, síndrome de Rubinstein-Taybie, e a idade paterna avançada, associada a mutações pontuais em células da linhagem germinativa (OLMOS-SERRANO; CORBIN; BURNS, 2011; REITH et al., 2013; SAMACO et al., 2013; ERGAZ; WEINSTEIN-FUDIM; ORNOY, 2016; HOMS et al., 2016; ZHENG et al., 2016).

Avanços genômicos identificaram em cerca de 10% dos casos de TEA variações cromossômicas estruturais submicroscópicas, como CNVs (*Copy Number Variation*), além de anormalidades cromossômicas clássicas (BHANDARI; PALIWAL; KUHAD, 2020; HYMAN, 2021). Estudos demonstram, mutações gênicas ligadas a genes que codificam moléculas de adesão celular, como neuroligina e neurexina (*NLGN3* e *NLGN4*), foram identificadas em alguns casos de TEA (HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2014; TAKUMI *et al.*, 2020b). Em humanos e animais, pesquisas avaliaram diferentes vias biológicas e moleculares que foram implicadas no TEA, por exemplo, a via PI3K-mTOR, o que inclui ainda várias moléculas como PTEN, TSC1/2, FMRP, CYFIP1 (TAKUMI *et al.*, 2020b).

Atualmente biomarcadores para o autismo foram identificados em aproximadamente 59 milhões de SNPs - *Single Nucleotide Polimorphism* (KRUMM *et al.*, 2015). Durante o desenvolvimento cerebral, diferentes genes exercem papel

fundamental na maturação de células neurais (BARKER *et al.*, 1998). Em casos de deleção, o gene *GABRB3* (codificantes de GABA) contribui em comportamentos complexos no fenótipo do TEA (VEENSTRA-VANDERWEELE; COOK, 2004; DELOREY *et al.*, 2008; SCHAAFSMA; PFAFF, 2014). Evidencias demonstram e associam genes sexuais X e Y como contribuintes no desenvolvimento cerebral normal, e possiveis alterações promovem distúrbios psiquiátricos como o TEA (GATA-GARCIA *et al.*, 2021). Em relação aos genes no cromossomo X, *MeCP2* ligados a síndrome de Rett (WALSH; MORROW; RUBENSTEIN, 2008b) e *FMR1* ao transtorno invasivo do desenvolvimento (LEE; THOMAS; LEE, 2015b), foram associados a etiologia do autismo "secundário" decorrente de causas sindrômicas (PERSICO; BOURGERON, 2006). No caso dos homens, o cromossomo Y possui um gene em particular, *SRY* (*Sex-determining Region on the Y chromosome*), indicado em regular a atividade e função bioquímica da dopamina no cérebro, sua desregulação acaba por gerar transtornos como o autismo (BURGOYNE; ARNOLD, 2002; MCPHIE-LALMANSINGH *et al.*, 2008; XU; LOKE; HARLEY; LEE, 2015b).

Tal como o exposto, autores propuseram que 80% da etiologia do TEA ocorre por meio de natureza genética, e fatores ambientais representariam uma pequena parcela dessa proporção (BAI *et al.*, 2019). Entretanto, as limitações e dificuldades atuais de estudos em definir marcadores genéticos individuais para o autismo, tornouse tarefa desafiadora na pesquisa clínica no momento de identificar alelos promissores (TAKUMI *et al.*, 2020b). A hipótese de exposições ambientais passíveis de induzir danos ao código genético, vem tomando força desviando assim o foco dos fatores puramente genéticos na etiologia do TEA.

Os fatores ambientais exercem papel crítico na maturação encefálica pré-natal, e numerosos tipos de estresses maternos durante essa fase do desenvolvimento está ligada ao aumento de casos TEA (LYALL; SCHMIDT; HERTZ-PICCIOTTO, 2014a). Estudos epidemiológicos apontam uma variedade de agentes ambientais ligados a malformações e transtornos psiquiátricos como autismo, incluindo: infecções virais e bacterianas (OHKAWARA *et al.*, 2015; ORNOY; WEINSTEIN-FUDIM; ERGAZ, 2015); poluentes e neurotoxinas (pesticidas e inseticidas) (FURLONG *et al.*, 2014); exposição a metais pesados como mercúrio e chumbo (ORNOY; WEINSTEIN-FUDIM; ERGAZ, 2015), níveis baixos de radiação eletromagnética (THORNTON, 2006); etanol (NANSON, 1992); tabaco (TRAN *et al.*, 2013); poluição do ar (WEISSKOPF; KIOUMOURTZOGLOU; ROBERTS, 2015); fatores na dieta materna (CEZAR *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2016), suplementação nutricional (BÖLTE; GIRDLER; MARSCHIK, 2019); agentes teratogênicos como talidomida (STRÖMLAND; PINAZO-DURÁN, 1994); e ácido valpróico (MOORE *et al.*, 2000b) são capazes de prejudicar o cérebro fetal em desenvolvimento.

A ativação imune materna, mais um fator de risco para o desenvolvimento normal do sistema nervoso central (SNC) e alterações no sistema imunológico da prole, podem acarretar o fenótipo autista (GOLAN *et al.*, 2005; MATELSKI; VAN DE WATER, 2016). Os agentes infecciosos com maior prevalência na etiologia do autismo, incluem: rubéola congênita (CHESS; FERNANDEZ; KORN, 1978); vírus da influenza (ATLADÓTTIR *et al.*, 2010); e endotoxina bacteriana lipopolissacarídeo (LPS) (KIRSTEN *et al.*, 2012; LEE; THOMAS; LEE, 2015a). Conforme descrito por Costa et al. (2014) poluentes no ar, especialmente metais (matéria particulada fina com diâmetro inferior a 2,5 µm), além da poluição do ar em rodovias, ozônio, óxidos de nitrogênio e combustão de diesel, foram associadas ao TEA (COSTA *et al.*, 2014).

Algumas drogas utilizadas por gestantes com propriedades teratogênicas aparecem como causadoras de malformações congênitas, e potenciais para induzir autismo durante o período pré-natal (NEWSCHAFFER et al., 2016). A exemplo, a talidomida muito utilizada no tratamento da ansiedade, medicamento que no final dos anos 50 instituiu uma nova regulamentação de fármacos, foi a primeira droga a ser descrita como teratogênica (LENZ; KNAPP, 1962). Características de autismo foram observadas em indivíduos expostos a talidomida durante o período fetal, tornando o estudo clínico de drogas com potencial teratogênico um divisor de águas (LENZ; KNAPP, 1962). Em decorrência desses fato, outras medicações em potencial foram associadas a etiologia do autismo, o misoprostol, utilizado na prevenção de úlcera gástrica, responsável por ocasionar contração uterina e consequentes abortos (BANDIM et al., 2003). Os efeitos teratogênicos do misoprostol incluem: anomalias congênitas, hipoplasia de nervos cranianos por vezes associado à síndrome de Mobius (DUFOUR-RAINFRAY et al., 2011a). Pacientes portadores da síndrome de Mobius têm maior incidência em apresentar distúrbios do neurodesenvolvimento, especialmente o TEA (NEWSCHAFFER et al., 2007).

Roullet et al. (2013) e Chomiak et al. (2013) observaram em numerosos casos clínicos, o impacto de drogas antiepilépticas no neurodesenvolvimento fetal, quando administrado durante o período fetal (CHOMIAK; HU, 2013; ROULLET; LAI; FOSTER, 2013a). O ácido valpróico (VPA) é um anticonvulsivante amplamente utilizado, e a

droga comumente associada com o TEA, seu uso durante o período gestacional acarreta até 9% de prevalência para o desenvolvimento de autismo (RASALAM *et al.*, 2005).

1.2 Cérebro autista: características comportamentais e neurobiológicas

O TEA é considerado um transtorno do neurodesenvolvimento, justamente em decorrência das diferenças precoces observadas no cérebro em desenvolvimento (TAKUMI *et al.*, 2020b). Diagnosticado ainda na primeira infância, o TEA na grande maioria das vezes, é associado a deficiência intelectual QI < 70 (40% dos casos), atraso de fala e linguagem (25% dos casos), comprometimento cognitivo de planejamento e organização (LORD *et al.*, 2018; TAKUMI *et al.*, 2020b). Consideravelmente, o TEA é acompanhado de comorbidades psiquiátricas, que incluem: transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) em cerca de 28% dos casos (SIMONOFF *et al.*, 2008); irritabilidade e agressividade em 25% dos autistas (Hill et al., 2014); transtorno de ansiedade generalizada e fobias (UNG *et al.*, 2014); depressão (GOTHAM; BRUNWASSER; LORD, 2015); e transtorno obsessivo-compulsivo (POSTORINO *et al.*, 2017).

Uma gama de alterações morfológicas e funcionais foram encontradas no cérebro de crianças e ou adultos portadores do TEA (ERGAZ; WEINSTEIN-FUDIM; ORNOY, 2016). Consistentemente, pacientes diagnosticados com TEA grave ainda com idade precoce, apenas 10% são capazes de viver de forma independente, 12% necessitam de cuidados hospitalares, 46% requerem cuidados residenciais e 19% independência supervisionada limitada (NEWSCHAFFER *et al.*, 2007). Durante a vida adulta, a grande maioria dos indivíduos dentro do espectro autista, não possuem alta qualidade de vida, e apenas uma pequena porcentagem é capaz de trabalhar ou manter amizades (NEWSCHAFFER *et al.*, 2007).

A vida fetal é um momento crítico para o desenvolvimento e crescimento de arranjos neuronais, e entre o nascimento até os 24 meses de vida, uma ampla expansão de arborizações dendríticas serão formadas (RICE; BARONE, 2000a). Interferências nesses processos prejudicam o futuro SNC, além de induzir doenças congênitas no cérebro, em particular, no contexto da etiologia do autismo,

anormalidades anatômicas e funcionais de arborização dendrítica exercem papéis cruciais (COPF, 2016). Atualmente está sendo discutido que regiões cerebrais como lobos frontal e temporal são aumentados em indivíduos com TEA, que passam por um volume acelerado de crescimento durante a primeira infância (COURCHESNE; PIERCE, 2005). Estruturas presentes no lobo frontal, estão envolvidas no planejamento, projeção de consequências futuras, consciência e supressão de respostas socialmente inaceitáveis, enquanto o lobo temporal, participa da memória, compreensão da linguagem e processamento emocional (MURUGAN *et al.*, 2017). O prejuízo dessas regiões cerebrais, estão envolvidas em comportamentos do TEA, incluindo comunicação e déficits de interação social (LANGE *et al.*, 2015).

Apesar do rápido aumento cerebral na infância em indivíduos com TEA, durante a adolescência ocorre estabilização e fases de interrupção do crescimento, enquanto o cérebro normal continua a crescer no período púbere (HAZLETT *et al.*, 2011). Somente na fase adulta, o cérebro no TEA apresenta volume total diminuído em comparação com cérebros saudáveis (CARPER *et al.*, 2002). Além disso, a expansão da substância cinzenta e a maturação da substância branca cortical estão prejudicadas no autismo (CASANOVA; HERBERT; ZIEGLER, 2004; HARDAN *et al.*, 2004).

Neurotransmissores e neuropeptídeos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento normal do cérebro e influenciam a migração de células neuronais, diferenciação, sinaptogênese, apoptose e poda sináptica (MAROTTA *et al.*, 2020). Disfunções em sistemas de neurotransmissão levam a prejuízos no desenvolvimento cerebral normal, o que pode determinar transtornos como o TEA (ARYA *et al.*, 2016). A seguir alguns dos componentes que podem interferir e promover um cérebro autista:

a) GABA

O ácido gama aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor excitatório, possui relação complexa homeostática, na qual equilibra a excitabilidade neuronal (OWENS; KRIEGSTEIN, 2002). Durante o desenvolvimento cerebral, GABA afeta diretamente e indiretamente a proliferação e migração neuronal, maturação sináptica, diferenciação e morte celular (YIZHAR *et al.*, 2011). O desbalanço excitatório/inibitório

de sistemas gabaminérgicos e glutaminérgicos causam desequilíbrio, mecanismo potencial em gerar transtornos psiquiátricos, incluindo o TEA (MAROTTA *et al.*, 2020). Em particular, níveis GABAérgicos estão elevados em indivíduos com TEA em relação ao controle (AL-OTAISH *et al.*, 2018). Diferentes abordagens farmacológicas no autismo com moduladores GABAérgicos atingem vias inibitórias (GABA) e excitatórias (glutamato), dentre as substâncias mais estudadas estão arbaclofen (STX209), acamprosato, bumetanida e ácido valpróico (MAROTTA *et al.*, 2020).

b) Glutamato

Sendo o maior neurotransmissor excitatório do sistema nervoso, o glutamato possui altas concentrações no córtex em mamíferos, além de três subunidades de receptores, que incluem: N-metil-D-aspartato (NMDARs), ácido α-amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolepropiônico (AMPARs) e receptores metabotrópicos (PETROFF, 2002). Evidências apoiam que subunidades de receptores NMDARs e AMPARs estão associadas ao TEA (MAROTTA et al., 2020). Contudo, modificações em receptores AMPAR (GluA2) alteram a excitabilidade neuronal, e essa desregulação foi vista em distúrbios como o autismo (LI et al., 2016). Em modelos utilizando roedores, NMDA e NMDAR também foram correlacionados ao autismo (YOO et al., 2012), além de hiperatividade e hiperplasticidade do receptor NMDA no cerebelo (SODA et al., 2019). O desenvolvimento de características do autismo e desregulação glutamatérgica, foram ligadas a mutações em genes (SHANK, NLGN3, NLGN4 e UBE3A) responsáveis por proteínas na formação e manutenção de sinapses (TROBIANI et al., 2018). A supressão farmacológica da função NMDAR determinou melhoras em sintomas do tipo-autista, a cicloserina (agonista de NMDAR) reduziu o retraimento social e o comportamento repetitivo (URBANO et al., 2014). Da mesma forma, o tratamento com cloridrato de memantina (antagonista de NMDAR) aliviou sinais do TEA, que incluem estereotipias, letargia, irritabilidade, hiperatividade e desatenção (HOSENBOCUS; CHAHAL, 2013).

c) Acetilcolina

Atuante no sistema nervoso parassimpático como neurotransmissor e neuromodulador no SNC, a acetilcolina exerce papel fundamental na atividade de

neurônios motores na junção neuromuscular (THESLEFF; QUASTEL, 1965). Estudos *post-mortem* em amostras cerebrais de humanos, evidenciaram prejuízos do sistema colinérgico no TEA, com detecção de receptores nicotínico $\alpha4\beta2$ ACh (nAChRs) reduzidos no córtex parietal e frontal (PERRY *et al.*, 2001). Em subunidades $\alpha4$ nAChRs cerebelares, sua redução está ligada à perda de células de Purkinje e a um aumento compensatório de $\alpha7$ nAChRs (LEE *et al.*, 2002). O receptor nicotínico $\alpha7$ foi descrito como potencial em transtornos como o autismo, pois está envolvido no processamento sensorial, cognição, memória de trabalho, atenção, além de ser altamente expresso como hipocampo e córtex frontal (YANG *et al.*, 2017). Portanto, subtipos alfa7 e $\alpha4\beta2$ de nAChRs foram apontados como possíveis alvos terapêuticos no TEA, em exemplo, o bromidrato de galantamina (inibidor seletivo, competitivo e reversível da acetilcolinesterase) e GTS 21 (agonista parcial seletivo para $\alpha7$ -nAChRs) ambos com melhorias neurocognitivas (HARDAN; HANDEN, 2002; OLINCY *et al.*, 2006).

d) N-acetil-aspartato (NAA)

Presente no corpo neuronal e axônios, é um metabólito com altas concentrações no SNC, apesar disso, suas principais funções permanecem incertas (PASLAKIS et al., 2014). Muitas vezes utilizado como marcador biológico, o NAA está presente em neurônios, mielina e oligodendrócitos, além de ser comumente sintetizado nas mitocôndrias derivadas do ácido aspártico (BENARROCH, 2008). As concentrações reduzidas de NAA foram correlacionadas a disfunção mitocondrial encontrada em diversos distúrbios psiquiátricos, incluindo o TEA (ANGLIN et al., 2012). Durante um estudo utilizando ressonância magnética funcional em pacientes autistas, uma redução de NAA foi observada em diferentes regiões do cérebro, e mais especificadamente no córtex frontal esquerdo quando comparado ao controle (KLEINHANS et al., 2007). Do mesmo modo, o NAA e o glutamato demonstraram envolvimento no volume estriatal e maior assimetria em pacientes pediátricos com TEA (NAAIJEN et al., 2018). Entretanto, o estado metabólico do NAA pode ser facilmente modulado e ou revertido com tratamento farmacológico capaz de restaurar a normalidade do sistema (PASLAKIS et al., 2014). Níveis reduzidos de NAA no TEA pode traduzir a integridade e funcionamento neuronal, contudo estudos são necessários para elucidar essa hipótese (MAROTTA et al., 2020).

e) Ocitocina e arginina-vasopressina

A ocitocina principal neuropeptídeo do sistema nervoso, possui ação em diferentes processos fisiológicos, que incluem o estímulo da contração uterina durante o parto e ejeção de leite na lactação (CHEN et al., 1988). Contudo, outra molécula parece ganhar a atenção por também ser associada ao autismo, a argininavasopressina pertencente a mesma família da ocitocina e suas estruturas são semelhantes (RIPHAGEN; PITTMAN, 1986). Em decorrência disso, a ocitocina e arginina-vasopressina influenciam as funções uma da outra, além de agirem nas mesmas estruturas neurais e modularem comportamentos (EBSTEIN et al., 2012). Recentemente a ocitocina foi descrita por desempenhar importante papel no reconhecimento e vínculo social, e níveis alterados desse neuropeptídeo podem ser vistos em distúrbios como o TEA (KENDRICK; GUASTELLA; BECKER, 2017). A disfunção desse sistema modifica a plasticidade sináptica, e pode modular comportamentos sociais, nos quais incluem: contato visual, reconhecimento social, agressividade, comportamentos sexuais, a modelagem do "eu" emocional e social (INSEL, 2010). Atualmente resultados promissores terapêuticos da administração intranasal de ocitocina no autismo, têm oferecido otimismo na pesquisa clínica, por oferecer direcionamento do sistema de ocitocina na abordagem bem-sucedida para a disfunção social (YAMASUE et al., 2020).

f) Melatonina

A melatonina (metoxiindol) é importante regulador do ritmo sono-vigília, sintetizado e secretado pela glândula pineal à noite sob condições normais de luz/escuridão, sua liberação diária organiza o ritmo circadiano (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Considerado o "hormônio do sono", a melatonina reduz a latência do sono, atua como antioxidante, exerce papel no neurodesenvolvimento, na homeostase placentária, na imunidade e regula níveis de glicose do sangue (GALANO; TAN; REITER, 2011). Algumas pesquisas mapearam o distúrbio do sono em crianças com TEA, e foi observado que esses indivíduos têm dificuldade em adormecer, permanecer dormindo e parassonias (MIANO *et al.*, 2007). O sistema regulador e liberação da melatonina é complexo e abrange vias centrais e autonômicas, podendo ocorrer situações fisiopatológicas que perturbem esse enredo

e causem alterações e predisposição a transtornos psiquiátricos (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Estudos clínicos com indivíduos autistas, relatam níveis plasmáticos de melatonina e metabólitos diminuídos, além de taxas menores de sulfato de melatonina urinária em relação ao controle (TORDJMAN *et al.*, 2013). A função da melatonina durante o período gestacional foi associada ao autismo, uma vez que níveis de 6-sulfatoximelatonina eram mais baixos em mães de crianças com TEA do que o controle (BRAAM *et al.*, 2018). No período gestacional, a melatonina é capaz de atravessar a barreira placentária, fornecendo informações fotoperiódicas e ritmicidade sazonal das funções fisiológicas ao feto, o que estabelece um ciclo de sono normal (MAROTTA *et al.*, 2020). Esta informação, deixa claro o papel essencial da melatonina materna no neurodesenvolvimento, antes mesmo da glândula pineal fetal ser maturada, alterações nesse contexto propiciam distúrbios como o TEA (JIN *et al.*, 2018).

g) Vitamina D

A vitamina D é um hormônio esteroide sintetizado primariamente na pele sob exposição de luz UV-B e uma pequena parcela é derivada da dieta, sua função inclui: regulação neuronal de cálcio, neurotransmissores e fatores neurotróficos; atividade antioxidante; e imunomodulação (SARAFF; SHAW, 2016; SIRACUSANO et al., 2020). Algumas evidências biológicas indicam a ligação potencial entre vitamina D e autismo, justamente devido a enzimas metabolizadoras e receptores da vitamina D serem amplamente expressos em células do sistema imune, placenta e no cérebro (WANG; DING; WANG, 2021). Em especial, altos níveis de receptores de superfície de vitamina D (PDIA3) são observados no córtex e hipocampo, indicando seu papel na função e desenvolvimento cerebral (BIVONA et al., 2019). No cérebro, a vitamina D exerce efeitos importantes, como: diferenciação neuronal, proliferação e apoptose celular, plasticidade sináptica e ontogenia do sistema dopaminérgico (BIVONA et al., 2019; CANNELL; GRANT, 2013). Além disso, na neurotransmissão a vitamina D regula o glutamato, GABA, serotonina e dopamina, relevantes para a fisiopatologia do autismo (ALI; CUI; EYLES, 2018). Evidências indicam níveis mais baixos de vitamina D em pacientes com TEA, além disso, a deficiência de 25-hidroxivitamina D durante o período gestacional ou no nascimento são fatores em potencial para o fenótipo autista em crianças (VINKHUYZEN et al., 2018).

h) Zinco

O zinco é um mineral essencial que desempenha diferentes funções dentro do organismo humano. Interage em diversas vias no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios, na síntese e degradação de ácidos graxos, além de promover a atividade de mais de 300 enzimas (BRÄTTER et al., 1998). Proveniente da dieta, o zinco é um nutriente necessário a processos fisiológicos de diferenciação celular, reparação tecidual, antioxidante, resposta imune e desenvolvimento fetal (HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2014). O zinco possui reservas no corpo humano chegando a 2g, dentro do tecido muscular e ósseo, porém seu nível cerebral é admiravelmente elevado (HAGMEYER; HADERSPECK; GRABRUCKER, 2014). No cérebro, influencia a plasticidade sináptica e modula a resposta de neurotransmissores (LU et al., 2000; XIE; SMART, 1994). A deficiência de zinco prénatal 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). Além disso, a deficiência de zinco é um fator de risco para o desenvolvimento do fenótipo autista (ALSUFIANI et al., 2022). Ainda em âmbito experimental, estudos indicam que a suplementação com zinco durante o período prénatal melhora sintomas relacionados com o TEA (CEZAR et al., 2018).

1.3 Desenvolvimento cerebral e a interferência de fatores ambientais no TEA

É justamente no período da gestação que o corpo materno sofre mudanças adaptativas drásticas para um ambiente favorável ao desenvolvimento fetal, com alterações fisiológicas que propiciam alterações hormonais, metabólicas, bioquímicas e anatômicas (CARRARA; DUARTE, 1996). Esses ajustes biológicos funcionais preconizam o intercambio mãe-feto, controlada minunciosamente pela placenta, órgão que regula seletivamente a permeabilidade de nutrientes, gases e anticorpos, enquanto confere proteção fisiológica ao embrião, além de atuar como fígado, rins, pulmão, adrenal e intestino (BRENT, 2004a).

Possíveis desafios gestacionais podem levar a prejuízos na vida adulta, decorrentes de disfunção placentária que acaba por modular: a disponibilidade de nutrientes e fatores endócrinos envolvidos na imunidade fetal; hipoxia e restrição do ganho de peso; e programação do desenvolvimento cerebral (HSIAO *et al.*, 2012). Interferências ambientais no período pré-natal são potencializadas pelas mudanças fisiológicas na gestação (**Figura 2**), capazes de alterar a bioconversão de compostos químicos e influenciar os efeitos teratogênicos de medicações. Basicamente isso acontece em decorrência da redução da motilidade gastrointestinal materna, albumina plasmática diminuída, expansão do volume plasmático, e modificações da taxa de filtração glomerular e excreção renal (BRENT; BECKMAN, 1991; BRENT *et al.*, 1999; BRENT, 2004a).

Trimestre	Primeiro			Segundo			Terceiro		
Mês	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	3	C	Q	Q		Z	Q	Q	Q
	Dia gestacional (GD) Período pós-nat						ríodo pós-natal	(PND)	
Dias	GD 2	GD 5	GD a	GD	12 - 16	GD 21	PND o	PND 13	PND 22
	¥	9	8	8	8	8	4	-	2
Fases do desenvlvimento cerebral									
Neurogênese						<u>•</u>			
Maturação neuronal							*		
Fechamento do tubo neural			3			-			
Fatores de risco									
Poluição do ar									,
Pesticídas									
Talidomida		-				6			
Valproato (VPA)									
Carência de vitaminas									
Carência de ácido fólico									
Infecção (viral e bacteriana	-		1						

Figura 2 Desenvolvimento embrionário em humanos e roedores com períodos críticos que demonstra a associação de fatores ambientais e o TEA

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Quando o medicamento ultrapassa sua curva dose-resposta segura, efeitos teratogênicos são promovidos, causando anomalias morfológicas e neurológicas no feto, ou até mesmo prejuízos na implantação e concepção do óvulo gerando abortos (BRENT, 2004b). A maturação do SNC é um processo complexo altamente susceptível a interferências teratogênicas, sendo mais sensível em fases como a formação e fechamento do tubo neural, diferenciação e migração celular, formação de estruturas neuronais, sinaptogênese e mielinização (LYALL; SCHMIDT; HERTZ-PICCIOTTO, 2014b). Durante esse período crítico do desenvolvimento fetal, o cérebro sofre com agentes externos e a disfunção placentária influência a incidência de distúrbios do neurodesenvolvimento, como esquizofrenia, paralisia cerebral e autismo (HSIAO *et al.*, 2012). Considerado o mais teratogênico de todos os antiepilépticos atualmente disponíveis, o VPA possui propriedades teratogênicas que promovem anormalidades fetais morfológicas e comportamentais, com risco em torno de 6,3% em relação a outros medicamentos (ORNOY, 2006).

A utilização de fatores externos ambientais durante o período pré-natal em modelos animais de autismo, refletem nos aspectos neurobiológicos, comportamentais, moleculares e genéticos (KIM *et al.*, 2011; TAKUMI *et al.*, 2020a). Entretanto, modelos animais não simulam integralmente o TEA, além de possuir limitações resultante da falta de biomarcadores bem definidos (TAKUMI *et al.*, 2020b). Os modelos de autismo mais reproduzidos atualmente na literatura propoem lesões cerebrais, animais geneticamente modificados, ativação imune materna e exposição a agentes com efeitos teratogenicos.

Em relação aos modelos de lesões cerebrais para indução de fenótipo autista, a maioria dos estudos são baseados em uma única lesão pós-natal no cerebelo (Schmahmann, 2019). Contudo, diferentes regiões cerebrais estão envolvidas no TEA, tornando o modelo de lesão limitado e consequentemente pouco usado (KIM *et al.*, 2014b). Já os modelos alterados geneticamente para o autismo, mesmo após décadas de pesquisa, têm sido difícil identificar marcadores genéticos comuns a mais de 1% na população com TEA, o que limita bastante o modelo (SAXENA *et al.*, 2020).

Durante o período gestacional, a ativação imune da mãe é um fator de risco para o feto, por conduzir a promoção do sistema imunológico, resultando em fenótipos autistas (PATTERSON, 2011). KIRSTEN (2010) e colaboradores submeteram ratos a exposição ao LPS (100 µg/kg, i.p. no GD 9,5) e reproduziram um modelo experimental de autismo por infecção bacteriana, gerando sintomas do TEA (KIRSTEN *et al.*, 2010).

Sobre as interferências medicamentosas, o VPA é mais amplamente estudado por induzir características semelhantes de autismo em roedores, além de ser um modelo que oferece validade de face por promover aproximação com o quadro clínico do TEA (MABUNGA et al., 2015).

1.4 Ácido Valpróico

O valproato (ácido 2-propil-pentanóico, ácido valpróico, valproato de sódio e VPA), é um medicamento amplamente prescrito e eficaz contra crises de ausência generalizada desde 1974 (MEUNIER *et al.*, 1963; RIMMER; RICHENS, 1985; ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005;). Sendo o antiepiléptico comumente utilizado, o VPA é ainda indicado no tratamento de crises epilépticas (BEYDOUN; SACKELLARES; SHU, 1997), transtorno bipolar (estabilizador de humor) (KMETZ; MCELROY; COLLINS, 1997) e migrânea (enxaqueca) (FREITAG *et al.*, 2002).

O efeito antiepiléptico do VPA é atribuído a uma combinação de várias ações no SNC, até o momento pouco claras (ORNOY, 2009a). O mecanismo de ação da droga ocorre primariamente sobre o sistema GABAérgico, na produção de aspartato, em efeitos enzimáticos e no bloqueio dos canais de sódio voltagem dependentes (JOHANNESSEN, 2000; DUFOUR-RAINFRAY *et al.*, 2010). A neurotransmissão de GABA é concentrada na inibição do cérebro, e o valproato estimula a ação gabaérgica estimulando a abertura de canais de *CI*⁻ e hiperpolarização neuronal, reduzindo as crises epilépticas (TYZIO *et al.*, 2006). De forma seletiva, o VPA altera os níveis regionais de GABA no córtex cerebral podendo chegar a um aumento no cérebro inteiro de 15±45% (BALDNO; GELLER, 1981).

A exposição do VPA em períodos críticos embrionários de maturação cerebral, ocasiona a inibição de GABA transaminases (enzimas que degradam GABA), ao passo que aumenta a atividade da descarboxilase do ácido glutâmico, resultando em níveis e sinalização elevados de GABA (LÖSCHER, 2002). O funcionamento normal do sistema gabaérgico durante o desenvolvimento embrionário garante maturação das redes neurais, logo interferências como VPA, podem interromper progressos do circuito neuronal e resultar em fenótipos comportamentais autistas (GZIELO *et al.*, 2020).

Segundo a *American Food and Drug Administration* (FDA) o VPA é uma droga de categoria D, o que significa dizer, que além de exercer benefícios às mães, promove prejuízo fetal (ORNOY, 2009b; DUFOUR-RAINFRAY *et al.*, 2010). Dessa forma, na pratica clínica médicos são aconselhados a não prescrever a mulheres grávidas ou em idade fértil o VPA para epilepsia ou transtorno bipolar, a menos que essa seja a única opção terapêutica tolerada, o uso de contraceptivo eficaz e supervisão deve ser empregadas (TARTAGLIONE *et al.*, 2019b).

A teratogênia do VPA é baseada ao fato desse medicamento atravessar a placenta humana e aumentar sua excreção durante a gestação (ALBANI; RIVA, 1984; NAU, 1985). As concentrações séricas fetal e materna de VPA se equiparam, os níveis no soro do cordão umbilical muitas vezes são maiores do que na mãe, sugerindo maior afinidade por compartimentos fetais (ORNOY, 2009a). Contudo, o valproato é liberado no leite materno em baixas concentrações, e estima-se que os bebês ingiram cerca de 5% da dose diária da mãe ajustada ao peso (ALBANI; RIVA, 1984). A exposição pré-natal pode trazer riscos ao embrião de acordo com a dose do VPA administrada e a janela de exposição (CHALIHA *et al.*, 2020). As doses terapêuticas de VPA geralmente variam entre 200 mg a 3000 mg dia, sendo as doses mais altas associadas a maiores riscos para o feto (ROULLET; LAI; FOSTER, 2013b).

Durante o primeiro trimestre de gestação, período crítico da organogênese, que ocorre o fechamento do tubo neural e gênese do tronco cerebral, representam maiores efeitos negativos fetais do VPA, resultando três tipos de riscos: malformações congênitas, síndromes perinatais e transtornos no neurodesenvolvimento (DILIBERTI et al., 1984; ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005; IQBAL; SOHHAN; MAHMUD, 2001; ORNOY, 2009a). Os defeitos do tubo neural são as malformações mais frequentes promovidos pelo VPA em períodos críticos embrionários, com risco 20 vezes maior para a ocorrência de espinha bífida (ROBERT; GUIBAUD, 1982). Outras malformações congênitas decorrentes do valproato embrionário incluem os sistemas gastrointestinal, cardiovascular, dermatológico, genital, urinário, pulmonar e musculoesquelético (MEADOR, 2008). Estudos prospectivos e retrospectivos relacionam a somatória sinais e sintomas do VPA ao feto a origem do termo "Síndrome do Valproato Fetal" (SVF) (OMTZIGT *et al.*,1992). A SVF descrita pela primeira vez por DiLiberti e colaboradores (1984) como conjunto específico de características dismórficas faciais em sete bebês expostos ao valproato (DILIBERTI et al., 1984; OMTZIGT et al., 1992). A SVF é caracterizada por anomalias características

craniofaciais, sofrimento neonatal, abstinência neonatal, defeitos do tubo neural, trigonocefalia, anormalidades pulmonares, coloboma de íris/disco óptico, baixo QI verbal e características do TEA (ARDINGER *et al.*, 1988; WINTER *et al.*, 1996; MOORE *et al.*, 2000b; KINI *et al.*, 2016;).

Em particular, a exposição embrionária do VPA em crianças pode ainda promover déficit cognitivo, como atraso em habilidades de raciocínio verbal e de linguagem, níveis mais baixos de atenção e comprometimento da memória de trabalho (ADAB *et al.*, 2004;VINTEN *et al.*, 2005; MEADOR *et al.*, 2008; BROMLEY *et al.*, 2014). Durante a década de 90, estudos publicados associaram o VPA pré-natal ao TEA, originalmente baseados em crianças diagnosticadas com SVF e que exibiam atraso no desenvolvimento, o que inclui alguns dos sintomas autistas (60% dos indivíduos), e até mesmo todas as características básicas dos sinais do TEA (11% dos indivíduos) (CHRISTIANSON; CHESLER; KROMBERG, 1994; RANALDI *et al.*, 2001; WILLIAMS; HERSH, 2008).

Dentre os anticonvulsivantes utilizados durante a gravidez, o VPA foi a droga mais associada a ocorrência de sintomas tipo-autista (RASALAM *et al.*, 2005), mostrando que doses mais altas estão ligadas a habilidades globais cognitivas cada vez mais reduzidas (MEADOR *et al.*, 2008; BROMLEY; BAKER; MEADOR, 2009; BROMLEY *et al.*, 2014). Com base em evidências robustas, não é surpreendente que muitos estudos avaliem o potencial do VPA em roedores como um possível modelo de autismo induzido por drogas (RODIER; BRYSON; WELCH, 1997), representando casos de TEA idiopático com possível causa ambiental (TARTAGLIONE *et al.*, 2019c). No geral, os mecanismos pelos quais o VPA pré-natal causa risco aumentado para o TEA em humanos e roedores estão longe de serem contemplados (TARTAGLIONE *et al.*, 2019c). O modelo animal de autismo induzido pelo VPA pré-natal baseia-se em administração única que gera um conjunto de sintomas semelhantes a condição humana, primordialmente em domínios comportamentais sociais (MABUNGA *et al.*, 2015).

Ao mesmo tempo, o VPA exerce importante papel em eventos epigenéticos de vias cerebrais, seu mecanismo atua inibindo de forma não seletiva a histona deacetilase I e II (HDAC1 e HDAC2) expressas no cérebro (FUKUCHI *et al.*, 2009). A HDAC afeta enzimas nucleares e citoplasmáticas que induzem alterações na cromatina contribuindo para a regulação da transcrição gênica (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Exposição ao VPA gera hiperacetilação transitória de histonas

H3 e H4, que durante períodos críticos embrionários do desenvolvimento cerebral desempenham distúrbios como o TEA (KATAOKA *et al.*, 2013; MOLDRICH *et al.*, 2013). Os estímulos induzidos pelo VPA no período de fetal, promove certas alterações genéticas que resultam no desequilíbrio entre a excitação neuronal e inibição neuronal (sistema no cérebro (FUKUCHI *et al.*, 2009).

Em particular, o VPA está ligado a remodelação axonal de neurônios em desenvolvimento inibindo GSK3β (*glycogen synthase kinase-3 beta*) e então promovendo a sinalização de vias Wnt que regulam a diferenciação de neurônios progenitores intermediários corticais e a padronização do córtex cerebral (CHEN *et al.*, 2001; HALL; LUCAS; SALINAS, 2000; PHIEL *et al.*, 2001 HALL *et al.*, 2002; CHENN, 2008). Durante o desenvolvimento embrionário o VPA pode interromper as janelas espaço-temporais que são essenciais para o estabelecimento das redes neuronais normais (NICOLINI; FAHNESTOCK, 2018).

1.5 Recursos comportamentais e moleculares no modelo experimental de autismo em roedores induzido pelo VPA

Atualmente a validade do modelo VPA em roedores é baseada na detecção de sintomas comportamentais centrais que constituem o fenótipo do TEA incluindo: (1) comunicação verbal e não-verbal prejudicada; (2) falta de interação social; e (3) padrões de comportamento, interesses ou atividades restritos e repetitivos, juntamente com outros sinais comórbidos (GILLOTT; FURNISS; WALTER, 2001; LEYFER *et al.*, 2006).

Rodier et al. (1997) foram os primeiros a verificarem que ratas prenhes expostas ao VPA em dose única de 350 mg/kg no GD 12, apresentaram proles com alterações morfológicas e comportamentais semelhantes as exibidas por pacientes com TEA (RODIER; BRYSON; WELCH, 1997). O tempo embrionário e a dose administradas de VPA são variáveis chaves para ocasionar sintomas "tipo autista" em animais. O modelo de roedor tipo-autista implica em uma única dose de VPA na janela gestacional do 9º ao 12º GD (correspondente ao dia embrionário 20-24 em humanos) com doses entre 300 a 800 mg/kg (KIM *et al.*, 2011). Além disso, a espécie animal ou via de administração de VPA pré-natal interferem nos comportamentos semelhantes

ao autismo, e dessa forma precisam ser levadas em consideração (MABUNGA *et al.*, 2015). De forma robusta, diferentes autores demonstraram que doses intermediarias de VPA em ratas prenhes durante o GD 12,5 promovem sintomas do tipo autista nas proles (KIM *et al.*, 2011; HARA *et al.*, 2015a; SERVADIO; VANDERSCHUREN; TREZZA, 2015; CARTOCCI *et al.*, 2018; CEZAR *et al.*, 2018;).

Durante um estudo conduzido por Schneider e Przewlocki (2005), uma bateria de testes comportamentais realizada em ratos expostos ao VPA pré-natal (800 mg/kg no GD 12,5) revelou prejuízos que incluem: (a) redução da interação social; (b) comportamentos estereotipados; (c) respostas anormais ao estímulo doloroso; e (d) padrão alterado no neurodesenvolvimento (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005a). Partindo desse princípio, numerosos trabalhos replicaram em roedores o modelo de autismo utilizando VPA pré-natal em diferentes paradigmas. Contudo alterações comportamentais e morfológicas foram avaliadas em diferentes doses de VPA durante o período gestacional de roedores, incluindo: redução da vocalização ultrassônica em camundongos e ratos separados da mãe e irmãos (CARTOCCI *et al.*, 2019a; GANDAL *et al.*, 2010; MELANCIA *et al.*, 2018a); comportamento restrito de interesses medido pelo aumento da reentrada do mesmo braço previamente explorado no teste labirinto em T (RINALDI; SILBERBERG; MARKRAM, 2008; CEZAR *et al.*, 2018;); aumento da locomoção em campo aberto; comportamento tipo ansioso (ŠTEFÁNIK; OLEXOVÁ; KRŠKOVÁ, 2015; OLEXOVÁ; ŠTEFÁNIK; KRŠKOVÁ, 2016;) .

Alterações comportamentais associadas ao TEA foram ligadas a várias áreas do cérebro, o que possibilita avaliações através do modelo experimental de VPA pré-natal do ponto de vista da neurofisiologia e morfologia, acompanhadas por modificações a nível molecular (MYCHASIUK *et al.*, 2012). Diferentes sistemas de neurotransmissão foram implicados durante o estudo em roedores expostos ao VPA pré-natal, tornando uma ferramenta eficaz em induzir o fenótipo autista (**Figura 3**) (CAMPOLONGO *et al.*, 2018). Nesses diferentes modelos com a utilização do VPA (GD 12,5) alterações cerebrais foram vistas em roedores, incluindo: hiperserotonemia, modificações no córtex frontal, hipocampo e cerebelo (NAKASATO *et al.*, 2008; NARITA *et al.*, 2002); hiperatividade e hipoatividade dopaminérgica que contribuem para déficits comportamentais (HARA *et al.*, 2016; CEZAR *et al.*, 2018); ocitocina ligada a interação social (ACCORDINO *et al.*, 2016); regulação positiva da acetilcolinesterase no córtex pré-frontal (VANDERSCHUREN; ACHTERBERG; TREZZA, 2016); neurotransmissão histaminérgica cerebral como alvo terapêutico; e

aumento da expressão de marcadores apoptóticos e estresse oxidativo (TUNG; WINN, 2010).

Figura 3 Consequências da exposição pré-natal ao VPA, alterações morfológicas semelhantes as exibidas no TEA



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Esses achados apoiam a hipótese de que a exposição ao VPA durante o primeiro trimestre carrega o maior risco de desenvolver TEA por afetar estruturas sinápticas com desregulação das principais proteínas estruturais e funcionais pré e pós-sinápticas (TARTAGLIONE *et al.*, 2019c).

1.6 Cérebro autista: a hipótese da dopamina

Estudos que investigaram o papel de neurotransmissores no TEA têm associado cada vez mais essa condição com alterações em circuitos complexos cerebrais. Em especial, perturbações do sistema dopaminérgico em regiões especificas do cérebro durante períodos são capazes de promover transtornos do neurodesenvolvimento como TDAH e TEA (HAMILTON *et al.*, 2013; YANG; TAN; DU, 2014; PAVÅL, 2017a;). O prejuízo no desenvolvimento de estruturas cerebrais afeta conexões funcionais entre sítios cerebrais que resultam em comportamentos anormais (PAVÅL, 2017a).

A razão dos neurotransmissores e seus metabólitos é justamente o que garante o funcionamento normal das funções comportamentais basais, além de fornecer informações sobre atividade funcional de neurônios (VENERO; MACHADO; CANO, 1991). As catecolaminas são importantes neurotransmissores em mamíferos com funções adrenérgicas do sistema nervoso simpático, principal modo de comunicação entre células e moléculas sinalizadoras (WURTMAN; FERNSTROM, 1976). Os neurotransmissores permanecem em terminais pré-sinápticos dentro de vesículas, que após potencial limiar atingido, são liberados na fenda sináptica (STEINHARDT; BI; ALDERTON, 1994). Após liberados, esses compostos geram respostas fisiológicas em células pós-sinápticas, todavia os neurotransmissores são rapidamente: (a) metabolizados por enzimas; (b) recaptados da fenda; (c) ligados a neurônios pós-sinápticos (GARRIS *et al.*, 1994).

A dopamina (DA) 4-(2-aminoetil)-1,2-fenol é um neurotransmissor monoaminérgico de ação lenta, essencial para neuromodulação e regulação a longo prazo (Girault et al., 2004). Grande parte da síntese de DA é derivada da tirosina, e uma pequena parcela originada da L-fenilalanina, aminoácidos presentes em diferentes regiões cerebrais (FERNSTROM; FERNSTROM, 2007). A enzima passo limitante da sínteses de DA, tirosina hidroxilase, converte a tirosina em levodopa (L-DOPA) na presença de tetrahidrobiopterina, oxigênio (O2) e ferro (Fe²⁺) como cofatores; finalmente a L-DOPA é convertida em DA DOPA descarboxilase (HENN, 1980). Por meio da atividade do citocromo P450 2D6 na substância *nigra*, uma via de síntese menor que converte a DA (BROMEK *et al.*, 2011).

O papel da DA não está relacionado diretamente com excitação ou inibição neuronal, mas com função neuromoduladora que altera respostas de neurônios alvo (GIRAULT; GREENGARD, 2004). A neurotransmissão dopaminérgica é criticamente regulada pelo transportador de dopamina (DAT), proteína de membrana pré-sináptica expressa seletivamente em neurônios dopaminérgicos, fundamental para manter os níveis extracelulares de DA (CILIAX *et al.*, 1995, 2000). O DAT é dependente de Na⁺/Cl-, acopla o transporte de íons Na⁺ ao longo do gradiente eletroquímico com a recaptação de dopamina extracelular no espaço intracelular (SHIMADA *et al.*, 1992; JONES *et al.*, 1998).

Os receptores dopaminérgicos foram identificados em 1975, são subdivididos em dois tipos D₁ e D₂, pertencem a família de receptores acoplados à proteína G, constituídos por uma estrutura de sete hélices transmembranas e promotores da transdução do sinal celular pela ativação da proteína no meio intracelular (SEEMAN *et al.*, 1976; CAI *et al.*, 2021;). A família de receptores D₁ possui dois tipos D₁ e D₅, quando ativados levam a formação e aumento de AMP cíclico (cAMP) (MISSALE *et al.*, 1998). Os receptores D₁ e D₅, ligados a proteína G estimulatória (Gs), levam à excitação neuronal e consequente propagação do impulso elétrico (BAIK, 2013). Em relação a família de receptores D₂, alguns subtipos são encontrados D₂, D₃ e D₄, e considerados inibitórios, hiperpolarizam neurônios por meio de proteínas G inibitórias impedindo o impulso nervoso (WAMSLEY *et al.*, 1989).

Após sintetizada em neurônios especializados, a dopamina é sequestrada no lúmen através do transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2), todavia o ambiente ácido estabiliza a DA evitando a oxidação (EIDEN; WEIHE, 2011). Contudo, em células adrenérgicas e noradrenérgicas a dopamina pode ser convertida em noradrenalina e adrenalina por uma cascata bioquímica; na presença de O₂ dopamina β- hidroxilase (DBH) produz noradrenalina e feniletanolamina N-metiltransferase forma adrenalina (UDENFRIEND; WYNGAARDEN, 1956; WEINSHILBOUM; AXELROD, 1971). Fora de um ambiente ácido a DA sofre oxidação, em especial pela monoamina oxidase B (MAO-B) em 3,4-diidroxifenilacetaldeído (DOPAL), convertido então em ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH). A degradação de DOPAC ocorre pela catecol-O-Metiltransferase (COMT) em ácido homovanílico (HVA), além de converter diretamente dopamina em 3-metoxitiramina (3-MT) (EISENHOFER; KOPIN; GOLDSTEIN, 2004; CHEN *et al.*, 2011;). Os subprodutos e a dopamina podem ser quantificados no sangue, líquido
cefalorraquidiano, rins e intestino (ANLAUF *et al.*, 2003), contribuindo como biomarcadores úteis para diagnósticos como o TEA (DICARLO *et al.*, 2021).

As populações neuronais dopaminérgicas e a região no SNC precisam ser avaliadas, pois diferentes cascatas sinalizadoras de DA geram diferentes tipos de respostas fisiológicas (MISSALE *et al.*, 1998). Os corpos celulares de neurônios dopaminérgicos estão presentes na área tegmental ventral (VTA) e na substância *nigra*, projetando-se para o estriado e córtex pré-frontal (PAPA *et al.*, 2002). O circuito mesocorticolímbico é formado a partir de neurônios da VTA que se projetam para o córtex pré-frontal e estriado ventral, conhecido como núcleo accumbens, envolvido em funções como recompensa e comportamento relacionado à motivação (CHEVALLIER *et al.*, 2012; PAVĂL, 2017b). A via nigroestriatal origina-se em neurônios dopaminérgicos na substância *nigra pares compactos* projetando-se para o estriado dorsal, responsável pelo controle motor e aspectos do comportamento direcionado a objetivos (HABER, 2014). Na via tuberoinfundibular, uma população de neurônios dopaminérgicos no núcleo arqueado do hipotálamo médio-basal se projetam até à eminência média (hipófise) (KLEIN *et al.*, 2019). Resumo das vias dopaminérgicas na **Figura 4**.

Figura 4 Resumo das vias dopaminérgicas no cérebro



Importantes papéis são desempenhados pelo sistema dopaminérgico na neuromodulação, como: controle motor; memória; comportamento motivacional; recompensa; regulação do sono; atenção; cognição; afeto; regulação hormonal da fome; influenciar a imunidade, sistema cardiovascular, gastrointestinal e renal (KLEIN *et al.*, 2019). Uma vez que a DA influencia inúmeras funções vitais, não é surpreendente que a ruptura do funcionamento normal desse circuito implique na progressão de diferentes distúrbios neurológicos (PAVĂL, 2017b). Diversos autores descrevem desequilíbrio dopaminérgico em indivíduos com TEA, incluindo tanto à hiperatividade quanto à hipoatividade da DA (CAI *et al.*, 2021; CANITANO, 2006; CEZAR *et al.*, 2018). Estudos clínicos apontaram atividade de DA-hidroxilase reduzida em pacientes com TEA, além de baixa DA em plaquetas isoladas e na urina (GARNIER *et al.*, 1986; MARGARI *et al.*, 2018).

Em particular, algumas regiões cerebrais foram mapeadas como anormais em indivíduos com TEA, incluindo lobo temporal, sistema límbico, gânglios da base e cerebelo (Tang *et al.*, 2013). Contudo dados da literatura demonstram que o TEA se caracteriza pela hipoativação geral do sistema de recompensa, ligadas a redução da liberação de DA no córtex pré-frontal e redução da resposta neural no núcleo accumbens (**Figura 5**) (HEGARTY; SULLIVAN; O'KEEFFE, 2013).

Um evidente estudo descreveu que a disfunção dopaminérgica no mesencéfalo resulta nos comportamentos tipo-autista, como: (a) alterações do circuito mesocorticolímbico leva a prejuízos sociais; e (b) disfunções do circuito nigroestriatal acaba por promover comportamentos estereotipados (PAVÅL, 2017b). Essas evidencias fundamentaram a hipótese da DA no TEA, fornecendo ligações entre neurobiologia e comportamento tipo-autista (PAVÅL, 2017b).

Yarlagadda e colaboradores (2019) relataram que durante críticos períodos da gravidez níveis elevados de DA podem afetar o neurodesenvolvimento normal do feto, levando a condições como TEA (YARLAGADDA *et al.*, 2019). A DA e seus receptores surgem na fase inicial do desenvolvimento, e interferem nos processos do desenvolvimento como neurogênese, migração neuronal e diferenciação (ARAKI; COOPER; BLOUIN, 2007). Os níveis de DA maternos podem ser afetados por manipulações diretas e indiretas que incluem: abuso de drogas, medicações, dieta, hipertermia materna, estresse, hipoxia, neurotoxinas ambientais e desafio farmacológico (PREVIC, 2007; KUPERSTEIN; EILAM; YAVIN, 2008; KUBRUSLY; BHIDE, 2010; KOSILLO; BATEUP, 2021).

Figura 5 Esquema dos sinais do TEA, com alterações do circuito mesocorticolímbico (MCL) levando a prejuízos sociais; e disfunções do circuito nigroestriatal (NES) acaba por promover comportamentos estereotipados



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Portanto, o sistema dopaminérgico hiperativo está envolvido na disfunção do cérebro autista em humanos (YARLAGADDA *et al.*, 2019). Outro ponto a ser considerado, é a atividade de DA alterada pela produção de anticorpos anti-receptor de DA, relacionados a distúrbios neuropsiquiátricos autoimunes (CROEN *et al.*, 2015). Os níveis de autoanticorpos DA contra receptores D₁ e D₂ podem ser determinados nas mães durante o início, meio e final da gestação pelo sangue do corão umbilical ou amostras obtidas do feto (BRIMBERG *et al.*, 2013). Estudos mostraram que 10% das mães de indivíduos com TEA, testam positivo para autoanticorpos reativos ao cérebro fetal em regiões do córtex, hipocampo e cerebelo (KEIL *et al.*, 2010; CROEN *et al.*, 2015).

Estudos que relacionaram biomarcadores periféricos da disfunção dopaminérgica no TEA, basearam-se na concentração de DA e seus metabólitos em fluidos corporais periféricos (PAVĂL; MICLUTIA, 2021). De certa forma, essa

metodologia sofre limitações, uma vez que: a DA não atravessa a barreira hematoencefálica; e nenhuma evidência sugere que a quantificação do HVA no plasma ou líquido cefalorraquidiano sejam sensíveis para estimar a atividade dopaminérgica (DICARLO; WALLACE, 2022).

Analisando os efeitos de antagonistas dopaminérgicos nos comportamentos centrais do autismo, percebe-se que esses moduladores da DA não alteram os problemas sociais, agindo apenas na melhora de comportamentos não-sociais (PAVÅL, 2017b). Em relação ao bloqueio da neurotransmissão dopaminérgica, sugere-se melhora comportamental, no entanto, as evidências são escassas e os dados inconclusivos necessitando de trabalhos complementares (KING *et al.*, 2011). No geral indivíduos com TEA apresentam hipoatividade dopaminérgica (SCOTT-VAN ZEELAND *et al.*, 2010a), e quando avaliado o pós desafio com anfetamina os resultados indicaram que esses pacientes possuem níveis basais de DA alterados e/ou liberação modificada em resposta a esses estímulos (HEAL *et al.*, 2013).

Apesar da disfunção na sinalização de DA no TEA, anormalidades em outros neurotransmissores contribuem para as bases neurobiológicas dessa condição (KING *et al.*, 2011). Presumindo a complexidade do sistema dopaminérgico e a interação com outras vias de sinalização, uma visão mais ampla desse circuito precisa ser levada em consideração.

1.7 Cérebro autista: hiperserotonemia

Como discutido anteriormente, pouco se sabe em relação a etiologia do TEA, contanto, estudos associam desregulação de serotonina (5-HT) com comorbidades neuropsiquiátricas incluindo o autismo (MULLER; ANACKER; VEENSTRA-VANDERWEELE, 2016). Parte dessa discussão deve-se a achados que descrevem hiperserotonemia em aproximadamente 30% dos indivíduos no TEA com ou sem deficiências intelectuais (WHITAKER-AZMITIA, 2005). De fato, a hiperserotonemia é a alteração neuroquímica mais consistente no TEA (**Figura 6**), podendo ser encontrada em parentes de primeiro grau, além da relação ao risco de recorrência de autismo nessas famílias (WHITAKER-AZMITIA, 2005; MULLER; ANACKER; VEENSTRA-VANDERWEELE, 2016).

Em humanos, assim como na maioria dos mamíferos, 5-HT é produzido a partir do aminoácido essencial triptofano e por duas enzimas distintas, triptofano hidroxilase (TPH) 1 e 2 (LOVENBERG; JEQUIER; SJOERDSMA, 1967). A síntese de 5-HT é dividida em duas etapas, que incluem: (1) a TPH 1 E 2, enzima limitante de síntese, são responsáveis pela síntese de 5-HT na periferia e no SNC; (2) o produto intermediário 5-HTP é convertido em 5-HT pela descarboxilase de ácido aromático (WALTHER *et al.*, 2003). A 5-HT é substrato para a síntese de melatonina, contudo, o principal sistema de degradação serotoninérgico ocorre pela MAOA ligada às mitocôndrias, dando origem ao metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (HOMBERG *et al.*, 2016).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Embora a 5-HT seja reconhecida como neurotransmissor, 95% da fonte primaria serotoninérgica deriva de células enterocromafins no trato gastrointestinal, sendo absorvida pela pelas plaquetas à medida que vai para a circulação entérica (PUIG; GULLEDGE, 2011). A serotonina possui uma ampla gama de funções fisiológicas, quando liberada por neurônios entéricos e células enterocromafins regula a motilidade intestinal, agregação plaquetária e vasoconstrição (GERSHON *et al.*, 1977).

No SNC, a 5-HT está presente em neurônios que expressam TPH2 localizados em uma zona restrita do tronco cerebral, que envia projeções ascendentes para regiões do córtex, límbica, mesencéfalo e rombencéfalo (BERGER; GRAY; ROTH, 2009). Grande parte da 5-HT cerebral é encontrada na linha média do rombencéfalo, nos núcleos da rafe, que projetam axônios e inervam tecidos-alvo (BENES; TAYLOR; CUNNINGHAM, 2000). Receptores para 5-HT no mesencéfalo e rombencéfalo, são organizados em nove grupos (B1-B9 nos núcleos da rafe) (DAHLSTRÖM; FUXE, 1964). Os receptores serotoninérgicos são classificados em famílias 5-HT1 a 5-HT7, subdivididas em 14 tipos: 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5A, 5-HT5B, 5-HT6 e 5-HT7 (GARRAWAY; HOCHMAN, 2001). O transportador de serotonina (SERT) é uma proteína integral transportadora de 5-HT acoplada à Na+/Cl, presente em terminais pré-sinápticos no cérebro (QIAN et al., 1995). O gene SLC6A4 codifica SERT na região cromossômica 17q11, principal localização envolvida com o TEA, em especial a baixa expressão de SERT foi descrita no cérebro de indivíduos adultos (BACCHELLI; MAESTRINI, 2006).

A serotonina promove numerosos efeitos comportamentais envolvendo o controle do humor, apetite, temperatura corporal, excitação, sensibilidade à dor, comportamento sexual e liberação de hormônios (LAM; AMAN; ARNOLD, 2006). Durante o desenvolvimento, a serotonina demonstrou importante papel na maturação de circuitos cerebrais pré-natal e pós-natal (WHITAKER-AZMITIA, 2001). Anormalidades sinalização 5-HT, além na de da hiperserotonemia no desenvolvimento embrionário, possibilita comportamentos semelhantes ao autismo (YANG; TAN; DU, 2014). Os níveis serotoninérgicos em humanos apresentaram-se mais altos no sangue e mais baixos no cérebro de crianças com TEA (MCNAMARA et al., 2009). Curiosamente, a síntese materna de 5-HT é expandida, contribuindo para os níveis de 5-HT no prosencéfalo fetal (KIM et al., 2011). Em humanos, os níveis de serotonina são aumentados por várias circunstâncias, dentre elas o aumento da liberação interna, aumento da ingestão e diminuição do metabolismo (PIVEN et al., 1991).

No cérebro maduro, os níveis de 5-HT sanguíneos não são indicadores da atividade serotoninérgica cerebral, pois: (a) a serotonina não atravessa a barreira

hematoencefálica; (b) a enzima triptofano hidroxilase apresenta-se de formas diferentes na periferia e no SNC (YANG; TAN; DU, 2014). Notavelmente em modelos animais, a exposição pré-natal a talidomida e/ou ao VPA, geram hiperserotonemia e neurônios 5-HT alterados (MIYAZAKI; NARITA; NARITA, 2005). Estudos demonstraram um aumento nos axônios de conexões serotoninérgicas no tecido cerebral *post-mortem* de indivíduos com TEA em relação ao controle (AZMITIA *et al.*, 2011).

A hiperserotonemia exerce efeitos sobre a ocitocina, que em humanos, regula as interações sociais, a cognição social, o comportamento social e o medo (ISRAEL *et al.*, 2009; KIRSCH, 2014). Estudos da administração intranasal de ocitocina em humanos, demonstra melhora na memória para reconhecimento de faces, comportamento prejudicado em pacientes com TEA (RIMMELE *et al.*, 2009; MEYER-LINDENBERG *et al.*, 2011).

Apesar dos esforços em torno de pesquisas, o biomarcador de hiperserotonemia não revelou completamente sua associação ao risco de TEA. A questão central para desenvolver um modelo está relacionada com o fato da 5-HT alterada no desenvolvimento sensorial não responder a tratamentos direcionados na idade adulta (SANCHEZ *et al.*, 2015; WORBE *et al.*, 2016). Alguns fármacos direcionados aos receptores 5-HT, especialmente 5-HT1A e 5-HT2A, exibiram-se promissores em comportamentos do tipo-autista, diminuindo a inflexibilidade cognitiva e aumentando a interação social (GOULD *et al.*, 2011; AMODEO *et al.*, 2021).

Estudos futuros são necessários para identificar de forma clara a verdadeira associação da hiperserotonemia com TEA. Até o momento nenhum estudo avaliou se o aumento da 5-HT gestacional pode predizer o risco de TEA no cérebro em desenvolvimento, dessa forma, trabalhos futuros podem identificar indivíduos com biomarcadores que tenham maior probabilidade de se beneficiar ao tratamento.

1.8 Metilfenidato: possíveis intervenções farmacológicas no autismo

O cloridrato de metilfenidato (MET) é um psicoestimulante leve do SNC comercializado como ritalina e concerta, possui estrutura similar as anfetaminas, pertencente as classes de piperidinas e feniletilaminas, sendo o medicamento mais

utilizado em transtornos de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (LEVIN; KLEBER, 1995a; SOLANTO, 1998; ACCARDO; BLONDIS, 2001; WENTHUR, 2016). A droga foi sintetizada em 1944 por Panizzon (SALISBURY; HARE, 1957), e desde então, seu uso foi estabelecido para aumentar o estado de alerta e concentração de crianças com dificuldades emocionais (WILENS *et al.*, 1997; CRUTCHLEY; TEMLETT, 1999;).

A administração aguda ou crônica do MET estimula de forma indireta os sistemas noradrenérgico e dopaminérgico de circuitos corticoestriatais, reduzindo a recaptação pré-sináptica após a liberação de catecolaminas e aumento de suas concentrações médias na fenda pós-sináptica (**Figura 7**) (POSEY *et al.*, 2007; DEL CAMPO *et al.*, 2011;). O MET atua bloqueando os transportadores de dopamina (DAT) e noradrenalina (NET), inibindo a recaptação das catecolaminas, causando aumento nos níveis de: DA extracelular, densidade de receptores de DA, tirosina hidroxilase (TH) e o transportador de monoaminas vesicular 2 (VMAT2) (MARKOWITZ, 1997b; IZENWASSER *et al.*, 1999; MASSELLO; CARPENTER, 1999; PATRICK;). Esse fármaco possui efeitos moderados no sistema circulatório periférico, entretanto, suas propriedades de reforço no SNC e ações no DAT assemelham-se a cocaína (MURRAY, 1987; RITZ *et al.*, 1987; VOLKOW *et al.*, 1999a).

Quando administrado por via oral, o MET é rapidamente absorvido pelo epitélio intestinal, com ação iniciada após 8 –20 min (semelhante a cocaína), possui meia-vida de 1h, a duração e eficácia da droga são relativamente curtas (SWANSON *et al.*, 2003). As concentrações cerebrais de MET excedem as do plasma, uma vez que a droga atravessa a barreira hematoencefálica, contudo, após absorvida e metabolizada via desesterificação em ácido ritalínico (80%), sendo finalmente liberada na urina por 48h (FARAJ *et al.*, 1974; LEONARD *et al.*, 2004).

O uso prolongado de psicoestimulantes como o MET resulta em manifestações bioquímicas e comportamentais intensificadas, promovendo à sensibilização e tolerância a droga, em última análise, podem levar ao abuso potencial da substância principalmente na população de adolescentes e jovens adultos (JONES; DAFNY, 2014; KONSTENIUS *et al.*, 2014; KARIM; REYES-VAZQUEZ; DAFNY, 2017). A sensibilização comportamental é caracterizada pelo aumento progressivo comportamental/bioquímico frente a exposição repetida ao fármaco em relação a resposta inicial da mesma dose aguda (KONSTENIUS *et al.*, 2014; VANDERSCHUREN *et al.*, 1999). Estudos em roedores e humanos indicam que

indivíduos do sexo feminino expressam sensibilização comportamental maior e mais rápida do que o sexo masculino, além de efeitos colaterais mais graves após o uso de psicoestimulantes (BOOZE *et al.*, 1999).

Figura 7 Metilfenidato bloqueando os transportadores de dopamina (DAT) e noradrenalina (NET), inibindo a recaptação das catecolaminas, causando aumento nos níveis de DA extracelular e densidade de receptores de DA



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Em geral doses baixas/moderadas de MET prolongadamente causam sensibilização comportamental, enquanto doses mais altas pode provocar estereotipia e tolerância vista em experimentos que mediram a atividade locomotora em roedores (GAYTAN *et al.*, 1996, 2000; MCDOUGALL *et al.*, 1999). Estudos demonstram que alterações no tônus dopaminérgico de adolescentes estão relacionadas ao desenvolvimento da conectividade cortical e subcortical, causando neuroplasticidade e até mesmo dependência ao MET (WAHLSTROM *et al.*, 2010; WAHLSTROM; WHITE; LUCIANA, 2010).

O tratamento prolongado com MET desencadeia mudanças de forma persistente na transmissão monoaminérgica, resultando adaptações do SNC e

alterações comportamentais (HARA *et al.*, 2016). Durante o desenvolvimento normal de estruturas críticas cerebrais, processos de maturação ocorrem de forma coordenada, e interferências geram consequências citoarquitetônicas e neuroquímicas (RICE; BARONE, 2000b; GRAY *et al.*, 2007;). Em especial, as monoaminas atuam regulando diversos processos de maturação cerebral, e o uso de MET em períodos críticos do desenvolvimento afeta a sinaptogênese, mielinização e gliogênese (BARONE S. *et al.*, 2000). O MET exerce efeito mais pronunciadamente em regiões cerebrais associadas a cognição e aprendizagem, incluindo córtex cerebral e hipocampo, com picos de sinaptogênese durante a infância e adolescência em humanos e ratos (RICE; BARONE, 2000a)

Diferentes transições anatômicas e farmacológicas durante a adolescência promovem inúmeras consequências comportamentais e neuroquímicas, que são compensatórias no "estado adulto" do cérebro (INSEL; HULIHAN, 1995). O aumento da neurotransmissão de dopamina e noradrenalina promovido pelo MET no início da vida efetua mudanças mesmo após a ausência da droga, ou seja "*imprinting neuronal*" (ANDERSEN; NAVALTA, 2004). O termo "*imprinting neuronal*" descreve que a exposição precoce a psicoestimulantes interfere na atividade neuronal, e mesmo após o uso da droga, o curso do desenvolvimento é redirecionado e mudanças persistentes são observadas na vida adulta (ANDERSEN; NAVALTA, 2004). O *imprinting* não está ligado a destruição tóxica de neurônios, mas na influência da sensibilidade ao desafio de drogas com potencias em redirecionar a maturação durante períodos críticos do desenvolvimento (LIDOW *et al.*, 2001; ANDERSEN *et al.*, 2008;).

Apesar dos tratamentos do TEA serem baseados em práticas comportamentais e educacionais, o papel farmacológico como terapia adjuvante tem mostrado papel fundamental (BROADSTOCK; DOUGHTY; EGGLESTON, 2007). Até o presente momento nenhum tratamento está disponível para a cura do autismo, todavia, medicações são utilizadas para controlar sintomas centrais e condições associadas que melhoram a qualidade de vida de pacientes com TEA (BROADSTOCK; DOUGHTY; EGGLESTON, 2007).

As medicações mais prescritas em pacientes com TEA incluem: antipsicóticos típicos (haloperidol), antipsicóticos atípicos (risperidona), antidepressivos tricíclicos (clomipramina), inibidores seletivos da recaptação de serotonina (fluoxetina), antidepressivos dual (bupropiona), estimulantes (ritalina), anticonvulsivantes, lítio, ansiolíticos, agonista alfa 2-adrenérgico (clonidina), e antagonista adrenérgico

(propranolol) (WILLEMSEN-SWINKELS, 1995; WILLIAMS et al., 2006; POSEY et al., 2007). Em relação as abordagens terapêuticas alternativas, somam antagonistas opiáceos (cloridrato de naltrexona), imunoterapia, agentes hormonais, suplementos nutricionais e vitaminas (KERBESHIAN; BURD; AVERY, 2001). O uso de MET em pacientes com TEA está associado a diagnósticos adicionais como transtorno obsessivo-compulsivo, esquizofrenia, transtorno do humor, TDAH, epilepsia, além de outras condições neurológicas (KERBESHIAN; BURD; AVERY, 2001; VOLKOW et al., 1999a). Contudo, indivíduos com TEA podem ainda apresentar morbidades psiguiátricas como depressão, agressão, comportamento autodestrutivos, estereotipia; no geral esses sintomas intensificam-se na adolescência e na idade adulta (LARSEN; MOURIDSEN, 1997; ESCALONA et al., 2001;).

As intervenções farmacológicas introduzidas em pacientes com TEA ainda na infância podem: (1) regular e direcionar processos iniciais de neurodesenvolvimento; (2) aumentar a neuroplasticidade; e (3) aumentar a resposta a tratamentos comportamentais (BETHEA; SIKICH, 2007). Essa abordagem promove a plasticidade neural precoce (CHUGANI; CHUGANI, 2005), e parte dos tratamentos farmacológicos dos autistas relaciona-se a desequilíbrios na neurotransmissão (BETHEA; SIKICH, 2007).

Embora o estudo do autismo tenha acrescido nos últimos 10 anos, mais investigações em relação a eficácia ou segurança dos tratamentos farmacológicos para adolescentes ou adultos com TEA necessitam ser realizadas.

1.9 Autismo no sexo feminino: principais características do dimorfismo sexual comportamental e molecular

Atualmente a diferença na incidência e expressão do TEA entre homens e mulheres é um tema de bastante interesse na literatura. Recentemente tem sido sugerido que a razão da incidência de homens e mulheres com autismo é menor do que era suposto, aproximando-se de 2,5:1 a 4:1 (SHAMSI MEYMANDI *et al.*, 2020). No geral, os diagnósticos do TEA em indivíduos do sexo feminino ocorrem de forma menos precoce que nos homens (GREEN *et al.*, 2019). A maioria dos transtornos do neurodesenvolvimento conferem vulnerabilidade maior para o sexo masculino,

incluindo TDAH, transtorno desafiador opositivo (TDO) e deficiência intelectual (STEEB *et al.*, 2014). Esse conceito é baseado na variabilidade genética dos machos a fatores biológicos que conferem vulnerabilidade aos cérebros masculinos (GUR; GUR, 2017).

Os genes super expressos em cérebros masculinos em relação ao feminino foram associados ao TEA, em especial genes que codificam proteínas envolvidas com a matriz extracelular e citoesquelética, resposta imune e cromatina (BHATNAGAR *et al.*, 2014). Portanto, alterações em genes tipicamente expressos em níveis mais altos em homens possuem maior impacto no desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos (FERRI; ABEL; BRODKIN, 2018).

Grande parte da origem do desenvolvimento de muitas diferenças comportamentais entre machos e fêmeas são derivadas dos cromossomos sexuais X e Y (MCCARTHY *et al.*, 2012). Outro fator importante de diferenciação entre os sexos feminino e masculino, inclui os hormônios sexuais testosterona e estradiol, produzidos pelas gônadas (FERRI; ABEL; BRODKIN, 2018). No caso de indivíduos do sexo masculino, o gene SRY (*sex-determining region Y*) presente no braço curto do cromossomo Y, codifica o fator determinante do testículo, responsável pela regulação dos fatores de transcrição que dão início a formação dos testículos (LOKE; HARLEY; LEE, 2015a).

Durante o desenvolvimento gestacional, a testosterona é responsável pela masculinizarão do cérebro, enquanto a feminilização requer ausência desse hormônio (KRISHNAN, 2018). Outro momento crítico para o desenvolvimento do cérebro, compreende o aumento dos hormônios sexuais durante a puberdade, exibido pelos níveis cíclicos de estradiol e progesterona nas mulheres até a menopausa (ciclo menstrual ou estral); e o aumento constante de testosterona nos homens até a senescência (STEEB *et al.*, 2014). A testosterona fetal é um grande candidato para promover sintomas e comportamento do TEA (FERRI; ABEL; BRODKIN, 2018). Todavia, possuir um cromossomo Y, no caso dos homens, é um fator de risco para distúrbios do neurodesenvolvimento, e o fato de possuir um segundo cromossomo X confere proteção ao sexo feminino (WOOLLEY; MCEWEN, 1992). A teoria do *"Extreme Male Brain"* no autismo, garante que existem diferenças morfológicas e funcionais entre os cérebros masculinizada, derivada provavelmente da elevação da testosterona fetal (SCHAAFSMA; PFAFF, 2014).

Recentemente pesquisas descreveram que indivíduos do sexo feminino diagnosticadas com TEA apresentam características únicas quando comparadas aos homens (WILLIAMS; COPPOLINO; PERREAULT, 2021b). O dimorfismo sexual nos sintomas ligados ao TEA existem na memória, flexibilidade cognitiva, fluência verbal e comunicação social (MANDY; CHILVERS; COMORBIDITY, 2012) O TEA no sexo masculino prevê: dificuldades na comunicação/interação social e maiores comportamentos repetitivos e estereotipados; já nas mulheres o prejuízo do autismo atinge o controle verbal reduzido, aumento das habilidades motoras finas, dificuldade em internalizar e expressar emoções, mas são mais sociáveis (CARTER *et al.*, 2007; FRAZIER *et al.*, 2014).

As mulheres com TEA mostram comportamentos e interesses menos restritos, possuindo mais sintomas internalizantes, como depressão e ansiedade, enquanto nos homens, o autismo tende a gerar sintomas mais externalizantes, como agressão e hiperatividade (PINARES-GARCIA *et al.*, 2018). A deficiência intelectual tem proporção maior em mulheres com TEA do que em homens, necessitando de atenção em diagnósticos diferenciados (GREEN *et al.*, 2019).

De forma geral, vários elementos estão implicados na aparente predominância masculina em transtornos como o TEA, incluindo: (1) viés metodológico com amostras predominantemente masculinas em estudos sobre TEA; (2) ferramentas clínicas baseadas no fenótipo masculino; (3) e diferenças clínicas entre meninas e meninos influenciadas por fatores socioculturais e familiares (YOUNG; OREVE; SPERANZA, 2018). Um número relativo de mulheres com TEA não diagnosticadas ou diagnosticadas erroneamente, ocorrem e são obtidos tardiamente prejudicando a qualidade de vida desses indivíduos (Green *et al.*, 2018).

Contudo os dados obtidos na literatura revelam que as taxas de prevalência do TEA em mulheres sofrem atrasos no diagnósticos, erros ou até mesmo falta de identificação. Todavia, uma melhor compreensão desse tema sobre a influência do sexo no fenótipo de distúrbios como o TEA, poderia ajudar sobre a etiologia, biologia e comportamentos encontrados nesses indivíduos, e de forma clínica, melhorar a qualidade de vida de mulheres com autismo.

1.10 Justificativa

Diversos estudos associam o sistema dopaminérgico ao autismo, especialmente mutações genéticas em genes associados à DA como o transportador de dopamina (DAT), receptor e síntese enzimática de DA (MCFARLANE et al., 2008; HETTINGER et al., 2012; QIAN et al., 2013 BOWTON et al., 2014;). Esses achados sugerem que o sistema dopaminérgico cerebral parece estar envolvido na etiologia do TEA (NAKAMURA et al., 2010). 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). A literatura não evidencia como ocorre alteração do sistema dopaminérgico em autistas, uma vez que alguns trabalhos relatam hiperatividade (BACHEVALIER; LOVELAND, 2006; BARON-COHEN et al., 2000) e outros hipoatividade dopaminérgica (KIRSTEN et al., 2012, 2015b). De acordo com os achados do nosso grupo no qual esse transtorno foi induzido por meio de um desafio imunológico (LPS no GD 9) (KIRSTEN et al., 2012, GALVÃO et al., 2015; 2015b) o sistema dopaminérgico estriatal sofre uma hipoatividade em animais com fenótipo autista. O estudo detalhado para melhor elucidar as alterações desses sistemas cerebrais em autistas faz-se necessário, uma vez que os resultados da literatura são ainda conflitantes.

Consistentemente, Hara et al. (2015) verificaram a atividade dopaminérgica cerebral em camundongos expostos ao VPA no GD 12,5 e desafiados com metanfetamina na idade adulta, e demonstraram que a exposição pré-natal ao VPA reduz o efeito no aumento da atividade locomotora, incluindo diminuição da liberação de DA no córtex pré-frontal e na expressão de receptores dopaminérgicos em machos desafiados com o psicoestimulante (HARA *et al.*, 2015b). Nesse estudo, só foi possível revelar os efeitos do VPA na função dopaminérgica, após o desafio farmacológico com metanfetamina. O desafio farmacológico é uma estratégia potente capaz de acessar a atividade de neurotransmissores no SNC (HARA *et al.*, 2015b).

O metilfenidato é um potente inibidor da recaptação de DA e NOR; atua aumentando os níveis de DA extracelular no cérebro bloqueando os transportadores de DA nas sinapses (DELA PEÑA *et al.*, 2012). O metilfenidato é frequentemente prescrito como medicação contra TDAH (BOTLY *et al.*, 2008; GRZADZINSKI *et al.*, 2011). Pacientes com autismo são tratados raramente com o metilfenidato, apenas

quando, além do TEA esses possuem déficits de atenção como o TDAH (GRZADZINSKI *et al.*, 2011). O presente estudo utilizou como desafio farmacológico o metilfenidato, pois a administração aguda ou crônica desse fármaco aumenta seletivamente a liberação de DA e NA pré-frontal e estriatal em roedores normais (POSEY *et al.*, 2007). Em um estudo o tratamento crônico com metilfenidato melhorou o comportamento social e suprimiu a redução da densidade de espinhos dendríticos em camundongos expostos prenatalmente ao VPA em um modelo de autismo (HARA *et al.*, 2016). Porém, a administração aguda do metilfenidato não foi capaz de alterar os prejuízos comportamentais em animais expostos previamente ao VPA (HARA *et al.*, 2016).

O cérebro pode ser particularmente vulnerável para drogas que interferem processos e sistemas de neurotransmissores específicos (ANDERSEN; NAVALTA, 2004). Essa interferência tem efeitos que são dependentes da idade em que o indivíduo é exposto a droga, por consequência de regiões cerebrais não estarem totalmente maturadas (SCHRANTEE et al., 2017). Um estudo clínico em pacientes com TDAH demonstrou que jovens após 1 semana de tratamento com metilfenidato, alteraram a resposta do fluxo sanguíneo cerebral, provável reflexo decorrente do aumento na neurotransmissão dopaminérgica ocasionado possivelmente em decorrência de imprinting neuroquímico (ANDERSEN; NAVALTA, 2004; ANDERSEN et al., 2008; SCHRANTEE et al., 2017). Na adolescência algumas drogas psicoativas podem afetar o neurodesenvolvimento normal em fases primárias do desenvolvimento, acarretando efeitos em fases mais tardias da vida (ANDERSEN; NAVALTA, 2004; ANDERSEN et al., 2008;). O imprinting neuroquímico representa um tipo de plasticidade cerebral ao estímulo de drogas, apresentando troca funcional no cérebro alterando a expressão de RNA e proteínas (GRUSS; BOCK; BRAUN, 2003). A administração prolongada do metilfenidato pode ocasionar mudanças estruturais em circuitos envolvendo dopamina, além de traduzir essa neuroplasticidade em alterações comportamentais (SCHRANTEE et al., 2017).

Em decorrência de todas as justificativas supracitadas, o presente estudo revelou as alterações no sistema dopaminérgico em ratos expostos pré-natalmente ao VPA por meio do desafio farmacológico com metilfenidato. Foi proposto também verificar se o tratamento prolongado com MET é capaz de induzir neuroplasticidade em circuitos complexos envolvendo a dopamina afetando ainda comportamentos, incluindo aqueles associados com o autismo. Além disso, o modelo experimental

permitiu verificar eventuais efeitos adversos passiveis de ocorrência em humanos. A contribuição deste trabalho é ainda engrandecida pelo fato de até hoje não existir nenhum medicamento considerado satisfatoriamente eficiente para o autismo (SHENOUDA *et al.*, 2022). Nesse sentido, novos alvos e novas abordagens terapêuticas são necessários para intervenções mais eficientes.

Para investigar alterações neurobioquímicas e moleculares envolvidas nos prejuízos comportamentais associados ao autismo foram monitorados comportamentos estereotipados e de interação social, expressão gênica de receptores de dopamina, além da avaliação das concentrações de monoaminas e seus metabólitos no estriado e no córtex pré-frontal em ratos expostos pré-natalmente ao VPA e desafiados com metilfenidato pós-natal agudamente ou prolongadamente.



2 OBJETIVO GERAL

Verificar os prejuízos associados ao autismo em ratos expostos ao VPA no GD 12,5 em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal e possíveis alterações neurobioquímicas, moleculares, sexuais e comportamentais induzidas pela administração aguda ou prolongada do metilfenidato.

2.1 Objetivos específicos

- 2.1.1 Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD12,5 na prole masculina de ratas
 - Estudar os efeitos da administração pré-natal de VPA na comunicação (vocalização ultrassônica), comportamentos repetitivos e na capacidade cognitiva (labirinto em T), na interação social (comportamento de brincar) e na atividade locomotora (campo aberto).
 - Avaliar os efeitos da administração do VPA pré-natal nos níveis de monoaminas, seus metabólitos e *turnover* estriatais e corticais de ratos Wistar
 - Avaliar os efeitos da administração do VPA pré-natal na atividade dopaminérgica por meio da expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado e córtex de ratos
 - Avaliar por meio da imunofluorescência, neurônios TH⁺ imunorreativos na substância *nigra* e na área tegmental ventral de ratos submetidos ao VPA prénatal.

- 2.1.2 Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5)
 - Avaliação da atividade locomotora em CA após desafio farmacológico com metilfenidato em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
 - Avaliar os níveis de monoaminas, seus metabólitos e *turnover* estriatais e corticais após desafio farmacológico com metilfenidato em ratos tratados prénatalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
 - Avaliar a atividade dopaminérgica por meio da expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado e córtex após desafio farmacológico com metilfenidato em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
- 2.1.3 Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5)
 - Avaliação da atividade locomotora em CA e interação social (comportamento de brincar) após o tratamento prolongado com metilfenidato em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
 - Avaliar os níveis de monoaminas, seus metabólitos e *turnover* estriatais e corticais após o tratamento prolongado com metilfenidato em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
 - Avaliar a atividade dopaminérgica por meio da expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado e córtex após o tratamento prolongado com

metilfenidato em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).

- 2.1.4 Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD12,5 na prole feminina de ratas
 - Estudar os efeitos da administração pré-natal de VPA na comunicação (vocalização ultrassônica), comportamentos repetitivos e na capacidade cognitiva (labirinto em T), na interação social (comportamento de brincar) e na atividade locomotora (campo aberto).
 - Avaliar os efeitos da administração do VPA pré-natal nos níveis de monoaminas, seus metabólitos e *turnover* estriatais e corticais de ratos Wistar
 - Avaliar os efeitos da administração do VPA pré-natal na atividade dopaminérgica por meio da expressão gênica de DRD1 e DRD2 no estriado e córtex de ratas
- 2.1.5 Avaliar os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg) em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5)
 - Avaliação da atividade locomotora em CA após desafio farmacológico com metilfenidato em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
 - Avaliar os níveis de monoaminas, seus metabólitos e *turnover* estriatais e corticais após desafio farmacológico com metilfenidato em ratas tratados prénatalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).

- Avaliar a atividade dopaminérgica por meio da expressão gênica de DRD1 e DRD2 no estriado e córtex após desafio farmacológico com metilfenidato em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
- 2.1.6 Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 mg/kg) em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5)
 - Avaliação da atividade locomotora em CA e interação social (comportamento de brincar) após o tratamento prolongado com metilfenidato em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
 - Avaliar os níveis de monoaminas, seus metabólitos e *turnover* estriatais e corticais após o tratamento prolongado com metilfenidato em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
 - Avaliar a atividade dopaminérgica por meio da expressão gênica de DAT, DRD1 e DRD2 no estriado e córtex após o tratamento prolongado com metilfenidato em ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
- 2.1.7 Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD12,5 na prole masculina de ratas com maturidade sexual
 - Estudar os efeitos da administração pré-natal de VPA nos comportamentos: (1) estereotipado (teste grooming espontâneo PND 60); (2) anedonia (teste grooming espontâneo PND 61); e (3) tipo ansiedade (teste labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro- PND 62) em ratos.

- Avaliar durante o PND 90, os níveis de monoaminas, seus metabólitos e turnover no estriado, córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e PAG de ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).
- 2.1.8 Avaliar os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD12,5 na prole feminina de ratas com maturidade sexual
 - Estudar os efeitos da administração pré-natal de VPA nos comportamentos: (1) estereotipado (teste *grooming* espontâneo PND 60); (2) anedonia (teste *grooming* espontâneo PND 61); e (3) tipo ansiedade (teste labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro- PND 62) de ratas.
 - Avaliar durante o PND 90, os níveis de monoaminas, seus metabólitos e turnover no estriado, córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e PAG de ratas tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5).

Material e MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultos foram utilizados, com 120 dias de vida e peso corporal variando entre 200 e 340 gramas. Esses animais, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, permaneceram alojados em gaiolas-moradia de polipropileno fosco com tampas metálicas medindo 40 x 50 x 20 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° 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 experimentos foram conduzidos de acordo com as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo nº 6508200217/2017). Essas diretrizes são baseadas nas normas do *National Institutes of Health* (Bethesda, MD). O estudo foi realizado no biotério e laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, de acordo com os protocolos de boas práticas de laboratório com métodos de garantia de qualidade.

3.2 Experimentação com os animais

3.2.1 Acasalamento

As fêmeas virgens foram selecionadas ao acaso, e colocadas com machos sexualmente experientes e da mesma linhagem (*Wistar*), 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 (07h00 – 08h00) 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 8) (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. O parto foi ao natural (dia de vida pós-natal [PND] 1); no PND 2 as ninhadas foram padronizadas em 4 machos e 4 fêmeas por ninhada e os filhotes permaneceram com suas mães até o desmame no PND 21. As avaliações comportamentais e cerebrais foram conduzidas sempre com dois filhotes machos e duas fêmeas de cada ninhada, tratados prénatalmente com salina (SAL) e VPA.



Figura 8 Lavado vaginal em ratas visto no microscópio óptico

Fonte: KIRSTEN, T. B. (2012)

3.2.2 Tratamento farmacológico com ácido valpróico

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 anteriores (CEZAR *et al.*, 2018). 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).

O VPA foi administrado nas ratas prenhes via i.p. durante o GD 12,5 como padronizado em nossos estudos com o intuito de induzir comportamentos "tipoautista" (CEZAR *et al.*, 2018). As ratas do grupo controle receberam solução aquosa de NaCI estéril a 0,9% (salina), 0,2 ml/100g via i.p. no GD 12,5. O tratamento das ratas prenhes ocorreu sempre durante à tarde (entre 14h00 e 16h00).

3.2.3 Tratamento farmacológico com Metilfenidato

Os animais foram tratados com metilfenidato (Ritalina® LA 10 mg; Novartis Biociências S.A) para a avaliação da atividade de neurotransmissores no SNC, mimetizando os efeitos psicoestimulantes das anfetaminas (VOLKOW *et al.*, 1995; GATLEY *et al.*, 1996; VOLKOW *et al.*, 2001). A ritalina empregada no estudo é composta por 10 mg de cloridrato de metilfenidato e excipientes (esferas de sacarose, copolímero de metacrilato de amônio, copolímero de ácido metacrílico, talco, citrato de trietila, macrogol, gelatina, dióxido de titânio, óxido de ferro preto, óxido de ferro vermelho, óxido de ferro amarelo).

O metilfenidato foi dissolvido e administrado via gavagem 5 mg/kg nos ratos em solução aquosa de NaCl estéril a 0,9% no volume de 0,2 mL A dosagem e via de administração utilizadas foram baseadas no estudo de GERASIMOV et al. (2000), que descreveram previamente efeitos neuroquímicos e comportamentais significantes em doses intermediarias de metilfenidato (2 – 5 mg/kg) nos roedores (GERASIMOV *et al.*,

2000a). Estudos sobre os efeitos do metilfenidato relatam que, após 1h de exposição à droga, os níveis de DA são significativamente aumentados no estriado e no córtex pré-frontal (HAENLEIN; CAUL, 1987; SONUGA-BARKE, 2003; WILLIAMS, 2008).

O desafio farmacológico com metilfenidato foi administrado durante o PND 32 em ratos previamente expostos ao VPA no GD 12,5 e a avaliação comportamental e neuroquímica posteriormente realizada. Foi escolhido o tratamento com metilfenidato pois é conhecido que a administração aumenta seletivamente a liberação de DA em circuitos cerebrais estriatais e corticais (DING *et al.*, 1997; TOMASI *et al.*, 2015). Com isso, o metilfenidato serviu como ferramenta farmacológica que possibilita a ativação do sistema dopaminérgico.

Para o tratamento prolongado, os animais receberam metilfenidato por gavagem durante o PND 21 ao PND 32, uma vez ao dia no período matutino (entre 10h00 e 12h00 a.m.). A administração prolongada do metilfenidato pode ocasionar mudanças estruturais em circuitos envolvendo dopamina, além de traduzir essa neuroplasticidade em alterações comportamentais (QUINN, 2005).

3.3 Testes comportamentais

Após a padronização da ninhada, os filhotes expostos pré-natalmente ao VPA no GD 12,5 foram submetidos a diversos testes comportamentais para confirmação do modelo de autismo (CEZAR *et al.*, 2018). A bateria comportamental, além de avaliar sintomas associados ao autismo, também verificou as mudanças produzidas pelo tratamento pós-natal com metilfenidato agudamente e prolongadamente em ratos.

Para avaliar possíveis prejuízos causados pelo VPA pré-natal em uma fase de vida mais tardia, ratos jovens (durante PND 60 ao PND 62) foram submetidos a diversos testes comportamentais. 3.3.1 Avaliação da comunicação por meio do teste de vocalização ultrassônica nas proles de ratas expostas ao VPA no GD 12,5

A inabilidade persistente na comunicação verbal e não- verbal, um sintoma característico do TEA descrito anteriormente (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), foi avaliado nesse trabalho por meio do teste de vocalização ultrassônica. A comunicação das proles infante de ratas foi avaliada durante o PND 11 para verificar os prejuízos causados pelo VPA no GD 12,5. Quando sofrem isolamento, os filhotes de roedores emitem vocalizações (frequência de banda de 30– 50 kHz) 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 *et al.*, 1997; BRUNELLI; HOFER, 1996; KIRSTEN *et al.*, 2013).

Após a retirada do filhote de seu ninho e isolamento materno, dois filhotes machos e duas fêmeas de cada ninhada (n = 10 para cada grupo) foram individualmente colocados em gaiolas de polipropileno (30 x 20 x 12 cm) e conduzidos para a sala teste (com temperatura controlada, 22 ± 2° C) separados da sala moradia sempre durante o período matutino (KIRSTEN *et al.*, 2015a). A vocalização ultrassônica dos ratos 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 distante 8 cm do piso da gaiola. O aparelho permitiu o monitoramento automatizado das vocalizações dos animais em sessões de 5 minutos que verificaram alguns parâmetros da comunicação descritos no **Quadro 1**. No fim de cada sessão, os filhotes foram realojados em suas respectivas gaiolas com mãe e irmãos.

Parâmetros avaliados	Descrição
<u>N° de chamados em 40 kHz</u>	Número total de vocalizações emitidas pelos filhotes durante o período de isolamento materno
Duração total da vocalização	Tempo total em segundos das vocalizações emitidas pelos filhotes avaliados
Duração média da vocalização	Tempo médio em segundos de uma vocalização emitida pelos filhotes avaliados
<u>Duração máxima da</u> <u>vocalização</u>	Tempo máximo em segundos de uma vocalização emitida pelos filhotes avaliados
Duração total do silêncio	Tempo total em segundos em que o filhote passou em silêncio, isto é, não emitindo vocalizações ultrassônicas durante o período da avaliação
<u>Duração média do silêncio</u>	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

Quadro 1 Resumo dos parâmetros avaliados durante o teste de vocalização ultrassônica

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

3.3.2 Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole de ratas expostas ao VPA pré-natal no GD 12,5 e a administração pós-natal com metilfenidato

Padrões repetitivos e restritivos de comportamentos, manifestados por manipulação de objetos de forma repetitiva e/ou estereotipada, insistência na rotina e inflexibilidade a mudanças são características observadas em pacientes portadores do TEA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Para avaliar prejuízos

cognitivos dos comportamentos restritivos dos animais, o teste de alternação espontânea labirinto em T foi empregado durante o PND 29 (KIRSTEN *et al.*, 2015c). Os mesmos dois filhotes machos e duas fêmeas de cada ninhada 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 (90º 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. O teste foi realizado em uma sala com iluminação de intensidade baixa para evitar a sensibilidade ocular dos roedores.

Durante a sessão de teste, o rato 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, até a livre escolha de um dos braços laterais (esquerdo e direito). Assim que o filhote entrou em um dos braços, a barreira do braço correspondente bloqueou o animal nesse espaço 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 fora reiniciada. Os ratos avaliados realizaram 5 sessões no aparato e um escore foi atribuído como forma de análise. O parâmetro analisado foi a frequência de alternação 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 alternação entre os braços, foi considerado normal o comportamento do animal, e quanto menor a alternação, maior é a inflexibilidade cognitiva e o comportamento repetitivo. Para análise estatística, esses dados foram transformados em escores: 0 = nenhuma alternação entre os braços visitados, ou seja, repetição do mesmo lado visitado ao longo das cinco sessões; 1 = uma alternação entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 2 = duas alternações entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 3 = três alternações entre os braços visitados ao longo das cinco sessões entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 3 = três alternações entre os braços visitados ao longo das cinco sessões entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 3 = três alternações entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 3 = três alternações entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 3 = três alternações entre os braços visitados ao longo das cinco sessões; 4 = quatro alternações entre os braços visitados, ou seja, alternação entre os braços em todas as cinco sessões.

3.3.3 Avaliação da socialização e comportamento de brincar da prole de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e a administração pós-natal com metilfenidato

Os prejuízos na sociabilização e a ineficiência em relacionamentos sociais e interpessoais é um comportamento descrito em pacientes com TEA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). A sociabilidade dos animais foi testada por meio do comportamento de brincar de acordo com experimentos descritos anteriormente (CEZAR *et al.*, 2018; KIRSTEN *et al.*, 2010). Para aumentar a motivação em iniciar o comportamento social (PANKSEPP; BEATTY, 1980), dois filhotes machos e duas fêmeas de cada ninhada foram isolados em gaiolas-moradia após o desmame, no PND 21.

Figura 9 Parâmetros observados no teste comportamento social: A) e B) passar sob/sobre; C) pinning; D) perseguir; E) farejar





Fonte: Adaptado de MIKULECKÁ et al. (2014).

O comportamento de brincar foi avaliado no PND 30, pois esse comportamento apresenta pico justamente nesse período (PLETNIKOV *et al.*, 1999). Para realizar o teste os animais previamente expostos ao VPA no GD 12,5, foram submetidos ao tratamento agudo ou prolongado com metilfenidato (5 mg/kg via gavagem). No dia da avaliação social, cada filhote foi pareado com outro filhote *naïve* do mesmo gênero, com diferença do peso de até 10 gramas entre a dupla pareada.

Parâmetros avaliados	Descrição
<u>Pinning</u>	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
<u>Darts</u>	Número de vezes que o filhote se movimenta rapidamente, correndo em direção, em paralelo, ou se distanciando do intruso
Passar sobre/sob	Número de vezes que o filhote passa por cima ou por baixo do intruso que pode estar parado ou em movimento
<u>Perseguir</u>	Tempo total em segundos que o filhote gasta perseguindo o intruso, ou seja, se movimenta em direção ao outro, enquanto o animal perseguido também está se movimentando
<u>Farejar</u>	Tempo total em segundos em que o filhote passou em silêncio, isto é, não emitindo vocalizações ultrassônicas durante o período da avaliação
Levantar	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

Quadro 2 Resumo dos parâmetros avaliados durante o teste do comportamento de brincar

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

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 aclimatação. Após este período, foi realizado o pareamento e a sessão comportamental começou. Os testes duraram 10 minutos e foram realizados sempre durante a tarde (entre às 11h00 e às 15h00). As sessões foram filmadas e analisadas posteriormente avaliando os parâmetros descritos no **Quadro 2** de cada animal residente (experimental).

O teste de comportamento de brincar possibilita avaliação de diversas esferas sociais, incluindo o *pinning* que é considerado a brincadeira social, o *darts* e o passar sobre/sob que são solicitações de brincadeira, o perseguir e farejar que são investigações sociais e o levantar que é um parâmetro de exploração não social (PLETNIKOV *et al.*, 1999).

3.3.4 Avaliação da atividade geral em campo aberto da prole de ratas expostas ao VPA pré-natal e administração pós-natal com metilfenidato

Os comportamentos ansiosos e hiperativos fazem parte de sintomas do TEA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), apesar de se apresentarem em intensidades diferentes nos indivíduos. Com o intuito de estudar a resposta do metilfenidato aguda ou prolongadamente (5 mg/kg), os animais previamente expostos ao VPA no GD 12,5 foram submetidos ao teste de campo aberto durante o PND 32. O campo aberto foi desenvolvido para avaliar a emocionalidade em roedores por meio da atividade corporal e locomoção (HALL, 1941; PRUT; BELZUNG, 2003). O campo aberto foi aplicado nesse trabalho para verificar a ansiedade e atividade exploratória dos animais.

O aparato do campo aberto consiste em uma arena circular de madeira com diâmetro de 90 cm circundada por uma parede de 27 cm de altura, pintada com tinta acrílica preta. Uma câmera foi posicionada acima da arena e realizou o registro da sessão para posterior análise individualizada do movimento do animal nas zonas periférica e central do campo (**Figura 10**).



Figura 10 Ilustração do teste de campo aberto

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Para realizar o teste, cada rato foi colocado individualmente no centro da arena (já desinfetado com álcool 5%) e filmado por um período de 5 minutos. Depois de finalizada a sessão, os animais retornaram a suas caixas-moradia e o aparato campo aberto foi limpo com álcool 5% (para eliminar possíveis odores deixados por outros animais) e deixado para secar completamente. O comportamento animal foi mensurado pelas filmagens de maneira automática pelo software *Ethovision*® (*Ethovision; Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA*). O *EthoVision*® é um sistema de rastreamento em vídeo, de análise de movimento e reconhecimento comportamental (NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2001).

Diversos parâmetros foram analisados por meio do programa descritos no **Quadro 3**. As sessões experimentais foram realizadas a tarde (entre às 11h00 e às 16h00) em sala experimental sob luz de média intensidade no laboratório de comportamentos do biotério.

Parâmetros avaliados	Descrição
Distância percorrida	Distância percorrida pelo animal dentro do campo medida em cm
Tempo na ZP	Tempo total em segundos que o filhote gasta dentro da zona periférica do campo aberto
Frequência na ZP	Número de vezes que o animal visitou a zona periférica dentro do campo
Tempo na ZC	Tempo total em segundos que o filhote gasta dentro da zona periférica do campo aberto
Frequência na ZC	Número de vezes que o animal visitou a zona periférica dentro do campo
Imobilidade (s)	Tempo em segundos gasto pelo animal sem exercer nenhum movimento dentro do campo
Frequência de imobilidade	Número de vezes que o animal permaneceu imóvel
Mobilidade (s)	Tempo em segundos gasto pelo animal movimentando-se dentro do campo
Frequência de mobilidade	Número de vezes que o animal exerceu movimento
Rotação	Número de vezes que o animal girou em seu próprio eixo
Velocidade média	Velocidade média que o animal exerceu para percorrer no campo aberto
Transição entre ZP e ZC	Número de vezes que o animal transitou entre uma zona e outra da arena

Quadro 3 Resumo dos parâmetros avaliados durante o teste de campo aberto

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

3.3.5 Avaliação do comportamento repetitivo de *grooming* espontâneo em ratos Wistar tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5 durante o PND 60

A autolimpeza (*self-grooming*) em animais é considerado um comportamento inato, envolvido com a manutenção da limpeza corporal, além de exercer importante papel em outros processos fisiológicos como a termorregulação, comunicação social e reduzida excitação comportamental (FENTRESS, 1988; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992).

O self-grooming é um dos comportamentos mais observados em roedores e possui organização sequencial complexa padronizada com características de progressão cefalocaudal (FENTRESS, 1988; KALUEFF *et al.*, 2007a; KALUEFF; TUOHIMAA, 2005; SONG; BERRIDGE; KALUEFF, 2016; SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). O teste de *grooming* espontâneo em roedores é empregado para avaliar padrões complexos de atividades motoras, conhecidos como padrão de cadeia sintática (KALUEFF *et al.*, 2016a; SONG; BERRIDGE; KALUEFF, 2016). Problemas motores e estereotipias são observados no autismo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), e para avaliar esse prejuízo, ratos adolescentes expostos prénatalmente ao VPA foram submetidos ao teste de *grooming* durante o PND 60 (**Figura 11**).

O experimento foi adaptado dos estudos de Kalueff e colaboradores (2016), que basearam a avaliação da microestrutura do *grooming* pela divisão do animal em cinco quadrantes: patas dianteiras, face/cabeça, corpo, patas traseiras e genital/cauda (KALUEFF *et al.*, 2007a, 2016a).

Figura 11 Sequência da progressão cefalocaudal do *self-grooming*. Divisão do animal em cinco quadrantes: patas dianteiras (1), face/cabeça (2), corpo (3), patas traseiras (4) e genital/cauda (5)


Parâmetros avaliados	os Descrição		
Frequência de grooming	A frequência de <i>grooming</i> corresponde ao número de vezes que o rato realizou movimentos de autolimpeza, como lambida, lavagem ou aliciamento dos pêlos das patas dianteiras, face/cabeça, corpo, patas traseiras ou genital/cauda (Figura 10)		
<u>Tempo de grooming</u>	Tempo total em segundos que o rato passou realizando movimentos de autolimpeza, como lambida, lavagem ou aliciamento dos pêlos das patas dianteiras, face/cabeça, corpo, patas traseiras ou genital/cauda		
<u>Grooming total</u>	Considerado como avaliação da microestrutura do <i>grooming</i> , corresponde ao número de vezes que o rato realizou movimentos de autolimpeza, como lambida, lavagem ou aliciamento dos pêlos nos cinco quadrantes corporais durante a mesma crise de grooming		
<u>Levantar</u>	Número de vezes que o animal se sustentava apenas pelas patas traseiras, de maneira a explorar a gaiola		
<u>Bolos fecais</u>	Número de bolos fecais produzidos pelo animal durante a sessão de teste. Este parâmetro indica nível de estresse do animal ao ambiente novo.		

Quadro 4 Resumo dos parâmetros avaliados durante o teste de *grooming* espontâneo

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

As passagens de um quadrante ao outro compreendem as transições nomeadas de crises de *grooming*, e entre uma crise e outra deve haver 5 segundos de intervalo para contabilizar a sequência (KALUEFF *et al.*, 2007a, 2016a). Foi considerado *grooming* total o animal que realizou a autolimpeza nos cinco quadrantes corporais durante a mesma crise de *grooming*.

Os parâmetros avaliados nos animais foram descritos no **Quadro 4** (BERRIDGE *et al.*, 2005). Para realizar o teste de *grooming*, os ratos foram colocados em uma caixa de acrílico (30x30x30 que possui um espelho na parte posterior)

durante 10 minutos. As sessões foram filmadas por uma câmera Sony HandyCAM (posicionada frontalmente ao aparato possibilitando total observação do animal) e os vídeos foram analisados individualmente. Os comportamentos foram quantificados manualmente por um único pesquisador. O experimento foi conduzido à tarde (entre às 11h00 e às 16h00) em sala experimental sob luz ambiente de média intensidade.

3.3.6 Avaliação do comportamento de *grooming* induzido por sacarose em ratos *Wistar* tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5 durante o PND 61

O teste de Splash é utilizado como marcador comportamental de anedonia (perda de interesse em coisas que antes eram agradáveis) em roedores, geralmente induzidos em modelos de depressão (SANTARELLI et al., 2003). A ansiedade e depressão são prejuízos adicionais presentes em adolescentes e adultos com TEA (DEMETRIOU et al., 2018; WHITE et al., 2018), e nesse trabalho avaliamos o comportamento dos ratos tratados com VPA no GD 12,5 em relação ao grooming induzido pela solução de sacarose. Para induzir o self-grooming, uma solução de sacarose 10% foi aplicada na porção dorsal de cada rato (0,40 mL), método que foi adaptado de estudos anteriores (ISINGRINI et al., 2010; SANTARELLI et al., 2003). Durante o PND 61, os ratos foram borrifados com solução de sacarose 10% e colocados em uma caixa de acrílico (30x30x30 que possui um espelho na parte posterior) em sessões de 10 minutos. Os movimentos de grooming (lambida ou lavagem ou aliciamento dos pêlos) e o comportamento motivacional foram observados nos animais durante o teste de Splash (ISINGRINI et al., 2010; SURGET; BELZUNG, 2008). Os parâmetros avaliados nos animais foram descritos anteriormente no Quadro 4.

Figura 12 Sequência da progressão cefalocaudal do *self-grooming* induzido por sacarose 10%. Divisão do animal em cinco quadrantes: patas dianteiras (b), face/cabeça (c), corpo (e), patas traseiras (f), genital/cauda (d) e exploração vertical (a)



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

O experimento foi filmado por uma câmera Sony HandyCAM (posicionada frontalmente ao aparato possibilitando total observação do animal) e os vídeos foram analisados individualmente. Os comportamentos foram quantificados manualmente por um único pesquisador. O experimento foi conduzido à tarde (entre às 11h00 e às 16h00) em sala experimental sob luz ambiente de média intensidade (**Figura 12**).

3.3.7 Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado no PND 62 na prole de ratas Wistar tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5

O teste do labirinto em cruz elevado é empregado amplamente na literatura para avaliação de comportamento tipo-ansioso, exploratório e locomotor (GULINELLO; SMITH, 2003; PELLOW *et al.*, 1985). Para avaliar o comportamento tipo-ansioso, os ratos que receberam VPA no GD 12,5 foram submetidos ao teste labirinto em cruz elevado durante o PND 62.

Parâmetros avaliados	Descrição
<u>Tempo nos braços fechados</u>	Tempo total gasto pelo animal nos braços fechados do labirinto
<u>Tempo nos braços abertos</u>	Tempo total gasto pelo animal nos braços abertos do labirinto
Entrada nos braços fechados	Número de vezes que o animal visitou um dos braços fechados
Entrada nos braços abertos	Número de vezes que o animal visitou um dos braços abertos
Comportamento de risco	Número de vezes em que o animal projeta a cabeça para fora e ou para baixo do aparato, explorando o ambiente a sua volta.
Cruzamento entre os braços	Número de vezes que o animal cruza uma área a outra do labirinto (aberta e fechada)

Quadro 5 Resumo dos parâmetros avaliados durante o labirinto em cruz elevado

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

O aparato é constituído de estruturas de madeiras em forma de cruz, com dois braços abertos (50x10 cm) e dois braços fechados (50x10x40 cm) conectados por uma plataforma central (10x10 cm) e elevado a 55 cm do chão (Figura 13).

Para realizar o teste, cada animal foi posicionado individualmente no centro do labirinto (com a cabeça voltada para um dos braços fechados) e filmado por um período de 5 minutos. Depois de finalizada a sessão, os animais retornaram a suas caixas-moradia e o aparato labirinto em cruz elevado foi limpo com álcool 5% (para eliminar possíveis odores deixados por outros animais) e deixado para secar completamente. O comportamento natural do animal é a permanência nos braços fechados sendo os braços abertos aversivos (RODGERS; DALVI, 1997). Depois de finalizada a sessão, os animais retornaram a suas caixas-moradia e o aparato foi limpo com álcool 5% (para eliminar possíveis odores deixados por outros animais) e deixado para secar completamente. Diversos parâmetros foram quantificados manualmente por um único pesquisador descritos no Quadro 5. As sessões experimentais foram realizadas a tarde (entre às 11h00 e às 16h00) em sala experimental sob luz de média intensidade no laboratório de comportamentos do biotério.

Figura 13 Ilustração do teste de labirinto em cruz elevado



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

3.3.8 Avaliação do comportamento na caixa claro-escuro (CCE) no PND 62 na prole de ratas *Wistar* tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5

O comportamento tipo-ansioso testado na caixa claro-escuro é baseado na aversão inata dos roedores a ambientes iluminados (COSTALL *et al.*, 2011). Os roedores naturalmente sentem-se seguros em áreas escuras, por isso o modelo de teste CCE identifica o período em que os animais permanecem na área clara ou escuro como efeitos tipo-ansioso (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; ONAIVI; MARTIN, 1989). Nesse trabalho o teste da caixa claro-escuro foi empregado para verificar os prejuízos causados pelo VPA no GD 12,5 em ratos durante o PND 62.

A CCE é constituída com dois compartimentos de acrílico, sendo um escuro com medidas menores (21,5x34,5 cm), o outro claro possui medidas maiores (21,5x43,6 cm) e um foco de luz (lâmpada de 60 watts).



Figura 14 Ilustração do aparato caixa claro-escuro

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os compartimentos são separados por uma parede que possui uma porta, por onde os animais podem atravessar (**Figura 14**). O compartimento claro da CCE funciona como estímulo ansiogênico para os roedores, e o teste irá analisar justamente o conflito entre a motivação de explorar e a de evitar o ambiente claro (aversivo) dos animais. Durante o PND 62, cada rato foi colocado individualmente no aparato dentro do compartimento claro, com a cabeça voltada em direção oposta a porta da CCE. As sessões foram filmadas durante 5 minutos e os parâmetros avaliados estão descritos no **Quadro 6**.

Parâmetros avaliados	Descrição

Quadro 6 Resumo dos parâmetros avaliados durante a caixa claro-escuro

Parametros avallados	Descriçao
Tempo no compartimento escuro	Tempo total gasto pelo animal no compartimento escuro da caixa
<u>Tempo no compartimento claro</u>	Tempo total gasto pelo animal no compartimento claro da caixa
Transição entre os lados	Número de vezes que o animal transitou de um compartimento para o outro

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Depois de finalizada a sessão, os animais retornaram a suas caixas-moradia e o aparato foi limpo com álcool 5% (para eliminar possíveis odores deixados por outros animais) e deixado para secar completamente. Os vídeos foram analisados posteriormente e os parâmetros quantificados manualmente por um único pesquisador. As sessões experimentais foram realizadas a tarde (entre às 11h00 e às 16h00) em sala experimental sob luz de média intensidade

3.4 Estudo molecular do encéfalo dos ratos

3.4.1 Eutanásia e coleta dos encéfalos com as áreas de interesse

Após a realização dos testes comportamentais, os animais submetidos ao VPA no GD 12,5 e tratados ou não com o metilfenidato (5 mg/kg) foram eutanasiados por decapitação de acordo com os métodos preconizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal. A decapitação consiste na remoção da cabeça do animal por meio de uma guilhotina, o que permite a coleta eficiente de estruturas do SNC. As estruturas encefálicas de interesse foram removidas em 3 minutos por um pesquisador experiente, e o material biológico foi processado adequadamente de acordo com o teste molecular a ser realizado posteriormente. Na **Figura 15** é possível analisar todas as estruturas cerebrais utilizadas nos testes moleculares desse trabalho.

Figura 15 Esquema de corte sagital do cérebro de rato com todas as estruturas em destaque que foram utilizadas nesse estudo



Fonte: Cezar, L. C. (2022). VTA = Área Tegmental Ventral; SN = Substância Negra; PAG = Substância Cinzenta Periaquedutal

3.4.2 Determinação dos níveis de DA, 5-HT, NA e *turnover* no encéfalo da prole de ratas Wistar expostas ao VPA no GD 12,5 e com tratamento de metilfenidato de forma aguda ou prolongada via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A eutanásia ocorreu após o último teste comportamental. Para avaliar os diferentes aspectos neuroquímicos do autismo, as seguintes estruturas no encéfalo dos ratos foram coletadas: estriado, córtex frontal, hipocampo, hipotálamo e PAG.

Os encéfalos dos ratos foram retirados da caixa craniana e rapidamente colocados em uma placa refrigerada, com o intuito de preservar o órgão e dissecção de suas estruturas. As amostras foram acondicionadas em microtubos e colocadas em gelo seco para o rápido congelamento. A seguir, as amostras foram pesadas e estocadas em freezer (-80° C) para processamento em até 30 dias.

As estruturas encefálicas coletadas foram homogeneizadas com solução de ácido perclórico (CIHO₄) 0,1 M (Merk®) contendo 0,02% de metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅), ácido dissódico etilenodiaminotetracético (EDTA) e uma concentração conhecida de ácido 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA – padrão interno para a avaliação

dos neurotransmissores), o DHBA é utilizado como padrão interno por possuir as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas. O homogenato foi preparado com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência, sendo o volume de ácido de 15 a 20 vezes o peso das estruturas encefálicas estudadas.

Após a homogeneização, as estruturas encefálicas foram deixadas *overnight* em refrigerador a 4°C para a precipitação das proteínas e ácidos nucléicos. Posteriormente, após o período de 16h, o material foi centrifugado a 10.000 rpm (centrífuga *Eppendorf* SE 5804 series R – refrigerada a 4°C) durante 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e colocado em microtubos novos e armazenados em freezer -80° C, para posterior quantificação meio do método de HPLC descrito previamente (FELICIO *et al.*, 1996; NASELLO; FELICIO, 1990). Os seguintes neurotransmissores e metabólitos foram analisados:

- Dopamina (DA), ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA);
- Serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroindol 3-acético (5- HIAA);
- Noradrenalina (NA) e ácido vanil-mandélico (VMA).

Além dos neurotransmissores, a taxa de renovação de neurotransmissores (*turnover*) foi calculada através da razão neurotransmissor/metabólito. As análises foram feitas por cromatografia liquida da alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-ED – *High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detection*) no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo como o descrito anteriormente (SANDINI *et al.*, 2018). Para as avaliações, foi utilizado um cromatógrafo Shimatzu® (Modelo 20A), composto por um injetor automático com válvula injetora (volume entre 20 μl), bombas de fluxo quaternárias, coluna cromatográfica (150 x 4,6 mm, Shimpak – ODS C 18) com filtro de linha e um detector eletroquímico Antec Decade. Foi utilizada a técnica de cromatografia em fase reserva com pareamento iônico, que é baseada na cromatografia de partição ou absorção.

A fase móvel utilizada foi um sistema isocrático formado por tampão citrato 0,02 M, 5% de acetonitrila, 0,12 nM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) sódico e 0,0556% de ácido 1- heptanosulfônico (HSA). O pH foi ajustado para 2,71 com ácido ortofosfórico (H₃PO₄). A fase móvel foi filtrada em um sistema à vácuo antes de ser utilizada no HPLC-ED. Após esse procedimento ela circulou no sistema

overnight para equilíbrio da coluna, que foi acondicionada em um fluxo de 1,2 ml/min. O detector foi mantido com um potencial de 0,8 V no eletrodo de trabalho.

Para o preparo das soluções dos padrões das monoaminas, foram utilizados padrões de concentração 1 nM de cada neurotransmissor e seu metabólito diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e estocados em freezer -80°C. No momento da análise os padrões foram descongelados e diluídos de 2.500 a 10.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M. Foram injetados pelo menos dois padrões no HPLC-ED diariamente, um antes e outro ao final das dosagens para a utilização dos valores como referência (SANDINI *et al.*, 2018).

O equipamento foi padronizado diariamente, no início e no término da quantificação, com uma solução de trabalho, com concentração conhecida, de neurotransmissores, seus metabólitos e DHBA, empregando-se como diluente uma solução de ácido perclórico, 0,1M, contendo EDTA e metabissulfito de sódio.

Os neurotransmissores e seus metabólitos foram detectados a partir do seu tempo de retenção na coluna cromatográfica comparando-as com os padrões, a concentração foi baseada no valor da área do pico na equação para a curva de calibração. O limite de detecção foi de 0,25 e 1 ng para todos os analitos, o limite de quantificação foi de 10 ng/g de tecido cerebral ou 1,0 ng por 60 ng de sobrenadantes e a taxa de recuperação foi superior a 80% (SANDINI *et al.*, 2018).

3.4.3 Avaliação da expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado e córtex via RT-PCR em ratos expostos ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento com metilfenidato

3.4.3.1 Coleta do material

Para a devida retira das estruturas encefálicas de interesse dos animais no PND 32 após os testes comportamentais, foram submetidos a eutanásia em um procedimento de coleta que durou no máximo 3 minutos. O estriado e o córtex foram dissecados dos encéfalos dos ratos de acordo com as coordenadas de Paxinos & Watson (PAXINOS; WATSON, 1998). Cada estrutura foi acondicionada em microtubos, mergulhadas em nitrogênio líquido, pesadas e estocadas em freezer -80° C para posterior extração de RNA total.

3.4.3.2 Extração do RNA total pelo método TRIZOL

A coleta e processamento do material para extração de RNA total exigiu um preparo diferenciado, assim como de todas as soluções a serem utilizadas de acordo com o descrito anteriormente (TEODOROV *et al.*, 2011).

As amostras de interesse foram descongeladas e mergulhadas em 500 μ l de trizol (TRIzol® Reagent – Invitrogen) e um homogenato foi preparado com o uso da caneta sonicadora de alta frequência. Ao homogenato do encéfalo dos ratos, foi adicionado clorofórmio e centrifugado a 10.000 rpm (centrífuga *Eppendorf* SE 5804 series R – refrigerada a 4°C). Após a exposição do conteúdo celular, o RNA total tornase visível na presença de isopropanol. Após remover o sobrenadante, o *pellet* formado é lavado com 1 mL de álcool etílico 75% em centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Após os microtubos com os *pellets* serem lavados, todo o álcool foi removido dos tubos com auxílio de uma pipetada e 30 μ l de água tratada DEPC foi adicionado nos *pellets*. O RNA extraído foi armazenado em freezer -80° C para posterior quantificação.

3.4.3.3 Quantificação do RNA total

Para a quantificação do RNA total utilizou-se o método fluorímetro por meio do Qubit (Qubit® 3.0 *Fluorometer – Invitrogen*). O aparelho permitiu a quantificação das amostras utilizando corantes específicos, mesmo em baixas concentrações de RNA, esta metodologia confere alta especificidade e sensibilidade (1 μl de amostra é suficiente para a leitura). A quantificação do RNA obtido das amostras de encéfalo de ratos, foi realizado com o kit *Qubit*® *RNA HS Assay* (Invitrogen) baseado nas instruções do fabricante.

3.4.3.4 PCR em tempo real (PCR-RT)

Após a transcrição reversa a reação de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) utilizando o sistema TaqMan (TaqMan™ Fast Advanced Master Mix -Applied Biosystems[™]). Todas as reações foram preparadas em duplicatas para uma placa de 96 poços, e o seguinte protocolo foi empregado para a obtenção de PCR reaction mix: 10 µl de TaqMan[™] Fast Advanced Master Mix 2X, 1 µl de primer/probe 20X (TaqMan [®] Assay primer), 2 µl de cDNA template e 7 µl de DEPC (volume final de 20 µl por reação). Controles negativos utilizando todos os reagentes exceto o cDNA template foram feitos como as reações que utilizaram o material de interesse. Os ciclos de amplificação foram constituídos de 2 minutos a 50º C, 20 segundos a 95º C, 40 ciclos de 3 segundos a 95º C e 30 segundos a 60º C. À medida que a reação de amplificação se processa, um gráfico é construído, em que a ordenada corresponde ao número de cópias de DNA e as abscissas o número de ciclos. O ponto nas abscissas corresponde ao início de trecho linear chamado Ct (cycle threshold), ou seja, o ciclo de amplificação onde o acúmulo de fluorescência na amostra atinge a linha de detecção arbitrária (TEODOROV et al., 2011). O resultado é coletado durante a fase exponencial de amplificação, quando a emissão de fluorescência é proporcional ao número inicial de cópias do produto amplificado, ou concentração da amostra.

3.4.3.5 Quantificação relativa do PCR-RT pelo método 2-ΔΔCt

Para realizar as análises obtidas após o PCR-RT, o sinal da sequência de interesse foi comparado com o controle endógeno (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O método de Livak e Schmittgen (2001) é baseado na quantificação relativa (*relative quantification* – RQ) gerado a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores de Ct foram gerados a partir da normalização da expressão do gene de interesse em relação ao gene constitutivo (Ct = Ct alvo - Ct controle endógeno). O valor de Ct foi obtido pela média entre as duas repetições técnicas de cada amostra biológica, sendo corrigido pela

eficiência das reações. Este método considera que a eficiência é próxima a 1, valores de *fold-change* maiores que 1 indicam um aumento de expressão para o gene alvo, e o *fold-change* menor que 1 indica diminuição de expressão gênica. Os dados foram apresentados como expressão relativa de RNA mensageiro em unidades arbitrárias, com a média ± DP (desvio padrão).

Gene	Descrição	Sequência 5'- 3'	Amplicon
Drd1	Receptor de dopamina tipo D1 no SNC	F: CAGGTGCTAAAACTGTCCGA R: TTTCATTGGCTCATAAAGTGC	83
Drd2	Receptor de dopamina tipo D2 no SNC	F: TAGGAACCACATAGGAAAGCA R: ATGGGATACTATAACAAGGTAGGAC	64
GAPDH	Enzima gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase (gene constitutivo)	F: GTCTCCTGTGACTTCAACAG R: AGTTGTCATTGAGAGCAATGC	76
SIc6a3/ DAT1	Transportador de dopamina	F:GGACTATGGAGCCTACATCTTCCC R: CTCTGTGAAGAGCAGGTGTCC	111
Th	Tirosina hidroxilase é o passo limitante na síntese de catecolaminas	F: TCGGAAGCTATTGCAGAGA R: TTCCGCTGTGATTTCCACATG	60

Quadro 7	Resumo dos genes	utilizados no	PCR-RT · F=	forward e R=	reverse
Quadro 1	rtesume des genes		1 01 11.1 -		1010130

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

3.4.4 Modulação de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral e da substância negra após exposição pré-natal com VPA no GD 12,5 por meio da imunofluorescência Os ratos tratados com VPA no GD 12,5 foram mantidos em condições de biotério até o momento do experimento. Durante o PND 35, os animais foram pesados e anestesiados para posteriormente serem submetidos a perfusão. Foram administrados por via intraperitoneal xilazina (10 mg/kg) e cetamina (70 mg/kg) nos animais. Após 25 minutos de administrado o anestésico e o relaxante muscular, determinou-se o grau da anestesia nos ratos observando o movimento das vibrissas e das orelhas em resposta ao sopro suave, a não retração da pata ou da cauda em resposta a um pinçamento, frequência respiratória e cardíaca (CROMPTON *et al.*, 2006). Após constatado que os ratos tenham atingido o plano anestésico, cada animal foi submetido a perfusão transcardíaca.

3.4.4.1 Perfusão Transcardíaca

Cada animal foi submetido à perfusão transcardíaca, e para tanto, foram posicionados em decúbito dorsal sobre placa congelada. Foi iniciada a toracotomia com incisão da pele, músculos e arco costal, sendo estes afastados com auxílio de pinças cirúrgicas para exposição do coração. Com uma cânula, foi realizada uma cardiopunção no ventrículo esquerdo do animal, a qual é direcionada para o cone arterioso e fixada no coração com um porta-agulha Mayo, e, por fim, uma incisão no átrio direito evitando o rompimento das pequenas estruturas cardíacas que pode ser causado pela alta pressão da perfusão (**Figura 16**).

A cânula introduzida no coração do animal foi conectada a uma bomba peristáltica com volume médio de 30 mL/min, e então perfundido solução salina 0,9% durante 5 minutos (solução de lavagem), seguido de solução fixadora paraformaldeído (PFA) 4% (75 mL de PFA 8% diluído em 75 mL de solução tampão fosfato com pH 7,4) durante 17 minutos. É observado mudança na coloração do animal e contração muscular dos membros, evidenciando a correta penetração do fixador. Com o intuito de preservar o encéfalo, a cabeça do animal foi coberta por gelo picado.



Figura 16 Esquema com todas as etapas da perfusão transcardíaca em ratos

Fonte: Adaptado de GAGE et al. (2012).

Finalizada a etapa de perfusão, os ratos foram decapitados e os encéfalos extraídos da caixa craniana cuidadosamente, sendo acondicionados em tubos Falcon com solução fixadora de paraformaldeído 4% e sacarose 20% por 2 horas em temperatura de 4º C. Em seguida, os encéfalos foram imersos em solução crioprotetora (tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 e sacarose 20%) e armazenados por um período de 48 horas em geladeira até serem submetidos à microtomia.

3.4.4.2 Microtomia e processamento histológico

Os encéfalos devidamente fixados foram submetidos a microtomia com início caudal/rostral. Em um micrótomo de deslizamento (SM2010 R - Leica Biosystems), os encéfalos foram congelados com dióxido de carbono sólido e submetidos a secções coronais de 45 µm. Os cortes foram imersos em solução *antifreezing* (PBS 0,1 M pH 7,4, sacarose 30% e etilenoglicol), e distribuídos em cinco tubos, de maneira cíclica e sequenciada, de modo a manter a distância entre uma secção e outra

(aproximadamente 150 μm). As secções dos encéfalos (**Figura 17**) foram estocadas em freezer -20° C para posterior utilização em procedimentos de imunofluorescência.

Figura 17 Ilustração com as coordenadas do bregma para as secções utilizadas na imunofluorescência. Os cortes analisados começam no Bregma -4.20 mm até -6.84 mm na região entre substância *nigra* e área tegmental ventral



Fonte: Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2012.

3.4.4.3 Imunofluorescência indireta

A técnica de imunofluorescência para a detecção da TH⁺ foi realizada em secções de 45 µm "*free floating*". Os cortes de encéfalo foram colocados em placas de 6 poços (volume de trabalho por poço 1,90 – 2,90 mL) e então lavados com solução KPBS 0,02 M pH 7,4 (salina tamponada com fosfato e potássio) 6 vezes durante 5 minutos em agitação. Após as lavagens, os cortes coronais foram incubados em KPBS e peróxido de hidrogênio 0,3 % por 15 minutos, após, mais 6 lavagens com KPBS foram feitas por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, as secções foram incubadas *overnight* com anticorpo primário anti-TH (anti-mouse, MAB318 - Sigma-Aldrich) diluído em solução de bloqueio KPBS Triton X-100 à 0,3% (KPBS-Tx) contendo 3% de soro normal de cabra (NGS) (Sigma-Aldrich, USA). Os cortes foram

mantidos em mesa agitadora por 16 horas em temperatura ambiente. No dia seguinte, as fatias coronais de encéfalos seguiram procedimentos de lavagens (KPBS 6 vezes durante 5 minutos). Estas foram incubadas com o anticorpo secundário fluorescente compatível, anti-mouse para tipo-Th (Goat Alexa-Fluor 488, Molecular Probes, Invitrogen, EUA) diluídos em KPBS-Tx por 2 horas em uma sala escura (temperatura ambiente), seguida de lavagem em KPBS.

Os cortes foram submetidos a montagem em lâminas silanizadas (Starfrost – Knittel) e permaneceram em sala escura a temperatura ambiente até secarem completamente. Após secas, as lâminas foram cobertas com meio de montagem DAPI (VECTASHIELD® - VECTOR LABORATORIES) e fixadas com lamínulas.

Todas as amostras foram processadas concomitantemente e incubadas durante o mesmo tempo médio. Decorrido o procedimento acima descrito, utilizou- se o microscópio confocal (Olympus FV1000) para a visualização das marcações fluorescentes e captura das imagens.

3.4.4.4 Quantificação da imunofluorescência

Para análise e quantificação das células imunorreativas a Th⁺, imagens digitais foram capturadas em microscópio Olympus FV1000 confocal acoplado a uma câmera digital. Obtivemos imagens da área tegmentar ventral (VTA), substância negra compacta (SNc) e substância negra reticular (SNr) de diferentes níveis da estrutura utilizando 5 animais por grupo. A análise foi realizada somente no hemisfério esquerdo do encéfalo de cada corte (capturadas ao total de 10 imagens por corte), e a quantificação do número de neurônios TH-positivos foram realizados de forma manual. Os valores de células TH-positivas no hemisfério experimental dos grupos SALINA e VPA foram submetidos a análise estatística T de *student*.

3.5 Delineamento Experimental

Ratas Wistar com 120 dias de vida foram acasaladas e a prenhez confirmada no GD 0 (**Figura 18**). Para reprodução do modelo de autismo, as ratas gestantes foram expostas ao VPA (400 mg/kg) durante o GD 12,5. Após o nascimento, no PND 2 as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes, sendo 4 machos e 4 fêmeas. Visando avaliar a resposta desses animais frente à exposição ao VPA pré-natal e a administração do metilfenidato (5 mg/kg) agudo e prolongado, diversos testes comportamentais e moleculares foram empregados nesse estudo. Para melhor elucidar as etapas do trabalho, os experimentos foram divididos em três partes.





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

3.5.1 PARTE I – Estudo dos efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato agudo ou prolongado na prole masculina de ratas tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5

Durante essa etapa do trabalho, as proles masculinas de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 foram submetidas a diversos testes comportamentais, que avaliaram sintomas associados ao autismo que confirmam o modelo experimental. Para isso, os animais machos *Wistar* foram submetidos a avaliação: (1) da comunicação

(vocalização ultrassônica no PND 11), (2) os comportamentos repetitivos e a capacidade cognitiva (labirinto em T no PND 29) e (3) a socialização (comportamento de brincar no PND 30).

3.5.1.1 Experimento 1 - Avaliação dos efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg no PND 32) na prole masculina de ratas expostas ao VPA pré-natal

O experimento 1 ocorre no PND 32, uma dose de metilfenidato (5 mg/kg) oral foi administrada em ratos machos tratados pré-natalmente com VPA. Após 45 minutos que os animais receberam o desafio farmacológico com metilfenidato, a atividade locomotora foi observada no teste de campo aberto. Ao final do teste, os animais foram submetidos a decapitação e coleta das estruturas cerebrais de interesse. Para o teste de expressão gênica por PCR-RT, a dissecção dos encéfalos foi feita de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson no hemisfério esquerdo dos animais (PAXINOS; WATSON, 1998). Os níveis dos neurotransmissores e seus metabólitos feitas pelo método de HPLC utilizou os dois hemisférios cerebrais dos ratos (**Figura 12**).

Figura 19 Linha do tempo com os experimentos realizados em machos e fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal e desafiados com metilfenidato agudo



3.5.1.1 Experimento 2 - Avaliação dos efeitos do tratamento farmacológico prolongado (5 mg/kg PND 21 ao PND 32) com metilfenidato na prole masculina de ratas expostas ao VPA pré-natal

O experimento 2 ocorre no período do PND 21 ao PND 32, uma dose de metilfenidato (5 mg/kg) oral foi administrada diariamente em ratos machos tratados pré-natalmente com VPA. A administração prolongada do metilfenidato pode ocasionar mudanças estruturais em circuitos envolvendo dopamina, além de traduzir essa neuroplasticidade em alterações comportamentais. Logo após o desmame no PND 21, machos *Wistar* receberam diariamente por gavagem 5 mg/kg de metilfenidato. No 10º dia de tratamento com metilfenidato, ratos expostos ao VPA prénatal foram avaliados em relação a socialização (comportamento de brincar).

Figura 20 Linha do tempo com os experimentos realizados em machos e fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal e tratados com metilfenidato prolongado





Após 12 dias de tratamento com metilfenidato, os animais foram testados em relação a atividade locomotora observada no teste de campo aberto. Ao final do teste, os animais foram eutanasiados e as estruturas cerebrais de interesse coletadas, como

descrito anteriormente. Para o teste de expressão gênica por PCR-RT, a dissecção dos encéfalos foi feita de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson no hemisfério esquerdo dos animais (PAXINOS; WATSON, 1998). Os níveis dos neurotransmissores e seus metabólitos feitas pelo método de HPLC utilizou os dois hemisférios cerebrais dos ratos (**Figura 20**).

- 3.5.2 PARTE II Estudo dos efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato agudo ou prolongado na prole feminina de ratas tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5
- 3.5.2.1 Experimento 1 Avaliação dos efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg no PND 32) na prole feminina de ratas expostas ao VPA pré-natal

Depois de confirmada a gestação, ratas foram expostas ao VPA no GD 12,5 e os sinais e sintomas tipo-autistas reproduzidos em suas proles. O EXPERIMENTO I ocorre no PND 32, uma dose de metilfenidato (5 mg/kg) oral foi administrada em ratas fêmeas tratadas pré-natalmente com VPA. Após 45 minutos que os animais receberam o desafio farmacológico com metilfenidato, a atividade locomotora foi observada no teste de campo aberto. Ao final do teste, os animais foram submetidos a decapitação e coleta das estruturas cerebrais de interesse. Para o teste de expressão gênica por PCR-RT, a dissecção dos encéfalos foi feita de acordo com as coordenadas de Paxinos e Watson no hemisfério esquerdo dos animais (PAXINOS; WATSON, 1998). Os níveis dos neurotransmissores e seus metabólitos feitas pelo método de HPLC utilizou os dois hemisférios cerebrais das ratas (**Figura 19**). 3.5.2.2 Experimento 2 - Avaliação dos efeitos do tratamento farmacológico prolongado (5 mg/kg PND 21 ao PND 32) com metilfenidato na prole feminina de ratas expostas ao VPA pré-natal

Depois de confirmada a gestação, ratas foram expostas ao VPA no GD 12,5 e os sinais e sintomas tipo-autistas reproduzidos em suas proles. Logo após o desmame no PND 21, fêmeas *Wistar* receberam diariamente por gavagem 5 mg/kg de metilfenidato. No 10º dia de tratamento com metilfenidato as ratas foram avaliadas em relação a socialização (comportamento de brincar). Após 12 dias de tratamento com metilfenidato, os animais foram testados em relação a atividade locomotora observada no teste de campo aberto. Ao final do teste, os animais foram eutanasiados e as estruturas cerebrais de interesse coletadas, como descrito anteriormente (**Figura 20**).

- 3.5.3 PARTE III Efeitos da exposição ao VPA no GD 12,5 na prole masculina e feminina de ratas em diferentes fases do desenvolvimento comportamental e no SNC
- 3.5.3.1 Experimento 1 Avaliação de neurônios TH+ na substância nigra em machos Wistar submetidos ao VPA durante o GD 12,5

Para esse experimento foram avaliados dois grupos. O primeiro grupo foi o SALINA, que é composto por filhotes das ratas que foram tratadas pré-natalmente com salina no GD 12,5. O segundo grupo foi o VPA, que é composto por filhotes das ratas tratadas pré-natalmente com ácido valpróico no GD 12,5. Após o desmame, machos Wistar foram alojados em caixas moradia no biotério até o momento do experimento. No PND 35, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca e o cérebro processado para realizar a imunofluorescência de neurônios TH⁺ (**Figura 20**).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

3.5.3.2 Experimento 2 – Avaliação comportamental e molecular de ratos expostos ao VPA pré-natal durante a maturidade sexual

Durante essa etapa do experimento, os animais foram testados para verificar possíveis alterações no neurodesenvolvimento durante a vida juvenil/adulta. Para obtenção do modelo experimental de autismo, ratas prenhes foram expostas ao VPA (400 mg/kg) no GD 12,5 ou solução salina e separadas em grupos experimental e controle. Os animais foram mantidos com suas mães sem interferência externa até o momento do desmame no PND 21. Após o desmame foram selecionados aleatoriamente, dois machos e duas fêmeas de cada ninhada. Os animais selecionados foram mantidos juntos na gaiola moradia de acordo com o gênero até o dia do teste.

Testes comportamentais para a avaliação da ansiedade foram empregados nos ratos machos durante a fase de maturidade sexual, relatada dos 50 aos 60 dias de idade (ANDRADE, 2002). O teste de *grooming* espontâneo foi realizado ao PND 60, e *grooming* induzido por sacarose a 10% ao PND 61. Os animais foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado e a caixa claro-escuro no PND 62. Ao final do último teste comportamental, os animais foram mantidos em condições de

biotério até alcançarem a idade adulta (PND 90). No PND 90 os animais foram devidamente eutanasiados por decapitação, e as estruturas cerebrais de interesse foram retiradas para análise neuroquímica por HPLC (n = 10 para cada grupo) (**Figura 22**).



Figura 22 Linha do tempo com os experimentos realizados em machos Wistar expostos ao VPA prénatal

3.5.3.3 Experimento 3 – Avaliação comportamental e molecular de ratas expostos ao VPA pré-natal durante a maturidade sexual

Durante essa etapa do experimento, os animais foram testados para verificar possíveis alterações no neurodesenvolvimento durante a vida juvenil/adulta. Para obtenção do modelo experimental de autismo, ratas prenhes foram expostas ao VPA (400 mg/kg) no GD 12,5 ou solução salina e separadas em grupos experimental e controle. Os animais foram mantidos com suas mães sem interferência externa até o momento do desmame no PND 21. Após o desmame foram selecionados aleatoriamente, dois machos e duas fêmeas de cada ninhada. Os animais

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

selecionados foram mantidos juntos na gaiola moradia de acordo com o gênero até o dia do teste.

Testes comportamentais para a avaliação da ansiedade foram empregados nas ratas fêmeas durante a fase de maturidade sexual, relatada dos 50 aos 60 dias de idade (ANDRADE, 2002). O teste de *grooming* espontâneo foi realizado ao PND 60, e *grooming* induzido por sacarose a 10% ao PND 61. Os animais foram submetidos ao teste de labirinto em cruz elevado e a caixa claro-escuro no PND 62. Ao final do último teste comportamental, os animais foram mantidos em condições de biotério até alcançarem a idade adulta (PND 90). No PND 90 os animais foram devidamente eutanasiados por decapitação, e as estruturas cerebrais de interesse foram retiradas para análise neuroquímica por HPLC (n = 10 para cada grupo) (**Figura22**).

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram verificadas por meio do software GraphPad Prism 8 (GraphPad® Software, Inc., San Diego, CA, USA). Para todos os dados foram estabelecidos o limite mínimo de significância de 95% (p<0,05). Primeiramente foram verificados homocedasticidade dos dados pelo teste de Bartlet 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 paramétricos teste t de *Student*. O teste estatístico empregado para análises múltiplas foi a de variância ANOVA em duas vias, seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. Ainda para correlacionar os dados analisados, o teste de regressão linear foi aplicado. Os dados estão expressos como média ± erro padrão (EP) ou mediana (mínimo e máximo).



4 RESULTADOS

4.1 PARTE II – Estudo dos efeitos agudo e prolongado do metilfenidato na prole feminina de ratas tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5: principais efeitos comportamentais e centrais

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

4.1.1 Experimento 1 - Avaliação dos efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg no PND 32) na prole masculina de ratas expostas ao VPA pré-natal

Para reproduzir o modelo de autismo induzido pelo VPA, depois de confirmada a gestação, ratas com 120 dias de vida foram tratadas com solução salina 0,9% ou VPA no GD 12,5 (400 mg/kg) intraperitoneal. Os filhotes expostos ao VPA foram avaliados em diversos testes para estudo dos prejuízos comportamentais. O metilfenidato (5 mg/kg) utilizado como desafio farmacológico para ativação do sistema dopaminérgico foi administrado nos machos durante o PND 32. Nessa fase os testes aplicados foram: vocalização ultrassônica (PND 11), alternação espontânea no labirinto em T (PND 29), comportamento de brincar (PND 30) e atividade geral em campo aberto (PND 32). Após o último teste, os animais foram devidamente eutanasiados e os testes moleculares empregados.

4.1.1.1 Avaliação da comunicação no PND 11 por meio da vocalização ultrassônica na prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 A **Tabela 1** descreve e a **Figura 23** ilustra os efeitos da exposição ao VPA na comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole masculina infante de ratas. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes em todos os parâmetros avaliados. O número de vocalizações foi reduzido significativamente nos animais do grupo experimental [t = 4; p = 0,0003], a exposição prévia ao VPA foi capaz de prejudicar as vocalizações quando comparado ao controle. A análise da duração total de vocalizações demonstrou diferenças estatísticas significantes [t = 4,05; p = 0007]. A comparação dos dados revelou que o grupo exposto ao VPA pré-natal diminuiu a duração total de vocalizações. A duração média de vocalização diminuiu nos animais tratados pré-natalmente com VPA [t = 4,97; p < 0, 0001]. Em relação à duração máxima de vocalizações, o tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 foi capaz de diminuir em relação ao grupo controle [t = 6; p < 0,0001].

Da mesma maneira, foram encontradas diferenças quanto à duração total de silêncio [t = 4,69; p = 0,0002]. O VPA foi eficiente em aumentar a duração total de silêncio em relação ao grupo controle. Segundo a análise estatística a duração média de silêncio foi maior no grupo VPA. [t = 4,19; p = 0,0005].

Tabela 1 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA na vocalização ultrassônica na prole masculina de ratas durante o PND 11. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas Wistar, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos)

	Grupos		
Parâmetros	SALINA	VPA	
N° de vocalizações	462,50 ± 72,54	99,10 ± 34,06***	
Total de vocalização (s)	81,91 ± 15,82	13,90 ± 5,561***	
Média de vocalização (s)	0,172 ± 0,017	0,076 ± 0,007****	
Máxima de vocalização (s)	1,143 ± 0,228	0,2464 ± 0,030****	
Total de silêncio (s)	219,1 ± 15,82	294,2 ± 2,231****	
Média de silêncio (s)	0,070 ± 0,177	7,011 ± 1,587***	
Máxima de silêncio (s)	6,556 ± 1,593	53,07 ± 10,08****	

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student.* ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (s) segundos e Nº número.





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (s) segundos e Nº número. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

O tratamento pré-natal com VPA aumentou a duração máxima de silêncio de filhotes machos em relação ao grupo controle. Esses resultados demostraram que o VPA pré-natal prejudicou a comunicação dos filhotes, ou seja, eles passaram menor tempo sem solicitar sua mãe quando estavam em isolamento, observado pela diminuição da vocalização e maior tempo gasto em silêncio.

 4.1.1.2 Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T no PND 29 na prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5

A **Tabela 2** descreve e a **Figura 24** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal 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 de *Mann-Whitney U* foi revelado que a exposição ao VPA no GD 12,5 reduziu a alternação entre os braços quando comparado ao grupo controle [MW = 1, p < 0,0001]. 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.

Tabela 2Avaliação da exposição pré-natal ao VPA no comportamento repetitivo/restritivo e
inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole masculina de ratas durante o PND 29

	SALINA	VPA
Escore das alternâncias	3,3 ± 0,21	1,1±0,17****

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste de Mann-Whitney U. **** *p* < 0,0001.

Figura 24 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) na avaliação do comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T na prole masculina de ratas no PND 29



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste de Mann-Whitney U. ****p < 0,0001. Escores: 0 = nenhuma alternação entre os braços visitados; 1 = uma alternação entre os braços visitados; 2 = duas alternações entre os braços visitados; 3 = três alternações entre os braços visitados; e 4 = quatro alternações entre os braços visitados.

4.1.1.3 Avaliação da socialização pelo comportamento de brincar no PND 30 na prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5

A **Tabela 3** descreve e a **Figura 25** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na avaliação da socialização de ratos durante o PND 30 por meio do comportamento de brincar. De acordo com a análise estatística do teste t de *Student*, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Em relação à frequência de *pinning*, foi possível verificar que o tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 reduziu a interação social [t = 13; p < 0,0001]. A análise estatística verificou a redução na frequência de *darts* no grupo VPA [t = 12,8; p < 0,0001].

Quando os filhotes foram avaliados em relação ao tempo de farejar o companheiro, os ratos tratados pré-natalmente com o VPA diminuíram esse comportamento em relação ao grupo controle [t = 10; p < 0,0001]. O tempo de perseguir também foi menor no grupo VPA [t = 12; p < 0,0001]. Na avaliação da frequência de passar sob/sobre o rato adicionado a gaiola (intruso), os animais VPA reduziram seu comportamento comprometendo a socialização [t = 10; p < 0,0001].





Fonte: Cezar, L. C. (2022). Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *****p* < 0,0001. Representação de (s) segundos. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos). Ratos avaliados durante o PND 30. Cada sessão de teste durou 10 minutos com um rato intruso na mesma gaiola.

Finalmente, quando testado a frequência de levantar dos filhotes, uma redução significativa foi observada no grupo tratado em relação ao controle [t = 5,92; p < 0.0001]. Os resultados previamente expostos sobre a avaliação do

comportamento de brincar demonstraram que o tratamento com VPA alterou o comportamento dos filhotes e diminuiu a brincadeira, solicitaram menos a brincadeira e tiveram uma investigação social menor.

Tabela 3Avaliação da exposição pré-natal ao VPA no comportamento social da prole masculina de
ratas Wistar durante o PND 30. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5:
SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os
grupos)

	Grupos		
Parâmetros	SALINA	VPA	
Pinning	20,40 ± 1,03	3,8 ± 0,74****	
Darts	5,50 ± 0,26	0,70 ± 0,26****	
Farejar (s)	41,80 ± 2,00	16,00 ± 1,18****	
Perseguir (s)	41,40 ± 1,64	14,70 ± 1,57****	
Passar sob/sobre	23,50 ± 1,50	6,10 ± 0,75****	
Levantar	20,70 ± 1,82	8,40 ± 0,99****	

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (s) segundos.

4.1.1.4 Avaliação da atividade locomotora geral em campo aberto no PND 32 em ratos expostos ao VPA pré-natal (GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato pré-teste

A **Tabela 4** descreve e a **Figura 26** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na atividade geral em campo aberto nos filhotes machos de ratas. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Após 45 minutos de administrado o desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg no PND 32), os animais foram avaliados em relação a locomoção.

Tabela 4	Avaliação da exposição pré-natal ao VPA e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg - 45 minutos
	antes do teste) na atividade locomotora geral em campo aberto no PND 32 da prole
	masculina de ratas Wistar (n = 10 para todos os grupos)

	Grupos			
Parâmetros	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
Distância total cm	3087 ± 531	10085 ± 524***	4886 ± 238*####	5790 ± 239*** ^{####}
Distância média cm	0,77 ± 0,04	1,07 ± 0,06**	$0,84 \pm 0,05^{\#}$	0,86 ± 0,03 [#]
Distância máx. cm	20,8 ± 5,76	11,6 ± 0,44	10,6 ± 0,62	10, 7 ± 0,55
Tempo na ZP	290 ± 1,87	290 ± 1,72	284 ± 2,85	295 ± 2,42%
Frequência na ZP	19,8 ± 5,49	37,3 ± 2,19**	21,3 ± 6,28	5,6 ± 1,15###
Tempo médio ZP	36,1 ± 12,4	9,68 ± 1,04	27 ± 5,96	70,7 ± 26,6 ^{##}
Tempo na ZC	5,62 ± 1,47	8 ± 1, 47	8,9 ± 1,89	6,94 ± 1,67
Frequência na ZC	6 ± 1,46	10,1 ± 1,17	5,9 ± 1,21	3,7 ± 0,61
Tempo médio ZC	$0,9 \pm 0,08$	0,74 ± 0,13	1,70 ± 0,25 [#]	1,67 ± 0,31 [#]
Imobilidade (s)	246 ± 8,75	211,4 ± 9,26 ^{%%}	167, 8 ± 10****	233,4 ± 7,9 ^{%%%%}
Frequência de imobilidade	360,4 ± 54,3	547 ± 47,1*	522 ± 34,2	495,8 ± 38,2
Imobilidade média (s)	$0,48 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,07$	0,34 ± 0,05**	0, 51 ± 0,06
Mobilidade (s)	51,8 ± 9,53	65,5 ± 7,75	96,4 ± 8,58	61,1 ± 7,4 [%]
Frequência de mobilidade	427,5 ± 64,3	563, 4 ± 48,2	677,3 ± 50,3**	597,5 ± 34,9
Mobilidade média (s)	0,12 ± 0	0,11 ± 0,11	$0,14 \pm 0^{**}$	0,09 ± 0
Rotação	47,9 ± 5,39	77,1 ± 10,6*	43,8 ± 6,73 [#]	42, 9 ± 5,5 [#]
Velocidade média	23 ± 1,22	32 ± 2**	25,3 ± 1,51 [#]	25,7 ± 1,15 [#]
Transição entre ZP e ZC	70,7 ± 25,1	91,5 ± 16,6	96,4 ± 24,7	121,3 ± 23,6

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo SAL+MET. Representação de (cm) centímetros, (ZP) zona periférica, (ZC) zona central e (s) segundos. Cada sessão de teste durou 5 minutos.

O tratamento com VPA foi eficiente em alterar a distância percorrida total das proles masculinas de ratos quando comparado ao grupo controle [F (1, 36) = 55,27; p < 0,0001]. O grupo VPA+SAL aumentou a distância percorrida total significativamente em relação a todos os grupos estudados, exibindo uma hiperlocomoção dos animais. Em relação aos animais do grupo tratado com VPA pré-natal e desafiados com metilfenidato, houve um aumento na distância percorrida total quando comparado ao grupo controle (p < 0,001). Entretanto, o desafio farmacológico com metilfenidato foi eficiente em melhorar as alterações comportamentais observadas nos animais tratados com VPA em relação ao grupo VPA+SAL.

Quando analisamos a distância média percorrida, o grupo VPA+SAL aumentou a distância média percorrida em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 7,63; p = 0,0090]. Em relação a distância máxima percorrida, nenhuma alteração foi encontrada entre os grupos [F (1, 36) = 2,52; p = 0,1210]. A análise da permanência na zona periférica dos machos mostrou alteração significante [F (1, 36) = 6,43; p = 0,0156]. A exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 não alterou a permanência na zona periférica em relação ao grupo controle. O grupo VPA+MET aumentou a permanência na zona periférica em relação ao grupo SAL+MET. Já a permanência média na zona periférica foi alterada no grupo VPA+SAL em relação ao grupo VPA+MET [F (1, 36) = 5,45; p = 0,0242].

O número de entradas na zona periférica foi aumentado no grupo VPA+SAL em relação ao controle (p = 0,0352) e ao grupo VPA+MET (p < 0,0001). Em relação à duração na zona central, não foi possível verificar alterações estatisticamente significantes entre os grupos [F (1, 36) = 2,52; p = 0,1864]. O número de entradas na zona central foi significativamente alterado entre VPA+SAL vs VPA+MET [F (1, 36) = 7,38; p = 0,0101], a permanência média na zona central [F (1, 36) = 0,07] também foi alterada no grupo VPA+SAL em relação aos grupos SAL+MET (p = 0,0170) e VPA+MET (p = 0,0232).

A duração da imobilidade revelou diferenças entre os grupos [F (1, 36) = 30,61; p < 0,0101]. A exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 não alterou a duração da imobilidade em relação ao grupo controle. O tratamento com SAL+MET foi eficiente em alterar a duração da imobilidade das proles masculinas de ratos quando comparado a todos os grupos estudados (p < 0,0001).

Figura 26 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg 45 minutos antes do teste) na atividade locomotora geral em campo aberto no PND 32 da prole masculina de ratas *Wistar* (n = 10 para todos os grupos)



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32. Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes. Representação de (cm) centímetros, (ZP) zona periférica, (ZC) zona central e (s) segundos.
Em relação a frequência de imobilidade a exposição pré-natal ao VPA alterou seus níveis em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 5,98; p=0,0194]. Nenhuma alteração foi encontrada na imobilidade média [F (1, 36) = 1,71; p = 0,1971].

A análise estatística verificou diferenças estatísticas significantes na duração da mobilidade da prole masculina de ratos [F (40) = 5,33; p = 0,0038]. A exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 não alterou a mobilidade em relação ao grupo controle. Em relação ao grupo SAL+MET, houve um aumento na mobilidade em relação aos grupos VPA+SAL e ao grupo VPA+MET. A frequência de mobilidade foi alterada no grupo SAL+MET em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 4,55; p = 0,0059]. A média de mobilidades foi alterada nos grupos tratados SAL+MET vs VPA+MET [F (1, 36) = 4,62; p = 0,0382].

Em relação ao movimento de rotação observado nos animais, foi possível verificar alterações estatisticamente significantes [F (1, 36) = 8,55; p = 0,0398]. Os animais tratados do grupo VPA+SAL, rotacionaram mais em seu próprio eixo em relação aos demais grupos estudados. A velocidade média dos animais VPA+SAL também foi maior em relação aos grupos avaliados [F (1, 36) = 4,15; p = 0,0489]. Em relação a velocidade média empregada pelos animais, a exposição ao VPA no GD 12,5 foi alterada em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 7,74; p = 0,0085] e aos grupos tratados com metilfenidato (p < 0,01). Nenhuma alteração foi observada na transição entre as zonas periféricas e central [F (1, 36) = 0; p = 0,9285].

Com esses resultados, verificamos uma hiperlocomoção da prole masculina de ratas em relação aos grupos estudados. Todavia, o tratamento com metilfenidato foi eficiente em melhorar os prejuízos nos parâmetros comportamentais de ratos que receberam VPA no GD 12,5.

4.1.1.5 Avaliação dos níveis de NA, DA e 5-HT e seus metabólitos no estriado via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no PND 32 da prole masculina de ratas que foram expostos ao VPA no GD 12,5 e ao desafio farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 5** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao desafio farmacológico com metilfenidato na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos

estriatais via HPLC na prole masculina de ratas. Após 55 minutos de administrado o desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg), os animais foram eutanasiados e avaliados em relação aos neurotransmissores e seus metabólitos. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

		Gr	upos	
Analito	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
NA	381 ± 28,2	368,9 ± 13,3	554,2 ± 65,9* ^{##}	356,3 ± 20,1%
VMA	906,3 ± 53,5	275,4 ± 14,5****	409,1 ± 37,5****	370,2 ± 26,1****
DA	4389 ± 272,6	2541 ± 142*	6059 ± 769* ^{####}	1917±150** ^{%%%%}
DOPAC	162,8 ± 9,7***	95,9 ± 9,1	176,2 ± 15,6 ^{####}	86,2 ± 7,94***
HVA	95,9 ± 12,5	51,5 ± 6,8*	68,7 ± 11,5	47,6 ± 6,5**
5-HIAA	4096 ± 510,6	4314 ± 187	5353 ± 545,9	4395 ± 274,3
5-HT	7836± 610,5	5469 ± 648,4	8703 ± 764,3 [#]	7005 ± 656,7
VMA/NOR	$2,6 \pm 0,2$	0,74 ± 0,03****	1 ± 0,1****	0,1±0,1****
DOPAC/DA	0,3107 ± 0,01	0,4143 ± 0,1**	0,3171 ± 0,01 ^{##%}	$0,4043 \pm 0,02^*$
HVA/DA	0,223 ± 0,02	$0,233 \pm 0,03$	0,175 ± 0,05	0,214± 0,05
DOPAC+HVA/DA	153 ± 12	90 ± 8**	166 ± 18 ^{##}	86 ± 7** ^{%%%}
5-HIAA/5-HT	0,55 ± 0,03	$0,42 \pm 0,02$	0,66 ± 0,07	$0,65 \pm 0,02$

Tabela 5Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg
55 minutos antes da eutanásia) nos níveis de neurotransmissores, metabólitos e *turnover*
no corpo estriado da prole masculina de ratas *Wistar*

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo SAL+MET. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA) Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Os níveis estriatais noradrenérgicos ilustrados na **Figura 27** revelam que a noradrenalina estudada foi aumentada no grupo SAL+MET em relação aos outros grupos do estudo [F (1, 36) = 6; p < 0,0191], e os níveis de VMA foram significativamente reduzidos em todos os grupos estudados quando comparado ao

grupo controle SAL+SAL [F (1, 36) = 67; p < 0,0001]. Os níveis estriatais do *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) foram significativamente reduzidos em todos os grupos estudados quando comparado ao grupo controle SAL+SAL [F (1, 36) = 35; p < 0,0001].

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos **Figura 28**, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Os animais previamente tratados com VPA reduziram seus níveis de DOPAC estriatal quando comparado ao grupo SAL+SAL [F (1, 36) = 1; p < 0,0001]. No grupo SAL+MET a concentração de DOPAC foi aumentada significativamente em relação aos demais grupos (p < 0,001). Nos níveis de dopamina, também foram observadas alterações de redução no grupo VPA+SAL em relação ao controle e aumento do neurotransmissor no grupo SAL+MET em relação a todos os grupos avaliados [F (1, 36) = 1; p < 0,0001]. Em relação ao HVA estudado nos animais, o grupo VPA+SAL e VPA+MET diminuíram os seus níveis estriatais significativamente em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 1,44; p = 0,0018].





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

Em relação aos níveis do *turnover* da dopamina, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Os animais previamente tratados com VPA+SAL aumentaram seus níveis de DOPAC/DA estriatal quando comparado a

todos os grupos estudados [F (1, 36) = 0,17 p < 0,0001]. O desafio farmacológico com metilfenidato não foi eficiente em reestabelecer os níveis de DOPAC/DA no grupo VPA+MET. Não foram encontradas modificações nos níveis de HVA/DA entre os grupos [F (1, 36) = 2,89; p = 0978]. Nas concentrações de DOPAC+HVA/DA, os animais VPA+SAL reduziram seu *turnover* de dopamina em relação ao grupo controle SAL+SAL [F (1, 36) = 0,47; p < 0,0001].

Figura 28 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de dopamina na prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

Quando avaliada a concentração de 5-HIAA não foi observada nenhuma alteração estatística entre os grupos [F (1, 36) = 2; p = 0,1591] (**Figura 29**). Já em relação aos níveis de 5-HT no estriado, a única alteração observada foi o aumento do neurotransmissor no grupo SAL+MET em relação ao grupo VAP+SAL [F (1, 36) = 0,24; p < 0,0046]. As concentrações de 5-HIAA/5-HT não foram alteradas estatisticamente entre os grupos [F (40) = 1,90; p = 0,1470].

Figura 29 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de serotonina na prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

4.1.1.6 Avaliação dos níveis de NA, DA e 5-HT e seus metabólitos no córtex via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no PND 32 da prole masculina de ratas que foram expostos ao VPA no GD 12,5 e ao desafio farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 6** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao desafio farmacológico com metilfenidato na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos corticais via HPLC na prole masculina de ratas. Após 55 minutos de administrado o desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg), os animais foram eutanasiados e avaliados em relação aos neurotransmissores e seus metabólitos. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Os níveis corticais de VMA foram significativamente aumentados no grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo controle SAL+SAL [F (1, 36) = 10; p < 0,0026]. O desafio farmacológico com metilfenidato foi eficiente em reestabelecer os níveis de VMA no grupo VPA+MET. A noradrenalina estudada foi diminuída no grupo VPA+MET em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 9,38; p = 0,0041] e ao grupo VPA+SAL (p = 0459) (**Figura 30**).

			Grupos	
Analito	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
NA	252,8 ± 18,3	216,8 ± 12,9	211,2 ± 8,71	165 ± 11,8***
VMA	162,9 ± 17,5	229,3 ± 19,3*	201,7 ± 14,1	159,5 ± 15,7 [#]
DA	2229 ± 208	1347 ± 168*	2998 ± 149,5*####	3039 ± 237*####
DOPAC	725,7 ± 81,5	574,7 ± 65,6	507,6 ± 47,5	570,6 ± 56,9
HVA	448,1 ± 31	257 ± 15****	302 ± 24,8**	303,5 ± 29,7**
5-HIAA	4005 ± 482	2691 ± 317,7	6101 ± 681,7*####	2534 ± 89,8 ^{%%%%}
5-HT	3529 ± 611	5175 ± 511*	440,2 ± 57****####	427,8 ± 150****####
VMA/NOR	0,56 ± 0,04	1,07 ± 0,14**	1,04 ± 0,10*	$0,93 \pm 0,09$
DOPAC/DA	0,34 ± 0,01	0,38 ± 0,03	0,18 ± 0,01***####	0,19 ± 0***####
HVA/DA	0,36 ± 0,16	0,42 ± 0,15	$0,23 \pm 0,07$	0,16 ± 0,03
DOPAC+HVA/DA	795 ± 79,8	575,3 ± 65,7	553,6 ± 33,4	570,8 ± 57
5-HIAA/5-HT	1,28 ± 0,17	0,64 ± 0,12	12,1 ± 1,18**##	13,6 ± 3,98**###

Tabela 6Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg
55 minutos antes da eutanásia) nos níveis de neurotransmissores, metabólitos e *turnover*
no córtex da prole masculina de ratas *Wistar*

Figura 30 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de noradrenalina na prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.





Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

Os níveis do *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) foram significativamente aumentados no grupo VPA+SAL e SAL+MET quando comparado ao grupo controle SAL+SAL [F (1, 36) = 9,64; p = 0,0037].

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos (**Figura 31**), foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Os animais previamente tratados com VPA não modificaram seus níveis de DOPAC quando comparado ao grupo SAL+SAL [F (1, 36) = 2,77; p=0,1042]. Nos níveis de dopamina, também foram observadas alterações de redução no grupo VPA+SAL em relação ao controle e aumento do neurotransmissor nos grupos que receberam desafio farmacológico com metilfenidato [F (1, 36) = 5,67; p = 0,0226]. Em relação ao HVA estudado nos animais, todos os grupos reduziram seus níveis significativamente em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 13; p = 0,0008].

Em relação aos níveis do *turnover* da dopamina, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Os animais desafiados com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET) reduziram seus níveis de DOPAC/DA no córtex quando comparados aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1, 36) = 0,72; p < 0,0037]. Não foram encontradas modificações nos níveis de HVA/DA entre os grupos [F (1, 36) =

0,20; p = 0,6507]. e nas concentrações de DOPAC+HVA/DA [F (1, 36) = 3,73; p = 0,0612].

Figura 32 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de serotonina na prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

Os níveis de 5-HIAA no córtex foram aumentados no grupo SAL+MET em relação aos grupos estudados [F (1, 36) = 6,29; p < 0,0001] (**Figura 32**). Quando avaliado as concentrações de 5-HT foi observado um aumento significante no grupo VPA+SAL em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 4,16; p < 0,0001]. O desafio farmacológico com metilfenidato foi eficiente em reduzir os níveis de 5-HT nos grupos SAL+MET e VPA+MET. Quando avaliado as concentrações de 5-HIAA/5-HT os grupos que receberam metilfenidato aumentaram seus níveis em relação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1, 36) = 0,26; p < 0,0001].

4.1.1.7 Avaliação da expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado via PCR-RT no PND 32 na prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao desafio farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 7** descreve e a **Figura 33** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na expressão gênica no estriado via PCR-RT nos filhotes machos de ratas.

De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes. Após 55 minutos de administrado o desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg) os machos tratados pré-natalmente com VPA GD 12,5 foram avaliados em relação a expressão gênica no estriado. A exposição ao VPA pré-natal foi eficiente em alterar a expressão gênica de *DAT* [F (1, 16) = 11; p < 0,0001]. Houve uma diminuição significante na expressão de *DAT* nos grupos VPA+SAL e VPA+MET em relação ao grupo controle e ao grupo SAL+MET (p < 0,0001). As análises demonstraram que o gene *DRD1* teve sua expressão reduzida nos animais que receberam VPA no GD 12,5 quando comparado ao grupo controle [F (1, 16) = 3, 66; p < 0,0001].

O tratamento com metilfenidato não foi eficiente em modificar a expressão de *DRD1* no grupo VPA+MET (p < 0,0001). O mesmo parâmetro de redução na expressão gênica de *DRD2* foi observado [F (1, 16) = 6; p < 0,0001]. O grupo VPA+SAL reduziu seus níveis de *DRD2* em relação ao grupo controle (p < 0,0001). Em relação a expressão do gene *TH*, uma redução significante da expressão foi verificada nos animais do grupo VPA+SAL e VPA+MET quando comparados aos grupos controles SAL+SAL e SAL+MET.

Tabela 7Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg
55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica no corpo estriado da prole masculina
de ratas Wistar

			Grupos	
GENE	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
DAT	1 ± 0,04	0,42 ± 0,01****	1,28 ± 0,11 ^{####}	0,16 ± 0,05****%%%%
DRD1	1, ± 0,11	0,05 ± 0,01****	0,66 ± 0,01 ^{###}	0,04 ± 0,02****###
DRD2	0,92 ± 0,09	0,04 ± 0,01***	1,24 ± 0,14 ^{####}	0,22 ± 0,09***%%%
ТН	1 ± 0,10	0,03 ± 0****	1,34 ± 0,13 ^{####}	0,02 ± 0****%%%%

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001; comparando ao grupo SAL+MET.

Figura 33 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica de *DAT*, *DRD1, DRD2 e TH* no estriado da prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 5 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

Todos os genes avaliados tiveram sua expressão reduzida no estriado nos animais previamente tratados com VPA no GD 12,5 em relação ao grupo controle. O tratamento com metilfenidato (5 mg/ kg) não foi eficiente em reverter os prejuízos causados pelo VPA.

4.1.1.8 Avaliação da expressão gênica de DRD1, DRD2 e TH no córtex via PCR-RT no PND 32 na prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao desafio farmacológico com metilfenidato A **Tabela 8** descreve e a **Figura 34** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na expressão gênica no córtex via PCR-RT nos filhotes machos de ratas. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes. Após 55 minutos de administrado o desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg) os machos tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5 foram avaliados em relação a expressão gênica de dopamina no córtex.

Tabela 8Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg
55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica no córtex da prole masculina de ratas
Wistar. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5
e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com
metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no
PND 32

			Grupos	
GENE	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
DRD1	0,99 ± 0,11	$0,84 \pm 0,05$	0,75 ± 0,11	4,53 ± 0,70****###%%%%
DRD2	0,94 ± 0,12	0,51 ± 0,11	0,64 ± 0,18	3,36 ± 0,26****####%%%%
ТН	1,16 ± 0,14	2 ± 0,39	3,6 ± 0,57####	10,7 ± 1****###%%%%

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL.

A exposição ao VPA pré-natal não foi eficiente em alterar a expressão gênica de *DRD1* [F (1, 16) = 29; p = 0,9903], *DRD2* [F (1, 16) = 73; p = 0,3872] e *TH* [F (1, 16) = 25; p = 0,7177]. Porém o grupo tratado com VPA pré-natal e metilfenidato no PND 32 demonstrou aumento da sua expressão em todos os genes estudados no córtex: *DRD1* (p < 0,0001), *DRD2* (p < 0,0001) e *TH* (p < 0,0001) quando comparado a todos os grupos estudados (SAL+SAL, VPA+SAL e SAL+MET). **Figura 34** Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica de *DRD1, DRD2 e TH* no córtex da prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Todos os genes avaliados tiveram sua expressão aumentada no córtex naqueles animais tratados com VPA no GD 12,5 e desafiados farmacologicamente com metilfenidato no PND 32 (VPA+MET). Em relação ao tratamento isolado com VPA, nenhum gene foi afetado quando avaliado no córtex.

4.1.1.9 Avaliação da correlação entre o comportamento social (pinning) no PND 30 e a expressão do gene DAT no estriado (PND 32) na prole masculina de ratas expostas ao VPA pré-natal

A **Figura 35** ilustra a correlação dos efeitos da exposição ao VPA pré-natal no *pinning* durante o PND 30 e a expressão gênica de DAT no estriado no PND 32 em filhotes machos de ratas. O teste de regressão linear não demonstrou correlação entre os parâmetros estudados no grupo salina, incluídos nas **Figuras 35a** [F = 0; p = 0,9569].

Em relação aos animais tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5, o teste de regressão linear demonstrou correlação positiva na **Figura 35b**. De acordo com a análise quanto maior a frequência de *pinning* maior será a expressão do gene *DAT* [F = 32; p = 0,0108].

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 5 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

Figura 35 Correlação dos efeitos da exposição ao VPA pré-natal (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento social e a expressão gênica de DAT no estriado em ratos machos durante o PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste de regressão linear. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 5 para todos os grupos).

4.1.2 Experimento 2 - Avaliação comportamental e neuroquímica dos efeitos do tratamento farmacológico prolongado (5 mg/kg PND 21 ao PND 32) com metilfenidato na prole masculina de ratas expostas ao VPA pré-natal

Depois de confirmada a gestação, ratas foram expostas ao VPA no GD 12,5 e os sinais e sintomas tipo-autistas reproduzidos em suas proles. Nesse experimento, tratou-se prolongadamente com metilfenidato animais previamente submetidos ao VPA pré-natal. A administração prolongada do metilfenidato pode ocasionar mudanças estruturais em circuitos envolvendo dopamina, além de traduzir essa neuroplasticidade em alterações comportamentais. Logo após o desmame no PND 21, machos *Wistar* receberam diariamente por gavagem 5 mg/kg de metilfenidato. No 10º dia de tratamento com metilfenidato, ratos expostos ao VPA pré-natal foram avaliados em relação a socialização (comportamento de brincar).

Após 12 dias de tratamento com metilfenidato, os animais foram testados em relação a atividade locomotora observada no teste de campo aberto. Ao final do teste, os animais foram eutanasiados e estruturas cerebrais de interesse coletadas, como o descrito anteriormente.

4.1.2.1 Avaliação da socialização pelo comportamento de brincar no PND 30 da prole masculina de ratos expostos ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento prolongado com metilfenidato

A **Tabela 9** descreve e a **Figura 36** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal em machos e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 10 dias consecutivos) no comportamento social. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas alterações estatisticamente significantes.

Em relação à frequência de *pinning*, foi possível verificar uma redução significante nesse parâmetro nos machos do grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo SAL+SAL [F (1, 36) = 90; p < 0,0001]. O tratamento prolongado com metilfenidato mostrou-se eficiente em reduzir a frequência de *pinning* nos animais SAL+ MET e VPA+MET em relação ao grupo controle (p < 0,0001). O metilfenidato não foi capaz de restabelecer a sociabilização nos animais previamente tratados com VPA pré-natal, além de alterar esse comportamento nos animais controle SAL+MET.

A frequência de *darts* foi reduzida nos grupos VPA+SAL, SAL+MET e VPA+MET [F (1, 36) = 21; p < 0,0001] quando comparado aos machos do grupo controle. O tratamento com metilfenidato não foi eficiente em restaurar a duração do farejar naqueles animais tratados com VPA (SAL+SAL vs. VPA+MET).

O tratamento com VPA foi eficiente em alterar o tempo de perseguir das proles masculinas de ratas quando comparado ao grupo controle [F (1,36) = 2,55; p < 0,0001]. O tratamento prolongado com metilfenidato não alterou essa condição, uma vez que os grupos SAL+MET e. VPA+MET demonstraram redução significante do tempo gasto perseguindo em relação ao grupo controle.

Na avaliação do parâmetro de passar sob/sobre os ratos que foram tratados com VPA pré-natalmente exibiram uma frequência menor [F (1, 36) = 13,78; p = 0,0006] do que o grupo SAL+SAL. O tratamento prolongado com metilfenidato recebido pelos machos do grupo VPA+MET, foi eficiente em melhorar a frequência de passar sob/sobre em relação ao grupo VPA+SAL (p = 0,0299).

Figura 36 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (10 dias de tratamento) no comportamento social de brincar na prole masculina de ratos no PND 30



Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes. Representação (s) segundos. Cada sessão do teste durou 10 minutos com um rato intruso na mesma gaiola.

Em relação ao tempo gasto pelos filhotes farejando, os ratos tratados prénatalmente com o VPA diminuíram esse comportamento [F (1, 36) = 4, 19; p < 0,0001].

Tabela 9 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de metilfenidato prolongadamente (5 mg/kg 10 dias de tratamento) no comportamento social de brincar no PND 30 da prole masculina de ratas *Wistar*. Os grupos representam SAL+SAL = salina 0,9% pré-natal e pós-tratamento com salina; VPA+SAL = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg e pós-tratamento com salina; SAL+MET = salina pré-natal e pós-tratamento com metilfenidato; VPA+MET = VPA pré-natal e pós-tratamento com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos)

		Gru	upos	
Parâmetros	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
Pinning	18 ± 1,12	2,9 ± 0,52****	5,1 ± 0,64****	4,1 ± 0,76****
Darts	5,9 ± 0,43	0,8 ± 0,2****	2,2 ± 0,59****	1,1 ± 0,4****
Farejar	38,4 ± 3	26,3 ± 1,58** ^{%%%%}	42,5 ± 2,38	21,3 ± 1,45**** ^{%%%%}
Perseguir	40,5 ± 3,26	21,7 ± 2,7****	28,2 ± 2,35*	17,8 ± 2****%
Passar sob/sobre	22,8 ± 0,87	14,4 ± 0,93****	18,3 ± 1,3	20 ± 2 [#]
Levantar	19,6 ± 1	12,4 ± 0,81*	19,8 ± 2,27##	25,9 ± 1,48 ^{###%}

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL.

Finalmente, quando testado a frequência de levantar dos animais, o grupo VPA+SAL reduziu significativamente esse comportamento em relação aos grupos SAL+SAL, SAL+MET e VPA+MET [F (1,36) = 19; p < 0,0001]. O grupo VPA+ MET aumentou a frequência de levantar em relação ao grupo controle (p = 0,0272).

Os resultados previamente expostos sobre a avaliação do comportamento de brincar demonstram que a utilização do VPA pré-natal prejudicou a socialização da prole masculina de ratos. De forma geral, o tratamento prolongado com metilfenidato alterou o comportamento dos filhotes no grupo controle e restabeleceu algumas das alterações causadas pelo VPA. 4.1.2.2 Avaliação da atividade locomotora geral no campo aberto no PND 32 da prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao metilfenidato prolongadamente

A **Tabela 10** descreve e a **Figura 37** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal em machos e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na atividade locomotora geral em campo aberto. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas alterações estatisticamente significantes.

O tratamento com VPA foi eficiente em aumentar a distância percorrida total nos machos quando comparado a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 67; p < 0,0001]. O tratamento com metilfenidato prolongado naqueles animais pré-natalmente tratados com VPA, foi eficiente em reestabelecer a distância percorrida total (VPA+SAL vs. VPA+MET p < 0,0001). Quando analisamos a distância média percorrida, o grupo VPA+SAL aumentou a distância média percorrida em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 6, 84; p < 0,0001]. Os machos tratados prolongadamente com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET) demonstraram uma diminuição da distância média percorrida quando comparado aos grupos VPA+SAL e SAL+SAL.

A análise estatística revelou que exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 não alterou a permanência na zona periférica em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 0, 99; p = 0,0242]. O grupo SAL+MET aumentou a permanência na zona periférica em relação ao grupo controle (p = 0,0194). Já a permanência média na zona periférica não foi alterada entre os grupos [F (1, 36) = 1, 69; p = 0, 2010]. O número de entradas na zona periférica foi aumentado nos animais VPA+SAL em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 4, 96; p = 0,0090]. O tratamento pré-natal com VPA e a administração prolongada com metilfenidato (VPA+MET) foi suficiente em melhorar esse parâmetro comportamental em relação ao grupo VPA+ SAL (p = 0,0002).

Em relação à duração na zona central, os animais do grupo SAL+MET gastaram mais tempo no centro do aparato campo aberto quando comparado a todos os grupos do estudo [F (1, 36) = 7,17; p < 0,0001]. O número de entradas na zona central não foi significativamente alterado entre os grupos [F (1, 36) = 0, 02; p = 0,8873].

Tabela 10 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente por 12 dias de tratamento na locomoção durante o PND 32 em ratos *Wistar*. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratados prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos)

		G	rupos	
Parâmetros	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
Distância total cm	3771 ± 161	10662 ± 654****	3638 ± 152 ^{####}	4283 ± 318 ^{####}
Distância média cm	0,77 ± 0,04	1 ± 0,06***	0,33 ± 0****####	0,4 ± 0,02****####
Tempo na ZP	290,7 ± 1,87	290 ± 1,72	333 ± 17*#	313 ± 7,69*
Frequência na ZP	19,8 ± 5,49	37,3 ± 2,19* ^{%%%%}	11,3 ± 2,82	12,5 ± 3,25 ^{####}
Tempo médio ZP	36 ± 12,4	9,68 ± 1	$40,3 \pm 5,65$	35,4 ± 9,27
Tempo na ZC	31,2 ± 9,82	9,68 ± 1 ^{%%%%}	68,5 ± 10**	7,49 ± 1,5 ^{####}
Frequência na ZC	6 ± 1,46	10 ± 1,17	7,2 ± 1,15	10,8 ± 2,72
Tempo médio ZC	$0,9 \pm 0,08$	0,74 ± 0,13 ^{%%%%}	2,87 ± 0,29****	1,85 ± 0,26*##%
Imobilidade (s)	203,6 ± 11	228 ± 7,2****	85 ± 7,4****	65,9 ± 5,4****####
Frequência de imobilidade	360,4 ± 52,3	547 ± 47**	363,3 ± 20 [#]	380 ± 23 [#]
Imobilidade média (s)	0,41 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,81 ± 0,14**##	0,67 ± 0,18** ^{###}
Mobilidade (s)	51,8 ± 9,5	66,5 ± 7,75 ^{%%%%}	265,1 ± 10****	255 ± 9,4****####
Frequência de mobilidade	427,5 ± 64	563,4 ± 48	$362 \pm 20^{\#}$	383 ± 24 [#]
Mobilidade média (s)	0,13 ± 0,007	0,15 ± 0,01 ^{%%%%}	0,13 ± 0,01****	0,1 ± 0,06****####
Rotação	47,9 ± 5,3	77 ± 10** ^{%%%%}	6,8 ± 0,8***	9,6 ± 1,24***####
Velocidade média	23 ± 1,22	32 ± 2****	10 ± 0,2****####	12 ± 0,8****####
Transição entre ZP e ZC	70,7 ± 25	91 ± 16	9,8 ± 1,5*##	7,3 ± 2*##

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001; comparando ao grupo SAL+MET.

Figura 37 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) no comportamento locomotor durante o PND 32 em ratos *Wistar*



Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratados prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes. Representação (s) segundos.

Quando a permanência média na zona central foi avaliada, o grupo SAL+MET teve um tempo médio maior na zona central em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 4,10; p < 0.0101].

A duração da imobilidade revelou diferenças entre os grupos [F (1, 36) = 7,30; p < 0.0101]. A exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 não alterou a duração da imobilidade em relação ao grupo controle (p = 0,1568). O tratamento prolongado com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET), entretanto, foi eficiente em diminuir o tempo de imobilidade dos animais em relação aos grupos tratados com salina (SAL+SAL e VPA+SAL). Em relação a frequência de imobilidade, a exposição pré-natal ao VPA aumentou a imobilidade dos animais em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 4,84; p < 0,001].

Os machos do grupo VPA+MET demonstraram melhora da imobilidade em relação ao grupo VPA+SAL (p = 0,0207). Alterações similares comportamentais foram observadas em relação a frequência de imobilidade média [F (1, 36) = 0,26; p < 0,0001].

A análise estatística verificou diferenças significantes na duração da mobilidade de machos no PND 32 [F (40) = 1,52; p < 0,0001]. A exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 não alterou a mobilidade em relação ao grupo controle. Entretanto, o tratamento prolongado com metilfenidato aumentou a mobilidade nos grupos SAL+MET e VPA+MET em relação aos grupos VPA+SAL e SAL+SAL [F (1, 36) = 1,52; p < 0,0001].

Os animais do grupo VPA+SAL aumentaram a frequência de mobilidade em relação aos grupos tratados com metilfenidato SAL+MET e VPA+MET [F (1, 36) = 1,77; p < 0,05]. A média de mobilidades foi alterada nos grupos tratados SAL+MET e VPA+MET em relação aos grupos VPA+SAL e SAL+SAL [F (1, 36) = 1,63; p < 0,0001].

Em relação ao movimento de rotação, os animais tratados do grupo VPA+SAL rotacionaram mais em seu próprio eixo em relação aos demais grupos estudados [F (1, 36) = 4,83; p < 0,0001]. Todavia, os animais tratados dos grupos SAL+MET e VPA+MET reduziram a frequência de rotação quando comparados aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL. A velocidade média dos animais VPA+SAL também foi maior em relação aos grupos avaliados [F (1, 36) = 4,57; p < 0,00001]. O tratamento prolongado com metilfenidato foi capaz de reduzir a velocidade média dos grupos SAL+MET e VPA+MET e VPA+MET.

A transição entre as zonas periféricas e central foi menor nos grupos VPA+MET e SAL+MET em relação aos grupos que receberam salina pós-natal [F (1, 36) = 0,59; p < 0,001]. Em relação a avaliação dos dados apresentados, foi possível observar que o tratamento prolongado com metilfenidato reestabeleceu alguns parâmetros prejudicados no campo aberto naqueles animais que apresentam o fenótipo tipo-autista.

4.1.2.3 Avaliação dos níveis de NA, DA e 5-HT e seus metabólitos no estriado via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no PND 32 na prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento prolongado com metilfenidato

A **Tabela 11** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na dosagem dos neurotransmissores, metabólitos e *turnover* (razão dos metabólitos com os neurotransmissores) no estriado via HPLC na prole masculina de ratas *Wistar*. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Os níveis estriatais de VMA **Figura 38** foram significativamente reduzidos no grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo controle SAL+SAL [F (1, 36) = 3,58; p = 0,0665]. A noradrenalina estudada não foi alterada nos grupos estudados [F (1, 36) = 0,43; p = 0,5158]. Os níveis do *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) não foram significativamente alterados [F (1,36) = 1,58; p = 0,2159]. Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos **Figura 39**, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Nos níveis de DOPAC estriatal houve um aumento no grupo SAL+MET em relação aos demais grupos [F (1,36) = 6; p < 0,001]. A dopamina avaliada nos animais VPA+SAL reduziu em relação ao grupo controle [F (1,36) = 1,79; p < 0,0001].

Tabela 11 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) nos níveis estriatais de NA, DA e 5-HT na prole masculina de ratas *Wistar* no PND 32. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos)

	Grupos			
Analito	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
NA	239,2 ± 10,5	256,7 ± 9,68	219,7 ± 11,5	222,7 ± 11,5
VMA	94,8 ± 14,6	47,8 ± 8,67*	61 ± 6,25	57,9 ± 14,4
DA	1134 ± 140,8	625,7 ± 112,8*	1644 ± 63,4*###	836,6 ± 115 ^{%%%%}
DOPAC	373,3 ± 101	321,1 90,7	961,1 ± 241,3*#	318,5 ± 57,1%
HVA	196,7 ± 22,5	179 ± 21,9	314,7 ± 44,5* [#]	222,7 ± 18,7
5-HIAA	12791 ± 893,4	14015 ± 1150	19013 ± 1083**#	19397 ± 1411**#
5-HT	805 ± 109,3	549,6 ± 41,9	370,9 ± 85,6**	465,5 ± 57,1*
VMA/NOR	0,39 ± 0,06	0,21 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,26 ± 0,06
DOPAC/DA	4,55 ± 0,48	12,7 ± 2,4*	10,9 ± 1,6	9,96 ± 2,15
HVA/DA	2,6 ± 0,42	6,14 ± 0,73**	4,13 ± 0,47	5,61 ± 0,88*
DOPAC+HVA/DA	274,9 ± 39,7	220 ± 19,9	759 ± 91**** ^{####}	275 ± 12 ^{%%%%}
5-HIAA/5-HT	21 ± 4,71	35,4 ± 11	69,5 ± 20,3	38,5 ± 7

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, ##p < 0,001, ####p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo SAL+MET. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA) Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Porém, os machos do grupo SAL+MET aumentaram seus níveis estriatais de dopamina em relação a todos os grupos estudados (p = 0,0001). Em relação ao HVA no estriado, o grupo SAL+MET aumentou significativamente seus níveis em relação aos grupos VPA+SAL [F (1,36) = 7; p = 0,0101].

Aos níveis do *turnover* da dopamina, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Os níveis de DOPAC/DA foram aumentados no grupo VPA+SAL em relação ao controle [F (1,36) = 6,28; p = 0,0161].

Figura 38 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de noradrenalina na prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

Figura 40 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de dopamina na prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

Contudo, os níveis de HVA/DA nos grupos tratados previamente com VPA no GD 12,5 foram maiores em relação ao grupo controle [F (1,36) = 2,44; p < 0,01]. Nas concentrações de DOPAC+HVA/DA, os animais do grupo SAL+ MET aumentaram seu *turnover* de dopamina em relação a todos os grupos estudados [F (1,36) = 17; p < 0,0001].

Quando avaliada, as concentrações de 5-HIAA aumentaram nos grupos que receberam tratamento prolongado com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET) quando comparados aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1,36) = 25 p < 0,0001]. Já em relação aos níveis de 5-HT no estriado (**Figura 40**), os grupos SAL+MET e VPA+MET reduziram o neurotransmissor significativamente quando comparado ao grupo controle [F (1, 36) = 5; p < 0,001]. Em relação as concentrações de 5-HIAA/5-HT nenhuma alteração foi evidenciada segundo a estatística empregada [F (1,36) = 2,37; p = 0,1322].

4.1.2.4 Avaliação dos níveis de NA, DA e 5-HT e seus metabólitos no córtex via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no PND 32 na prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento prolongado com metilfenidato

A **Tabela 12** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na dosagem dos neurotransmissores, metabólitos e *turnover* (razão dos metabólitos com os neurotransmissores) no córtex via HPLC na prole masculina de ratas *Wistar*. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Os níveis de VMA na **Figura 41** foram significativamente aumentados no grupo VPA+MET [F (1, 36) = 19; p < 0,0001] quando comparado a todos os grupos. A noradrenalina estudada não foi alterada [F (1, 36) = 0, 98; p = 0,3281]. Os níveis corticais do *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) foram significativamente aumentados nos grupos SAL+MET e VPA+MET em relação aos grupos que não receberam tratamento com metilfenidato [F (1, 36) = 7,87; p < 0,0001].

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos na **Figura 42**, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Houve uma redução significativa nos níveis de DOPAC [F (1, 36) = 18; p < 0,0001], dopamina [F (1, 36) = 8, 61; p < 0,0001] e HVA [F (1, 36) = 24; p < 0,0001] nos animais VPA+SAL, SAL+MET e VPA+MET estudados quando comparado ao grupo controle. Aos níveis do *turnover* da dopamina, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes.

Os níveis de DOPAC/DA foram aumentados no grupo VPA+MET em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 9,99; p <0,0001]. Contudo, os níveis de HVA/DA não foram alterados [F (1, 36) = 5,85; p = 0,0207] em relação ao grupo controle [F (1, 36) =16; p < 0,0001]. Nas concentrações de DOPAC+HVA/DA, os animais dos grupos VPA+SAL, SAL+ MET e VPA+MET reduziram seu *turnover* de dopamina. Quando avaliada as concentrações de 5-HIAA, os animais tratados prénatalmente com VPA diminuíram os níveis do analito em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 24 p < 0,0001].

Tabela 12 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) nos níveis corticais de NA, DA e 5-HT na prole masculina de ratas *Wistar* no PND 32. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos)

			Grupos	
Analito	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
NA	291,4 ± 87,3	253,4 ± 54,4	290,5 ± 37,6	367,7 ± 38,6
VMA	219,3 ± 25,8	52 ± 4,99	551,8 ± 70,5 [#]	1403±220***###%%%%
DA	533,5 ± 64,7	219 ± 26,4****	191,5 ± 39****	115,3 ± 10,9****
DOPAC	3047 ± 302,8	1507 ± 164****	1402 ± 202****	1694 ± 152,6***
HVA	2470 ± 359,1	557,6 ± 72****	554,5 ± 62****	739,5 ± 203,2****
5-HIAA	25393± 3276	6753 ± 650****	7024±1039****	6713 ± 1175****
5-HT	354,7 ± 116	1112 ± 171	1617 ± 332,2**	1359 ± 235*
VMA/NOR	1,27 ± 0,42	0,31 ± 0,08	2,57 ± 0,34*###	3,42 ± 0,33*** ^{####}
DOPAC/DA	7,43 ± 1,15	6,18 ± 1	7,11 ± 0,77	12,2 ± 1*##%%
HVA/DA	5,61 ± 0,99	2,77 ± 0,63	3,67 ± 0,39	5,52 ± 1,48
DOPAC+HVA/DA	3054 ± 3003	1410 ± 268***	1406 ± 203,4***	1700 ± 151,8**
5-HIAA/5-HT	150,6 ± 11,3	6,71 ± 1,21****	8,57 ± 1,3****	7,23 ± 1,23****

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,001, ****p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo SAL+MET. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA) Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Quando avaliada as concentrações de 5-HIAA, os animais tratados prénatalmente com VPA diminuíram os níveis do analito em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 24 p < 0,0001]. Todavia os grupos tratados com metilfenidato prolongadamente também exibiram redução de 5-HIAA (p < 0,0001]. Já em relação aos níveis de 5-HT no córtex, os grupos SAL+MET e VPA+MET aumentaram o neurotransmissor no córtex significativamente quando comparado ao grupo controle [F (1, 36) = 4,94; p < 0,001]. O *turnover* de 5-HIAA/5-HT reduziu nos grupos VPA+SAL, SAL+ MET e VPA+MET em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 151; p < 0,0001] (**Figura 43**). Figura 41 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de noradrenalina na prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

Figura 42 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de dopamina na prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

Figura 43 - Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de serotonina na prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

4.1.2.5 Avaliação da expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado via PCR-RT no PND 32 da prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento prolongado com metilfenidato

A **Tabela 13** descreve e a **Figura 44** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na expressão gênica no estriado via PCR-RT na prole masculina de ratas *Wistar*. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

A exposição ao VPA pré-natal foi eficiente em alterar a expressão gênica de DAT em relação ao grupo controle [F (1, 16) = 8; p = 0,0012]. As análises demonstraram que o gene DRD1 teve sua expressão reduzida nos animais do grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo controle [F (1, 16) = 3, 33; p < 0,0001].

O tratamento com metilfenidato foi eficiente em modificar a expressão de *DRD1* no grupo SAL+MET em relação ao grupo controle (p < 0,0001). O mesmo parâmetro de redução foi observado na expressão gênica de *DRD2* [F (1, 16) = 0,03; p < 0,0001]. O grupo VPA+SAL reduziu seus níveis de *DRD2* em relação ao grupo controle (p < 0,0001) e o grupo SAL+MET aumentou a expressão de *DRD2* em relação ao SAL+SAL. A expressão do gene *TH* foi reduzida significativamente nos animais dos grupos VPA+SAL, SAL+MET e VPA+MET quando comparados ao grupo controle SAL+SAL [F (1, 16) = 0,03; p < 0,0001].

Figura 44 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica de *DAT*, *DRD1*, *DRD2* e *TH* estriatal da prole masculina de ratas *Wistar* no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 5 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

			Grupos	
GENE	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
DAT	1 ± 0,1	0,25 ± 0**	0,67 ± 0,18	0,65 ± 0,1
DRD1	1,2 ± 0,2	0,04 ± 0,01*	$2,13 \pm 0,40^{*\#\#}$	0,38 ± 0,06 ^{%%%}
DRD2	1,1 ± 0,72	0,04 ± 0***	1,46 ± 0,24 ^{####}	0,28 ± 0,10 ^{%%%**}
ТН	1,1 ± 0,08	0,03 ± 0****	0,55 ± 0,08**##	0,25 ± 0****

Tabela 13 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica de dopamina estriatal da prole masculina de ratas *Wistar* no PND 32

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL.

4.1.2.6 Avaliação da expressão gênica DRD1, DRD2 e TH no córtex via PCR-RT no PND 32 da prole masculina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento prolongado com metilfenidato

A **Tabela 14** descreve e a **Figura 45** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na expressão gênica no córtex via PCR-RT nos filhotes machos de ratas. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pósteste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

As análises demonstraram que a expressão do gene DRD1 [F (1, 16) = 52; p < 0,0001], DRD2 [F (1, 16) = 32; p < 0,0001] e TH [F (1, 16) = 45; p < 0,0001], foram aumentados significativamente no grupo SAL+MET em relação a todos os grupos estudados. Todos os genes avaliados tiveram uma expressão acentuada no córtex nos animais tratados prolongadamente com metilfenidato SAL+MET.

Tabela 14 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica de dopamina cortical da prole masculina de ratas *Wistar* no PND 32. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 5 para todos os grupos)

			Grupos	
GENE	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
DRD1	1 ± 0,2	1 ± 0	3,52 ± 0,31####	0,52 ± 0,1 ^{%%%%****}
DRD2	0,96 ± 0,1	$0,94 \pm 0$	18 ± 3 ^{####}	0,37 ± 0,08 ^{%%%%*****}
ТН	0,82 ± 0,1	1,72 ± 0,2	$5,64 \pm 0,84^{\#\#\#}$	0,38 ± 0,12 ^{%%%%****}

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0.001; ****p < 0.001; ****p < 0.001; ****p < 0.001; ****p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0.001; ****p < 0.001; ****

Figura 45 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e tratamento prolongado com metilfenidato (12 dias de tratamento) na expressão gênica de *DRD1, DRD2 e TH* no córtex da prole masculina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 5 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

4.2 PARTE II – Estudo dos efeitos agudo e prolongado do metilfenidato na prole feminina de ratas tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5: principais efeitos comportamentais e centrais

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

4.2.1 Experimento 1 - Avaliação dos efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg no PND 32) na prole feminina de ratas expostas ao VPA pré-natal

Para reproduzir o modelo de autismo induzido pelo VPA, depois de confirmada a gestação, ratas com 120 dias de vida foram tratadas com solução salina 0,9% ou VPA no GD 12,5 (400 mg/kg) intraperitoneal. Os filhotes expostos ao VPA foram avaliados em diversos testes para estudo dos prejuízos comportamentais. O metilfenidato (5 mg/kg) utilizado como desafio farmacológico para ativação do sistema dopaminérgico foi administrado nos machos durante o PND 32. Nessa fase os testes aplicados foram: vocalização ultrassônica (PND 11), alternação espontânea no labirinto em T (PND 29), comportamento de brincar (PND 30) e atividade geral em campo aberto (PND 32). Após o último teste, os animais foram devidamente eutanasiados e os testes moleculares empregados.

4.2.1.1 Avaliação da comunicação no PND 11 por meio da vocalização ultrassônica na prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5

A **Tabela 15** descreve e a **Figura 46** ilustra os efeitos da exposição ao VPA na comunicação por meio da vocalização ultrassônica da prole feminina infante de ratas. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes em todos os parâmetros avaliados. O número de vocalizações mostrou diferença

estatística entre os grupos [t = 4,58; p = 0,0002]. A exposição prévia ao VPA foi capaz de reduzir as vocalizações quando comparado ao controle.

A análise da duração total de vocalizações demonstrou diferenças estatísticas significantes [t = 4,24; p = 0,0005]. A comparação dos dados revelou que o grupo exposto ao VPA pré-natal diminuiu a duração total de vocalizações. A duração média de vocalização apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [t = 4,72; p = 0,0002]. Os animais tratados pré-natalmente com VPA diminuíram a duração média de vocalização em relação ao grupo controle. Em relação à duração máxima de vocalizações, foi possível verificar alterações estatisticamente significantes entre os grupos [t = 3,17; p = 0,0053]. O tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 foi capaz de diminuir o tempo máximo de vocalizações em relação ao grupo controle.

Tabela 15 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA na vocalização ultrassônica da prole feminina de ratas durante o PND 11. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas Wistar, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos)

	Grup	OOS
Parâmetros	SALINA	VPA
N° de vocalizações	463,20 ± 62,71	122,40 ± 39,90***
Total de vocalização (s)	94,08 ± 17,57	13,47 ± 7,21**
Média de vocalização (s)	0,18 ± 0,02	0,06 ± 0,005***
Máxima de vocalização (s)	1,30 ± 0,33	0,22 ± 0,03***
Total de silêncio (s)	206,9 ± 17,57	287,5 ± 7,21**
Média de silêncio (s)	1,02 ± 0,59	7,27 ± 2,04**
Máxima de silêncio (s)	6,00 ± 1,11	81,1 ± 19,27****

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student.* ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (s) segundos e Nº número.







Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (s) segundos e Nº número. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Da mesma maneira, foram encontradas diferenças quanto à duração total de silêncio [t = 4,24; p = 0,0005]. O VPA foi eficiente em aumentar a duração total de

silêncio em relação ao grupo controle. Segundo a análise estatística a duração média de silêncio evidenciou alterações estatisticamente significantes [t = 2,92; p = 0,0090]. Os filhotes previamente expostos pré-natalmente ao VPA exibiram uma duração média de silêncio maior quando comparado ao grupo controle. Na duração máxima de silêncio foi possível observar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [t = 3,89; p = 0,0011]. O tratamento pré-natal com VPA aumentou a duração máxima de silêncio das fêmeas em relação ao grupo controle. Esses resultados na avaliação da vocalização ultrassônica mostraram que o VPA pré-natal prejudicou a comunicação dos filhotes.

4.2.1.2 Avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T no PND 29 na prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5

A **Tabela 16** descreve e a **Figura 47** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na avaliação de comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T da prole feminina de ratas no PND 29. De acordo com a análise estatística do teste de Mann-Whitney U foram encontradas diferenças quanto à alternação entre os braços (MW = 19,50, p = 0,0211). A exposição ao VPA no GD 12,5 reduziu a alternação entre os braços, comparado ao grupo controle.

Tabela 16	Avaliação da exposição pré-natal ao VPA no comportamento repetitivo/restritivo e
	inflexibilidade cognitiva no labirinto em T nas fêmeas durante o PND 29. Os grupos
	representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas Wistar, SALINA = salina; VPA = ácido
	valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos)

	SALINA	VPA
Escore das alternâncias	$2,6 \pm 0,22$	1,7 ± 0,21*

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste de Mann-Whitney U. *p < 0.05.

Figura 47 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) na avaliação do comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva no labirinto em T nas fêmeas no PND 29



Fonte: Cezar, L. C. (2022)

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste de Mann-Whitney U. *p < 0,05. Escores: 0 = nenhuma alternação entre os braços visitados; 1 = uma alternação entre os braços visitados; 2 = duas alternações entre os braços visitados; 3 = três alternações entre os braços visitados; e 4 = quatro alternações entre os braços visitados.

4.2.1.3 Avaliação da socialização pelo comportamento de brincar no PND 30 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5

A Tabela 17 descreve e a Figura 48 ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na avaliação da socialização na prole feminina de ratas por meio do comportamento de brincar. De acordo com a análise estatística teste Mann Whitney U, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes na socialização. O tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 não foi capaz de alterar a frequência de *pinning* [t = 1,3, p = 0,2085] e *darts* [t = 0,48, p = 0,6301] quando comparado ao grupo controle. Quando as fêmeas foram testadas em relação ao tempo de farejar, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos [t = 1,46, p = 0,1603]. O tempo de perseguir revelou diferenças entre os grupos [t = 3,29, p = 0,0040]. O tratamento com VPA foi eficiente em alterar o tempo de perseguir das proles femininas de ratas quando comparado ao grupo controle; SAL vs. VPA (p < 0,0001). Na avaliação da frequência de passar sob/sobre não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [t = 1,6; p = 0,1253]. Finalmente, quando testado a frequência de levantar nas proles femininas de ratas, foi possível observar uma frequência menor de levantar em relação ao grupo salina [t = 2,93; p = 0,0089].




Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* **p* < 0,05 e ***p* < 0,01. Representação de (s) segundos e Nº número. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Tabela 17 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA no comportamento social da prole feminina de ratas durante o PND 30. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos)

	Grupos		
Parâmetros	SALINA	VPA	
Pinning	18,9 ± 1,84	14,3 ± 3,0	
Darts	3,2 ± 0,53	3,6 ± 0,61	
Farejar	41 ± 3,16	33,3 ± 4,19	
Perseguir	24,9 ± 0,70	20,6 ± 1,09**	
Passar sob/sobre	21 ± 0,74	18,1 ± 1,64	
Levantar	23,5 ± 1,05	18,9 ± 1,15**	

Fonte: Cezar, L. C. (2022)

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* **p* < 0,05 e ***p* < 0,01.

4.2.1.4 Avaliação da atividade locomotora geral no campo aberto no PND 32 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao desafio farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 18** descreve e a **Figura 49** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na atividade geral de proles femininas de ratas por meio do teste de campo aberto. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes. A distância percorrida total foi diminuída no grupo VPA+SAL em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 2,31; p = 0,0085]. Em relação a distância média percorrida, houve uma redução nos animais VPA+SAL em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 22; p < 0,0001]. Nenhuma alteração foi observada na distância máxima percorrida [F (1, 36) = 0, 01; p = 0,9074].

Quando avaliada a permanência na zona periférica, o tempo gasto foi menor no grupo VPA+MET em relação ao grupo SAL+SAL [F (1, 36) = 15; p = 0,0292].

 Tabela 18
 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg 45 minutos antes do teste) na atividade locomotora geral em campo aberto no PND 32 da prole feminina de ratas *Wistar* (n = 10 para todos os grupos)

Parâmetros	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
Distância total cm	7552 ± 444,5	4382 ± 519,8**	6633 ± 361	5467 ± 1065
Distância média cm	0,85 ± 0,03	0,54 ± 0,02****	0,82 ± 0,04 ^{###}	0,90 ± 0,04 ^{###}
Distância máx. cm	13,9 ± 0,85	11,9 ± 0,63	22,7 ± 7,18	22 ± 8,17
Tempo na ZP	288,1 ± 2,15	283,4 ± 2,58	283,2 ± 3,59	275,3 ± 2,55*
Frequência na ZP	31,9 ± 5,87	10,7 ± 1,94 ^{%%}	84,5 ± 27,9	17,4 ± 3,85 [%]
Tempo médio ZP	12,5 ± 3	37,4 ± 7,11**	14,2 ± 5,46 ^{##}	4,67 ± 1,6 ^{###}
Tempo na ZC	7,62 ± 1,28	13,2 ± 2,41	17,9 ± 2,13**	15,1 ± 1*
Frequência na ZC	7,1 ± 1,11	11,5 ± 1,87	8,1 ± 1,29	14,1 ± 4,42
Tempo médio ZC	1,45 ± 0,23	1,12 ± 0,16	1,16 ± 0,28	4,38 ± 1,62
Imobilidade (s)	204,2 ± 7,5	179,5 ± 10,6	233,7 ± 10,7 ^{##}	229,6 ± 12 ^{##}
Frequência de imobilidade	487,6 ± 23	538,8 ± 29,8	338,1 ± 36*###	432 ± 41,3
Imobilidade média (s)	0,41 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,81 ± 0,14 [#]	0,67 ± 0,18
Mobilidade (s)	619,2 ± 31,1	663,5 ± 38,6	387,9 ± 45,1 ^{##}	499,3 ± 59,5 ^{##}
Frequência de mobilidade	81,8 ± 6,59	101,6 ± 8,27	52,3 ± 8,87** ^{###}	56,6 ± 9,65
Mobilidade média (s)	0,13 ± 0,007	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,006
Rotação	40,5 ± 5	18,7 ± 2,6**	$33,3 \pm 5,2$	39,1 ± 3,74 [#]
Velocidade média	26,2 ± 1,18	16,4 ± 0,83****	24,6 ± 1,45 ^{###}	27,2 ± 1,44 ^{####}
Transição entre ZP e ZC	70,6 ± 13,3	63,2 ± 15,6	92,6 ± 25,1	93,2 ±18,1

Grupos

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,005, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,005, **p < 0,0001; comparando ao grupo SAL+MET. Representação de (cm) centímetros, (ZP) zona periférica, (ZC) zona central e (s) segundos.

Figura 49 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg 45 minutos antes do teste) na atividade locomotora geral em campo aberto durante o PND 32 na prole feminina de ratas



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32. Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando o grupo entre os colchetes. Representação de (cm) centímetros, (ZP) zona periférica, (ZC) zona central e (s) segundos. A frequência de visitas na zona periférica foi diminuída nos animais do grupo VPA+MET quando comparado ao grupo SAL+ MET e VPA+ SAL [F (1, 36) = 2,52; p = 0,0042]. O tempo médio na zona periférica foi menor nos animais que receberam VPA no GD 12,5 em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 12; p < 0,0001].

Em relação à duração na zona central, foi possível verificar que os animais tratados com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET), aumentaram sua permanência na ZC em relação ao grupo controle SAL+SAL. [F (1, 36) = 5; p < 0,001]. A frequência na zona central não foi alterada nos grupos estudados [F (1, 36) = 0, 09; p = 0,7554]. Já a permanência média na zona central foi aumentada nos animais do grupo VPA+MET em relação ao grupo VPA+SAL [F (1, 36) = 3, 31; p = 0,0450].

O tempo total da imobilidade foi aumentado entre os grupos tratados com metilfenidato em relação ao grupo VPA+SAL [F (1, 36) = 0, 98; p < 0,001]. A imobilidade média foi aumentada nos animais do grupo SAL+MET em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 9; p = 0,0395]. Já a frequência de imobilidade foi maior no grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo SAL+MET [F (1, 36) = 0, 41; p < 0,001]. O grupo SAL+MET mostrou alterações em relação ao grupo SAL+SAL (p < 0,0151).

Em relação ao tempo de mobilidade, a análise estatística verificou diferenças estatísticas significantes [F (1, 36) = 0, 54; p < 0,001]. A exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 aumentou a mobilidade em relação aos grupos SAL+MET e VPA+MET. A frequência de mobilidade foi maior nos animais do grupo SAL+MET em relação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1, 36) = 0, 55; p < 0,0001]. Nenhuma alteração significante foi observada na mobilidade média [F (1, 36) = 2,38; p = 0,1313].

Contudo no movimento de rotação, observado nos animais, foi possível verificar que o grupo VPA+SAL rotacionou menos em seu próprio eixo em comparação ao grupo SAL+SAL. O tratamento com metilfenidato nos animais pré tratados com VPA foi capaz de reestabelecer essas alterações comportamentais (p < 0,0001). Isso também foi observado em relação a velocidade média dos animais, que foi menor no grupo VPA+SAL em relação aos grupos estudados [F (1, 36) = 24; p < 0,0001], e reestabelecida com o uso do metilfenidato (VPA+SAL vs VPA+MET p < 0,0001).

Com esses resultados, verificamos uma hipolocomoção da prole feminina dos animais tratados pré-natalmente com VPA em relação ao grupo controle. O desafio farmacológico com metilfenidato foi eficiente em melhorar alguns dos prejuízos comportamentais daqueles que receberam VPA no GD 12,5. 4.2.1.5 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e seus metabólitos no estriado via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no PND 32 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao desafio farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 19** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao desafio farmacológico com metilfenidato na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos estriatais via HPLC na prole feminina de ratas. Após 55 minutos de administrado o desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg), os animais foram eutanasiados e avaliados em relação aos neurotransmissores e seus metabólitos. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Os níveis estriatais noradrenérgicos ilustrados na **Figura 50** revelam que a noradrenalina estudada não foi alterada [F (1, 36) = 0,96; p = 0,3792]. Os níveis estriatais de VMA foram significativamente aumentados no grupo VPA+MET quando comparado ao grupo controle SAL+SAL e SAL+MET [F (1, 36) = 4, 72; p < 0,001].

Os níveis estriatais do *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) foram significativamente aumentados no grupo VPA+MET em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 3, 84; p < 0,0002]. Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Nenhuma alteração foi observada nos níveis de DOPAC estriatal [F (1, 36) = 0, 06; p = 0,8068]. Os níveis de dopamina foram aumentados no grupo SAL+MET em relação ao VPA+SAL e VPA+MET [F (1, 36) = 0, 87; p < 0,001]. Em relação ao HVA estudado nas fêmeas, o grupo VPA+MET aumentou significativamente os seus níveis estriatais quando comparado a todos os grupos avaliados [F (1, 36) = 32; p < 0,0001].

Nos níveis do *turnover* da dopamina, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Nos níveis de DOPAC/DA nenhuma alteração foi encontrada [F (1, 36) = 0,01; p = 0,9171].

Tabela 19 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) nos níveis de neurotransmissores, metabólitos e *turnover* no corpo estriado da prole feminina de ratas *Wistar*. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32

	Grupos				
Analito	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET	
NA	411,3 ± 25,8	409,3 ± 23,3	409,5 ± 24,4	352,9 ± 35,8	
VMA	184,3 ± 23,5	397,7 ± 79,6	299,6 ± 50,4	530,9 ± 60,2***%	
DA	271,5 ± 30	187 ± 12,2	385,7 ± 70,5 ^{##}	226,7 ± 18,5 [%]	
DOPAC	130,6 ± 22	87,2 ± 6,51	120 ± 13,8	92,3 ± 6,30	
HVA	56,8 ± 9,46	51,3 ± 8,42	119,9 ± 25,2	628 ± 85****####%%%%	
5-HIAA	4580 ± 252,4	4705 ± 245,1	3904 ± 172,1	5201 ± 486,5 [%]	
5-HT	6706 ± 784,1	7584 ± 354,6	10911± 1216**#	319 ± 57**** ^{####%%%%}	
VMA/NOR	0,45 ± 0,16	1 ± 0,21	0,8 ± 0,16	2,63 ± 0,59** ^{##%%}	
DOPAC/DA	0,45 ± 0,05	$0,48 \pm 0,03$	0,50 ± 0,15	0,55 ± 0,11	
HVA/DA	0,20 ± 0,03	0,27 ± 0,03	0,33 ± 0,08	2,5±0,28****####%%%%	
DOPAC+HVA/DA	130,8 ± 22	87,5 ± 6,48	120,4 ± 13,8	91,2 ± 5,83	
5-HIAA/5-HT	0,83 ± 0,14	0,62 ± 0,02	0,39 ± 0,04	14,1 ± 1**** ^{###%%%%}	

Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. %p < 0,05, %%p < 0,01, %%%p < 0,001; comparando ao grupo SAL+MET. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA) Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Nos níveis do *turnover* da dopamina, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Nos níveis de DOPAC/DA nenhuma alteração foi encontrada [F (1, 36) = 0,01; p = 0,9171]. Já em relação as concentrações de HVA/DA, as fêmeas do grupo VPA+MET demonstraram um aumento significativo em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 53; p < 0,0001]. Nas concentrações de DOPAC+HVA/DA, os animais não modificaram seu *turnover* de dopamina [F (1, 36) = 0,26; p = 0,6101] (**Figura 51**).

Figura 50 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de noradrenalina na prole feminina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando o grupo entre os colchetes.





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

Quando avaliada as concentrações de 5-HIAA o grupo VPA+MET aumentou a concentração do neurotransmissor em relação ao grupo SAL+MET [F (1, 36) = 3, 52; p = 0,0281]. Já em relação aos níveis de 5-HT no estriado, o grupo VPA+MET reduziu significativamente o neurotransmissor quando comparado aos demais grupos [F (1, 36) = 66; p < 0,0001]. O grupo SAL+MET aumentou os níveis de 5-HT em relação a todos os grupos investigados (p < 0,0001). As concentrações de 5-HIAA/5-HT foram alteradas no grupo VPA+MET em comparação a todos os grupos do estudo [F (1, 36) = 165; p < 0,0001] (**Figura 52**).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

4.2.1.6 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e seus metabólitos no córtex via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no PND 32 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao desafio farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 20** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao desafio farmacológico com metilfenidato na dosagem dos neurotransmissores, metabólitos e *turnover* no córtex via HPLC na prole feminina de ratas *Wistar*. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Os níveis corticais de noradrenalina [F (1, 36) = 8; p < 0,0001] e de VMA [F (1, 36) = 17; p < 0,0001] foram significativamente diminuídos no grupo VPA+MET quando comparado a todos os grupos estudados. Os níveis corticais do *turnover* da

noradrenalina (VMA/noradrenalina) não foram alterados [F (1, 36) = 1; p = 0,3044] (**Figura 53**).

Tabela 20 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) nos níveis de neurotransmissores, metabólitos e *turnover* no córtex da prole feminina de ratas *Wistar*. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32

	Grupos				
Analito	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET	
NA	252,8 ± 18,3	216,8 ± 12,9	211,2 ± 8,71	165 ± 11,8***	
VMA	162,9 ± 17,5	229,3 ± 19,3*	201,7 ± 14,1	159,5 ± 15,7 [#]	
DA	2229 ± 208	1347 ± 168*	2998 ± 149*###	3039 ± 237*####	
DOPAC	725,7 ± 81,5	574,7 ± 65,6	507,6 ± 47,5	570,6 ± 56,9	
HVA	448,1 ± 31	257,9 ± 15****	302 ± 24,8**	303,5 ± 29,7**	
5-HIAA	4005 ± 482,3	2691 ± 317,7	6101 ± 681*###	2534 ± 89,8 ^{%%%%}	
5-HT	3529 ± 611,2	5175 ± 511,1*	440 ± 57****####	427,8 ± 150****####	
VMA/NOR	2,23 ± 0,29	2,23 ± 0,23	2,41 ± 0,24	1,88 ± 0,22	
DOPAC/DA	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,2±0,01**** ^{####}	0,19 ± 0,01**** ^{####}	
HVA/DA	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,16 ± 0,01**#	0,12 ± 0,01****###	
DOPAC+HVA/DA	1136 ± 84,8	1247 ± 81,2	819,8 ± 102,1 [#]	605,7 ± 94,1**###	
5-HIAA/5-HT	0,53 ± 0,36	0,59 ± 0,16	0,26 ± 0,05	$0,20 \pm 0,04$	

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo SAL+MET. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA) Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Figura 53 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de noradrenalina na prole feminina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. O grupo VPA+MET reduziu seus

níveis corticais de DOPAC em relação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1, 36) = 2, 35; p < 0,0001]. Nos níveis de dopamina, não foram observadas alterações nos grupos estudados [F (1, 36) = 0, 28; p = 0,5937]. Em relação ao HVA estudado nos animais, as concentrações foram significativamente diminuídas no grupo VPA+MET quando comparado aos grupos VPA+SAL e SAL+SAL [F (1, 36) = 1,68; p < 0,0001].

Os níveis de DOPAC/DA foram aumentados [F (1, 36) = 0, 02; p < 0,0001] nos grupos que receberam desafio farmacológico com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET) quando comparados aos grupos que não receberam (SAL+SAL e VPA+SAL). Todavia, as concentrações de HVA/DA reduziram nos grupos VPA+MET e SAL+MET quando comparados aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1 36) = 0,17; p < 0,0001]. O mesmo pode ser observado nos níveis de DOPAC+HVA/DA naqueles grupos tratados com metilfenidato [F (1, 36) = 3,19; p < 0,0001] (**Figura 54**).

Os níveis corticais de 5-HIAA [F (1, 36) = 3,46; p = 0,0709] e de 5-HT [F (1, 36) = 0,29; p = 0,5894], não foram alterados segundo a avaliação estatística empregada. As fêmeas tratadas previamente no GD 12,5 (VPA+SAL) não demonstraram alterações nos níveis do *turnover* de 5-HT [F (1, 36) = 7, 29; p = 0,1035] (**Figura 55**).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando o grupo entre os colchetes. 4.2.1.7 Avaliação da expressão gênica de DRD1 e DRD2 no estriado via PCR-RT no PND 32 na prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao desafio farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 21** descreve e a **Figura 56** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e o desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg) na expressão gênica do estriado via PCR-RT nas fêmeas. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

O grupo tratado com VPA no GD 12,5 e desafiado com metilfenidato no PND 32 (VPA+MET) reduziu significativamente a expressão de *DRD1* estriatal em relação a todos os grupos estudados [F (1, 16) = 0,41; p < 0,001]. Em relação a expressão do gene *DRD2*, os grupos tratados com metilfenidato (VPA+MET e SAL+MET) diminuíram os níveis gênicos no estriado quando comparados aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL. O tratamento prévio com metilfenidato agudamente em fêmeas expostas ao VPA pré-natal, revelou uma hipoexpressão de *DRD1* e *DRD2* (p < 0,001).

Tabela 21Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico
com metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica de DRD1
e DRD2 no estriado de ratas no PND 32 (n = 5 para todos os grupos)

	Grupos				
Gene	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET	
DRD1	1 ± 0,26	1 ± 0,22	0,25 ± 0,05	0,07 ± 0,02*%%	
DRD2	0,84, ± 0,06	1,15 ± 0,23	$0,46 \pm 0,10^{\#}$	0,10 ± 0,01**###	

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001, ****p < 0.001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0.05, **p < 0.001; comparando ao grupo SAL+MET.

Figura 56 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica de *DRD1* e *DRD2* no estriado de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 5 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

4.2.1.8 Avaliação da expressão gênica de DRD1 e DRD2 no córtex via PCR-RT no PND 32 na prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao desafio farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 22** descreve e a **Figura 57** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e o desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg) na expressão gênica do córtex via PCR-RT nas fêmeas. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, não foram encontradas alterações estatísticas entre os grupos. Nenhum dos múltiplos tratamentos foram eficientes em alterar a expressão cortical de *DRD1* [F (1, 16) = 0,36; p = 0,5536] e *DRD2* [F (1, 16) = 0,07; p = 0,7938] em fêmeas no PND 32.

Tabela 22Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico
com metilfenidato (5 mg/kg 55 minutos antes da eutanásia) na expressão gênica de DRD1
e DRD2 no córtex de ratas no PND 32 (n = 5 para todos os grupos)

	Grupos					
Gene	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET		
DRD1	1,17 ± 0,15	1,27 ± 0,14	1,25 ± 0,19	1,18 ± 0,02		
DRD2	1,11 ± 0,08	1,57 ± 0,28	0,97 ± 0,29	1,56 ± 0,25		







Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e desafio com salina no PND 32, SAL+MET = grupo controle que foi desafiado com metilfenidato no PND 32 e VPA+MET = VPA no GD 12,5 e desafio com metilfenidato no PND 32 (n = 5 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

4.2.2 Experimento 2 - Avaliação comportamental e neuroquímica dos efeitos do tratamento farmacológico prolongado (5 mg/kg PND 21 ao PND 32) com metilfenidato na prole feminina de ratas expostas ao VPA pré-natal

Depois de confirmada a gestação, ratas foram expostas ao VPA no GD 12,5 e os sinais e sintomas tipo-autistas reproduzidos em suas proles. Nesse experimento, tratou-se prolongadamente com metilfenidato animais previamente submetidos ao VPA pré-natal ou a solução salina 0,9%. A administração prolongada do metilfenidato pode ocasionar mudanças estruturais em circuitos envolvendo dopamina, além de traduzir essa neuroplasticidade em alterações comportamentais. Logo após o desmame no PND 21, fêmeas Wistar receberam diariamente por gavagem 5 mg/kg de metilfenidato. No 10º dia de tratamento com metilfenidato, ratas expostos ao VPA pré-natal foram avaliados em relação a socialização (comportamento de brincar).

Após 12 dias de tratamento com metilfenidato, os animais foram testados em relação a atividade locomotora observada no teste de campo aberto. Ao final do teste, os animais foram eutanasiados e estruturas cerebrais de interesse coletadas, como o descrito anteriormente.

4.2.2.1 Avaliação da socialização pelo comportamento de brincar no PND 30 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento prolongado com metilfenidato

A **Tabela 23** descreve e a **Figura 58** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal em fêmeas e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 10 dias consecutivos) no comportamento social de ratas. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas alterações estatisticamente significantes.

Em relação à frequência de *pinning*, foi possível verificar uma redução significante desse parâmetro nas ratas do grupo SAL+MET quando comparado a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 19; p < 0,0001]. A frequência de *darts* não sofreu nenhuma alteração entre os grupos segundo a estatística empregada [F (1, 36) = 1,51; p = 0,2263].

O tempo gasto pelas fêmeas farejando foi maior naqueles animais que receberam tratamento prolongado com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET) em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 36; p < 0,0001]. Todavia, o tempo de perseguir não foi alterado significativamente entre os grupos [F (1,36) = 1,75; p = 0,1935].

Figura 58 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (aos 10 dias de tratamento) no comportamento social de brincar no PND 30 na prole feminina de ratas



Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato, VPA+MET = VPA no GD 12,5 que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

	Grupos				
Parâmetros	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET	
Pinning	17,2 ± 1,22	17,6 ± 1,24	4,1 ± 0,69**##	16,4 ± 1,91 ^{%%%}	
Darts	$3,4 \pm 0,37$	3,5 ± 0,26	3,1 ± 0,31	4,2 ± 0,59	
Farejar	29,8 ± 1,35	26,2 ± 2,72	41,1 ± 1,47*###	38,5 ± 1,91 ^{##}	
Perseguir	$40,6 \pm 3,60$	37,5 ± 3,81	40,5 ± 1,99	29,8 ± 1,17	
Passar sob/sobre	18,8 ± 1,54	24,9 ± 0,70	26,9 ± 1,7*	27,8 ± 1,98**	
Levantar	18,9 ± 0,9	15,4 ± 1,5	21,9 ± 2,2	29,3 ± 2*###	

Tabela 23Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal de metilfenidato
prolongadamente (5 mg/kg aos 10 dias de tratamento) no comportamento social de brincar
no PND 30 da prole feminina de ratas *Wistar* (n = 10 para todos os grupos)

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL.

Na avaliação do parâmetro de passar sob/sobre as ratas que foram tratados com VPA pré-natalmente e metilfenidato prolongado exibiram uma frequência menor desse comportamento em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 2,78; p < 0,001]. Finalmente, quando testado a frequência de levantar dos animais, o grupo VPA+MET aumentou significativamente esse comportamento em relação aos grupos SAL+SAL, SAL+MET e VPA+SAL [F (1,36) = 9; p < 0,001]. Os resultados previamente expostos sobre a avaliação do comportamento de brincar, demonstram que a utilização do VPA pré-natal não prejudicou a socialização da prole feminina de ratas. 4.2.2.2 Avaliação da atividade locomotora geral em campo aberto no PND 32 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento prolongado com metilfenidato

A **Tabela 24** descreve e a **Figura 59** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal em fêmeas de ratas no GD 12,5 e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na atividade locomotora geral em campo aberto. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas alterações estatisticamente significantes.

O tratamento com VPA foi eficiente em reduzir a distância percorrida total nas fêmeas quando comparado ao grupo controle [F (1, 36) = 27; p < 0,0001]. O tratamento com metilfenidato prolongado naqueles animais pré-natalmente tratados com VPA não foi eficiente em reestabelecer a distância percorrida total (VPA+SAL vs. VPA+MET p = 0,1986).

Quando analisamos a distância média percorrida, o grupo VPA+SAL diminuiu esse parâmetro em relação ao grupo SAL+SAL [F (1, 36) = 45; p < 0,0001]. O tratamento prolongado com metilfenidato foi eficiente em reduzir significativamente a distância média em relação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL (p < 0,0001). Em relação a distância máxima percorrida, os animais dos grupos SAL+MET e VPA+MET reduziram esse comportamento em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 4,88; p < 0,0001].

A análise estatística revelou que exposição pré-natal ao VPA no GD 12,5 não alterou a permanência na zona periférica em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 0, 99; p = 0,0242]. O grupo SAL+MET aumentou a permanência na zona periférica em relação ao grupo controle (p = 0,0194). Já a permanência média na zona periférica não foi alterada entre os grupos [F (1, 36) = 0; p = 0, 9654]. O número de entradas na zona periférica foi reduzido nos animais VPA+SAL, SAL+MET e VPA+MET em relação ao grupo controle [F (1, 36) = 11; p = 0,001].

Em relação à duração na zona central, os animais do grupo SAL+MET e VPA+MET gastaram mais tempo no centro do aparato campo aberto quando comparado aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1, 36) = 7,17; p < 0,0001].

 Tabela 24
 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) na atividade locomotora geral em campo aberto durante o PND 32 na prole feminina de ratas

Parâmetros	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET
Distância total cm	7552 ± 444,5	4832 ± 295****#	3442 ± 194,6****	3945 ± 249****
Distância média cm	$0,85 \pm 0,03$	0,54 ± 0,59****	0,34 ± 0**** ^{####}	0,41 ± 0****#
Distância máx. cm	13,9 ± 0,85	11,9 ± 0,63	1,94 ± 0,2**** ^{####}	2,43 ± 0,2****####
Tempo na ZP	288,1 ± 2,15	283,4 ± 2,58***	306,5 ± 11,8****	302,4 ± 6,03****
Frequência na ZP	31,9 ± 5,87	10,7 ± 1,94***	7,4 ± 0,76****	7,8 ± 1,09****
Tempo médio ZP	12,5 ± 3,06	37,4 ± 7,11**	38,8 ± 2,2***	27,2 ± 3,15
Tempo na ZC	7,61 ± 1,28	13,2 ± 2,41	19,6 ± 1,59***	19,3 ± 2,38**
Frequência na ZC	7,1 ± 1,11	11,5 ± 1,87	$6,2 \pm 0,59^{\#}$	7,1 ± 1,01
Tempo médio ZC	1,45 ± 0,23	1,12 ± 0,16	3,12 ± 0,35*** ^{####}	1,73 ± 0,28 ^{%%}
Imobilidade (s)	204,2 ± 7,5	179,5 ± 10,6	75 ± 3,18**** ^{####}	73,6 ± 3,5****####
Frequência de imobilidade	487, 6 ± 23	538,8 ± 29,8	311,8 ± 13****###	351,7 ± 18*** ^{####}
Imobilidade média (s)	0,41 ± 0,03	$0,34 \pm 0,03$	0,25 ± 0,01***	$0,23 \pm 0^{***\#}$
Mobilidade (s)	81,8 ± 6,59	101,6 ± 8,27	257,1 ± 6**** ^{####}	244,1 ± 7**** ^{####}
Frequência de mobilidade	619,2 ± 31,1	663,5 ± 38,6	315,1 ± 13**** ^{####}	352 ± 18**** ^{####}
Mobilidade média (s)	0,13 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,8 ± 0,04**** ^{####}	0,71 ± 0**** ^{####}
Rotação	40,5 ± 5	18,7 ± 2,61****	5,9 ± 0,52**** [#]	8,3 ± 1,04****
Velocidade média	28,1 ± 2,17	17,3 ± 1,22****	9,93 ± 0,59****##	10,8 ± 0,44**** ^{##}
Transição entre ZP e ZC	68,5 ± 12,2	59,9 ± 14,5	44,4 ± 16,8	18,09 ± 7,36

Grupos

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Figura 59 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) na atividade locomotora geral em campo aberto no PND 32 na prole feminina de ratas



Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes. Representação (s) segundos.

O número de entradas na zona central não foi significativamente alterado entre os grupos [F (1, 36) = 0, 02; p = 0,8873]. O tempo médio gasto na ZP foi maior nos VPA+SAL e SAL+MET em relação ao SAL+SAL [F (1, 36) = 2; p < 0,001]. A frequência na zona central foi menor nas ratas do grupo SAL+MET em relação ao grupo VPA+SAL [F (1, 36) = 1,99; p = 0,0225]. Já o tempo médio na ZC foi maior nos animais do grupo SAL+MET em relação a todos os grupos estudados [F (1, 36) = 3,87; p < 0,0001].

O tempo de imobilidade foi reduzido entre os grupos tratados com metilfenidato em comparação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1,36) = 2,82; p < 0,0001]. Contudo a frequência de imobilidade foi menor nos grupos SAL+MET e VPA+MET em relação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1,36) = 0; p < 0,0001]. A imobilidade média também foi menor nos grupos SAL+MET e VPA+MET em relação ao grupo controle SAL+SAL [F (1,36) = 0,78; p < 0,001].

O tempo total de mobilidade foi maior nos grupos que receberam tratamento prolongado com metilfenidato quando comparado ao grupo controle SAL+SAL e o grupo VPA+SAL [F (1,36) = 474,2; p < 0,001]. Porém a frequência com que as fêmeas ficaram móveis foi menor nos grupos SAL+MET e VPA+MET em relação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1,36) = 127,2; p < 0,0001]. Quando avaliado a mobilidade média, as fêmeas tratadas prolongadamente com metilfenidato aumentaram esse parâmetro em comparação ao grupo controle [F (1,36) = 344,1; p < 0,0001].

Os animais dos grupos VPA+SAL, SAL+MET e VPA+MET rotacionaram menos em seu próprio eixo em relação ao grupo SAL+SAL [F (1,36) = 17; p < 0,0001]. Contudo, a velocidade média dos animais VPA+SAL, SAL+MET e VPA+MET foi menor em relação ao grupo SAL+SAL [F (1,36) = 20 p < 0,0001]. Nenhuma alteração estatística foi observada em relação a transição entre as zonas periférica e central do aparato [F (1,36) = 0,44; p = 0,0602].

Com esses resultados, verificamos uma hipolocomoção da prole feminina tratadas pré-natalmente com VPA em relação ao grupo controle. Todavia, o tratamento prolongado com metilfenidato não foi eficiente em melhorar alguns dos prejuízos comportamentais daqueles que receberam VPA no GD 12,5.

4.2.2.3 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e seus metabólitos no estriado via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no PND 32 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento prolongado com metilfenidato

A **Tabela 25** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na dosagem dos neurotransmissores, metabólitos e *turnover* (razão dos metabólitos com os neurotransmissores) no estriado via HPLC na prole feminina de ratas *Wistar*. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Os níveis estriatais de VMA (**Figura 60**) não foram significativamente modificados entre os grupos [F (1, 36) = 0,26; p = 0,6077]. A noradrenalina estudada no grupo VPA+MET foi aumentada em relação a todos os grupos estudados [F (1,36) = 15; p < 0,0001]. O *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) foi aumentado no grupo VPA+MET em relação ao grupo SAL+SAL e VPA+SAL [F (1,36) = 1,96; p < 0,001].

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos (**Figura 61**), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos níveis de DOPAC [F (1,36) = 0; p=0,9059], dopamina [F (1,36) = 0; p = 0,9233] e HVA estriatal [F (1,36) = 2,26; p = 0,1409]. Os níveis do *turnover* da dopamina não apresentaram diferença estatisticamente significante em relação ao DOPAC/DA [F (1,36) = 0; p = 0,9878], HVA/DA [F (1,36) = 0; p = 0,7627] e DOPAC+HVA/DA [F (1,36) = 0,23; p = 0,6299].

Quando avaliado, as concentrações de 5HIAA [F (40) = 7,04; p=0,0008] e 5HT [F (40) = 4,73; p=0,0070] no estriado, aumentaram no grupo VPA+MET quando comparado aos demais grupos estudados (**Figura 62**).

As concentrações de 5-HIAA aumentaram no grupo que receberam tratamento prolongado com metilfenidato quando comparado a todos os grupos estudados [F (1,36) = 11 p < 0,001]. Já em relação aos níveis de 5-HT no estriado, o grupo SAL+MET aumentou o neurotransmissor significativamente quando comparado ao grupo controle [F (1, 36) = 2; p < 0,001]. Quando avaliado, as concentrações de 5-HIAA/5-HT foram reduzidas nos grupos SAL+MET e VPA+MET em comparação ao grupo controle [F (1,36) = 10; p < 0,01].

	Grupos				
Analito	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET	
NA	228,8 ± 10,7	228,2 ± 17,4	269,1 ± 27,5	594±75****###%%%%	
VMA	78,3 ± 12	71 ± 10,5	105,3 ± 9,96	110,3 ± 14,3	
DA	73,4 ± 22,2	73,9 ± 12,6	94,1 ± 10,1	97,8 ± 18,1	
DOPAC	236,9 ± 25,6	272,7 ± 32,1	399,4 ± 61,3	422,7 ± 74,6	
HVA	189,1 ± 38,2	181,6 ± 25,9	149,6 ± 19,6	227,7 ±26,7	
5-HIAA	20181 ± 1569	19124 ± 981,6	15993 ± 1976	28128 ± 2795*#%%%	
5-HT	569,6 ± 74,5	750,5 ± 63,5	1615 ± 382** [#]	1175 ± 169	
VMA/NOR	0,33 ± 0,04	$0,33 \pm 0,04$	0,48 ± 0,12	0,77 ± 0,16*#	
DOPAC/DA	7,74 ± 2,39	8 ± 2	6,19 ± 1,34	6,55 ± 1,22	
HVA/DA	4,41 ± 0,73	4,29 ± 1,94	$2,36 \pm 0,45$	$2,69 \pm 0,6$	
DOPAC+HVA/DA	321,6 ± 98,5	378,1 ± 104,7	531,8 ± 152,9	475,4 ± 99,5	
5-HIAA/5-HT	36,9 ± 3,8	25,3 ± 4,91	11,4 ± 1,76**	28,4 ± 7	

Tabela 25 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) nos níveis estriatais de NA, DA e 5-HT na prole feminina de ratas *Wistar* no PND 32 (n = 10 para todos os grupos)

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, ##p < 0,001, ###p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo SAL+MET. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA) Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Figura 60 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de noradrenalina na prole feminina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

Figura 61 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de dopamina na prole feminina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

Figura 62 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis estriatais de serotonina na prole feminina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

As concentrações de 5-HIAA aumentaram no grupo que receberam tratamento prolongado com metilfenidato quando comparado a todos os grupos estudados [F (1,36) = 11 p < 0,001]. Já em relação aos níveis de 5-HT no estriado, o grupo SAL+MET aumentou o neurotransmissor significativamente quando comparado ao grupo controle [F (1, 36) = 2; p < 0,001]. Quando avaliado, as concentrações de 5-HIAA/5-HT foram reduzidas nos grupos SAL+MET e VPA+MET em comparação ao grupo controle [F (1,36) = 10; p < 0,01].

4.2.2.4 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e seus metabólitos no córtex via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no PND 32 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento prolongado com metilfenidato

A **Tabela 26** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na dosagem dos neurotransmissores, metabólitos e *turnover* (razão dos metabólitos com os neurotransmissores) no córtex via HPLC na prole feminina de ratas *Wistar*. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Os níveis corticais de VMA (**Figura 63**) [F (1,36) = 27,6; p < 0,0001] foram aumentados no grupo SAL+MET em relação a todos os grupos estudados. Já naqueles animais que receberam VPA+MET, os níveis de VMA foram reduzidos em relação aos grupos avaliados. A quantidade de noradrenalina [F (1,36) = 3,87; p < 0,001] foi aumentada nos grupos tratados com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET) quando comparado aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL. Os níveis corticais do *turnover* da noradrenalina foram significativamente reduzidos no grupo VPA+MET em relação aos demais grupos estudados [F (1, 36) = 62; p < 0,0001].

Em relação aos níveis de dopamina (**Figura 64**) e seus metabólitos, foram encontradas algumas diferenças estatisticamente significantes. Os grupos VPA+SAL, SAL+MET e VPA+MET aumentaram seus níveis corticais de DOPAC em relação ao controle SAL+SAL [F (1, 36) = 10; p < 0,001].

Tabela 26 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) nos níveis corticais de NA, DA e 5-HT na prole feminina de ratas *Wistar* no PND 32. Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos)

Grupos					
Analito	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET	
NA	488,9 ± 52,8	352,1 ± 40,7	650,4 ± 72,6 [#]	760,5 ± 77,3* ^{###}	
VMA	1756 ± 241,8	1425 ± 172,9	2953 ± 308** ^{####}	351 ± 58*** ^{##%%%%}	
DA	117,4 ± 19,1	87,1 ± 8	196,7 ± 18,4*###	179 ± 18,8 ^{###}	
DOPAC	488,9 ± 52,8	1446 ± 200,2**	1513 ± 206***	1343 ± 176,1**	
HVA	494,3 ± 79	396 ± 53,7	427,3 ± 57,9	329,7 ± 54,1	
5-HIAA	9423 ± 894,3	8484 ± 395,6	7442 ± 441,6	5098 ± 985,1** [#]	
5-HT	888,9 ± 119,8	669,6 ± 96,8	1190 ± 147,2	1914 ± 331,6**###	
VMA/NOR	3,52 ± 0,28	3,91 ± 0,27	4,43 ± 0,12	0,9±0,2****###%%%%	
DOPAC/DA	11,58 ± 2,53	18 ± 2,72	9 ± 1,21 [#]	7,54 ± 0,69 ^{##}	
HVA/DA	11,5 ± 2,53	17 ± 2,15	9 ± 1,21 [#]	1,35 ± 0,20**###%	
DOPAC+HVA/DA	1407 ± 319,8	1343 ± 166,5	1395 ± 147,7	1444 ± 192,8	
5-HIAA/5-HT	10,6 ± 1,25	13 ± 1,6	5,96 ± 0,66 ^{###}	5,2 ± 1,36* ^{###}	

Os valores são representados como média ± E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,001, ****p < 0,0001; comparando ao grupo VPA+SAL. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo SAL+MET. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA) Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Os níveis de 5-HIAA foram reduzidos no grupo VPA+MET em relação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1, 36) = 5; p < 0,001], e os níveis de 5-HT foram aumentados no grupo VPA+MET [F (1, 36) = 5,72; p < 0,0004] quando comparado aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL (**Figura 65**). Quando avaliado, o turnover de 5-HIAA/5-HT foi maior [F (1, 36) = 1,51; p < 0,001] nos grupos VPA+SAL e SAL+ SAL em relação aos grupos testados com metilfenidato prolongado (SAL+MET e VPA+MET) (Figura 41C).

Figura 63 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de noradrenalina na prole feminina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

Figura 65 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao tratamento prolongado farmacológico com metilfenidato nos níveis corticais de serotonina na prole feminina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam SAL+SAL = grupo controle, VPA+SAL = VPA no GD 12,5 e tratamento prolongado com salina, SAL+MET = grupo controle que recebeu tratamento prolongado com metilfenidato e VPA+MET = VPA no GD 12,5 tratado prolongadamente com metilfenidato (n = 10 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001, ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

4.2.2.5 Avaliação da expressão gênica de DRD1 e DRD2 no estriado via PCR-RT no PND 32 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 27** descreve e a **Figura 66** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na expressão gênica no estriado via PCR-RT nos filhotes fêmeas de ratas. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

Tabela 27Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica no estriado da prole feminina de ratas

	Grupos				
GENE	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET	
DRD1	0,14 ± 0,04	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,03 ± 0,01	
DRD2	0,1 ± 0,02	$0,08 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,03$	0,03 ± 0	

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. p < 0.05.

A expressão de *DRD1* foi aumentada nos animais tratados prolongadamente com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET) em relação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1, 16) = 5; p = 0 < 0,001]. O grupo das ratas VPA+MET demonstrou uma expressão acentuada de *DRD1* no córtex quando comparado aos demais grupos (p < 0,0001).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam o tratamento com VPA no GD 12,5 e o tratamento prolongado com metilfenidato (n = 5 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. p < 0,05 comparando os grupos.

4.2.2.6 Avaliação da expressão gênica de DRD1 e DRD2 no córtex via PCR-RT no PND 32 da prole feminina de ratas expostas ao VPA no GD 12,5 e ao tratamento farmacológico com metilfenidato

A **Tabela 28** descreve e a **Figura 66** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal e ao tratamento farmacológico prolongado com metilfenidato (5 mg/kg por 12 dias consecutivos) na expressão gênica no córtex via PCR-RT na prole feminina de ratas. De acordo com a análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pósteste Tukey, foram encontradas diversas alterações estatisticamente significantes.

A expressão de *DRD1* foi aumentada nos animais tratados prolongadamente com metilfenidato (SAL+MET e VPA+MET) em relação aos grupos SAL+SAL e VPA+SAL [F (1, 16) = 5; p = 0 < 0,001]. O grupo das ratas VPA+MET demonstrou uma expressão acentuada de *DRD1* no córtex quando comparado aos demais grupos (p < 0,0001).

Tabela 28 Avaliação da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg) e pós-natal ao metilfenidato (5 mg/kg) prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica no córtex da prole feminina de ratas. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SAL+SAL = salina 0,9% pré-natal e pós-tratamento com salina; VPA+SAL = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg e pós-tratamento com salina; VPA+MET = VPA pré-natal e pós-tratamento com metilfenidato; SAL+MET = salina pré-natal e pós-tratamento com metilfenidato (n = 5 para todos os grupos)

	Grupos					
GENE	SAL+SAL	VPA+SAL	SAL+MET	VPA+MET		
DRD1	$0,3 \pm 0,02$	$0,3 \pm 0,04\%$	$0,55 \pm 0,03^*$	0,79 ± 0,08****####%		
DRD2	$0,5 \pm 0,08$	0,47 ± 0,11	0,35 ± 0,15	$0,25 \pm 0,06$		

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,001; comparando ao grupo SAL+SAL. *p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001; comparando ao grupo VPA+SAL. %p < 0,05, %%p < 0,01, %%%%p < 0,001; comparando ao grupo SAL+MET.

Figura 67 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) e ao desafio farmacológico com metilfenidato prolongadamente (12 dias de tratamento) na expressão gênica de *DRD1* e *DRD2* no córtex na prole feminina de ratas no PND 32



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam os diversos tratamentos com VPA no GD 12,5 e o pós-tratamento com metilfenidato (n = 5 para todos os grupos). Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. p < 0,05 comparando os grupos entre os colchetes.

4.3 PARTE III – Efeitos da exposição ao VPA no GD 12,5 na prole masculina e feminina de ratas em diferentes fases do desenvolvimento comportamental e no SNC

Durante essa etapa do experimento, os animais foram testados para verificar possíveis alterações no neurodesenvolvimento durante a vida juvenil/adulta. Para obtenção do modelo experimental de autismo, ratas prenhes foram expostas ao VPA (400 mg/kg) no GD 12,5 ou solução salina e separadas em grupos experimental e controle.

4.3.1 Experimento 1: avaliação da modulação de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral e substância *nigra* por meio da imunofluorescência após exposição pré-natal com VPA no GD 12,5

Para esse experimento foram avaliados dois grupos. O primeiro grupo foi o SALINA, que é composto por filhotes das ratas que foram tratadas pré-natalmente com salina no GD 12,5. O segundo grupo foi o VPA, que é composto por filhotes das ratas tratadas pré-natalmente com ácido valpróico no GD 12,5. Após o desmame, machos Wistar foram alojados em caixas moradia no biotério até o momento do experimento. No PND 35, os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca e o cérebro processado para realizar a imunofluorescência de neurônios TH⁺.

Os resultados apresentados na **Figura 68** ilustram os efeitos da exposição ao VPA no GD 12,5 em neurônios dopaminérgicos TH⁺ no complexo VTA-SN por meio da imunofluorescência no PND 35. A análise estatística do teste t de *Student* revelou um aumento significativo no número de neurônios imunorreativos TH⁺ em animais tratados com VPA no GD12,5 quando comparados ao grupo controle salina [t = 4,96; p = 0,0025].

Figura 68 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos neurônios dopaminérgicos TH⁺ imunorreativos na área tegmental ventral e substância *nigra* em ratos no PND 35



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student.* **p < 0,001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 4 para todos os grupos). Contagem de neurônios TH⁺ em fotomicrografias da região da área tegmental ventral (VTA) e substância *nigra* (SN). 10 campos fotográficos foram utilizados em cada corte no lado esquerdo do encéfalo.

Na avaliação das imagens nas **Figuras 69, 70 e 71** é possível observar um aumento significativo da marcação em verde de neurônios dopaminérgicos reativos ao anticorpo TH no grupo VPA em relação ao grupo SALINA. Além do número de neurônios TH⁺, nas **Figuras 69, 70 e 71** podemos observar também o aumento da intensidade de fluorescência (cor verde) das células imunorreativas no grupo VPA nas regiões complexo área tegmental ventral, substância *nigra* parte compacta e substância *nigra* parte reticular.

Figura 69 Fotomicrografias do encéfalo de ratos para avaliação dos efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos neurônios dopaminérgicos TH⁺ imunorreativos no complexo VTA-SN no PND 35



Imagens com cortes coronais processados por imunofluorescência utilizando anticorpo para TH, o qual revelou a imunorreatividade de neurônios dopaminérgicos na cor verde. Os cortes foram obtidos no PND 35 de ratos tratados no GD 12,5 com VPA. Com Nº 4, os animais de cada grupo tiveram seus encéfalos fotografados em 10 campos do lado esquerdo. Para avaliar o sistema dopaminérgico as regiões da área tegmental ventral (VTA), substância nigra *pars* compacta (SNc) e substância nigra reticular (SNr). Barra de escala = 45 µm. Nível encefálico caudal com aumento de 10X.

Figura 70 Fotomicrografias do encéfalo de ratos para avaliação dos efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos neurônios dopaminérgicos TH⁺ imunorreativos no complexo VTA-SN no PND 35



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Imagens com cortes coronais processados por imunofluorescência utilizando anticorpo para TH, o qual revelou a imunorreatividade de neurônios dopaminérgicos na cor verde. Os cortes foram obtidos no PND 35 de ratos tratados no GD 12,5 com VPA. Com Nº 4, os animais de cada grupo tiveram seus encéfalos fotografados em 10 campos do lado esquerdo. Para avaliar o sistema dopaminérgico as regiões da área tegmental ventral (VTA), substância nigra *pars* compacta (SNc) e substância nigra reticular (SNr). Barra de escala = 45 µm. Nível encefálico caudal com aumento de 10X.

Figura 71 Fotomicrografias do encéfalo de ratos para avaliação dos efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos neurônios dopaminérgicos TH⁺ imunorreativos no complexo VTA-SN no PND 35



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Imagens com cortes coronais processados por imunofluorescência utilizando anticorpo para TH, o qual revelou a imunorreatividade de neurônios dopaminérgicos na cor verde. Os cortes foram obtidos no PND 35 de ratos tratados no GD 12,5 com VPA. Com Nº 4, os animais de cada grupo tiveram seus encéfalos fotografados em 10 campos do lado esquerdo. Para avaliar o sistema dopaminérgico as regiões da área tegmental ventral (VTA), substância nigra *pars* compacta (SNc) e substância nigra reticular (SNr). Barra de escala = 45 µm. Nível encefálico caudal com aumento de 10X.
4.3.2 Experimento 2: avaliação comportamental e molecular de ratos em maturidade sexual expostos ao VPA pré-natal

Depois de confirmada a gestação, ratas com 120 dias de vida foram tratadas com solução salina 0,9% ou VPA no GD 12,5 (400 mg/kg) intraperitoneal. Os filhotes expostos ao VPA foram avaliados em diversos testes para estudo dos prejuízos comportamentais durante a fase juvenil. Para verificar os impactos do autismo nos animais em uma fase mais tardia os testes aplicados foram: padrão do *grooming* espontâneo (PND 60), padrão do *grooming* induzido pela sacarose (PND 61), atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz (PND 62) e atividade ansiosa na caixa claro-escuro (PND 62). Os filhotes expostos ao VPA foram mantidos em condições de biotério até a fase adulta. Para verificar os impactos do VPA no SNC dos ratos tipo-autistas, a concentração de neurotransmissores via HPLC foi realizada no PND 90 no estriado, córtex, hipocampo, hipotálamo e PAG

4.3.2.1 Avaliação do padrão de grooming espontâneo no PND 60 em machos Wistar tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5

A **Tabela 29** descreve e a **Figura 72** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal no *grooming* espontâneo durante o PND 60 em ratos. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados. A frequência de *self-grooming* foi diminuída naqueles animais que receberam VPA no GD 12,5 em relação ao grupo controle [t = 4,79; p = 0,0001].

Em relação ao tempo gasto pelos animais realizando o *self-grooming*, é possível observar uma diminuição dessa atividade no grupo VPA [t = 3,68; p = 0,0017]. Além disso, a exposição prévia ao VPA no GD 12,5 foi capaz de reduzir a frequência de *grooming* total [t = 4,00; p = 0,0003] e a atividade exploratória de levantar [t = 4,54; p = 0,0002] quando os animais foram comparados ao grupo SALINA. Segundo a análise estatística, a frequência de bolos fecais não foi alterada entre os grupos estudados [t=1,91; p = 0,0717].







Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001. Representação de (%) porcentagem e (s) segundos. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Tabela 29	Avaliação do padrão de grooming espontâneo no PND 60 em machos Wistar expostos ao
	VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido
	valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Parâmetros	SALINA	VPA
Frequência de grooming	5,8 ± 0,57	$2,8 \pm 0,2^{***}$
Tempo de <i>grooming</i> (s)	73,8 ± 9	35,7 ± 4,1**
Tempo de <i>grooming</i> (%)	12,3 ± 1,5	5,96 ± 0,8**
Grooming total	$2,9 \pm 0,37$	0,8 ± 0,29***
Levantar	28,2 ± 1,2	19,8 ± 1,38***
Bolos fecais	$2,4 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,6$

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,001, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (%) porcentagem e (s) segundos.

4.3.2.2 Avaliação do padrão de grooming induzido pela sacarose 10% no PND 61 em machos Wistar tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5

A **Tabela 30** descreve e a **Figura 73** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal no *grooming* induzido pela sacarose 10% durante o PND 61 em machos *Wistar*. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados. A frequência de *self-grooming* foi reduzida naqueles animais que receberam VPA no GD 12,5 em relação ao grupo controle [t = 6,14; p = 0,0001].

Em relação ao tempo gasto pelos animais realizando o *self-grooming*, é possível observar uma diminuição dessa atividade no grupo VPA [t = 5,14; p = 0,0001]. Além disso, a exposição prévia ao VPA no GD 12,5 foi capaz de reduzir a frequência de *grooming* total [t = 7,24; p = 0,0001] e a atividade exploratória de levantar [t = 4,90; p = 0,0001] quando os animais foram comparados ao grupo SALINA. Segundo a análise estatística, a frequência de bolos fecais foi aumentada no grupo VPA em relação ao grupo SALINA [t=3,05; p = 0,0068].

Figura 73 Avaliação do padrão de *grooming* induzido pela sacarose 10% no PND 61 em machos *Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001. Representação de (%) porcentagem e (s) segundos. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Tabela 30	Avaliação do padrão de grooming induzido pela sacarose 10% no PND 61 em machos
	Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9%
	pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grup	DOS
Parâmetros	SALINA	VPA
Frequência de grooming	15,6 ± 1,29	7,2 ± 0,44****
Tempo de <i>grooming</i> (s)	$30 \pm 2,4$	16 ± 1,5****
Tempo de grooming (%)	39,4 ± 2,72	29,2 ± 1,99**
Grooming total	$4,4 \pm 0,3$	1,3 ± 0,3****
Levantar	$30,8 \pm 2,4$	17,1 ± 1,42***
Bolos fecais	$0,6 \pm 0,3$	2,7 ± 0,61**

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (%) porcentagem e (s) segundos.

4.3.2.3 Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado durante o PND 62 em machos Wistar tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5

A **Tabela 31** descreve e a **Figura 74** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado no PND 62 em machos *Wistar*. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Em relação a permanência nos braços fechados, o grupo exposto prénatalmente ao VPA aumentou o seu tempo gasto no aparato quando comparado ao grupo controle [t = 3,47; p = 0,0037]. Porém, a análise estatística revelou redução no tempo de permanência nos braços abertos nos animais VPA+SAL [t = 2,50; p = 0,0254].

Quando os animais foram testados em relação a frequência de cruzamento entre os braços do labirinto em cruz elevado, não houve alterações estatisticamente significantes entre os grupos [t = 0,59; p = 0,5586]. Todavia, quando o comportamento de risco foi testado o grupo VPA+SAL exibiu uma redução em relação ao grupo SAL+SAL [t = 3,55; p = 0,0032].

Figura 74 Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado no PND 62 em machos *Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (%) porcentagem e (s) segundos. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Tabela 31Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado no
PND 62 em machos Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos).
SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Parâmetros	SALINA	VPA
Tempo nos braços fechados (%)	73 ± 4,58	91,2 ± 2,49**
Tempo nos braços abertos (%)	24,3 ± 4,52	10,7 ± 5*
Cruzamento entre os braços	8,12 ± 1,17	6,87 ± 1,17
Comportamento de risco	11,1 ± 2,52	1,87 ± 0,63**
Entrada braços fechados	7,5 ± 0,96	8,25 ± 1,56
Entrada braços abertos	7 ± 1,11	1,75 ± 0,36***

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* **p* < 0,05, ***p* < 0,001, ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001. Representação de (%) porcentagem e (s) segundos.

A frequência de entrada nos braços fechados não foi alterada [t = 7,24; p = 0,0001], porém a frequência de entrada nos braços abertos foi diminuída no grupo VPA+SAL [t = 4,46; p = 0,0005].

Os resultados previamente expostos sobre a avaliação no labirinto em cruz elevado demonstraram que a utilização do VPA pré-natal prejudicou a atividade exploratória e ansiedade de ratos.

4.3.2.4 Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado durante o PND 62 em machos Wistar tratados pré-natalmente com VPA no GD 12,5

A **Tabela 32** descreve e a **Figura 75** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na avaliação da atividade ansiosa na caixa claro-escuro no PND 62 em machos *Wistar*. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

A análise estatística revelou que o tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 foi capaz de aumentar a permanência dos animais no lado escuro da caixa claroescuro quando comparado ao grupo controle [t = 3,23; p = 0,0059]. Em relação a avaliação da permanência no lado claro do aparato, foi possível verificar diferenças estatisticamente significantes na diminuição dessa atividade no grupo VPA em relação ao controle [t = 4,11; p = 0,0011]. Os animais do grupo tratado previamente com VPA no GD 12,5 transitaram menos entre os lados claro-escuro do aparato [t = 3,26; p = 0,0057] quando comparado ao grupo SALINA.

Os resultados previamente expostos sobre a avaliação na caixa claro-escuro demonstraram que a utilização do VPA pré-natal prejudicou a ansiedade de machos juvenis *Wistar*.

Tabela 32Avaliação da atividade ansiosa por meio da transição claro-escuro no aparato caixa claro-
escuro no PND 62 em machos Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os
grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Parâmetros	SALINA	VPA
Tempo no escuro (%)	$76 \pm 5,66$	95,4 ± 2**
Tempo no claro (%)	24,4 ± 4,73	3,63 ± 1,79**
Transição entre os lados	14,5 ± 3,24	3,12 ± 1,28**

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* **p* < 0,05, ***p* < 0,01, ****p* < 0,001 e *****p* < 0,0001. Representação de (%) porcentagem e (s) segundos.

Figura 75 Avaliação da atividade ansiosa por meio da transição claro-escuro no aparato caixa claroescuro no PND 62 em machos *Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg





Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* **p < 0,01. Representação de (%) porcentagem e (s) segundos. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

4.3.2.5 Avaliação do grooming espontâneo e induzido por sacarose 10% entre os grupos estudados de machos Wistar SALINA e VPA

A **Figura 76** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal no *grooming* espontâneo e no induzido por sacarose durante o PND 60 e 61 em machos. A análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey revelou diversas alterações estatisticamente significantes. A frequência de *self-grooming* foi alterada em ambos os testes [F (1, 36) = 29.1; p = 0,00001]. A frequência de *self-grooming* foi aumentada no teste de *grooming* induzido pela sacarose 10% em ambos os grupos (SALINA e VPA) em relação ao teste de *grooming* espontâneo.

Figura 76 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam os tratamentos com VPA e SALINA no GD 12,5. Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001 comparando os grupos entre os colchetes.

Em relação ao tempo gasto dos animais realizando o *self-grooming*, é possível observar uma diminuição dessa atividade nos grupos SALINA e VPA no teste de *grooming* induzido por sacarose em comparação com o teste de *grooming* espontâneo [F (1, 36) = 8.14; p = 0,0001] nos animais do grupo VPA. A duração da atividade exploratória de levantar não demonstrou diferenças nos grupos em relação aos testes

aplicados [F (1, 36) = 53.07; p = 0,4810]. Segundo a análise estatística, a frequência de bolos fecais foi alterada no grupo SALINA [F (1, 36) = 21.09; p = 0,0389].

4.3.2.6 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no estriado via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratos adultos (PND 90) expostos ao VPA pré-natal no GD 12,5

A **Tabela 33** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos no estriado via HPLC em animais machos com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Os níveis estriatais de VMA [t = 2,77; p = 0,0124] e noradrenalina [t = 3,35; p = 0,0035] foram significativamente reduzidos no grupo VPA quando comparado ao grupo controle SALINA **Figura 77**. Os níveis estriatais do *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) não foram modificados entre os animais estudados [t = 1,81; p = 0,0868].

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos (**Figura 78**) foi encontrado um aumento estatisticamente significante nos níveis de DOPAC [t = 3,10; p = 0,0062] no grupo VPA em relação ao grupo controle. Nenhuma alteração nos níveis de dopamina foi revelada [t = 0,1955; p = 0,8472]. Já o HVA estriatal, reduziu no grupo VPA quando comparado ao grupo SALINA [t = 2,83; p = 0,0109].

Em relação aos níveis do *turnover* da dopamina, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação ao DOPAC/DA [t = 2,10; p = 0,0493].

Já os níveis de HVA/DA foram reduzidos no grupo VPA [t = 2,27; p = 0,0356]. As concentrações de DOPAC+HVA/DA foram aumentadas nos animais expostos previamente ao VPA no GD 12,5 [t = 2,40; p = 0,0270]. Quando avaliada, as concentrações de 5-HIAA [t = 0,2,17; p = 0,0433] foram reduzidas nos machos expostos ao VPA GD 12,5. Todavia, os níveis de 5-HT não foram modificados no estriado [t = 1; p = 0,3273].

Tabela 33	Avaliação dos níveis de neurotransmissores no corpo estriado no PND 90 em machos
	Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9%
	pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Analito	SALINA	VPA
NA	980,1 ± 51,5	689,8 ± 69,4**
VMA	538,6 ± 195,6	114,3 ± 43,7*
DA	183,5 ± 40,1	187,2 ± 35,1
DOPAC	257,4 ± 34	773,7 ± 222,7**
HVA	476,7 ± 54,4	267,1 ± 49,9*
5-HIAA	35950 ± 1883	30556 ± 1615*
5-HT	1416 ± 277,2	1773 ± 221,1
VMA/NOR	0,61 ± 0,25	$0,48 \pm 0,32$
DOPAC/DA	1,87 ± 0,41	5,74 ± 1,82
HVA/DA	$2,99 \pm 0,5$	1,64 ± 0,32*
DOPAC+HVA/DA	318,4 ± 43,1	676,2 ± 142,3*
5-HIAA/5-HT	38,6 ± 8,69	19 ± 2,47*

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (%) porcentagem e (s) segundos. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Figura 77 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis estriatais de noradrenalina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Figura 78 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis estriatais de dopamina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Figura 79 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis estriatais de serotonina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% prénatal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Quando avaliado, as concentrações de 5-HIAA [t = 2,36; p = 0,0292] foram aumentadas no grupo VPA. As concentrações de 5-HIAA/5-HT foram reduzidas nos machos do grupo VPA em comparação ao grupo controle [t = 2,18; p = 0,0428] (**Figura 79**).

4.3.2.7 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no córtex via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratos adultos (PND 90) expostos ao VPA pré-natal no GD 12,5

A **Tabela 34** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos no córtex via HPLC em animais machos com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Os níveis corticais de VMA (**Figura 80**) [t = 6,71; p < 0,0001] e noradrenalina [t = 2,61; p = 0,0175] foram significativamente aumentados no grupo VPA quando comparado ao grupo controle SALINA. Os níveis corticais do *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) foram aumentados nos animais VPA [t = 2,18; p = 0,0423].

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos (**Figura 81**), houve um aumento significativo nos níveis de DOPAC [t = 2,37; p = 0,0291] no grupo VPA em relação ao grupo controle.

Os níveis de dopamina [t = 2,72; p = 0,0130] e de HVA [t = 4,39; p = 0,0003] também foram aumentados nos animais que receberam VPA pré-natal em relação ao grupo controle. Os níveis do *turnover* da dopamina, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação ao DOPAC/DA [t = 0,2421; p = 0,8112]. Em relação aos níveis de HVA/DA [t = 3,19; p = 0,0046], os animais tratados com VPA demonstraram um aumento desse analito. As concentrações de DOPAC+HVA/DA também foram aumentadas nos animais expostos previamente ao VPA no GD 12,5 [t = 3; p = 0,0074].

Quando avaliado, as concentrações de 5-HIAA (**Figura 82**) [t = 2,36; p= 0,0292] foram aumentadas no grupo VPA. Já os níveis de 5-HT não sofreram nenhuma alteração significante [t = 1,22; p = 0,2336].

Tabela 34	Avaliação dos níveis de neurotransmissores no córtex no PND 90 em machos Wistar
	expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal;
	VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos		
Analito	SALINA	VPA	
NA	217,8 ± 44,9	392,4 ± 49,3*	
VMA	51,3 ± 4,21	161,3 ± 15,8****	
DA	180,3 ± 12,5	259,7 ± 26,2*	
DOPAC	1965 ± 284,7	2879 ± 446	
HVA	395,8 ± 37,2	711,3 ± 61,4*	
5-HIAA	11253 ± 1148	13288 ± 1133*	
5-HT	899,6 ± 114	1114 ± 215,5	
VMA/NOR	0,27 ± 0,05	0,6 ± 0,13*	
DOPAC/DA	10,6 ± 1,3	10,2 ± 1,26	
HVA/DA	2,14 ± 0,27	2,54 ± 0,28*	
DOPAC+HVA/DA	1655 ± 229,6	3084 ± 414,7**	
5-HIAA/5-HT	14,4 ± 2,43	16,6 ± 3,45	

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Figura 80 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis corticais de noradrenalina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e ****p < 0,0001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Figura 82 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis corticais de serotonina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05. Representação de (s) segundos e Nº número. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

4.3.2.8 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no hipocampo via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratos adultos (PND 90) expostos ao VPA pré-natal no GD 12,5

A **Tabela 35** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos no hipocampo via HPLC em animais machos com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Os níveis hipocampais de VMA (**Figura 83**) [t = 1,81; p = 0,0863] não foram alterados. Entretanto os níveis de noradrenalina foram reduzidos nos animais VPA [t = 3; p = 0,0068].

	Grupos		
Analito	SALINA	VPA	
NA	370 ± 24,5	237,6 ± 35,7**	
VMA	165,5 ± 78,3	12301 ± 6530	
DA	102,8 ± 23	182,3 ± 50,9	
DOPAC	398,8 ± 52,8	559,8 ± 76,3**	
HVA	769,4 ± 126,4	643,4 ± 73	
5-HIAA	7815 ± 845,4	12172 ± 1051**	
5-HT	852,8 ± 251,1	1342 ± 153**	
VMA/NOR	-0,10 ± 0,62	89,2 ± 53,1	
DOPAC/DA	9,35 ± 3,43	4,57 ± 1,29**	
HVA/DA	10 ± 1,6	$3,8 \pm 0,7^{**}$	
DOPAC+HVA/DA	413,1 ± 50,9	566,2 ± 76,4	
5-HIAA/5-HT	14,4 ± 2,95	9,47 ± 1,46	

Tabela 35	Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipocampo no PND 90 em machos Wistar
	expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal;
	VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student.* ***p* < 0,01. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-dihidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina. **Figura 83** Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis hipocampais de noradrenalina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Figura 84 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) nos níveis hipocampais de dopamina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg





Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Os níveis do *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) não foram alterados nos animais VPA [t = 1,68; p = 0,1098]. Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos, foi encontrado um aumento estatisticamente significante nos níveis de DOPAC [t = 2; p = 0,0443] no grupo VPA em relação ao grupo controle. Nenhuma alteração nos níveis de dopamina [t = 0,1955; p = 0,8472] e HVA no hipocampo foram encontradas comparado ao grupo SALINA [t = 0,59; p = 0,5599]. Nos níveis do *turnover* da dopamina, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na redução de DOPAC/DA [t = 3; p = 0,0018] e HVA/DA [t = 2,78; p = 0,0123]. As concentrações de DOPAC+HVA/DA não foram alteradas nos animais expostos previamente ao VPA no GD 12,5 [t = 1,66; p = 0,1132] (**Figura 84**).

Quando avaliado, as concentrações de 5-HIAA [t = 3; p = 0,0042] foram aumentadas nos machos expostos ao VPA GD 12,5. Todavia, os níveis de 5-HT foram aumentados no hipocampo de ratos expostos ao VPA no GD 12,5 [t = 1; p = 0,3273]. As concentrações de 5-HIAA/5-HT não foram alteradas nos grupos avaliados [t = 1,80; p = 0,0879] (**Figura 85**).

Figura 85 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis hipocampais de serotonina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student.* **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

4.3.2.9 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no hipotálamo via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratos adultos (PND 90) expostos ao VPA pré-natal no GD 12,5

A **Tabela 36** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos no hipotálamo via HPLC em animais machos com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Tabela 36Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipotálamo no PND 90 em machos Wistar
expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal;
VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Analito	SALINA	VPA
NA	1399 ± 482,5	982,6 ± 239,2
VMA	6317 ± 1599	5122 ± 1760
DA	368,4 ± 76,1	153,6 ± 91,3*
DOPAC	1288 ± 182,5	1299 ± 159,7
HVA	2449 ± 234,7	1276 ± 174,1***
5-HIAA	25681 ± 3258	28576 ± 2214
5-HT	3975 ± 725,9	3343 ± 523
VMA/NOR	4,5 ± 1,13	$4,3 \pm 0,8$
DOPAC/DA	$4,32 \pm 0,8$	8,34 ± 1,33***
HVA/DA	7,7 ± 1,47	10,9 ± 1,33*
DOPAC+HVA/DA	1436 ± 199,5	1280 ± 175,1
5-HIAA/5-HT	7,8 ± 1,22	9,6 ± 1,89

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Figura 86 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis hipotalâmicos de noradrenalina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student*. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Figura 87 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis hipotalâmicos de dopamina em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg





Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Os níveis hipotalâmicos de VMA (**Figura 86**) [t = 0,70; p = 0,4896] e noradrenalina [t = 1,66; p = 0,1129] não foram alterados. Os níveis do *turnover* da noradrenalina (VMA/noradrenalina) não foram alterados nos animais VPA [t = 0,05; p = 0,9596].

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos, nenhuma alteração nos níveis de DOPAC foram observadas [t = 0,04; p = 0,9652].

Os níveis de dopamina [t = 2,87; p = 0,0102] e de HVA [t = 4; p = 0,0008] foram reduzidos nos animais que receberam VPA pré-natal em relação ao grupo controle. Os níveis do *turnover* da dopamina, apresentaram diferenças estatisticamente significantes no aumento de DOPAC/DA [t = 2,57; p = 0,0192] e HVA/DA [t = 2,23; p = 0,0384]. As concentrações de DOPAC+HVA/DA não foram alteradas nos animais expostos previamente ao VPA no GD 12,5 [t = 0,58; p = 0,5636] (**Figura 87**).

Quando avaliado o hipotálamo, as concentrações de 5-HIAA [t = 0,73; p = 0,4719] e 5-HT [t = 0,42; p = 0,6785] não sofreram nenhuma alteração significante. As concentrações de 5-HIAA/5-HT não foram alteradas nos grupos avaliados [t = 0,84; p = 0,4085] (**Figura 88**).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student*. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

4.3.2.10 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no PAG via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratos adultos (PND 90) expostos ao VPA pré-natal no GD 12,5

A **Tabela 37** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos na PAG via HPLC em animais machos com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Os níveis de VMA (**Figura 89**) [t = 0,56; p = 0,5815] não foram alterados, porém a noradrenalina foi aumentada nos animais VPA na PAG [t = 2,32; p = 0,0321].

Tabela 37	Avaliação dos níveis de neurotransmissores na PAG no PND 90 em machos Wistar
	expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal;
	VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Analito	SALINA	VPA
NA	24,6 ± 10,8	182,1 ± 115,8
VMA	172,2 ± 109,8	116,7 ± 76,8
DA	79,7 ± 24,5	81,9 ± 19,4*
DOPAC	69,3 ± 9,86	127 ± 40,4
HVA	393,6 ± 52,4	266 ± 49,6**
5-HIAA	8628 ± 562,1	9684 ± 2005
5-HT	2898 ± 784,8	1076 ± 223**
VMA/NOR	5,23 ± 1,88	0,97 ± 0,48*
DOPAC/DA	1,37 ± 0,23	1,44 ± 0,38
HVA/DA	6,75 ± 1	3,92 ± 1,7****
DOPAC+HVA/DA	87,2 ± 10,2	125,2 ± 17,8*
5-HIAA/5-HT	5,25 ± 0,93	9,11 ± 1,24*

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Figura 89 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de noradrenalina na PAG em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Figura 90 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de dopamina na PAG em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg





Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos, nenhuma alteração nos níveis de DOPAC foram observadas [t = 0,04; p = 0,9652]. Os níveis de dopamina [t = 2,37; p = 0,0288] e de HVA [t = 3,46; p = 0,0027] foram aumentados nos animais que receberam VPA pré-natal em relação ao grupo controle (**Figura 90**).

Aos níveis do *turnover* da dopamina, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na DOPAC/DA [t = 0,44; p = 0,6591]. Os níveis de HVA/DA [t = 6,51; p < 0,0001] foram significativamente reduzidos nos animais VPA. Já as concentrações de DOPAC+HVA/DA foram aumentadas nos animais expostos previamente ao VPA no GD 12,5 [t = 0,2,33; p = 0,0312]. Quando avaliada a PAG, as concentrações de 5-HIAA [t = 1,99; p = 0,0620] não foram alteradas. Os níveis de 5-HT foram diminuídos nos animais tratados no GD 12,5 com VPA [t = 3,65; p = 0,0021]. Quando avaliada a PAG, as concentrações de 5-HIAA [t = 2,47; p = 0,0234] (**Figura 91**).

Figura 91 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina na PAG em machos *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos). 4.3.3 Experimento 3: avaliação comportamental e molecular de ratas em maturidade sexual expostas ao VPA pré-natal

Depois de confirmada a gestação, ratas com 120 dias de vida foram tratadas com solução salina 0,9% ou VPA no GD 12,5 (400 mg/kg) intraperitoneal. Os filhotes expostos ao VPA foram avaliados em diversos testes para estudo dos prejuízos comportamentais durante a fase juvenil. Para verificar os impactos do autismo nos animais em uma fase mais tardia os testes aplicados foram: padrão do *grooming* espontâneo (PND 60), padrão do *grooming* induzido pela sacarose (PND 61), atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz (PND 62) e atividade ansiosa na caixa claro-escuro (PND 62). Os filhotes expostos ao VPA foram mantidos em condições de biotério até a fase adulta. Para verificar os impactos do VPA no SNC das ratas tipo-autistas, a concentração de neurotransmissores via HPLC foi realizada no PND 90 no estriado, córtex, hipocampo, hipotálamo e PAG.

4.3.3.1 Avaliação do padrão de grooming espontâneo no PND 60 em ratas Wistar tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5

A **Tabela 38** descreve e a **Figura 92** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal no *grooming* espontâneo durante o PND 60 em fêmeas *Wistar*. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

A frequência de *self-grooming* foi aumentada naqueles animais que receberam VPA no GD 12,5 [t = 2,59; p = 0,0181]. Em relação ao tempo gasto dos animais realizando o *self-grooming*, nenhuma alteração foi observada [t = 2,04; p = 0,0560]. Além disso, a exposição prévia ao VPA no GD 12,5 não foi capaz de alterar a frequência de *grooming* total [t = 0; p > 0,9999].





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Segundo a análise estatística, a frequência de bolos fecais não foi alterada entre os grupos estudados [t = 0; p > 0,9999].

Tabela 38Avaliação do padrão de grooming espontâneo no PND 60 em fêmeas Wistar expostos ao
VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido
valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Parâmetros	SALINA	VPA
Frequência de grooming	$2,1 \pm 0,34$	3,8 ± 0,55*
Tempo de <i>grooming</i> (s)	44,7 ± 9,19	75, 9 ± 12,2
Tempo de grooming (%)	7,46 ± 1,52	12,6 ± 2
Grooming total	0,9 ± 0,17	0,9 ± 0,27
Levantar	40, 6 ± 2	22,6 ± 1,6****
Bolos fecais	3,1 ± 0,86	3,1 ± 0,43

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001.

4.3.3.2 Avaliação do padrão de grooming induzido pela sacarose 10% no PND 61 na prole de ratas tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5

A **Tabela 39** descreve e a **Figura 93** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal no *grooming* induzido pela sacarose 10% durante o PND 61 em fêmeas *Wistar*. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados. A frequência de *self-grooming* foi diminuída naqueles animais que receberam VPA no GD 12,5 [t = 2,92; p = 0,0090] quando comparados ao grupo SALINA.

Em relação ao tempo gasto das ratas realizando o *self-grooming*, nenhuma alteração foi observada na atividade do grupo VPA [t = 0,43; p = 0,6670]. Além disso, houve redução na frequência de *grooming* total no grupo VPA [t = 2,65; p = 0,0161].

Figura 93 Avaliação do padrão de *grooming* induzido pela sacarose 10% no PND 61 em fêmeas *Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

A atividade exploratória de levantar foi reduzida naquelas fêmeas tratadas com VPA no GD 12,5 quando comparadas ao grupo SALINA [t = 3,93; p = 0,0010]. Segundo a análise estatística, a frequência de bolos fecais não foi alterada entre os grupos estudados [t = 0,94; p = 0,3553].

Tabela 39Avaliação do padrão de grooming induzido pela sacarose 10% no PND 61 em fêmeas
Wistar expostas ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9%
pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Parâmetros	SALINA	VPA
Frequência de grooming	11,3 ± 0,84	7,7 ± 0,89*
Tempo de <i>grooming</i> (s)	253,6 ± 14,3	267,9 ± 29,3
Tempo de grooming (%)	42,2 ± 2,39	44,6 ± 4,88
Grooming total	3,1 ± 0,34	1,7 ± 0,39*
Levantar	14,9 ± 0,8	10,1 ± 0,91
Bolos fecais	1,4 ± 0,58	0,8 ± 0,24

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de Student. *p < 0,05.

4.3.3.3 Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado durante o PND 62 nas fêmeas Wistar tratadas pré-natalmente com VPA no GD 12,5

A **Tabela 40** descreve e a **Figura 94** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado *n*o PND 61 em fêmeas *Wistar*. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Em relação a permanência nos braços fechados, o grupo exposto prénatalmente ao VPA aumentou o seu tempo gasto no aparato quando comparado ao grupo controle [t = 2,63; p = 0,0168]. Porém, a análise estatística não revelou diferenças significantes no tempo de permanência nos braços abertos nos animais VPA+SAL [t = 1,86; p = 0,0780].

Tabela 40Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado no
PND 62 em fêmeas Wistar expostas ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos).
SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Parâmetros	SALINA	VPA
Tempo nos braços fechados (%)	71,5 ± 4,57	86,2 ± 3,16*
Tempo nos braços abertos (%)	23,7 ± 4,39	13,2 ± 3,44
Cruzamento entre os braços	10,4 ± 0,61	7,1 ± 0,84**
Comportamento de risco	5,9 ± 0,94	5,3 ± 1,22
Entrada braços fechados	8,9 ± 0,34	6,4 ± 0,76**
Entrada braços abertos	4,2 ± 0,59	3,1 ± 0,52

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. **p* < 0,05 e ***p* < 0,01.

Quando as ratas foram testadas em relação a frequência de cruzamento entre os braços do labirinto em cruz elevado, houve uma diminuição no grupo VPA em relação ao SALINA [t = 3,14; p = 0,0056]. Todavia, quando o comportamento de risco foi testado, no grupo VPA+SAL nenhuma alteração foi encontrada [t = 0,38; p = 0,7024].

A frequência de entrada nos braços fechados foi reduzida no grupo VPA [t = 2,98; p = 0,0080], porém a frequência de entrada nos braços abertos não foi alterada em relação ao grupo controle [t = 1,38; p = 0,1820].

Os resultados previamente expostos sobre a avaliação no labirinto em cruz elevado demonstraram que a utilização do VPA pré-natal prejudicou a atividade exploratória e ansiedade nas fêmeas de ratas. **Figura 94** Avaliação da atividade exploratória espontânea e ansiosa no labirinto em cruz elevado no PND 62 em fêmeas *Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

4.3.3.4 Avaliação da atividade ansiosa por meio da transição claro-escuro no aparato caixa claro-escuro durante o PND 62 em fêmeas Wistar tratadas prénatalmente com VPA no GD 12,5

A **Tabela 41** descreve e a **Figura 95** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na avaliação da atividade ansiosa na caixa claro-escuro no PND 62 em fêmeas *Wistar*. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

A análise estatística revelou que o tratamento pré-natal com VPA no GD 12,5 foi capaz de aumentar a permanência dos animais no lado escuro da caixa claroescuro quando comparado ao grupo controle [t = 4,45; p = 0,0003]. Em relação a avaliação da permanência no lado claro do aparato, foi possível verificar diferenças estatisticamente significantes na diminuição dessa atividade no grupo VPA em relação ao controle [t = 4,44; p = 0,0003]. Os animais do grupo previamente tratado com VPA no GD 12,5 transitaram menos entre os lados claro-escuro do aparato [t = 2,23; p = 0,0385] quando comparado ao grupo SALINA.

Os resultados previamente expostos sobre a avaliação na caixa claro-escuro demonstraram que a utilização do VPA pré-natal prejudicou a ansiedade da prole feminina de ratos.

Tabela 41 Avaliação da atividade ansiosa por meio da transição claro-escuro no aparato caixa claro-escuro no PND 62 em fêmeas Wistar expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Parâmetros	SALINA	VPA
Tempo no escuro (%)	50,6 ± 1,63	72,7 ± 4,68***
Tempo no claro (%)	45,9 ± 1,56	24,4 ± 4,56***
Transição entre os lados	20,7 ± 0,8	13,7 ± 3***

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* **p* < 0,05, ***p* < 0,01 e ****p* < 0,001.

Figura 95 Avaliação da atividade ansiosa por meio da transição claro-escuro no aparato caixa claroescuro no PND 62 em fêmeas *Wistar* expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

4.3.3.5 Avaliação do grooming espontâneo e induzido por sacarose 10% entre os grupos estudados de ratas Wistar SALINA e VPA

A **Figura 96** ilustra os efeitos da exposição ao VPA pré-natal no *grooming* espontâneo durante o PND 60 e no *grooming* induzido pela sacarose 10% no PND 61 em fêmeas. A análise estatística ANOVA de duas vias seguido do pós-teste Tukey revelou diversas alterações estatisticamente significantes.

A frequência de *self-grooming* foi aumentada no teste de *grooming* induzido por sacarose em ambos os grupos (SALINA e VPA) em relação ao teste de *grooming* espontâneo [F (1, 36) = 23,28; p = 0,0001].



Figura 96 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5) no comportamento de grooming espontâneo e induzido por sacarose em fêmeas *Wistar* no PND 60 e PND 61

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os grupos representam os tratamentos com VPA e SALINA no GD 12,5. Os valores são representados como média \pm E.P.M., aplicado teste ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Tukey. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,001 comparando os grupos entre os colchetes.

4.3.3.6 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no estriado via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal

A **Tabela 42** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos no estriado via HPLC em animais fêmeas com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Os níveis estriatais de VMA (**Figura 97**) não foram alterados nos animais estudados [t = 1,25; p = 0,2258]. Já a noradrenalina foi reduzida nas ratas expostas ao VPA no GD 12,5 [t = 2,23; p = 0,0383]. Os níveis do *turnover* VMA/NOR não foi alterado em nenhum dos grupos avaliados [t = 1,13; p = 0,2704].

Em relação aos níveis de dopamina e seus metabólitos (**Figura 98**), os níveis de DOPAC [t = 2,81; p = 0,0114] foram aumentados no grupo VPA. Os níveis de dopamina não foram alterados [t = 0,56; p = 0,5801] e o HVA foi diminuído [t = 2,33; p = 0,0314] nas ratas expostas ao VPA. Em relação aos níveis do *turnover* de dopamina, DOPAC/DA foi reduzido naqueles animais que receberam VPA no GD 12,5 [t = 3,12;

p = 0,0059]. Já o HVA/DA não foi alterado na análise realizada [t = 1,66; p = 0,1129], todavia, houve um aumento no *turnover* DOPAC+HVA/DA no grupo VPA [t = 4; p = 0,0008].

Tabela 42Avaliação dos níveis de neurotransmissores no estriado no PND 90 em fêmeas Wistar
expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal;
VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Analito	SALINA	VPA
NA	993,2 ± 49,8	870,2 ± 41,3
VMA	773,3 ± 203,6	478,3 ± 117,6
DA	167,6 ± 83,3	81,3 ± 13,6
DOPAC	1027 ± 137,4	611 ± 197,8
HVA	326,9 ± 48,7	194 ± 29,4*
5-HIAA	32577 ± 3817	30581 ± 1638
5-HT	1952 ± 345,7	1247 ± 174,8
VMA/NOR	$0,69 \pm 0,23$	0,38 ± 0,14
DOPAC/DA	11,8 ± 2,19	7,38 ± 1,87*
HVA/DA	$3,85 \pm 0,88$	2,91 ± 0,51***
DOPAC+HVA/DA	1031 ± 137,6	614 ± 197,8
5-HIAA/5-HT	25,5 ± 7,4	$34 \pm 7,4$

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Quando avaliado o estriado, as concentrações de 5-HIAA (**Figura 99**) [t = 0,48; p = 0,6365] e 5-HT [t = 1,66; p = 0,1129], nenhuma alteração significante foi encontrada. Nenhuma alteração foi encontrada nas concentrações de 5-HIAA/5-TH [t = 0,80; p = 0,4281].

Figura 97 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de noradrenalina estriatal em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* **p* < 0,05. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Figura 98 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de dopamina estriatal em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg





Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).
Figura 99 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina estriatal em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

4.3.3.7 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no córtex via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal

A **Tabela 43** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos no córtex via HPLC em animais fêmeas com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Os níveis corticais de VMA foram reduzidos significativamente no grupo VPA [t = 6,37; p < 0,0001]. As concentrações de noradrenalina [t = 1,29; p = 0,2141] não foram significativamente modificadas. Houve uma redução nos níveis corticais do *turnover* VMA/noradrenalina [t = 4,69; p = 0,0002] no grupo VPA (**Figura 100**).

Em relação a concentração de dopamina no córtex, os níveis de DOPAC [t = 0,46; p = 0,6497], dopamina [t = 0,33; p = 0,7399] HVA [t = 1,75; p = 0,0984] não foram estatisticamente alterados entre os grupos. Os níveis de DOPAC/DA [t = 1,14; p = 0,2682], HVA/DA [t = 0,894; p = 0,3846], DOPAC+HVA/DA [t = 0,4672; p = 0,6467] não apresentaram diferenças significativas (**Figura 101**).

Tabela 43	Avaliação dos níveis de neurotransmissores no córtex no PND 90 em fêmeas Wistar
	expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal;
	VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Analito	SALINA	VPA
NA	291,1 ± 31,8	348,5 ± 28,9
VMA	160,8 ± 20,4	18 ± 9,24****
DA	180,7 ± 8,55	184,2 ± 23,6
DOPAC	2839 ± 320,2	3101 ± 465,3
HVA	621,2 ± 50,2	813,1 ± 107,8
5-HIAA	6739 ± 918,9	4585 ± 386,7*
5-HT	2494 ± 902,5	1839 ± 305,2
VMA/NOR	1,43 ± 0,3	1,72 ± 0,55
DOPAC/DA	10,5 ± 2,41	9,82 ± 9
HVA/DA	6,34 ± 0,58	11,4 ± 3,25
DOPAC+HVA/DA	546,1 ± 95,3	199 ± 51**
5-HIAA/5-HT	6,29 ± 0,55	8,87 ± 2

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Figura 100 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de noradrenalina cortical em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Quando avaliado no córtex, as concentrações de 5-HIAA [t = 2,28; p = 0,0360] foram reduzidas no grupo VPA em relação ao grupo SALINA (**Figura 102)**. Já os níveis de 5-HT não foram alterados [t = 0,29; p = 0,7730]. Os níveis do *turnover* 5-HIAA/5-HT [t = 1,94; p = 0,0700] não foram alterados entre os grupos.

4.3.3.8 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no hipocampo via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal

A **Tabela 44** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos no hipocampo via HPLC em animais fêmeas com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Os níveis de VMA não foram modificados entre os grupos [t = 1,60; p = 0,1272]. Porém os níveis de noradrenalina foram reduzidos no hipocampo de ratas que receberam VPA pré-natal [t = 2,12; p = 0,0493]. Os níveis de VMA/NOR [t = 0,05; p = 0,9558] não foram alterados (**Figura 103**).

Em relação a concentração de dopamina no hipocampo, os níveis de DOPAC [t = 0.81; p = 0.4265] e dopamina [t = 0.05; p = 0.9531] não foram alterados. Já o HVA foi aumentado no hipocampo naqueles animais que receberam VPA [t = 4.41; p = 0.0004]. Os níveis de DOPAC/DA [t = 0.40; p = 0.6874] e HVA/DA [t = 1.74; p = 0.1004] não foram alterados entre os grupos. Entretanto uma redução nos níveis DOPAC+HVA/DA [t = 3; p = 0.0055] foram observados nos animais do grupo VPA (**Figura 104**). Quando avaliado no hipocampo, as concentrações de 5-HIAA [t = 1; p = 0.2859], 5-HT [t = 0.18; p = 0.9853] e 5-HIAA/5-HT [t = 0.87; p = 0.3959] não foram alterados.

Tabela 44	Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipocampo no PND 90 em fêmeas Wistar
	expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal;
	VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Analito	SALINA	VPA
NA	341,1 ± 16,8	266,1 ± 31,1*
VMA	364,2 ± 79,9	484,9 ± 66,7
DA	47,3 ± 9,99	43,6 ± 5,23
DOPAC	540,2 ± 95,5	469,2 ± 175,3
HVA	238,3 ± 19,9	336,9 ± 30,1*
5-HIAA	11912 ± 1303	9211 ± 714,7
5-HT	1610 ± 211,3	1613 ± 312,5
VMA/NOR	1,43 ± 0,3	1,72 ± 0,55
DOPAC/DA	10,5 ± 2,41	9,82 ± 9
HVA/DA	6,34 ± 0,58	11,4 ± 3,25
DOPAC+HVA/DA	546,1 ± 95,3	199 ± 51**
5-HIAA/5-HT	6,29 ± 0,55	8,87 ± 2

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Figura 103 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de noradrenalina hipocampal em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos)

Figura 105 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina hipocampal em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos) 4.3.3.9 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no hipotálamo via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal

A **Tabela 45** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos no hipotálamo via HPLC em animais fêmeas com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Os níveis de VMA não foram modificados entre os grupos [t = 1,38; p = 0,1837].

	Grupos	
Analito	SALINA	VPA
NA	836,7 ± 98,5	473,1 ± 80,3*
VMA	4326 ± 862,8	5941 ± 787,5
DA	113 ± 20,6	91,1 ± 15,4
DOPAC	1490 ± 330,6	549,9 ± 116,8*
HVA	1570 ± 512,9	758,6 ± 134,8
5-HIAA	22000 ± 1667	12064 ± 2475**
5-HT	1871 ± 180,3	1137 ± 260*
VMA/NOR	5,15 ± 0,93	9,14 ± 1*
DOPAC/DA	15,1 ± 4,52	9 ± 3,44
HVA/DA	11,5 ± 2,49	11,6 ± 4
DOPAC+HVA/DA	1503 ± 329,5	561,5 ± 120,2*
5-HIAA/5-HT	16,7 ± 4,93	17,8 ± 6,28

Tabela 45Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipotálamo no PND 90 em fêmeas Wistar
expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal;
VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Figura 106 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de noradrenalina hipotalâmico em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Figura 107 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de dopamina hipotalâmico em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student*. *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Porém os níveis de noradrenalina foram reduzidos no hipotálamo de ratas que receberam VPA pré-natal [t = 2,86; p = 0,0104]. Os níveis de VMA/NOR [t = 2,63; p = 0,0167] foram aumentados no grupo VPA (**Figura 106**).

Em relação a concentração de dopamina no hipotálamo, os níveis de DOPAC [t = 2,68; p = 0,0152] e HVA [t = 2,24; p = 0,0375] foram aumentados nas ratas do grupo VPA. Já a dopamina analisada não foi modificada [t = 0,92; p = 0,3664]. As concentrações de DOPAC/DA [t = 1,33; p = 0,1989] e de HVA/DA [t = 0,96; p = 0,3485] não foram alteradas entre os grupos. Entretanto uma redução foi observada nos níveis de DOPAC+HVA/DA no grupo tratado com VPA [t = 2,66; p = 0,0151] (**Figura 107**).

Quando avaliado no hipotálamo, as concentrações de 5-HIAA [t = 3,33; p = 0,0037] e 5-HT [t = 4,57; p = 0,0002] foram reduzidas no grupo VPA. Todavia o *turnover* 5-HIAA/5-HT [t = 1,26; p = 0,2216] não sofreu nenhuma alteração no hipotálamo das ratas (**Figura 108**).

Figura 108 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina hipotalâmico em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022). Os valores são representados como média ± E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

4.3.3.9 Avaliação dos níveis de DA, 5-HT, NA e turnover no PAG via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em ratas adultas (PND 90) expostas ao VPA pré-natal

A **Tabela 46** descreve os efeitos da exposição ao VPA pré-natal na dosagem dos neurotransmissores e metabólitos na PAG via HPLC em animais fêmeas com 90 dias de vida. A análise estatística do teste t de *Student* revelou diferenças significantes nos parâmetros avaliados.

Os níveis de noradrenalina foram reduzidos na PAG de ratas que receberam VPA pré-natal [t = 2,64; p = 0,0212]. Entretanto as concentrações de VMA [t = 0,29; p = 0,7734] não foram modificadas entre os grupos (**Figura 109**).

Tabela 46	Avaliação dos níveis de neurotransmissores no hipotálamo no PND 90 em fêmeas Wistar
	expostos ao VPA pré-natal; (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal;
	VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg

	Grupos	
Analito	SALINA	VPA
NA	73,1 ± 28,4	-2,26 ± 1,64*
VMA	3655 ± 587,4	3415 ± 564
DA	147,9 ± 17,5	156,2 ± 21,9
DOPAC	126,2 ± 18	84,9 ± 11,9
HVA	364,9 ± 59,9	411,7 ± 68
5-HIAA	6741 ± 1189	4867 ± 484
5-HT	2263 ± 407,6	1741± 330,3
VMA/NOR	304,6 ± 277,2	2952 ± 2834
DOPAC/DA	0,74 ± 0,15	0,56 ± 0,06
HVA/DA	2,83 ± 0,66	$3,24 \pm 0,59$
DOPAC+HVA/DA	119 ± 24,6	88,1 ± 11,4
5-HIAA/5-HT	3,89 ± 0,86	$5,08 \pm 0,79$

Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. Representação de (VMA) Ácido vanil-mandélico, (NA) Noradrenalina, (DOPAC) Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético, (DA) Dopamina, (5-HIAA); Ácido 5-hidroxi-indolacético, (HVA) Ácido homovanílico, (5-HT) Serotonina.

Em relação a concentração de dopamina na PAG, os níveis de DOPAC [t = 1,88; p = 0,0837], dopamina [t = 0,29; p = 0,7741] e HVA [t = 0,51; p = 0,6150] não foram alterados (**Figura 110**).

Figura 109 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de noradrenalina na PAG em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).





Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).

Nenhuma alteração foi observada nas ratas estudadas em relação aos níveis do DOPAC/DA [t = 1; p = 0,3239], HVA/DA [t = 0,46; p = 0,6519] e DOPAC+HVA/DA [t = 1,13; p = 0,2773].

O padrão de serotonina na PAG não foi alterado nas ratas estudas observado nos níveis de 5-HIAA [t = 1,46; p = 0,1698], 5-HT [t = 0,99; p = 0,3396] e 5HIAA/5HT [t = 1; p = 0,2500] (**Figura 111**).

Figura 111 Efeitos da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no GD 12,5 nos níveis de serotonina na PAG em fêmeas *Wistar* no PND 90 (n = 10 para todos os grupos). SALINA = salina 0,9% pré-natal; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg



Fonte: Cezar, L. C. (2022).

Os valores são representados como média \pm E.P.M, aplicado teste t de *Student.* *p < 0,05 e **p < 0,01. Os grupos representam os tratamentos no GD 12,5 de ratas *Wistar*, SALINA = salina 0,9%; VPA = ácido valpróico pré-natal 400 mg/kg; (n = 10 para todos os grupos).



5 DISCUSSÃO

5.1 Alterações comportamentais e dopaminérgicas do modelo de autismo induzido pelo VPA pré-natal

Atualmente de acordo com a *National Autism Association* cerca de 1% da polução mundial é acometida pelo transtorno do espectro autista (ZABLOTSKY *et al.*, 2015; SHENOUDA *et al.*, 2022). Ainda que a etiologia do TEA permaneça pouco compreendida, algumas pesquisas apoiam fatores genéticos (GESCHWIND, 2008b; WALSH; MORROW; RUBENSTEIN, 2008a; KIM *et al.*, 2016) e ambientais (MOORE *et al.*, 2000a ;LYALL; SCHMIDT; HERTZ-PICCIOTTO, 2014a;) como influenciadores para o desenvolvimento das variações fenotípicas envolvendo habilidades comportamentais e funcionais do autismo (CHEUNG; LAU, 2020; KODAK; BERGMANN, 2020). Diferentes alterações e combinações comportamentais estão associadas ao diagnóstico do TEA (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014), podendo afetar indivíduos em um *continuum* de gravidade (FRAZIER *et al.*, 2012; TAHERI; PERRY, 2012; LEE; THOMAS; LEE, 2015b;). Embora o autismo seja um transtorno multifatorial bem descrito, encontrar suas causas e mecanismos fisiopatológicos exatos ainda é um grande desafio a ser superado (TARTAGLIONE *et al.*, 2019c).

Até o presente momento poucos trabalhos elucidaram o real papel da disfunção de vias centrais cerebrais colaboradoras para o desenvolvimento de transtornos como o TEA. Os modelos de autismo em roedores auxiliam a pesquisa clínica, em particular, a exposição pré-natal ao VPA reproduz de forma semelhante alterações comportamentais verificadas em humanos portadores do TEA (ROULLET *et al.*, 2010; DUFOUR-RAINFRAY *et al.*, 2011b; KIM *et al.*, 2011; MEHTA; GANDAL; SIEGEL, 2011; SAXENA *et al.*, 2020).

De acordo com o descrito na literatura, reproduzimos nesse estudo, um modelo de autismo em ratos *Wistar* (machos e fêmeas) utilizando o VPA prénatalmente de forma robusta, mimetizando as principais alterações comportamentais do TEA em humanos (MARKRAM; RINALDI; MARKRAM, 2007; ORNOY, 2009a; MEADOR, 2009; BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011; CHRISTENSEN *et al.*, 2016; BROMLEY; BAKER; CEZAR *et al.*, 2018).

Nos resultados apresentados observamos diferentes efeitos do VPA prénatal na prole masculina, incluindo: (1) comunicação ineficiente decorrente da redução de chamados ultrassônicos no PND 11; (2) indução de comportamento estereotipado e repetitivo com interesses restritos e resistência à mudanças durante o PND 29; (3) prejuízo na socialização, revelando interações sociais qualitativamente anormais no PND 30; (4) hiperlocomoção em campo aberto; (5) redução da atividade de NOR e DA estriatal; (6) aumento de NOR e 5-HT no córtex; (7) hipoatividade de DA e HVA cortical; (8) redução da expressão gênica de *DRD1, DRD2, TH e DAT* no estriado; (8) preservação dos genes *DRD1, DRD2* e *DAT* no córtex; e (9) redução de neurônios TH⁺ na região VTA-SN. Esses dados revelam um fenótipo comportamental autista induzido pelo VPA pré-natal em ratos, além de disfunções do sistema dopaminérgico córtico-estriatal presumivelmente ligados a sintomas complexos do TEA.

O tempo e a dose de VPA administrado pré-natalmente, são variáveis chaves para os resultados observados nos modelos de autismo em roedores (ROULLET *et al.*, 2010; ROULLET; LAI; FOSTER, 2013b). Nesse trabalho, preconizou-se uma dose moderada do VPA de 400 mg/kg no GD 12,5, evitando possíveis efeitos tóxicos nas ratas prenhes (CEZAR *et al.*, 2018). Contudo, os testes comportamentais empregados para confirmar o modelo de autismo foram descritos e validados anteriormente por diferentes autores na literatura (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005b; SCHNEIDER *et al.*, 2008; D'SOUZA *et al.*, 2009; ROULLET *et al.*, 2010; BAMBINI-JUNIOR *et al.*, 2011; BRISTOT SILVESTRIN *et al.*, 2013; FAVRE *et al.*, 2013; HARA *et al.*, 2015a; KIRSTEN *et al.*, 2015a; CHO *et al.*, 2017; CEZAR *et al.*, 2018; MELANCIA *et al.*, 2018b; ZHANG *et al.*, 2018).

O prejuízo na comunicação é um dos sinais centrais observados no autismo (DSM-V, 2013). Embora os roedores não usem a linguagem verbal para comunicarse, eles produzem vocalizações ultrassônicas com diferentes significados decorrentes do contexto em que são emitidos (EGNOR; SEAGRAVES, 2016). O valor da comunicação é evidente mesmo em fases iniciais do desenvolvimento, exibidos por ratos recém-nascidos que quando separados da mãe e do ninho emitem chamados ultrassônicos (WÖHR; SCHWARTING, 2008; SCATTONI; CRAWLEY; RICCERI, 2009). Na **Figura 23** as proles masculinas expostas ao VPA pré-natal, quando separados da mãe e irmãos, reduziram o número de chamados ultrassônicos, exibindo prejuízos na comunicação e aumento do tempo em silêncio. Esses resultados corroboram com estudos que avaliaram redução na frequência e/ou duração de vocalizações ultrassônicas emitidas por filhotes expostos ao VPA pré-natal (MOLDRICH *et al.*, 2013; SERVADIO *et al.*, 2016, 2018; DAI; YIN; QIN, 2017; CARTOCCI *et al.*, 2018, 2019b; MELANCIA *et al.*, 2018b; TSUJI; FUJISAKU; TSUJI, 2020). Wellmann *et al.* (2014) relataram que a vocalização ultrassônica está comprometida de forma complexa durante a interação social em ratos expostos ao VPA durante o período pré-natal (WELLMANN; VARLINSKAYA; MOONEY, 2014). Esse efeito do VPA pré-natal em reduzir e comprometer as quantidades de chamados ultrassônicos em roedores foi relacionado a alterações das atividades sináptica e excitabilidade neural (WALCOTT; HIGGINS; DESAI, 2011).

A flexibilidade cognitiva, componente essencial para o funcionamento normal cerebral, refere-se à capacidade de manter uma tarefa, abolir condutas inadequadas, ajustar comportamentos de forma flexível em concordância a possíveis mudanças ambientais, inibindo respostas anteriores, encontrando e alternando novas regras (GEURTS; CORBETT; SOLOMON, 2009). Particularmente, indivíduos com TEA exibem inflexibilidade cognitiva a mudanças inesperadas que normalmente desafiam e causam dificuldades expressivas diárias (RUMSEY; RAPOPORT; SCEERY, 1985; OZONOFF; JENSEN, 1999; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Em roedores a flexibilidade cognitiva pode ser mensurada em testes de alternação espontânea, que demonstra o comportamento investigativo e a disposição em explorar um ambiente novo (LALONDE, 2002; DEACON; RAWLINS, 2006;). Como verificado na Figura 24, o teste de alternação espontânea labirinto em T revelou que animais do grupo VPA aumentaram a reentrada do mesmo braço previamente explorado diminuindo seus scores. De acordo com esses resultados, comportamentos repetitivos e estereotipados com interesses restritos e resistência à mudança, são alterações amplamente discutidas em modelos animais de autismo utilizando o VPA pré-natal (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005b; ZHANG et al., 2012; KUMAR; SHARMA, 2016; CUEVAS-OLGUIN et al., 2017; CAMPOLONGO et al., 2018; CEZAR et al., 2018; MATSUO; YABUKI; FUKUNAGA, 2020).

Outro aspecto importante na confirmação do modelo de autismo induzido pelo VPA pré-natal é a sociabilidade, significativamente alterada em crianças com TEA (HOBSON *et al.*, 2013; CAMPBELL *et al.*, 2016;). Os roedores são seres altamente sociais e exibem padrões complexos de interação, cuidado parenteral e

comportamento sexual (RICCERI; MOLES; CRAWLEY, 2007). A brincadeira social é a primeira forma de comportamento exibida por mamíferos, crucial para o desenvolvimento adequado neuronal (VANDERSCHUREN; ACHTERBERG; TREZZA, 2016). Essa resposta característica a iniciação de brincadeira em ratos, comumente conhecida como *pinning*, é avaliada como interesse social (THOR; HOLLOWAY, 1984).

Notavelmente na **Figura 25**, os animais tratados com VPA exibiram diminuição em diferentes componentes do repertório social, tais como: frequência de *pinning*, investigação social, aliciamento e a exploração vertical. Vários estudos corroboram esses resultados, que demonstram preferência diminuída ao estímulo social, sugerindo menor interesse com comprometimento dessa habilidade na prole masculina de ratas expostas ao VPA pré-natal (GANDAL *et al.*, 2010; ROULLET *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; KERR *et al.*, 2013; MOLDRICH *et al.*, 2013; MELANCIA *et al.*, 2018b; MATSUO; YABUKI; FUKUNAGA, 2020). Em relação a frequência de levantar (**Figura 25e**), os machos do grupo VPA+SAL reduziram esse comportamento; comumente relacionado a vias complexas no SNC envolvendo o sistema dopaminérgico (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1984).

A locomoção em campo aberto é um dos parâmetros comportamentais amplamente utilizados para avaliar a emocionalidade, refletindo o funcionamento sensório-motor normal de roedores (PRUT; BELZUNG, 2003). Em nossos resultados, ratos que foram expostos ao VPA pré-natal aumentaram a atividade locomotora medida pela distância percorrida total em CA. Alguns estudos da literatura, reproduziram o mesmo efeito do VPA em machos, ocasionando hiperatividade locomotora dos ratos no CA (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005b; BRINGAS et al., 2013; KIM et al., 2013, 2014a, 2017, CHOI et al., 2014; KUMAR; SHARMA, 2016; CHO et al., 2017). Olexová et al. (2016) descreveram que ratos tratados com VPA pré-natal apresentaram frequência aumentada na ZP e reduzida na ZC, indicando comportamento tipo-ansioso durante o CA (OLEXOVÁ; ŠTEFÁNIK; KRŠKOVÁ, 2016). A hiperatividade e ansiedade são características típicas comportamentais encontradas no autismo (BANJI et al., 2011; KERR et al., 2013; SPAIN; ZIVRALI YARAR; HAPPÉ, 2020) e também associadas comumente a outros distúrbios neuropsiguiátricos, incluindo o TDAH (EMOND; JOYAL; POISSANT, 2009; REIMHERR et al., 2017). A exposição in útero ao VPA está sendo associada ao aumento do risco de TDAH em roedores (WILLIAMS, 2008; CHOI et al., 2014). Os resultados da **Figura 26** sugerem que a hiperatividade locomotora exibida nos ratos expostos ao VPA pré-natal pode constituir características semelhantes àquelas encontradas em pacientes com TDAH, assim como o descritos anteriormente por KINJO *et al.* e colaboradores (KINJO *et al.*, 2019). O modelo animal por indução pré-natal ao VPA torna-se promissor não apenas para o estudo do autismo em ratos, mas outras transtornos do neurodesenvolvimento que incluam a disfunção dopaminérgica, assim como o TDAH (TARTAGLIONE *et al.*, 2019a).

Atualmente diferentes mecanismos envolvendo eventos neuroanatômicos e neuroquímicos no desenvolvimento do SNC têm sido associados as alterações comportamentais encontradas em pacientes com TEA (PAVÅL, 2017a; PAVÅL; BHANDARI; PALIWAL; KUHAD, 2020; MICLUTIA, 2021). Em particular, alguns estudos apontaram à disfunção dopaminérgica como promotora para alterações de comportamentos complexos encontrados em distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo o TEA (DICHTER; DAMIANO; ALLEN, 2012; MAROTTA *et al.*, 2020). Dentro desse contexto, o papel crítico das vias dopaminérgicas envolvidas em transtornos do neurodesenvolvimento como o autismo permanece pouco entendido.

A DA é um neurotransmissor elementar no controle de funções executivas, perceptivas e motoras (HOSENBOCUS; CHAHAL, 2012). Inicialmente, o estriado e o córtex pré-frontal são regiões cerebrais vitais participativas na sinalização de DA, alterações neuroanatômicas nesses sítios poderiam indicar fator crítico para a ocorrência do TEA (PAVAL et al., 2017). Considerando a transmissão dopaminérgica como altamente dinâmica, e sua interação com outros sistemas de sinalização no SNC, esse trabalho estudou as modificações funcionais da DA em diferentes regiões cerebrais de ratos tratados com VPA pré-natal. Nas Figuras 27 e 28 os machos tratados com VPA no GD 12,5 exibiram redução das atividades de NOR (diminuição de VMA e VMA/NOR) e DA (diminuição de DA, DOPAC e HVA) no estriado. Somado a essas análises, verificamos que a expressão gênica estriatal de DAT, DRD1, DRD2 e TH foram reduzidas nos ratos do grupo VPA+SAL em relação ao grupo controle (Figura 33). A hipoatividade dopaminérgica estriatal alinhada as alterações comportamentais exibidas pelos ratos que receberam VPA pré-natal nesse estudo, sugerem importante papel da região do corpo estriado no estabelecimento de sintomas característicos do TEA.

Kaluzna-Czaplinska *et al.* 2010 conduziram em pacientes com TEA estudo dos níveis periféricos de HVA que foram detectados aumentados, indicando

desequilíbrio do sistema dopaminérgico (KAŁUZNA-CZAPLIŃSKA; SOCHA: RYNKOWSKI, 2010). Em relação aos impactos centrais do TEA, Gunaydin et al. (2014) apoiaram a hipótese que o circuito mesocorticolímbico poderia modular comportamentos sociais por meio do controle bidirecional das projeções dopaminérgicas da VTA para o núcleo accumbens (GUNAYDIN et al., 2014; GUNAYDIN; DEISSEROTH, 2014). A posteriori, Gunaydin et al. (2014) ativaram receptores D1 de neurônios DA na VTA através da optogenética, e camundongos aumentaram a interação social, ao passo que, a inibição trouxe um efeito oposto (GUNAYDIN; DEISSEROTH, 2014). As mudanças em indivíduos com autismo na escolha social ou processamento de recompensas sociais foram significativamente associadas a redução da substância cinzenta em conexões neurais corticoestriatais (MCALONAN et al., 2005). E mais recentemente, estudos demonstraram no TEA que alterações dopaminérgicas mesocorticolímbica estaria ligada a liberação reduzida de DA no córtex pré-frontal e consequente diminuição da resposta neural no núcleo accumbens (CHEVALLIER et al., 2012; PAVÅL, 2017a).

Quando avaliamos a neuroquímica no córtex pré-frontal (Figuras 30, 31 e 32), os machos VPA+SAL exibiram hipoatividade de DA (redução de DA e HVA) e 5-HT (redução de 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT). Embora verificado comprometimento da atividade DA no córtex pré-frontal em ratos tratados pré-natalmente com VPA, nenhuma alteração da expressão gênica cortical foi observada (Figura 34). Esses resultados podem estar associados ao fato da biodisponibilidade dopaminérgica ser regulada pelo DAT, uma proteína de membrana pré-sináptica prioritariamente presente no corpo estriado (GIROS et al., 1996), exercendo papel crítico para a processamento de aprendizagem plasticidade sináptica, recompensa, е comportamental (PESSIGLIONE et al., 2006; SCHULTZ, 2016).

Numerosos estudos mostraram ligação entre o autismo e vários polimorfismos de genes implicados nas vias dopaminérgicas, em particular o gene *DAT* (GADOW *et al.*, 2010; DICARLO *et al.*, 2019, 2021; DICARLO; WALLACE, 2022; SAHA *et al.*, 2022). Em humanos, polimorfismos no gene codificador da proteína DAT é fortemente associado com o TEA (GADOW *et al.*, 2008), TDAH (REITH *et al.*, 2021) e esquizofrenia (FANOUS *et al.*, 2004). Evidências apoiam ainda, que a disfunção do DAT leva a desregulação do sinal dopaminérgico, influenciando o papel da DA na modulação de comportamentos sociais (DICARLO *et al.*, 2019). A função do DAT prejudicada promove redução na taxa de recaptação de DA no espaço extracelular,

causando um efluxo anômalo de DA e suas funções basais (HAMILTON *et al.*, 2013; HERBORG *et al.*, 2018). DiCarlo *et al.*, (2019) mostraram que camundongos com mutação homozigótica *DAT T356M+/+* apresentam padrões de comportamento tipicamente ligados ao fenótipo autista, que incluem prejuízos nas interações sociais e estereotipias (DICARLO *et al.*, 2019). Nossas investigações alinham-se com as hipóteses relatadas sobre a disfunção estriatal do gene *DAT*, e os resultados expostos apoiam a mudança na natureza da sinalização dopaminérgica principal promotora de comportamentos característicos do TEA no modelo VPA.

Na **Figura 35**, identificamos uma correlação positiva de ratos tratados com VPA pré-natal que exibiram redução da expressão gênica estriatal do DAT e redução do comportamento social medido pelo *pinning*; demonstrando que quanto menor for a expressão de *DAT* menor será a frequência de *pinning* no grupo VPA+SAL em relação ao controle. Dentro dessa perspectiva, o presente estudo conclui que o tratamento com VPA no GD 12,5 em ratos ocasiona prejuízos dopaminérgicos envolvendo genes estriatais passo-limitantes em promover o comportamento social, e que ainda são ligados a padrões tipicamente observados em pacientes com TEA.

Analisando outros elementos da transmissão dopaminérgica, alguns genes aparecem como moduladores do comportamento social normal (FANOUS *et al.*, 2004). No que diz respeito ao circuito dopaminérgico, variantes genéticas foram associadas com o TEA, incluindo, *DRD3* (DE KROM *et al.*, 2009), *DRD1* (HETTINGER *et al.*, 2008), *SLC6A3* (DEVLIN *et al.*, 2012), *DRD2* (HETTINGER *et al.*, 2012) e *DDC* (dopa descarboxilase) (TOMA *et al.*, 2013). Homberg *et al.* (2016) concluíram que a expressão reduzida de *DRD1* prejudica componentes na cognição social, além de alterar o processamento de recompensas e tomada de decisão em roedores (HOMBERG *et al.*, 2016). Esses achados estão de acordo com o avaliado no presente estudo.

Chao *et al.* (2020), descreveram que camundongos *BTBR* exibem hipofunção da DA ocasionado pela expressão reduzida de TH em sistemas fronto estriatais, sugerindo diminuição da enzima em modelos de autismo (CHAO *et al.*, 2020). Em concordância, os resultados do presente trabalho (**Figura 33d**) corroboram com achados anteriores, em que a prole masculina de ratas tratadas com VPA prénatal reduziram os níveis proteicos de TH no estriado (CEZAR *et al.*, 2018). No cérebro, a TH é a enzima passo-limitante que catalisa a hidroxilação da tirosina em L-DOPA, posteriormente convertida em DA; e como o previsto, além da redução proteica

de TH no estriado, o VPA pré-natal em ratos causou redução da expressão gênica de *TH*. Esse parâmetro alterado em ratos que foram submetidos ao VPA pré-natal, indica que a redução da TH no estriado está alterando a resposta dopaminérgica desses animais e colaborando para o surgimento de comportamentos do tipo-autista.

Além da atividade dopaminérgica, o VPA pode afetar a remodelação axonal (HALL et al., 2002), diferenciação e proliferação de progenitores neurais (JUNG et al., 2008), promovendo prejuízos em diferentes processos reguladores fundamentais no desenvolvimento do cérebro (PHIEL et al., 2001). Vias de sinalização Wnt exercem papel fundamental na regulação, diferenciação e a padronização de neurônios no córtex cerebral (CHENN, 2008; MUNJI et al., 2011). Tendo em vista suas funções cruciais na população de precursores neurais do córtex, a ativação anormal da via Wnt pode ser induzida pela exposição ao VPA no período uterino, implicando no estabelecimento de redes neurais corticais normais (CHENN, 2008). Todavia, circuitos corticais e neurônios de projeção cortical foram identificados como potencialmente importantes na fisiopatologia do TEA (TAKUMI et al., 2020b). MURUGAN et al. (2017), descobriram através de estimulação optogenética que uma combinação de informações sociais e espaciais são codificadas pelo córtex pré-frontal de camundongos (MURUGAN et al., 2017). Usando um modelo de autismo em camundongos, Brumback et al. (2018) indicaram a estimulação ontogenética de neurônios que expressão DRD2 no córtex interrompe o comportamento social, revelando o papel importante do sistema dopaminérgico na sociabilidade (BRUMBACK et al., 2018). No presente estudo, a expressão de DRD2 foi preservada no grupo experimental VPA+SAL em relação ao controle.

Em outro experimento realizado com ratos *Sprague-Dawley* que receberam VPA pré-natal, níveis aumentados de 5-HT hipocampais e de DA no córtex pré-frontal foram encontrados (NARITA *et al.*, 2002). Por outro lado, HARA e colaboradores (2015) utilizando o mesmo tratamento com VPA em camundongos, analisaram que as monoaminas e metabólitos no córtex foram reduzidos (HARA *et al.*, 2015a). Concomitantemente, nesse estudo conseguimos detectar alterações neuroquímicas no córtex dos machos VPA+SAL, sugerindo que o desequilíbrio nos níveis de DA e 5-HT estão associados aos sintomas comportamentais característicos do TEA. Apesar dos dados avaliados demonstrarem que ratos tratados com VPA pré-natal modificam sua resposta neuroquímica cortical de DA, a complexidade do funcionamento do

sistema dopaminérgico está longe de ser contemplada, e estudos futuros precisam ser realizados para melhor corroborar essa hipótese.

Diferentes linhas de investigações mostraram o sistema serotoninérgico envolvido aos eventos do neurodesenvolvimento, incluindo migração, diferenciação e plasticidade neuronal (CELADA et al., 2013; FISCHER; ULLSPERGER, 2017; GASPAR; CASES; MAROTEAUX, 2003). A serotonina intervém em várias funções cerebrais, e alguns estudos destacaram alterações nos níveis serotonérgicos em indivíduos com TEA (WEST; WALDROP; YANG; ZHODZISHSKY; CRAWLEY, 2007; BRUNSSEN, 2009 GOULD et al., 2011; GABRIELE; SACCO; PERSICO, 2014 SWEENEY et al., 2019). Estudos in vivo descreveram níveis de serotonina 20% a 50% mais altos em indivíduos com TEA, enquanto dados post mortem, demonstraram redução de 5-HT no cérebro autista (WEST; WALDROP; BRUNSSEN, 2009GABRIELE; SACCO; PERSICO, 2014; MULLER; ANACKER; VEENSTRA-VANDERWEELE, 2016; ABDULAMIR; ABDUL-RASHEED; ABDULGHANI, 2018). Nos resultados apresentados, concluímos alterações nos níveis de 5-HT no córtex pré-frontal de ratos tipo-autista (VPA+SAL). Esses achados, sugerem associação da serotonina na fisiopatologia do TEA, ainda que pouco claro, os resultados da literatura apresentam-se conflitantes, e a relação do autismo com o sistema serotoninérgico permanece pouco entendido.

Em roedores, a extensão axonal e maturação sináptica dopaminérgica no mesencéfalo (SN e VTA) diferenciam-se entre os dias embrionários 12º e 15º (AREAL; BLAKELY, 2020). Os neurônios da VTA projetam-se para o córtex pré-frontal e estriado ventral que formam o circuito mesocorticolímbico, região responsável por comportamentos motivacionais e de recompensa (CHEVALLIER *et al.*, 2012). Já os neurônios que se projetam da SN em direção ao estriado dorsal constituem a via nigroestriatal, responsável pela ação motora (HABER, 2014). Em destaque, a disfunção do circuito mesocorticolímbico em indivíduos com TEA culmina em redução da liberação de DA no córtex pré-frontal e resposta neural estriatal ineficiente (SCOTT-VAN ZEELAND *et al.*, 2010b DICHTER; DAMIANO; ALLEN, 2012;). O sistema recompensa mesocorticolímbico disfuncional deixa de registrar experiências sociais como recompensadoras, isso articula a teoria da motivação nos indivíduos com TEA, que são um caso extremo de motivação social reduzida, levando a déficits sociais (CHEVALLIER *et al.*, 2012; PAVĂL, 2017b). Contudo, comportamentos estereotipados em pacientes com TEA foram associados a disfunções da via

nigroestriatal, principal responsável pelo controle de respostas motoras (LEWIS *et al.*, 2007). Esses dados convergem com a hipótese do presente trabalho, indicando papel determinante da disfunção dopaminérgica nas vias mesocorticolímbica e nigroestriatal em comportamentos tipo-autista induzidos por VPA pré-natal.

Os resultados apresentados na **Figura 68**, revelam que ratos juvenis tratados com VPA pré-natal aumentaram a quantidade de neurônios TH⁺ imunorreativos do complexo VTA-SN em relação ao controle, indicando hiperatividade dopaminérgica. Ao decorrer de todos os resultados discutidos no presente trabalho, dois paradigmas são apontados em relação ao modelo de autismo induzido por VPA pré-natal em ratos; (1) a hipoatividade de DA e HVA no córtex, associada ao aumento de neurônios TH⁺ imunorreativos em VTA+SN, sugerem modificações na sinalização mesocorticolímbica de DA, o que explica os prejuízos comportamentais sociais, locomotores e cognitivos; (2) níveis reduzidos de DA (DA, DOPAC, HVA e *turnover*) e diminuição da expressão gênica (*DAT, DRD1,DRD2 e TH*) na região estriatal, em conjunto ao aumento de neurônios TH⁺ imunorreativos, indicam disfunção da nigroestriatal, principal circuito ligado a estereotipias.

Recentemente, Ádám *et al.* (2020) em seus experimentos, demonstraram que camundongos tratados com VPA pré-natal aumentaram os neurônios TH⁺ imunorreativos na SN, refletindo uma hiperproliferação compensatória associada a respostas aberrantes em outras regiões cerebrais envolvidas com DA, ainda de acordo com os achados do presente trabalho (ÁDÁM *et al.*, 2020). Poucos estudos elucidaram o grau de disfunção do sistema dopaminérgico, e trabalhos futuros devem procurar determinar se a sinalização de DA estriatal desempenha um papel central na fisiopatologia do TEA, além de direcionar esses circuitos cerebrais como potencial alvo terapêutico para déficits sociais.

Em conclusão, destacamos o comprometimento dopaminérgico em regiões centrais estriatais e corticais de ratos expostos ao VPA pré-natal, somados a diferentes prejuízos comportamentais envolvendo habilidades de comunicação, estereotipias, sociabilidade e hiperlocomoção. Os machos VPA+SAL revelaram ainda hiperatividade dopaminérgica, medido pelo aumento de neurônios TH⁺ imunorreativos do complexo VTA-SN, apontando importante prejuízo de DA em vias mesocorticolímbico e nigroestriatal. O conjunto de resultados apresentados ao longo desse trabalho, fornecem não apenas evidências empíricas para corroborar a

hipótese da dopamina no autismo, mas também um princípio translacional clínico no desenvolvimento de possíveis vias de tratamento para o transtorno em humanos.

5.2 Diferenças sexualmente dimórficas comportamentais e moleculares de ratas em um modelo de autismo induzido por VPA pré-natal

Atualmente as diferenças na incidência e expressão do fenótipo TEA entre homens e mulheres é um assunto considerável dentro da literatura. Parte desse enredo é baseado no grande número de pesquisas clínicas sugerirem que o autismo se manifesta de maneira robusta no sexo masculino em relação ao feminino, com estimativas de 4:1. (FOMBONNE, 2003; LINGAM *et al.*, 2003; FOMBONNE; QUIRKE; HAGEN, 2009; LAI *et al.*, 2011; HALLADAY *et al.*, 2012; CHRISTENSEN *et al.*, 2016;). As diferenças fenotípicas do TEA em ambos os sexos podem dificultar o diagnostico nos indivíduos (BARGIELA; STEWARD; MANDY, 2016; TAYLOR *et al.*, 2016).

Os sintomas do TEA em homens são mais acentuados em relação a mulheres, podendo ser observado maior agressividade, hiperatividade, redução do comportamento social e aumento de inflexibilidade cognitiva (WERLING; GESCHWIND, 2013a). Em contrapartida, mulheres portadoras do TEA, ocultam os déficits centrais autistas com melhores habilidades de linguagem e sociais (Hull et al., 2017). Dessa forma, examinar as diferenças sexuais em modelos animais de autismo é essencial para melhorar a forma de diagnóstico e identificar tratamentos sexo-específico (THORNTON *et al.*, 2021).

Estudos clínicos revelam que a prevalência do autismo em crianças expostas ao VPA durante o período embrionário é proporcionalmente igual (1:1) entre os sexos (FAVRE *et al.*, 2013; RASALAM *et al.*, 2005). O desafio materno em roedores com VPA induz fenótipos do tipo autista na prole masculina e feminina (HARA *et al.*, 2012; KATAOKA *et al.*, 2013), contudo existem diferentes particularidades comportamentais e celulares observadas em ambos os sexos (NICOLINI; FAHNESTOCK, 2018). Os efeitos do VPA pré-natal em fêmeas no geral são menos severos do que os sintomas verificados em machos (SCHNEIDER *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2014c, 2016; SRINATH *et al.*, 2017; MELANCIA *et al.*, 2018a; KAZLAUSKAS *et al.*, 2019).

Consideramos que estudar a prole feminina de ratas em um modelo de autismo induzido por VPA pré-natal, colaboraria para evidenciar características fenotípicas e possíveis mecanismos de resiliência em fêmeas. Somado a esse fato, até o presente momento poucos trabalhos elucidaram a disfunção de vias centrais cerebrais associadas a alterações comportamentais em fêmeas com o fenótipo tipo-autista. Os resultados do presente estudo indicaram diferentes efeitos do VPA prénatal na prole feminina, incluindo: (1) prejuízo na comunicação decorrente da redução de chamados ultrassônicos (PND 11); (2) indução de comportamento estereotipado e repetitivo com interesses restritos no labirinto em T (PND 29); (3) redução do perseguir e exploração vertical sem prejuízo no *pinning* durante o comportamento de brincar (PND 30); (4) hipolocomoção em campo aberto (PND 32); (5) nenhuma alteração neuroquímica foi observada nas monoaminas corticoestriatais estudadas; (6) nenhuma modificação na expressão gênica de *DRD1, DRD2, TH e DAT* no estriado e córtex.

Esses dados revelam prejuízo comportamental induzido pelo VPA pré-natal em ratas, incluindo problemas de comunicação, estereotipias e redução da atividade locomotora presumivelmente ligados a sintomas complexos do TEA. No entanto, o comportamento social foi preservado nas fêmeas VPA+SAL, além do sistema dopaminérgico, sugerindo um potencial efeito protetor/compensatório para a indução de deficiência social. Quando analisados de forma conjunta, os resultados exibidos ao longo do trabalho sugerem diferenças sexualmente dimórficas comportamentais e neuroquímicas entre os ratos machos e fêmeas promovidos pela exposição ao VPA (GD 12,5).

De acordo com nossos achados, foi verificado que ratas expostas ao VPA pré-natal quando comparadas aos machos eram mais propensas a estereotipias (SCHNEIDER; TURCZAK; PRZEWŁOCKI, 2006b SCHNEIDER *et al.*, 2008;), menor frequência de vocalização ultrassônica (TARTAGLIONE *et al.*, 2019c), maior rigidez cognitiva no labirinto em T (MYCHASIUK *et al.*, 2012) e hiperlocomoção em CA (DEGROOTE *et al.*, 2014). Nossos resultados estão em convergência com aqueles encontrados na literatura, e comprovam que a exposição pré-natal ao VPA induz sintomas semelhantes ao TEA em ambos os sexos.

No que diz respeito a esfera social, em experimentos com humanos, indivíduos do sexo feminino portadores do TEA demonstraram menos sintomas sociocomunicativos em comparação ao sexo masculino (LAI *et al.*, 2011;

DWORZYNSKI *et al.*, 2012). Todavia, em roedores diferentes estudos mostraram que ambos os sexos são afetados de forma diferente pelo VPA pré-natal, sugerindo interação entre a droga e o gênero na indução do autismo (KAZLAUSKAS *et al.*, 2019). Em nossos resultados, verificamos que fêmeas expostas ao VPA pré-natal não alteraram a frequência de *pinning* no comportamento de brincar (**Figura 48**), entretanto, os machos exibiram solicitação e brincadeira social prejudicadas (**Figura 25**). Concordante com esses achados, diferentes autores concluíram que machos expostos ao VPA pré-natal mostraram deficiências sociais mais robustas em relação as fêmeas (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005a; SCHNEIDER; TURCZAK; PRZEWŁOCKI, 2006b; SCHNEIDER *et al.*, 2007; MOLDRICH *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2014c; CHO *et al.*, 2017; JEON *et al.*, 2018; MELANCIA *et al.*, 2018a;). Considerando tudo isso, sugerimos uma interação de sociabilidade sexo-dependente dos efeitos do VPA pré-natal em ratos, podendo fatores biológicos conferirem vulnerabilidade para os sintomas do TEA encontrados nos machos.

Apesar de pouco claro, tem sido sugerido que modificações na dinâmica neuronal molecular e celular mais drásticas são necessárias para indução do fenótipo autista em mulheres (ROBINSON *et al.*, 2013; ALAERTS; SWINNEN; WENDEROTH, 2016). Os resultados do presente estudo indicam que a administração ao VPA prénatal nas fêmeas não foi eficiente em causar modificações neuroquímicas nos sistemas de monoaminas corticoestriatais. É importante ressaltar, que esses achados foram contrastantes em relação aos machos, uma vez que importantes circuitos dopaminérgicos e serotoninérgicos foram prejudicados. Além disso, nenhuma alteração na expressão gênica estriatal e cortical foi observada no grupo VPA+SAL de fêmeas em relação ao controle. Da mesma forma, Hara *et al.* (2015), verificaram que machos *Sprague-Dawley* expostos ao VPA pré-natal reduziram a expressão de receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ no córtex pré-frontal, enquanto a prole feminina não sofreu alterações (HARA *et al.*, 2015a).

Como descrito anteriormente, o sistema dopaminérgico exerce funções complexas no SNC envolvendo processos motivacionais e recompensa, a hipoatividade de DA tem importante papel contribuinte em déficits sociais descritos inclusive em modelos de autismo (BERRIDGE *et al.*, 2006; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, TREZZA; 2010; CHALIHA *et al.*, 2020;). Nesse trabalho, sugerimos que a hipoatividade dopaminérgica córtico-estriatal exerce importante função indutora na redução da sociabilidade em ratos machos tratados com VPA. De

fato, o dimorfismo sexual é uma característica do modelo de autismo VPA, que tornam as fêmeas menos susceptíveis a perturbações em genes envolvidos na plasticidade sináptica dopaminérgica (MELANCIA *et al.*, 2018). De acordo com essa possibilidade, Kim et al. (2013) observaram que ratos expostos ao VPA pré-natal exibiram anormalidades na maturação sináptica devido alterações da atividade glutamatérgica, porém nenhuma alteração foi exibida pelas fêmeas (KIM *et al.*, 2013).

Em particular, a dinâmica estrutural e funcional do sistema dopaminérgico é intrinsecamente diferente entre sexos masculino e feminino, o que provavelmente contribui para a predisposição de machos aos distúrbios neurológicos associados à dopamina (LAI; LOMBARDO; BARON-COHEN, 2014; LOKE; HARLEY; LEE, 2015b). Quando o tecido cerebral de ratos foi cultivado *in vitro*, foi possível observar mais neurônios TH⁺ em culturas femininas XX do que culturas masculinas XY mesmo antes da expressão dos hormônios gonadais; sugerindo regulação do número de células DA via genes de cromossomos sexuais (BEYER; PILGRIM; REISERT, 1991; BEYER et al., 1992;). Em particular um gene do cromossomo Y intitulado de SRY (Sexdetermining Region on the Y chromosome), é expresso em neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo regulando a biossíntese de DA e o movimento no sexo masculino (XU; BURGOYNE; ARNOLD, 2002; LOKE; HARLEY; LEE, 2015c). Dada a localização e função do gene SRY, sua desregulação é capaz de gerar distúrbios no sistema dopaminérgico podendo aumentar a probabilidade masculina em desenvolver distúrbios como o TEA (XU; BURGOYNE; ARNOLD, 2002; MCPHIE-LALMANSINGH et al., 2008; LOKE; HARLEY; LEE, 2015b;). Os resultados verificados nesse estudo, sugerem que as fêmeas tratadas com VPA pré-natal possuem atividade dopaminérgica preservada durante o PND 32, e sociabilidade normal de forma paradoxal aos machos. Entretanto, as fêmeas VPA+SAL apresentaram anormalidades comportamentais em diferentes aspectos que envolvem o fenótipo do TEA.

Em última análise, o modelo autista induzido pelo VPA confere forte valor para determinar e compreender as particularidades dos sintomas dependentes do sexo no TEA, além de auxiliar para que terapias mais personalizadas sejam desenvolvidas na pesquisa translacional.

5.3 Alterações comportamentais e moleculares de ratos tratados com VPA prénatal e desafiados agudamente e prolongadamente com metilfenidato

O presente estudo utilizou o metilfenidato como ferramenta farmacológica, com o intuito produzir manifestações comportamentais e resultar plasticidades do sistema dopaminérgico, além dos componentes celulares do SNC de ratos tratados pré-natalmente com VPA. Os resultados demonstraram que ambos os tratamentos com MET promoveram diferentes aspectos da modulação dopaminérgica e alterações comportamentais em animais tipo-autistas.

O MET não atua estimulando diretamente receptores catecolaminérgicos, porém facilita a ação da dopamina (DA) no estriado e córtex pré-frontal (ARCHER, 1989; DING *et al.*, 1994; CHALLMAN; LIPSKY, 2000). O tratamento do TDAH é baseado primariamente ao uso terapêutico do MET (LEVIN; KLEBER, 1995b; LLANA; CRISMON, 1999; ACCARDO; BLONDIS, 2001), atribuído a capacidade da droga em ligar-se no transportador de dopamina (DAT) na membrana celular pré-sináptica e bloquear a recaptação de DA (ARCHER, 1989; PATRICK; MARKOWITZ, 1997a; IZENWASSER *et al.*, 1999; MASSELLO; CARPENTER, 1999; VOLKOW *et al.*, 1999b; CRAFT, 2003; DELA PEÑA *et al.*, 2012;). Os efeitos da cocaína e do MET no SNC são semelhantes em termos de afinidade e ações no DAT (FOWLER *et al.*, 1999; GATLEY *et al.*, 1995). O MET de forma indireta, causa o bloqueio dos transportadores de NOR e 5-HT, ainda que com afinidade reduzida em relação ao DAT (KUCZENSKI *et al.*, 1995; GATLEY *et al.*, 1995; KUCZENSKI; SEGAL, 1997).

O desafio farmacológico é uma estratégia potente capaz de acessar a atividade de neurotransmissores no SNC (HARA *et al.*, 2016). Em especial, a ação de psicoestimulantes estruturalmente semelhantes as anfetaminas, estão intimamente ligadas a atividade catecolaminérgicas no cérebro (DAFNY; YANG, 2006; KOLLINS *et al.*, 2006). Pacientes com autismo são tratados raramente com o MET, apenas quando além do TEA, esses possuem déficits de atenção como o TDAH (GRZADZINSKI *et al.*, 2011). POSEY e colaboradores (2007) descreveram que a administração aguda ou crônica do MET em roedores normais, aumenta seletivamente a liberação de DA e NA pré-frontal e estriatal (POSEY *et al.*, 2007). Esses achados contribuem para a hipótese da ação estimuladora de MET sobre

sistemas dopaminérgico e noradrenérgico córtico-estriatal, indicados por modular comportamentos em indivíduos com TEA (DEL CAMPO *et al.*, 2011). Nesse trabalho a sensibilização pré-natal ao VPA em ratas gestantes desempenhou importante papel no efeito agudo das proles ao metilfenidato causando alterações comportamentais e neuroquímicas.

Com os resultados do presente estudo, foi possível observar que a administração aguda do metilfenidato (5 mg/kg no PND 32) em ratos tratados com VPA pré-natal: (1) reverteu o prejuízo da atividade locomotora em campo aberto (CA), com melhora da distância média percorrida e tempo de imobilidade; (2) reverteu o comportamento estereotipado avaliado pelo movimento de rotação no campo aberto; (3) não exibiu melhora no perfil DA, NOR e 5-HT estriatal e cortical; (4) não reverteu a diminuição da expressão gênica de *DAT*, *DRD1*, *DRD2* e *TH* no estriado; e (5) causou superexpressão gênica de *DRD1*, *DRD2* e *TH* a nível cortical.

A administração do MET em ratos pode ocasionar diferentes respostas comportamentais como descrito na literatura (ANDERSEN et al., 2008; KODA et al., 2010; POSEY et al., 2007). Em baixas doses o MET (2,0-5,0 mg/kg) promove a atividade locomotora, e em doses mais altas (10,0 mg/kg e superiores) estimula a estereotipia (GAYTAN et al., 1997; SOLANTO, 1998; BRANDON et al., 2001;). Contudo, respostas comportamentais e neuroquímicas são dependentes da via e dose utilizadas de MET, que interferem na velocidade plasmática de absorção da droga (GAYTAN et al., 2000; KUCZENSKI; SEGAL, 2002; ASKENASY et al., 2007;). A dose de MET empregada nos ratos deste trabalho foi de 5 mg/kg, que de acordo com a literatura, mimetiza o uso terapêutico (SWANSON et al., 1999; VITIELLO et al., 2001). Os ratos do grupo controle que receberam MET (5 mg/kg no PND 32) quando submetidos ao teste de CA, aumentaram a distância total percorrida e a mobilidade, comprovando a eficiência da droga em estimular a atividade locomotora. Justamente por ativar circuitos dopaminérgicos, os ratos controle exibiram hiperlocomoção, conforme descrito anteriormente (VANDERSCHUREN et al., 1999; GERASIMOV et al., 2000a; AMINI et al., 2004; DAFNY; YANG, 2006; YANG; SWANN; DAFNY, 2006).

Em contraste, ratos tratados pré-natalmente com VPA e desafiados com MET (5 mg/kg no PND 32) melhoraram a hiperlocomoção em CA, verificado pela redução da distância total percorrida, frequência de rotação e velocidade média (cm/s). Esses achados sugerem que a ativação aguda de catecolaminas frente ao MET é responsiva mesmo naqueles animais sensibilizados pré-natalmente ao VPA,

exibindo efeitos de melhora da locomoção e comportamento similar ao grupo controle SAL+MET. Todavia, a ação de circuitos cerebrais responsáveis por iniciar alteração no comportamento de animais em resposta a psicoestimulantes permanece pouco entendida (DAFNY; YANG, 2006).

Algumas evidências propõem que sistemas dopaminérgicos mesocorticolímbico e mesoacumbens, ativados por anfetaminas, desempenham papel importante na resposta motora (DELONG, 1990; WOLF, 1998; WU; BRUDZYNSKI; MOGENSON, 2011; HARA *et al.*, 2016;). Em resumo, a principal estrutura do estriado ventral, núcleo accumbens, é apontado como componente neuronal chave à ação de psicoestimulantes (DEADWYLER *et al.*, 2004), além de cumprir funções de recompensa cerebral e locomoção (BERRIDGE *et al.*, 2006; PESSIGLIONE *et al.*, 2006). Supondo que essas alterações ocorrem em animais tratados com MET, nesse trabalho diferentes neurotransmissores cerebrais foram avaliados no estriado e córtex.

Analisando a resposta do MET na neuroquímica de ratos normais, nossos resultados demonstraram que o estriado foi ativado e a resposta de NOR e DA modificada. Os níveis de NOR estriatal no grupo SAL+MET foi aumentado, apesar da redução de VMA e VMA/NOR, sugerindo uma diminuição desse sistema. Em contrapartida, os efeitos do MET agudo foram claros e específicos em relação a atividade dopaminérgica, verificada pelo aumento nos níveis de DA, DOPAC e DOPAC+HVA/DA no grupo SAL+MET. Esses resultados revelam que o tratamento agudo com MET em ratos no PND 32 é eficiente em produzir efeitos estimulantes nas concentrações estriatais de DA, assim como descrito anteriormente (GATLEY *et al.*, 1996; DING *et al.*, 1997; KUCZENSKI; SEGAL, 1997). KUCZENSKI et al., 2002 avaliaram que ratos *Sprague-Dawley* que receberam MET 5mg/kg via gavagem no PND 28 após 40 min, aumentaram de forma significante a DA no núcleo accumbens e a resposta locomotora (KUCZENSKI; SEGAL, 2002). Esses achados corroboram com as alterações estriatais e locomotoras observadas nesse estudo após dose aguda de MET em ratos controle.

Em relação aos ratos do grupo VPA+MET, nenhuma melhora ou alteração foi identificada nos níveis de DA e metabólitos estriatais em relação ao controle. Isso favorece a suposição da hipoatividade dopaminérgica estriatal causada pelo VPA prénatal em ratos observada em trabalhos anteriores do mesmo grupo (CEZAR *et al.*, 2018).

papel crucial do estriado em Além do respostas motoras а psicoestimulantes, o córtex pré-frontal tem sido implicado na coordenação de funções complexas incluindo o movimento. Isso ocorre, porque, quantidades significativas de atividade dopaminérgica acontecem em terminais do córtex (SOLANTO, 1998; IZENWASSER et al., 1999). Sabendo que a ativação do MET pode envolver as catecolaminas no córtex pré-frontal (BERRIDGE et al., 2006), nosso estudo observou diferentes alterações neuroquímicas em ratos desafiados agudamente. A administração de MET aumentou os níveis de DA cortical no grupo SAL+MET, porém com redução nas taxas de HVA e DOPAC/DA comparado ao grupo controle. Apesar dos níveis aumentados de dopamina, o MET agudo em ratos normais exerceu pouca influência sob as concentrações de HVA livre no cérebro, sugerindo uma tentativa da dinâmica do metabolismo dopaminérgico em diminuir a degradação para manter a função neurotransmissora equilibrada (NISSBRANDT; CARLSSON, 1987; VENERO; MACHADO; CANO, 1991).

Quando avaliamos os níveis corticais serotoninérgicos nos ratos do grupo SAL+MET; verificamos uma redução nos níveis de 5-HT somado ao aumento de 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT. Diante desses resultados, concluímos duas possíveis situações: (1) o MET agudo no córtex de ratos controle foi capaz de aumentar a atividade de recaptação de 5-HT, o que favorece a conversão e desenvolvimento do metabólito 5-HIAA; (2) a 5-HT foi sensibilizada pela ação do MET de forma indireta, via balanço da resposta dopaminérgica frente a droga. O córtex pré-frontal é inervado por projeções serotoninérgicas dos núcleos da rafe, e boa parte dos neurônios corticais possuem predominantemente alta densidade de receptores 5-HT1A (POMPEIARTO; PALACIOS; MENGODB, 1992; GARCIA-GARCIA et al., 2017). A proporção de neurônios no córtex serotoninérgicos é menor comparada a DA, apesar disso, além da inervação dopaminérgica a administração de MET é sugerida como modulatória em papéis fisiológicos de 5-HT na cognição (LUO; LI; ZHONG, 2016; SALMAN et al., 2019; CASADO-SAINZ et al., 2022). Todavia, é possível concluir que o MET atua de forma indireta via sistema dopaminérgico em respostas de 5-HT na atividade cortical (grupo SAL+MET).

Os animais tratados com VPA pré-natal e expostos ao MET agudo (5 mg/kg no PND 32), mostraram alterações significantes no sistema cortical DA e 5-HT. O MET mudou a dinâmica dopaminérgica daqueles animais tratados com VPA no GD 12,2, aumentando os níveis de DA, reduzindo o HVA e as taxas de DOPAC/DA. HARA *et*

al. (2015) demonstraram que a exposição pré-natal ao VPA reduz a atividade farmacológica da metanfetamina no córtex de camundongos, diminuindo a locomoção, a liberação dopaminérgica cortical e a expressão de receptores D1 e D2 (HARA *et al.*, 2015b). No presente trabalho a ativação DA cortical sugeriu estar ligada a redução da hiperlocomoção nos animais VPA+MET causado pelo metilfenidato.

A regulação da expressão gênica induzida por MET é mais robusta em setores sensório-motores no corpo estriado (YANO; STEINER, 2007), com efeitos correlacionados entre regiões corticais específicas (REEP; CHEATWOOD; CORWIN, 2003). Brandon *et al.*, (2003) conduziram uma pesquisa em que ratos tratados agudamente e prolongadamente com MET alteraram a regulação de genes estriatais *"short-term" c-fos e zif268*, envolvidos em respostas DA de maneira dose-dependente (BRANDON; STEINER, 2003). Esses efeitos do MET em genes e fatores de transcrição *"short-term"* que, são semelhantes a ação de psicoestimulantes como a cocaína, que alteram cascatas sinalizadoras resultando em funções sinápticas de DA e na dependência de drogas (CHONG; CLAUSSEN; DAFNY, 2012; ZIPPERLY *et al.*, 2021).

Apesar de não exposto, avaliamos o gene *DAT* no córtex de ratos durante o PND 32 após o tratamento com MET agudo e prolongado, e dentro do método utilizado PCR-RT, não foi possível detectar e quantificar a expressão gênica do transportador de DA cortical em nenhum grupo estudado. Todavia, os resultados apresentados neste trabalho, demonstraram que o MET (5 mg/kg no PND 32) em ratos controle SAL+MET não alterou a expressão de genes envolvidos na resposta DA estriatal e cortical. É pertinente ressaltar que utilizamos uma dose de MET que mimetiza a terapêutica, e isso pode ser um fator determinante para a ativação de genes e cascatas moleculares em neurônios (PANOS; LAW; FERGUSON, 2014). Ainda assim, o tratamento agudo com MET induz alterações na expressão gênica no corpo estriado de ratos SAL+MET conforme trabalhos revisados (YANO; STEINER, 2005a, 2005b, 2007; YANO; BEVERLEY; STEINER, 2006). Porém, mais estudos que apoiem a hipótese de mudanças em genes regulatórios da reposta neuronal resultando em variações nas concentrações de monoaminas ou metabólitos precisam ser realizados (PANOS; LAW; FERGUSON, 2014).

Quando aferimos as ações do desafio com MET em ratos tratados com VPA pré-natal, nenhuma mudança foi notada na expressão gênica já reduzida em relação ao grupo VPA+SAL no estriado. De acordo com os dados, os ratos do grupo

VPA+MET revelaram superexpressão gênica de *DRD1, DRD2* e *TH* no córtex. Somado a outras alterações observadas ao longo desse trabalho, ratos expostos ao VPA pré-natal e desafiados com MET agudo, apresentaram sensibilidade maior a psicoestimulantes em níveis corticais, além de modificar a resposta locomotora. Tais mudanças induzidas em circuitos corticoestriatais sugere, portanto, sítio anatômico alvo para o tratamento com MET em transtornos como TDAH e TEA (YANO; STEINER, 2005a).

Diferentes fatores influenciam os efeitos dos psicoestimulantes, dentre eles, as diferenças de gênero parecem determinantes na excitação e conjugação de drogas (CORNFORTH; SONUGA-BARKE; COGHILL, 2010). Essa proposição é baseada na ação estrogênica sobre a ação de drogas estimulantes (REZVANI; LEVIN, 2004). A resposta dopaminérgica a estimulantes como o MET, pode variar de acordo com o sexo e idade mesmo fazendo uso do mesmo protocolo dose-resposta (CHELARU; YANG; DAFNY, 2012). A fim de avaliar diferenças sexualmente dimórficas na resposta ao tratamento agudo com MET, no presente estudo ratas tratadas com VPA pré-natal e desafiadas no PND 32 foram testadas. Todavia as ratas utilizadas nessa fase do experimento não possuem maturidade hormonal, o que pode influenciar a resposta do MET.

Segundo os principais achados, fêmeas e machos do grupo controle SAL+MET exibiram padrões e níveis de atividade semelhantes nos testes após o uso agudo de MET. Em resumo, a administração aguda do metilfenidato (5 mg/kg no PND 32) na prole feminina de ratas tratadas com VPA pré-natal: (1) reverteu a hipoatividade locomotora em campo aberto (CA), com melhora da distância total percorrida e velocidade média; (2) promoveu comportamento ansioso, visto no aumento do tempo na ZC no CA; (3) aumentou os níveis de VMA, VMA/NOR, 5-HT e 5-HIAA/5-HT no estriado; (4) redução nos níveis de NOR, VMA, DOPAC, HVA e taxas *turnover* corticais; (5) diminuição da expressão gênica *DRD1* e *DRD2* no estriado; (6) não causou alterações gênicas cortical. Analisando de forma conjunta os dados, as fêmeas tratadas agudamente com MET (SAL+MET e VPA+MET) demonstraram comportamento tipo ansioso em CA medido pelo aumento da permanência na ZC, porém os machos mantiveram um comportamento normal.

Alguns trabalhos verificaram que ratas adultas exibem maior hiperatividade induzida pelo MET em CA do que machos (GAYTAN *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2003; YANG; SWANN; DAFNY, 2006). Em concordância com o presente trabalho, Chelaru

et al. (2012) demonstraram que diferentes linhagens de ratos não exibiram alterações significantes na hiperatividade induzida pelo MET em qualquer idade e sexo (CHELARU; YANG; DAFNY, 2012). Quando comparado os níveis neuroquímicos das monoaminas entre machos e fêmeas VPA+MET no tratamento agudo, algumas diferenças foram notadas, incluindo: aumento de VMA, VMA/NOR, 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT em fêmeas, porém redução nos níveis estriatais de VMA e VMA/NOR sem alterações em 5-HT nos machos; hipoatividade de DA no córtex de ambos os sexos que receberam VPA pré-natal e MET agudo (VPA+MET). Em conclusão no tratamento com VPA pré-natal, as fêmeas expressam comportamento similar aos machos após o tratamento agudo com MET.

Durante a infância, o desenvolvimento normal do cérebro requer maturação coordenada de muitos processos que ocorrem de maneira temporal e regionalmente dependente (BARONE S. *et al.*, 2000; RICE; BARONE, 2000; ANDERSEN; NAVALTA, 2004). O sistema monoaminérgico exerce importante papel regulador no processo de maturação cerebral e o tratamento a longo prazo com psicoestimulantes neste momento crítico, pode exercer efeitos transitórios ou permanentes no SNC na idade adulta (DAFNY; YANG, 2006). A exposição prolongada ao MET no cérebro em desenvolvimento pode potencialmente ter consequências citoarquitetônicas e neuroquímicas, que incluem sinaptogênese, mielinização e gliogênese (LEVITT *et al.*, 1997; BARONE S. *et al.*, 2000; GRAY *et al.*, 2007). De forma mais pronunciada, o MET atua em regiões associadas à cognição e aprendizagem, incluindo hipocampo e córtex pré-frontal, com sinaptogênese durante a infância e adolescência em humanos e ratos (BAYER *et al.*, 1993; GRAY *et al.*, 2007).

Anormalidades na maturação de determinadas regiões cerebrais induzidas por agentes farmacológicos como MET, pode ocasionar adaptações e mudanças estruturais dopaminérgicas, além de modular comportamentos (CHAO; NESTLER, 2004; GRAY *et al.*, 2007; SCHRANTEE *et al.*, 2017). As avaliações desse trabalho, demonstraram que a administração prolongada ao MET (5 mg/kg do PND 21 ao 35) em ratos tratados com VPA pré-natal, promoveu modulação e sensibilização de marcadores catecolaminérgicos e comportamentais, que incluem: (1) melhora da atividade locomotora em campo aberto; (2) reversão do comportamento estereotipado avaliado pelo movimento de rotação no campo aberto; (3) melhora nos níveis de DA e redução na atividade de 5-HT estriatais; (4) aumento dos níveis de NOR E 5-HT corticais; (5) nenhuma alteração em relação a expressão gênica estriatal e cortical.

Quando estudamos as fêmeas nesse contexto, a administração prolongada ao MET (5 mg/kg do PND 21 ao 35) em ratas tratadas com VPA pré-natal, gerou: (1) piora da atividade locomotora em CA; (2) comportamento tipo-ansioso medido pelo aumento da permanência na ZC do CA; (3) nenhuma alteração neuroquímica estriatal significante; (4) aumento dos níveis de DA e DOPAC, redução de 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT corticais; (5) nenhuma alteração em relação a expressão gênica estriatal (6) aumento da expressão de *DRD1* cortical. Em relação a esses resultados, sugerimos que o metilfenidato exerce efeito sexualmente dimórfico entre fêmeas e machos que receberam tratamento prolongado (SAL+MET e VPA+MET). As fêmeas tratadas com VPA pré-natal e MET prolongado, exibiram redução da expressão de *DRD1* cortical em relação ao controle, alteração encontrada a partir da ativação do sistema dopaminérgico pelo psicoestimulante.

O pinning é um componente do comportamento social de ratos jovens e outros mamíferos que pode ser profundamente deprimido pela ação de doses moderadas de MET (BEATTY, 1982; PANKSEPP; BEATTY, 1980). O comportamento de brincar a que os animais foram submetidos nesse trabalho, revelou diferentes alterações após o tratamento prolongado com MET (5 mg/kg). A freguência de pinning, darts e farejar foram reduzidas no grupo controle SAL+MET, revelando redução da brincadeira e solicitação sociais. A supressão do comportamento social foi confirmada nesse estudo após o uso prolongado de MET em ratos normais, ainda que esse efeito não seja apoiado pela ação agonista indireta na liberação de catecolaminas (BEATTY; COSTELLO; BERRY, 1984). Os animais do grupo controle SAL+MET exibiram maior tempo farejando, o que indica estereotipia. O comportamento estereotípico desenvolve-se por meio do medicamento e inclui complexidade mesmo em animais normais, ainda que a atividade seja percebida como sem sentindo (KING, 1992). De acordo com os nossos achados, Mcdougall et al. (1999) observaram que altas doses de MET prolongadas (15 mg/kg), resultaram em estereotipia de ratos juvenis que aumentaram o tempo farejando sem alterações locomotoras (MCDOUGALL et al., 1999).

Em relação a exposição com VPA pré-natal, nenhuma melhora relevante foi identificada na brincadeira social após o uso prolongado de MET nos ratos do grupo VPA+MET. Ao mesmo tempo, a frequência exploratória vertical foi aumentada no grupo VPA+MET, sugerindo sensibilização comportamental ligada ao sistema dopaminérgico (BERNARDI; PALERMO-NETO, 1984). A expressão da sensibilização comportamental pelo uso crônico de psicoestimulantes é caracterizada por produzir aumento gradual das respostas comportamentais/locomotoras, sendo utilizada como modelo experimental para determinar o potencial da droga em desenvolver dependência (KALIVAS; WEBER, 1988; ROBINSON; BERRIDGE, 1993; KUCZENSKI; PIERCE; KALIVAS, 1995; WHITE; KALIVAS, 1998; SEGAL, 2002).

Geralmente o tratamento prolongado com MET promove a sensibilização comportamental, observada pelo aumento da locomoção em ratos no CA (AMINI *et al.*, 2004; DAFNY; YANG, 2006; YANG; SWANN; DAFNY, 2006). De acordo com os resultados do presente trabalho, ratos normais que receberam tratamento prolongado com MET (SAL+MET) aumentaram o tempo na ZC e mobilidade; além de reduzir o tempo de imobilidade, frequência de rotação, velocidade média, sem aumento da distância total percorrida em CA. O fato de o comportamento locomotor ser preservado no grupo SAL+MET, indica efeito adaptativo em relação ao tratamento agudo com MET, e a dose-resposta não gerou sensibilização de forma crônica.

Os roedores têm preferência em permanecer na ZP do CA, o aumento do tempo gasto na ZC indica tendência ansiosa (PRUT; BELZUNG, 2003). Um efeito adicional verificado pelo uso prolongado ao MET é justamente a ansiedade, consequência comum do desenvolvimento da dependência (BOYETTE-DAVIS *et al.*, 2018; MORTON; STOCK, 2000; SEGEV *et al.*, 2016). Crawford *et al.* (2013) demonstraram que ratos filhotes após MET crônico produziram comportamento tipo-ansioso na vida adulta (CRAWFORD; RAHMAN; BECK, 2013). Estudos confirmam neurodegeneração em algumas áreas do cérebro, como hipocampo e amígdala pelo uso crônico de MET (MARTINS *et al.*, 2006; RIDDLE; FLECKENSTEIN; HANSON, 2006). Modificações nessas áreas cerebrais geram alterações comportamentais, que incluem: ansiedade, depressão redução da aprendizagem e memória (BOLAÑOS *et al.*, 2008; VENDRUSCOLO *et al.*, 2008; MOTAGHINEJAD *et al.*, 2015). De acordo com os achados na literatura, nossos resultados indicam desenvolvimento de comportamento tipo-ansioso relacionado ao tratamento prolongado com MET no grupo controle SAL+MET.

A avaliação em CA dos animais expostos ao VPA (GD 12,5) e tratados prolongadamente com MET revelou melhora em relação a hiperatividade locomotora apresentada no grupo VPA+SAL reduzindo a distância percorrida total em CA. Os ratos VPA+MET reduziram a imobilidade, rotação e velocidade em CA quando comparados ao grupo VPA+SAL. Nossos resultados sugerem melhora do quadro
motor em ratos sensibilizados ao VPA durante o período pré-natal ocasionado pelo MET prolongado, sem desenvolver alterações que indiquem comportamento tipoansioso.

HARA et al (2015) identificaram que a exposição ao VPA pré-natal em camundongos tratados com MET crônico, ativou a DA pré-frontal melhorando anormalidades comportamentais ligadas ao TEA (HARA *et al.*, 2015a). O tratamento crônico com MET em ratos VPA pode desencadear mudanças comportamentais adaptativas persistentes, com potencial relevância terapêutica em sintomas ligados ao TEA (HARA *et al.*, 2015).

Diferentes estudos demonstraram alterações dopaminérgicas moleculares e neuroquímicas no corpo estriado após o tratamento prolongado com MET (VOLKOW *et al.*, 1998, 1999c, 1999d; GERASIMOV *et al.*, 2000b; BRANDON; STEINER, 2003;GLASER *et al.*, 2005; GRAY *et al.*, 2007; QUANSAH *et al.*, 2017;). Em destaque, PANOS *et al.* (2014) observaram que o MET crônico em doses clinicamente relevantes produziu efeitos nas concentrações estriatais de DA, TH e *turnover* HVA/DA (PANOS *et al.*, 2014). Analisando nossos dados, verificamos o mesmo efeito neuroquímico do MET crônico nos níveis estriatais de DA em ratos normais (SAL+MET), revelado pelo aumento de DA, DOPAC e *turnover* DOPAC+HVA/DA. Esses resultados corroboram e ampliam achados anteriores nos níveis de DA estriatal (PANOS *et al.*, 2014; PANOS; LAW; FERGUSON, 2014) e sugerem *imprinting* neuroquímico (GRUSS; BOCK; BRAUN, 2003).

Em resumo, o estriado atua como componente chave neuronal ligado à ação de psicoestimulantes, e o MET (crônico) evidenciou efeito neuroadaptativo nessa região no grupo SAL+MET em relação ao tratamento agudo, visto anteriormente na literatura (BERRIDGE *et al.*, 2006; PESSIGLIONE *et al.*, 2006; CHONG; CLAUSSEN; DAFNY, 2012). Apesar de revelar a ação estimuladora do MET crônico na DA estriatal nos ratos controle SAL+MET, nenhuma alteração relevante foi observada nos animais VPA+MET. O tratamento prolongado com MET não foi eficiente em reverter os níveis reduzidos de DA no estriado de ratos expostos ao VPA no GD 12,5.

Quando avaliamos os níveis de 5-HT no estriado dos ratos, o tratamento prolongado de MET no grupo SAL+MET promoveu redução de 5-HT e aumento de 5-HIAA diferente do resultado da administração aguda a qual não foi alterada. Alter *et al.* (2017), propuseram que a ativação de receptores 5-HT1B em neurônios estriatais

levou a diminuição da atividade locomotora induzida por DA em ratos expostos ao MET (ALTER et al., 2017). De acordo com a neuroquímica estriatal do grupo SAL+MET, sugerimos que a ativação de DA influencia o sistema 5-HT de forma indireta, porém o real papel dessa interação não está totalmente claro. Todavia, o grupo VPA+MET, reduziu 5-HT e aumentou o 5-HIAA, indicando que o MET foi capaz de alterar a reposta serotoninérgica mesmo sem efeitos da DA estriatais. Esses achados confirmam o prejuízo encontrado nos ratos expostos ao VPA pré-natal em relação ao sistema dopaminérgico como o identificado anteriormente pelo nosso grupo e outros autores (HARA *et al.*, 2012, 2015a; CAMPOLONGO *et al.*, 2018; CEZAR *et al.*, 2018).

Em um estudo utilizando camundongos, KODA e colaboradores (2010) relataram que o uso crônico de MET aumenta níveis extracelulares de NOR e DA no córtex pré-frontal, mas não no estriado (KODA *et al.*, 2010). De forma divergente, este estudo verificou no grupo SAL+MET, redução de DA, DOPAC e HVA no córtex. Nenhuma alteração dopaminérgica ocorreu no grupo VPA+MET em relação ao prejuízo gerado pelo VPA pré-natal. Em comparação ao visto no desafio com MET, o tratamento prolongado não promoveu nenhuma neuroadaptação cortical no sistema DA.

Como discutido anteriormente, o MET atua bloqueando o transportador de dopamina regionalmente distribuído em altas concentrações pelo estriado(CILIAX *et al.*, 1995; EMOND; JOYAL; POISSANT, 2009), isso explica os resultados verificados nos grupos SAL+MET e VPA+MET. Os efeitos do MET crônico nos ratos (SAL+MET e VPA+MET) reduziu níveis de 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT. Esses resultados destacam o potencial em induzir plasticidade serotoninérgica do cérebro em desenvolvimento de ratos após o uso crônico de MET (ANDERSEN; NAVALTA, 2004).

É pertinente mencionar o papel crucial da DA sobre a serotonina, modulando e regulando padrões de memória, tanto no córtex quanto no hipocampo (GONZÁLEZ-BURGOS; FERIA-VELASCO, 2008; CARLI; INVERNIZZI; ADELL, 2014;). Salman *et al.* (2021) verificaram que ratos receberam MET prolongado e tiveram níveis elevados de 5-HT e 5-HIAA associados ao aumento da memória ocasionado pela ação da DA (SALMAN *et al.*, 2021). Nesse trabalho os ratos controles tratados com MET agudo e prolongado exibiram alterações neuroquímicas corticais serotoninérgicas e dopaminérgicas. Esses achados sugerem que a resposta 5-HT frente o uso de MET é importante para entender possíveis efeitos terapêuticos da droga em pacientes com TDAH e TEA.

Estudos atuais demonstraram que tratamentos agudos e crônicos com MET em ratos causam diferentes alterações na expressão gênica estriatal (YANO; STEINER, 2005a). Nossos resultados mostram alterações no grupo SAL+MET em relação ao aumento da expressão gênica estriatal de *DRD1* e *DRD2* com redução de *TH*. Apesar da atuação bloqueadora de MET nos transportadores de DA, nenhuma alteração gênica foi observada no grupo SAL+MET. Quansah *et al.* (2019) verificaram a expressão de *DAT* no corpo estriado aumentada em ratos tratados com MET, efeito dependente tanto da duração do tratamento e do hemisfério cerebral investigado (QUANSAH; ZETTERSTRÖM, 2019). Em nossos experimentos, a dosagem e via de administração de MET não foram eficientes em gerar aumento na expressão de *DAT*.

Contudo, evidencias indicam que a administração de MET a longo prazo promove alterações neuroplásticas via estimulação de receptores D₁ no estriado (PAPA *et al.*, 2002; YANO; STEINER, 2005b, 2005a; QUANSAH *et al.*, 2017). Essas alterações moleculares causadas pelo MET, modificam o estado crônico de um neurônio aumentando ou reduzindo a ativação de receptores D₁ e D₂ coordenada por níveis de DA endógena determinando ações celulares e expressão gênica (LUD CADET *et al.*, 2010; CHONG; CLAUSSEN; DAFNY, 2012; VENKATARAMAN; CLAUSSEN; DAFNY, 2017). Em concordância, achados sugerem que o bloqueio dopaminérgico de D₁ e D₂ reduz os efeitos comportamentais da resposta a psicoestimulantes, indicando a importância autorregulatória dopaminérgica mediada por receptores (RANALDI *et al.*, 2001).

Os dados apresentados estão de acordo com a literatura em relação aos efeitos neuroadaptativos do MET no grupo SAL+MET, que aumentaram a expressão de receptores D₁ e D₂ e reduziram a expressão de TH. Consistente com isso, Gray *et al.*, (2007) verificaram que ratos durante o PND 7 – PND 35 tratados com MET reduziram a imunorreatividade de fibras TH no estriado (GRAY *et al.*, 2007). Esses efeitos de regulação gênica do MET mimetizam aqueles produzidos por outros psicoestimulantes que atuam diretamente como agonistas de receptores dopaminérgicos, geralmente mais robustos em regiões dorsais do estriado médio a caudal (KARIM *et al.*, 2018).

Quando estudamos o córtex, nossos resultados indicaram que a atividade gênica de DA foi alterada pelo uso prolongado de MET, verificada pelo aumento de

DRD1, *DRD2* e *TH* em ratos do grupo SAL+MET. Diante da literatura, verificamos que nosso estudo está de acordo com achados que indicam em ratos tratados cronicamente com MET aumento de receptores D₁ e D₂ (HARA *et al.*, 2016); aumento da imunorreatividade de TH em fibras corticais da camada 6 (GRAY *et al.*, 2007). Em resumo, o presente estudo mostra que a administração crônica de MET em animais jovens induz mudanças na atividade locomotora e em algumas proteínas-chave que medeiam a função das catecolaminas.

Como discutido nesse estudo, os efeitos neuroquímicos de MET nos ratos controle foram evidentes em regiões estriatais e corticais. Apesar da eficácia dose-resposta de MET comprovada no estudo, a exposição pré-natal de ratos ao VPA reduziu ou anulou os efeitos estimuladores da droga nesse modelo. De fato, um crescente associativo ao longo dos nossos resultados apoia melhoras comportamentais obtidas por meio do tratamento com metilfenidato agudo ou prolongado em ratos machos e fêmeas submetidos ao modelo de autismo utilizando o VPA pré-natal.

5.4 Alterações comportamentais e neuroquímicas do VPA pré-natal (400 mg/kg no GD 12,5) em ratos machos e fêmeas durante a maturidade sexual

A caracterização comportamental é uma importante manifestação da mente humana, e por ela é possível medir alterações complexas do SNC. O TEA é um dos principais transtornos do desenvolvimento e a avaliação do fenótipo comportamental em modelos animais é considerada hoje uma poderosa abordagem de avaliação (TAKUMI *et al.*, 2020a). O autismo é um transtorno multifatorial e frequentemente comórbido, no qual engloba outros problemas psiquiátricos, incluindo ansiedade e medo excessivos (SIMONOFF *et al.*, 2008; OLEXOVÁ; ŠTEFÁNIK; KRŠKOVÁ, 2016). Nessa fase do trabalho, a resposta tipo-ansiosa de ratos tratados com VPA pré-natal foi avaliada, juntamente com a neuroquímica de regiões cerebrais associadas ao autismo.

Os resultados demonstraram diferentes efeitos do VPA pré-natal na prole masculina de ratas, incluindo: (1) redução da frequência/tempo de *self-grooming* e *grooming* total espontâneos; (2) anedonia, medida pela redução da frequência/tempo

de *self-grooming* induzido por sacarose 10%; (3) reposta tipo-ansiosa medida pelo aumento da frequência nos braços fechados e redução nos braços abertos do labirinto em cruz elevado; (4) comportamento tipo-ansioso verificado pelo aumento da permanência no lado escuro na caixa claro-escuro; (5) redução das monoaminas e metabólitos NOR, DA e 5-HT estriatais; (6) aumento de NOR, DA e 5-HIAA no córtex; (7) hiperserotonemia no hipocampo; (8) hipoatividade de DA e HVA no hipotálamo; e (9) aumento de DA e DOPAC na PAG. Os resultados do presente estudo são consistentes em revelar que a exposição pré-natal ao VPA induz comportamentos tipo-ansioso e anedonia em ratos machos. É importante ressaltar ainda, que segundo os nossos achados, o fenótipo comportamental tipo-autista no modelo de VPA prénatal em ratos revelou disfunções neuronais de circuitos dopamina e serotonina em diferentes regiões cerebrais testadas.

Devido aos movimentos altamente padronizados, o *self-grooming* é um dos comportamentos frequentemente observados em roedores com grande valor neurofisiológico (SPRUIJT *et al.*, 1985; KALUEFF *et al.*, 2007b;). A autolimpeza ocorre normalmente em ratos como comportamento de manutenção, e para a realização dessa tarefa, mecanismos neurais de controle motor hierárquico são ativados (FENTRESS, 1988; ROTH *et al.*, 2013). A avaliação do *self-grooming* é um modelo de estudo para comportamentos repetitivos, autodirigidos e sequencialmente padronizados, podendo ser identificado em transtornos psiquiátricos como o TEA (SILVERMAN *et al.*, 2009; PEARSON *et al.*, 2011; REYNOLDS; URRUELA; DEVINE, 2013).

Nos resultados apresentados, os ratos do grupo VPA reduziram a frequência/tempo de *self-grooming*, *grooming* total espontâneos e comportamento de levantar quando comparados ao controle. Vários estudos demonstraram que o tratamento pré-natal com VPA pode ocasionar o aumento do *self-grooming*, comportamento considerado estereotipado exibido por animais tipo-autista. (SIEGEL, 2011; CHEAHA *et al.*, 2015; DU *et al.*, 2017; AL SAGHEER *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018b; KIM *et al.*, 2019; ZAMBERLETTI *et al.*, 2019; HIRSCH *et al.*, 2020; MEHTA; GANDAL; MOHAMMADI *et al.*, 2020). Os efeitos dose-dependente comportamentais do VPA em diferentes espécies animais no modelo de autismo, explica os resultados conflitantes do presente trabalho com aqueles descritos na literatura em relação ao *self-grooming* (CHALIHA *et al.*, 2020). Apesar da disfunção do *self-grooming* representar padrão motor repetitivo e comportamentos compulsivos

expresso em indivíduos autistas, o prejuízo na autolimpeza em roedores não é considerado um padrão específico no modelo tipo-autista (KALUEFF *et al.*, 2016b). Nesse sentido, para melhor corroborar nossa hipótese outros aspectos do comportamento de *self-grooming* precisam ser estudados em modelos de autismo induzido pelo VPA.

Homberg *et al.* (2002) correlacionaram em ratos o aumento do comportamento ansioso e hipoatividade dopaminérgica na amígdala com *self-grooming* diminuído (HOMBERG *et al.*, 2002). A redução na atividade de autolimpeza em roedores frequentemente tem sido associada a comportamentos de ansiedade (ROGEL-SALAZAR; LÓPEZ-RUBALCAVA, 2011) e depressão (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Partindo desse pressuposto, nossos resultados revelaram que os ratos expostos ao VPA pré-natal apresentaram: (1) anedonia, medida pela redução de *grooming* induzido por sacarose 10%; (2) comportamento ansioso verificado pelo aumento na permanência nos braços fechados (labirinto em cruz elevado); (3) e aumento na permanência no lado escuro da caixa claro-escuro.

Frequentemente o TEA ocorre simultaneamente a outros distúrbios psiquiátricos, e particularmente os sintomas de ansiedade podem afetar até 70% das crianças no espectro do autismo (KAAT; GADOW; LECAVALIER, 2013; CONNER *et al.*, 2021). De acordo com esse estudo, a exposição ao VPA pré-natal em ratos causou comportamento semelhante à ansiedade em ratos assim como o previsto em diversos trabalhos (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005b; MARKRAM *et al.*, 2008; BANJI *et al.*, 2011; SANDHYA; SOWJANYA; VEERESH, 2012; KERR *et al.*, 2013; BANERJEE *et al.*, 2014; OLEXOVÁ; ŠTEFÁNIK; KRŠKOVÁ, 2016). Consistente com essas observações, nossos achados mostram que a exposição pré-natal ao VPA aumenta os comportamentos de ansiedade, assim como prejudica a vocalização, socialização, estereotipias e locomoção durante a fase juvenil de ratos machos.

Apesar de poucos estudos envolvendo o sexo feminino e autismo, o comportamento tipo-ansiedade também foi demonstrado na prole feminina de ratas tratadas com VPA pré-natal (EDALATMANESH *et al.*, 2013; KATAOKA *et al.*, 2013). As diferenças sexuais no cérebro influenciam significativamente a neuroanatomia, bioquímica e processos cognitivos (COSGROVE; MAZURE; STALEY, 2007; MCCARTHY *et al.*, 2012). As diferenças sexuais são pronunciadas na suscetibilidade aos distúrbios neurológicos, a exemplo, mulheres são mais propensas do que os

homens no desenvolvimento da doença de Alzheimer, transtornos de depressão e ansiedade (WEISSMAN *et al.*, 1986; NOLEN-HOEKSEMA, 1987; HEBERT *et al.*, 2013).

Nos resultados apresentados, diferentes efeitos do VPA pré-natal em ratas foram identificados, incluindo: (1) estereotipia medida pelo aumento da frequência de *self-grooming*; (2) anedonia pela redução da frequência/tempo de *self-grooming* induzido por sacarose 10%; (3) reposta tipo-ansiosa pelo aumento da permanência nos braços fechados e redução nos braços abertos do labirinto em cruz elevado; (4) comportamento tipo-ansioso verificado pelo aumento da permanência no lado escuro na caixa claro-escuro; (5) redução de DOPAC, HVA e *turnover* estriatal; (6) redução de VMA e VMA/NOR no córtex; (7) aumento do HVA no hipocampo; (8) hipoatividade de DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA no hipotálamo; e (9) nenhuma alteração das monoaminas na PAG. Os resultados do presente estudo são consistentes em revelar que a exposição pré-natal ao VPA induz comportamentos de estereotipia, tipo-ansioso e anedonia em ratas. Em relação aos resultados apresentados pelos machos do grupo VPA, as fêmeas expressaram alterações similares exceto pelo aumento do *self-grooming* espontâneo. Durante a fase adulta foi possível perceber comprometimento do sistema dopaminérgico em fêmeas tratadas com VPA pré-natal.

Cartocci *et al.* (2019) demonstraram que diferentes regiões cerebrais são afetadas especificadamente pelo sexo da prole e tratamento com VPA pré-natal, sugerindo que homens e mulheres respondem de forma diferente a estímulos externos, o que explica a incidência masculina aos transtornos como o TEA (SEGATTO *et al.*, 2013; CARTOCCI *et al.*, 2019b). O VPA pré-natal afeta de forma dimórfica o cérebro de ratos, e áreas como córtex, cerebelo, hipocampo e núcleo accumbens são afetadas dependente do sexo (CARTOCCI *et al.*, 2019b). Nossos resultados vão de acordo com essa hipótese, uma vez que diferenças sexualmente dimórficas em monoaminas cerebrais foram reveladas nos animais tratados com VPA pré-natal afeta o cérebro e o comportamento de forma dependente do sexo e idade avaliada. Esses achados oferecem relevância clínica, já que o TEA ainda possui disparidades na incidência, manifestação, prognóstico e tratamento observadas entre os sexos.

Quando avaliamos as fêmeas tratadas com VPA pré-natal, durante a fase adulta, a neuroquímica revelou hipoatividade dopaminérgica estriatal e hipotalâmica no PND 90. Analisando de forma conjunta, os resultados durante o PND 32, ratas tratadas com VPA pré-natal não demonstraram alterações na DA, sugerindo neuroadaptação cerebral decorrente dos sintomas tipo-autista.

Como já mencionado anteriormente, a atividade dopaminérgica alterada é consequência da ampla e diversificada gama de defeitos moleculares e sinápticos, tornando a função neurotransmissora anormal em distúrbios comportamentais como o TEA (DICARLO; WALLACE, 2022). Além da dopamina, diferentes sistemas de neurotransmissão estão sendo associados ao TEA, particularmente o papel da serotonina tem sido investigado e ligado a alguns dos comportamentos tipo-autista (LAM; AMAN; ARNOLD, 2006; NAKAMURA *et al.*, 2010).

No início, Schain & Freedman (1961) demonstraram níveis de 5-HT significativamente aumentados no sangue de crianças com autismo em relação a indivíduos não-autistas (SCHAIN; FREEDMAN, 1961). A partir da evidência em cerca de um terço da população de TEA ter hiperserotonemia (TARTAGLIONE *et al.*, 2019c), os presentes resultados revelaram que ratos tratados com VPA pré-natal apresentaram hiperserotonemia no hipocampo, além de aumento de 5-HIAA no córtex e redução de 5-HT no estriado na fase adulta. Durante os períodos críticos do desenvolvimento cerebral, alteração dos níveis de 5-HT exercem efeitos duradouros podendo gerar ansiedade e depressão na idade adulta (BONNIN; LEVITT, 2011; TEISSIER; SOIZA-REILLY; GASPAR, 2017).

Algumas regiões cerebrais estão envolvidas na cognição, como o córtex pré-frontal e estriado, sítios densamente inervados por aferências serotoninérgicas e dopaminérgicas provenientes de fibras da rafe, sistemas mesocorticolímbico e nigroestriatal (SALMAN *et al.*, 2021). É pertinente mencionar, que a DA tem participação crucial na atividade de 5-HT, e por meio dessa interação diferentes aspectos da transmissão sináptica modulam e regulam funções cognitivas e comportamentos no SNC (PIETRO; SEAMANS, 2007; GONZÁLEZ-BURGOS; FERIA-VELASCO, 2008).

Processos implicados na flexibilidade cognitiva, aprendizagem e memória, são fortemente modulados pela atividade conjunta dos neurotransmissores 5-HT e DA (CARLI; INVERNIZZI, 2014). Alterações oriundas desse complexo estão ligadas na fisiopatologia de distúrbios como TEA, em que o funcionamento cognitivo é um importante indicador de prejuízo (LUCK; GOLD, 2008). Os resultados do presente trabalho revelaram que ratos adultos expostos ao VPA pré-natal exibiram alterações

na DA e 5-HT corticoestriatais, redução de DA e 5-HT no estriado; aumento de DA e 5-HIAA no córtex. Nossos dados sugerem que o VPA pré-natal em ratos foi eficiente em gerar alterações nas atividades de 5-HT e DA em sistemas corticoestriatais, colaborando para o fenótipo tipo-autista relatados nos animais ao longo do estudo.

Corroborando com esses achados, Narita *et al.* (2002) observaram que camundongos tratados com VPA pré-natal aumentaram os níveis de 5-HT no córtex frontal, hipocampo e cerebelo (NARITA *et al.*, 2002). Coletivamente, estudos em humanos e em modelos animais apoiam um papel crítico da neurotransmissão de 5-HT no TEA, indicada como mediadora da resposta ansiosa (MULLER; ANACKER; VEENSTRA-VANDERWEELE, 2016; WANG *et al.*, 2018a). O trabalho de Wang *et al.* (2018), verificaram que ratos tratados com VPA pré-natal apresentaram comportamento ansioso e aumento da atividade de 5-HT no núcleo dorsal da rafe (WANG *et al.*, 2018a). Essas observações experimentais abordam potencial mecanismo da hiperserotonemia como mediador no aumento da ansiedade em animais tratados com VPA pré-natal. Os resultados do presente trabalho, indicam que funções anormais do sistema 5-HT intervêm no comportamento ansioso e *self-grooming* observados na prole masculina tipo-autista VPA. É importante ressaltar que as deficiências do sistema serotoninérgico verificadas, não estão restritas a uma única área do cérebro, mas no estriado, córtex e hipocampo de ratos adultos VPA.

Banker *et al.* (2021) revisaram o papel do hipocampo no TEA, e descreveram essa área como um componente crítico, que em conjunto de outras regiões cerebrais, contribuem para o fenótipo autista (BANKER *et al.*, 2021). O comprometimento da função do hipocampo colabora em domínios comportamentais do fenótipo autista, como memória, raciocínio espacial e interação social (SCHUETZE *et al.*, 2016). Com os dados do presente estudo, sugerimos que o hipocampo exerce importante papel no fenótipo autista associado a respostas do sistema serotoninérgico. Nossos resultados demonstram ainda, que outras áreas cerebrais analisadas nos animais VPA não reduziram os níveis de 5-HT como o observado no hipocampo dos machos.

A PAG é uma estrutura complexa cerebral envolvida em comportamentos adaptativos, emoção e ansiedade PAG (LOVICK; ADAMEC, 2009; OMELCHENKO; SESACK, 2010). O sistema dopaminérgico atua na PAG modulando comportamentos nociceptivos e sensação de medo (MEYER *et al.*, 2009; OMELCHENKO; SESACK, 2010). No presente trabalho, identificamos aumento da atividade de DA e DOPAC na

PAG de ratos tratados com VPA pré-natal. Esses resultados, sugerem que a hiperatividade dopaminérgica na PAG colabora no fenótipo-autista nos ratos VPA. Até o presente momento, nenhum estudo verificou a resposta dopaminérgica na PAG em um modelo de autismo em ratos utilizando VPA pré-natal. Estudos devem ser realizados para melhor corroborar essa hipótese.

O hipotálamo é um regulador chave da homeostase em mamíferos, exercendo função integradora de processamento em sinais sensoriais cerebrais, executando ações autonômicas regulatórios na liberação de peptídeos e neuroendócrina (PEARSON; PLACZEK, 2013; BIRAN *et al.*, 2015). Avaliando o impacto das anormalidades no desenvolvimento hipotalâmico normal, diferentes aspectos neurobiológicos adversos podem ser percebidos, como infertilidade, depressão, estresse crônico, obesidade e transtornos do desenvolvimento, incluindo o TEA (MICHAUD, 2001; SILVEIRA; TRARBACH; LATRONICO, 2010; SWAAB, 2004). A atrofia hipotalâmica está presente em modelos animais geneticamente modificados do fenótipo tipo-autista (DODERO *et al.*, 2013; PAGANI *et al.*, 2019). Além disso, uma região específica hipotalâmica conhecida como "área de *grooming*" desempenha um papel crítico no controle da higiene em roedores (KRUK *et al.*, 1998; ROELING *et al.*, 1994).

Contudo, a região hipotalâmica avaliada nos ratos expostos ao VPA prénatal, mostrou redução de DA e HVA. Juntamente com a hipoatividade de DA no hipotálamo, o presente estudo verificou redução na frequência/tempo *self-grooming* espontâneo em ratos VPA. Analisando outros modelos de autismo, KIRSTEN *et al.* (2017) mostraram que a exposição pré-natal ao LPS em ratos reduziu níveis hipotalâmicos de HVA e a taxa de renovação HVA/DA, além do aumento do *selfgrooming* (KIRSTEN; BERNARDI, 2017). Dentro desse paradigma, de acordo com os resultados apresentados, sugerimos que a hipoatividade dopaminérgica no hipotálamo parece estar relacionada a deficiências comportamentais encontradas no TEA.

Reforçando o papel do hipotálamo, estudos documentaram dois peptídeos de importante papel fisiológico, a oxitocina e a arginina-vasopressina, no apoio e regulação de respostas aflitivas e socioemocionais, descritas como habilidades prejudicadas no TEA (TECOTT, 2005; LINDENBERG *et al.*, 2011; KNOBLOCH *et al.*, 2012; DÖLEN *et al.*, 2013; STORM; MEYER- NAKAJIMA; GÖRLICH; HEINTZ, 2014;). Investigações clínicas em humanos, validaram que os efeitos da administração

intranasal de ocitocina reduz a resposta ao estresse social e ansiedade, promovendo a interação social positiva em indivíduos com TEA (HEINRICHS; VON DAWANS; DOMES, 2009; HARARI-DAHAN; BERNSTEIN, 2014; CARIA; CIRINGIONE; DE FALCO, 2020). Portanto, a redução da atividade dopaminérgica hipotalâmica é indicada como neuromodulador em outros sistemas que incluem a ocitocina, influenciando comportamentos sociais e cognitivos prejudicados em ratos expostos ao VPA pré-natal (WU *et al.*, 2021). Novos estudos devem ser realizados para comprovar a interação dos presentes achados com a ocitocina no hipotálamo.

O papel do sistema dopaminérgico mesocortical tem sido frequentemente estudado e associado a sintomas que envolvem o TEA (PAVÅL, 2017b). Diferentes trabalhos reproduziram o fenótipo autista em ratos através do VPA pré-natal, e validaram níveis aumentados de DA no córtex pré-frontal desses animais (NAKASATO *et al.*, 2008; NARITA *et al.*, 2002). Concomitantemente a esses fatos, quando testamos ratos expostos ao VPA pré-natal na fase adulta, revelamos níveis aumentados de DA, seu metabólito (DOPAC e HVA) e taxa de renovação dopaminérgica cortical (HVA/DA e DOPAC+HVA/DA). Uma vez que o córtex pré-frontal recebe projeções axonais de neurônios dopaminérgicos da VTA, Nakasato *et al.*, (2008) sugerem que estresse, reclusão social e comportamento tipo-depressão são influenciados pela hiperatividade de DA cortical observada em ratos tratados com VPA pré-natal (NAKASATO *et al.*, 2008). Nossos resultados corroboram essa hipótese, uma vez que os machos *Wistar* do grupo VPA demonstraram aumento do comportamento tipo-ansioso e anedonia, redução da atividade social e aumento da atividade dopaminérgica no córtex em relação ao grupo controle.

Embora a hiperatividade dopaminérgica cortical tenha sido revelada em ratos no PND 90 tratados pré-natalmente com VPA, paradoxalmente, níveis neuroquímicos de DA e HVA demonstraram redução durante o PND 32 no grupo VPA em relação ao controle. Esse resultado aponta a tentativa do cérebro tipo-autista em adaptações homeostáticas como mecanismo de ajuste da resposta dopaminérgica. A adaptação homeostática pode ocorrer em nível celular, sináptico (CARLI; INVERNIZZI, 2014), e numerosas transições anatômicas corticais no tônus dopaminérgico ocorrem entre a adolescência e vida adulta (ANDERSEN; NAVALTA, 2004). Em ratos, a redistribuição de fibras dopaminérgicas corticoestriatais podem permanecer até a idade adulta (PND 135), exercendo efeitos na neuroquímica cerebral e modulando diferentes comportamentos (COSGROVE; MAZURE; STALEY, 2007; GRAY *et al.*, 2007).

Concluímos que os resultados discutidos até aqui sugerem que (1) a sinalização cerebral de dopamina deficiente em ratos adultos VPA não estavam restritas a uma área do cérebro, mas ao estriado, córtex, hipotálamo e PAG; (2) hiperserotonemia no hipocampo promove comportamento ansioso nos machos tipoautista VPA; (3) o desequilíbrio da atividade neurobiológica interativa de 5-HT e DA em regiões corticoestriatais promove fenótipo-autista em ratos VPA; (4) a hipoatividade dopaminérgica no hipotálamo está relacionada a comportamentos encontrados no TEA (5) fêmeas expressaram alterações comportamentais e neuroquímicas semelhantes aos machos VPA, além de exibirem características fenotípicas similares ao autismo; e (6) comprometimento dopaminérgico de fêmeas adultas tratadas com VPA pré-natal. Esses achados contribuem para uma melhor compreensão de mecanismos centrais do TEA, além de identificar a dopamina como biomarcador e potencial alvo farmacoterapêutico para o transtorno em machos e fêmeas.



6 CONCLUSÕES

6.1 Alterações comportamentais e neuroquímicas do VPA pré-natal (400 mg/kg no GD 12,5) em ratos machos e fêmeas durante a maturidade sexual

- Comunicação ineficiente durante o PND 11 em filhotes Wistar, quando isolados da ninhada passaram mais tempo sem solicitar a mãe, observados na diminuição da vocalização ultrassônica e maior tempo gasto em silêncio.
- Comportamento estereotipado e repetitivo com interesses restritos, resistência à mudança vista pelo aumento da repetição no braço visitado ao longo das sessões no labirinto em T no PND 29.
- Socialização anormal no teste comportamento de brincar durante o PND 30, verificado pela redução na brincadeira social, diminuição na solicitação social e na investigação social de ratos juvenis.
- Hiperlocomoção em CA, medida pelo aumento da distância total percorrida, frequência de rotação e velocidade média.
- Alteração nos níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* estriatais, verificado pela hipoatividade de NOR (VMA e VMA/NOR) e DA (DA, DOPAC, HVA e DOPAC+HVA/DA).
- Alteração nos níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* no córtex pré-frontal, verificado pelo aumento de NOR (VMA e VMA/NOR) e redução de DA (DA e HVA).
- Redução na expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado.
- Preservação da expressão gênica de DRD1, DRD2 e DAT no córtex.
- Hiperatividade dopaminérgica, medida pelo aumento de neurônios TH+ imunorreativos do complexo VTA-SN durante o PND 35

6.2 Os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5) foram:

- Reversão da hiperlocomoção em CA, com melhora na distância total percorrida, frequência de rotação e velocidade média.
- Não causou melhora na interação social verificada no comportamento de brincar.
- Não causou melhora nos níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* estriatais e no córtex pré-frontal de ratos tipo-autista.
- Não melhorou a redução na expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado de ratos VPA.
- Causou superexpressão gênica de DRD1, DRD2 e TH a nível cortical

6.3 Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5) foram:

- Reversão da hiperlocomoção em CA, com melhora na distância total percorrida, frequência de rotação e velocidade média.
- Não causou melhora nos níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* estriatais de ratos tipo-autista.
- Alterou os níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* estriatais e no córtex pré-frontal de ratos tipo-autista, medido pelo aumento de NOR e 5-HT.
- Não melhorou a redução na expressão gênica de DAT, DRD1, DRD2 e TH no estriado de ratos VPA.
- Preservação da expressão gênica de DRD1, DRD2 e DAT no córtex.

6.4 Os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD 12,5 na prole feminina de ratas foram:

- Diferenças sexualmente dimórficas comportamentais e neuroquímicas em relação ao machos expostos ao VPA pré-natal
- Comunicação ineficiente durante o PND 11 em filhotes Wistar, verificados na diminuição da vocalização ultrassônica e maior tempo gasto em silêncio.
- Comportamento estereotipado e repetitivo com interesses restritos, resistência à mudança vista pelo aumento da repetição no braço visitado ao longo das sessões no labirinto em T no PND 29.
- Socialização preservada no teste comportamento de brincar durante o PND 30, verificado pela brincadeira social normal. A exploração vertical foi reduzida e o tempo de perseguir das fêmeas VPA.
- Hipolocomoção em CA, medida pela redução da distância total percorrida, frequência de rotação e velocidade média.
- Nenhuma alteração nos níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* estriatais e corticais.
- Preservação da expressão gênica de *DRD1* e *DRD2* no estriado e córtex.

6.5 Os principais efeitos do desafio farmacológico com metilfenidato (5 mg/kg) em ratas tratadas pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5) foram:

 Reversão da hipolocomoção em CA, com melhora na distância total percorrida. As ratas do grupo VPA+MET apresentaram comportamento tipo-ansioso, medido pelo aumento do tempo gasto na ZC em CA.

- Alterou os níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* estriatais, verificado pelo aumento de NOR (VMA e VMA/NOR) e 5-HT (5-HT e 5-HIAA/5-HT).
- Alterou os níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* no córtex préfrontal, verificado pela redução de NOR (NOR e VMA) e DA (DOPAC e HVA).
- Redução na expressão gênica de *DRD1*e *DRD2* no estriado.
- Preservação da expressão gênica de *DRD1* e *DRD2* no córtex.

6.6 Os principais efeitos do tratamento prolongado com metilfenidato (5 mg/kg) em ratos tratados pré-natalmente com VPA (400 mg/kg no GD 12,5) foram:

- Piora na locomoção em CA, com redução na distância total percorrida, comportamento ansioso em decorrência do aumento da permanência na ZC.
- Não causou alterações significantes nos níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* estriatais.
- Alterou os níveis de monoaminas, seus metabolitos e *turnover* no córtex préfrontal, medido pelo aumento de DA (DA e DOPAC) e redução de (5-HIAA e 5-HIAA/5-HT.
- Não alterou a expressão gênica de *DRD1* e *DRD2* no estriado de ratos VPA.
- Aumento da expressão gênica de DRD1 no córtex.
- 6.7 Os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD 12,5 em ratos com maturidade sexual foram:

- Redução da frequência/tempo do self-grooming e grooming total espontâneos no PND 60.
- Comportamento de anedonia, verificado pela redução da frequência/tempo de self-grooming induzido por sacarose 10% no PND 61.
- Comportamento tipo-ansioso visto pelo aumento da frequência nos braços fechados e redução nos braços abertos no labirinto em cruz elevado durante o PND 62.
- Aumento do tempo gasto no compartimento escuro no teste caixa claro-escuro durante o PND 62.
- Redução nos níveis de NOR, DA, 5-HT, seus metabolitos e *turnover* estriatais durante o PND 90.
- Aumento nos níveis de NOR, DA, 5-HT, seus metabolitos e *turnover* no córtex pré-frontal durante o PND 90.
- Hiperserotonemia no hipocampo durante o PND 90.
- Hipoatividade de DA e HVA no hipotálamo durante o PND 90.
- Aumento de DA e DOPAC na PAG durante o PND 90.

6.8 Os principais prejuízos associados a administração do VPA no GD 12,5 em ratas com maturidade sexual foram:

- Comportamento estereotipado verificado pelo aumento da frequência/tempo do self-grooming e grooming total espontâneos no PND 60.
- Comportamento de anedonia, verificado pela redução da frequência/tempo de self-grooming induzido por sacarose 10% no PND 61.

- Comportamento tipo-ansioso visto pelo aumento da frequência nos braços fechados e redução nos braços abertos no labirinto em cruz elevado durante o PND 62.
- Aumento do tempo gasto no compartimento escuro no teste caixa claro-escuro durante o PND 62.
- Redução nos níveis de DA seus metabolitos e *turnover* estriatais durante o PND 90.
- Redução nos níveis de VMA e VMA/NOR no córtex pré-frontal durante o PND 90.
- Aumento do HVA no hipocampo durante o PND 90.
- Sem alterações neuroquímicas na PAG durante o PND 90.

6.9 Considerações finais

Em conclusão é possível destacar que os resultados apresentados fornecem informações consistentes sobre o prejuízo dopaminérgico e serotoninérgico que envolvem alterações comportamentais exibidas em diferentes níveis de maturidade nos ratos machos expostos ao VPA pré-natal. Nossos resultados apoiam melhoras comportamentais obtidas por meio do tratamento com metilfenidato agudo ou prolongado em ratos submetidos ao modelo de autismo utilizando o VPA pré-natal. O fenótipo comportamental autista induzido pelo VPA pré-natal em ratos, exibe comprometimento dopaminérgico em diferentes regiões cerebrais de ratos expostos ao VPA pré-natal, somados a prejuízos comportamentais envolvendo habilidades de comunicação, estereotipias, sociabilidade e hiperlocomoção. As fêmeas Wistar expostas ao VPA pré-natal apresentaram anormalidades comportamentais em diferentes aspectos que envolvem o fenótipo do TEA, particularidades dos sintomas dependentes do sexo. Além de identificar a dopamina como biomarcador e potencial

alvo no TEA, o modelo autista induzido pelo VPA confere forte valor para determinar e compreender as particularidades do transtorno no cenário clínico.



REFERÊNCIAS

ABDULAMIR, H. A.; ABDUL-RASHEED, O. F.; ABDULGHANI, E. A. Serotonin and serotonin transporter levels in autistic children OPEN ACCESS. **Saudi Med J**, v. 39, n. 5, p. 487–494, 2018.

ABRAHAMS, B. S.; ARKING, D. E.; CAMPBELL, D. B.; MEFFORD, H. C.; MORROW, E. M.; WEISS, L. A.; MENASHE, I.; WADKINS, T.; BANERJEE-BASU, S.; PACKER, A. SFARI Gene 2.0: A community-driven knowledgebase for the autism spectrum disorders (ASDs). **Molecular Autism**, v. 4, n. 1, p. 2–4, 2013.

ABRAHAMS, 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, maio 2008.

ACCARDO, P.; BLONDIS, T. A. What's all the fuss about Ritalin? **Journal of Pediatrics**, v. 138, n. 1, p. 6–9, 2001.

ACCORDINO, R. E.; KIDD, C.; POLITTE, L. C.; HENRY, C. A.; MCDOUGLE, C. J. **Psychopharmacological interventions in autism spectrum disorderExpert Opinion on Pharmacotherapy**, v17, n. 7, p. 937 – 952.

ADAB, N.; KINI, U.; VINTEN, J.; AYRES, J.; BAKER, G.; CLAYTON-SMITH, J.; COYLE, H.; FRYER, A.; GORRY, J.; GREGG, J.; MAWER, G.; NICOLAIDES, P.; PICKERING, L.; TUNNICLIFFE, L.; CHADWICK, D. W. The longer term outcome of children born to mothers with epilepsy. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 75, n. 11, p. 1575–1583, 2004.

ÁDÁM, Á.; KEMECSEI, R.; COMPANY, V.; MURCIA-RAMÓN, R.; JUAREZ, I.; GERECSEI, L. I.; ZACHAR, G.; ECHEVARRÍA, D.; PUELLES, E.; MARTÍNEZ, S.; CSILLAG, A. Gestational Exposure to Sodium Valproate Disrupts Fasciculation of the Mesotelencephalic Dopaminergic Tract, With a Selective Reduction of Dopaminergic Output From the Ventral Tegmental Area. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 14, n. June, p. 1–19, 2020.

AL-OTAISH, H.; AL-AYADHI, L.; BJØRKLUND, G.; CHIRUMBOLO, S.; URBINA, M. A.; EL-ANSARY, A. Relationship between absolute and relative ratios of glutamate, glutamine and GABA and severity of autism spectrum disorder. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 3, p. 843–854, 2018.

AL SAGHEER, T.; HAIDA, O.; BALBOUS, A.; FRANCHETEAU, M.; MATAS, E.; FERNAGUT, P. O.; JABER, M. Motor impairments correlate with social deficits and restricted neuronal loss in an environmental model of autism. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 9, p. 871–882, 2018.

ALAERTS, K.; SWINNEN, S. P.; WENDEROTH, N. Sex differences in autism : a resting-state fMRI investigation of functional brain connectivity in males and females. **Social Cognitive and Affective Neuroscience,** v 17, n. 6, p. 1002–1016, 2016.

ALBANI, F.; RIVA, R. Differential transplacental binding of valproic acid: influence of free fatty acids. British **Journal of Clinical Pharmacology,** v 17, n 6 p. 759–762, 1984.

ALI, A.; CUI, X.; EYLES, D. Developmental vitamin D deficiency and autism: Putative pathogenic mechanisms. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, v. 175, p. 108–118, 2018.

ALSUFIANI, H. M.; ALKHANBASHI, A. S.; LASWAD, N. A. B.; BAKHADHER, K. K.; ALGHAMDI, S. A.; TAYEB, H. O.; TARAZI, F. I. Zinc deficiency and supplementation in autism spectrum disorder and Phelan-McDermid syndrome. **Journal of Neuroscience Research**, v. 100, n. 4, p. 970–978, 2022.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5**. [s.l.] Hogrefe Verlag, 2014. 991 (5th ed.). American Psychiatric Publishing.

AMINI, B.; YANG, P. B.; SWANN, A. C.; DAFNY, N. DIFFERENTIAL LOCOMOTOR RESPONSES IN MALE RATS FROM THREE STRAINS TO ACUTE METHYLPHENIDATE. International Journal of Neuroscience, v. 114, n. 9, p. 1063–1084, 7 jan. 2004.

AMODEO, D. A.; OLIVER, B.; PAHUA, A.; HITCHCOCK, K.; BYKOWSKI, A.; TICE, D.; MUSLEH, A.; RYAN, B. C. Serotonin 6 receptor blockade reduces repetitive behavior in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 200, n. May 2020, p. 173076, 2021.

ANDERSEN, S. L.; NAPIERATA, L.; BRENHOUSE, H. C.; SONNTAG, K. C. Juvenile methylphenidate modulates reward-related behaviors and cerebral blood flow by decreasing cortical D3 receptors. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 11, p. 2962–2972, 2008.

ANDERSEN, S. L.; NAVALTA, C. P. Altering the course of neurodevelopment: a framework for understanding the enduring effects of psychotropic drugs. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 22, n. 5–6, p. 423–440,

24 ago. 2004.

ANGLIN, R. E. S.; MAZUREK, M. F.; TARNOPOLSKY, M. A.; ROSEBUSH, P. I. The mitochondrial genome and psychiatric illness. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 159 B, n. 7, p. 749–759, 2012.

ANLAUF, M.; SCHÄFER, M. K.-H.; EIDEN, L.; WEIHE, E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: Cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. **Journal of Comparative Neurology**, v. 459, n. 1, p. 90–111, 21 abr. 2003. Disponível em:

ARAKI, H.; COOPER, B.; BLOUIN, M. S. Genetic Effects of Captive Breeding Cause a Rapid, Cumulative Fitness Decline in the Wild. **Science**, v. 318, n. 5847, p. 100–103, 2007.

ARCHER, T. Neurotoxin-induced cognitive and motor activity modification: a catecholamine connection. **Attention deficit disorder: clinical and basic research**, v. Hillsdale, p. Pub, 287–322, 1989.

ARDINGER, H. H.; ATKIN, J. F.; BLACKSTON, R. D.; ELSAS, L. J.; CLARREN, S. K.; LIVINGSTONE, S.; FLANNERY, D. B.; PELLOCK, J. M.; HARROD, M. J.; LAMMER, E. J.; MAJEWSKI, F.; SCHINZEL, A.; TORIELLO, H. V.; HANSON, J. W.; OPTIZ, J. M.; REYNOLDS, J. F. Verification of the fetal valproate syndrome phenotype. **American Journal of Medical Genetics**, v. 29, n. 1, p. 171–185, jan. 1988.

AREAL, L. B.; BLAKELY, R. D. Neurobehavioral changes arising from early life dopamine signaling perturbations. **Neurochemistry International**, v. 137, n. March, p. 104747, 2020.

ARNDT, T. L.; STODGELL, C. J.; RODIER, P. M. The teratology of autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2- 3, p. 189–199, 2005.

ARYA, A.; CAMPUS, S.; KALAN, B.; HARYANA, S. AUTISM: AN EARLY-ONSET NEURODEVELOPMENTAL DISORDER Ashwani Arya * and Gulshan Sindhwani Department of Pharmaceutical Education and Research, **BPS Women University**, **South Campus, Bhainswal Kalan, Sonipat, Haryana, India**. v. 7, n. 9, p. 3567– 3575, 2016.

ASKENASY, E. P.; TABER, K. H.; YANG, P. B.; DAFNY, N. Methylphenidate (Ritalin): Behavioral studies in the rat. **International Journal of Neuroscience**, v.

117, n. 6, p. 757- 794, 2007.

ATLADÓTTIR, H. Ó.; THORSEN, P.; SCHENDEL, D. E.; ØSTERGAARD, L.; LEMCKE, S.; PARNER, E. T. Association of hospitalization for infection in childhood with diagnosis of autism spectrum disorders: A danish cohort study. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v. 164, n. 5, p. 470–477, 2010.

AZMITIA, E. C.; SINGH, J. S.; HOU, X. P.; WEGIEL, J. Dystrophic Serotonin Axons in Postmortem Brains from Young Autism Patients. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 294, n. 10, p. 1653–1662, out. 2011.

BACCHELLI, E.; MAESTRINI, E. Autism spectrum disorders: Molecular genetic advances. **American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 142C, n. 1, p. 13–23, 15 fev. 2006.

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.

BAI, D.; YIP, B. H. K.; WINDHAM, G. C.; SOURANDER, A.; FRANCIS, R.; YOFFE, R.; GLASSON, E.; MAHJANI, B.; SUOMINEN, A.; LEONARD, H.; GISSLER, M.; BUXBAUM, J. D.; WONG, K.; SCHENDEL, D.; KODESH, A.; BRESHNAHAN, M.; LEVINE, S. Z.; PARNER, E. T.; HANSEN, S. N.; HULTMAN, C.; REICHENBERG, A.; SANDIN, S. Association of Genetic and Environmental Factors with Autism in a 5-Country Cohort. **JAMA Psychiatry**, v. 76, n. 10, p. 1035–1043, 2019.

BAIK, J.-H. Dopamine Signaling in reward-related behaviors. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, 2013.

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, jan. 1995.

BALDNO, F.; GELLER, H. M. Effect of sodium valproate on hypothalamic neurons in vivo and in vitro only does valproate not influence GABA induced suppression of firing rate but its primary action is to increase the spontaneous activity of cortical neurons . In this study we investi. v. 219, p. 231–237, 1981.

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. 181–5, jun. 2003.

BANERJEE, A.; ENGINEER, C. T.; SAULS, B. L.; MORALES, A. A.; KILGARD, M. P.; PLOSKI, J. E. Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 1–13, 2014.

BANJI, D.; BANJI, O. J. F.; ABBAGONI, S.; HAYATH, M. S.; KAMBAM, S.; CHILUKA, V. L. Amelioration of behavioral aberrations and oxidative markers by green tea extract in valproate induced autism in animals. **Brain Research**, v. 1410, n. 4, p. 141–151, 2011.

BANKER, S. M.; GU, X.; SCHILLER, D.; FOSS-FEIG, J. H. Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. **Trends in Neurosciences**, v. 44, n. 10, p. 793–807, 2021.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381–395, 2011.

BARGIELA, S.; STEWARD, R.; MANDY, W. The Experiences of Late-diagnosed Women with Autism Spectrum Conditions: An Investigation of the Female Autism Phenotype. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 46, 2016.

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.

BARONE S., J.; DAS, K. P.; LASSITER, T. L.; WHITE, L. D. Vulnerable processes of nervous system development: a review of markers and methods. **Neurotoxicology**, v. 21, n. 1–2, p. 15–36, 2000.

BAYER, S. A.; ALTMAN, J.; RUSSO, R. J.; ZHANG, X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **NeuroToxicology**, v. 14, n. 1, p. 83–144, 1993.

BEATTY, J. Phasic Not Tonic Pupillary Responses Vary With Auditory Vigilance Performance. **Psychophysiology**, v. 19, n. 2, p. 167–172, 1982.

BEATTY, W. W.; COSTELLO, K. B.; BERRY, S. L. Suppression of play fighting by amphetamine: Effects of catecholamine antagonists, agonists and synthesis inhibitors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 20, n. 5, p. 747–755, 1984.

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**, p. 1–11, 2016.

BENARROCH, E. E. N-Acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate: Neurobiology and clinical significance. **Neurology**, v. 70, n. 16, p. 1353–1357, 2008.

BENES, F. M.; TAYLOR, J. B.; CUNNINGHAM, M. C. Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex during the postnatal period: Implications for the development of psychopathology. **Cerebral Cortex**, v. 10, n. 10, p. 1014–1027, 2000.

BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The Expanded Biology of Serotonin. **Annual Review of Medicine**, v. 60, n. 1, p. 355–366, 2009.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of apomorphine administration on rearing activity of control and experimental rats withdrawn from long-term haloperidol treatment. **General Pharmacology**, v. 15, n. 4, p. 363–365, 1984.

BERRIDGE, C. W.; DEVILBISS, D. M.; ANDRZEJEWSKI, M. E.; ARNSTEN, A. F. T.; KELLEY, A. E.; SCHMEICHEL, B.; HAMILTON, C.; SPENCER, R. C. Methylphenidate Preferentially Increases Catecholamine Neurotransmission within the Prefrontal Cortex at Low Doses that Enhance Cognitive Function. **Biological Psychiatry**, v. 60, n. 10, p. 1111–1120, 2006.

BERRIDGE, K. C.; ALDRIDGE, J. W.; HOUCHARD, K. R.; ZHUANG, X. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: A model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. **BMC Biology**, v. 3, p. 1–16, 2005.

BETHEA, T. C.; SIKICH, L. Early pharmacological treatment of autism: a rationale for developmental treatment. **Biological psychiatry**, v. 61, n. 4, p. 521–37, 15 fev. 2007.

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. 182–8, 1997.

BEYER, C.; EUSTERSEHULTE, B.; PILGRIM, C.; REISERT, I. Cell&Tissue Research Sex steroids do not alter sex differences in tyrosine hydroxylase activity of dopaminergic neurons in vitroCell Tissue Res. **Cell Tissue Res**, v. 270, p. 547-552, 1992.

BEYER, C.; PILGRIM, C.; REISERT, I. Dopamine content and metabolism in mesencephalic and diencephalic cell cultures: Sex differences and effects of sex steroids. **Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 1325–1333, 1991.

BHANDARI, R.; PALIWAL, J. K.; KUHAD, A. Neuropsychopathology of Autism Spectrum Disorder: Complex Interplay of Genetic, Epigenetic, and Environmental Factors. *In*: [s.l: s.n.]p. 97–141.

BHATNAGAR, S.; ZHU, X.; OU, J.; LIN, L.; CHAMBERLAIN, L.; ZHU, L. J.; WAJAPEYEE, N.; GREEN, M. R. Genetic and pharmacological reactivation of the mammalian inactive X chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 35, p. 12591–12598, 2 set. 2014.

BIRAN, J.; TAHOR, M.; WIRCER, E.; LEVKOWITZ, G. Role of developmental factors in hypothalamic function. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. 7, p. 1–11, 2015.

BIVONA, G.; GAMBINO, C. M.; IACOLINO, G.; CIACCIO, M. Vitamin D and the nervous system. **Neurological Research**, v. 41, n. 9, p. 827–835, 2019.

BOLAÑOS, C. A.; WILLEY, M. D.; MAFFEO, M. L.; POWERS, K. D.; KINKA, D. W.; GRAUSAM, K. B.; HENDERSON, R. P. Antidepressant Treatment Can Normalize Adult Behavioral Deficits Induced by Early-Life Exposure to Methylphenidate. **Biological Psychiatry**, v. 63, n. 3, p. 309–316, 2008.

BÖLTE, S.; GIRDLER, S.; MARSCHIK, P. B. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. **Cellular and Molecular Life Sciences,** v. 76, n. 7, p. 1275- 1297, 2019.

BONNIN, A.; LEVITT, P. Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. **Neuroscience**, v. 197, p. 1–7, 2011.

BOOZE, R. M.; WOOD, M. L.; WELCH, M. A.; BERRY, S.; MACTUTUS, C. F. Estrous Cyclicity and Behavioral Sensitization in Female Rats Following Repeated Intravenous Cocaine Administration. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 3, p. 605–610, 1999.

BOTLY, L. C. P.; BURTON, C. L.; RIZOS, Z.; FLETCHER, P. J. Characterization of methylphenidate self-administration and reinstatement in the rat. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 1, p. 55–66, 2008.

BOURGERON, T. A synaptic trek to autism. **Current opinion in neurobiology**, v. 19, n. 2, p. 231–4, 2009.

BOURGERON, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 551–563, 2015.

BOWTON, E.; SAUNDERS, C.; REDDY, I. A.; CAMPBELL, N. G.; HAMILTON, P. J.; HENRY, L. K.; COON, H.; SAKRIKAR, D.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. M.; BLAKELY, R. D.; SUTCLIFFE, J.; MATTHIES, H. J. G.; ERREGER, K.; GALLI, A. SLC6A3 coding variant Ala559Val found in two autism probands alters dopamine transporter function and trafficking.**Translational psychiatry**. V. 4, n. 10, p. 464-464.

BOYETTE-DAVIS, J. A.; RICE, H. R.; SHOUBAKI, R. I.; GONZALEZ, C. M. F.; KUNKEL, M. N.; LUCERO, D. A.; WOMBLE, P. D.; GUARRACI, F. A. A recreational dose of methylphenidate, but not methamphetamine, decreases anxiety-like behavior in female rats. **Neuroscience Letters**, v. 682, n. 5, p. 21–26, 2018.

BRAAM, W.; EHRHART, F.; MAAS, A. P. H. M.; SMITS, M. G.; CURFS, L. Low maternal melatonin level increases autism spectrum disorder risk in children. **Research in Developmental Disabilities**, v. 82, n. 3 p. 79–89, 2018.

BRANDON, C. L.; MARINELLI, M.; BAKER, L. K.; WHITE, F. J. Enhanced Reactivity and Vulnerability to Cocaine Following Methylphenidate Treatment in Adolescent Rats. **Neuropsychopharmacology**. v. 25, n. 5, p. 651-661, 2001.

BRANDON, C. L.; STEINER, H. Repeated methylphenidate treatment in adolescent rats alters gene regulation in the striatum. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 1584–1592, 2003.

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. 821–6, 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. 957–68, 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. 543–6, 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. 328–31,1999.

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. 439–45, 1993.

BRIMBERG, L.; SADIQ, A.; GREGERSEN, P. K.; DIAMOND, B. Brain-reactive IgG correlates with autoimmunity in mothers of a child with an autism spectrum disorder. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 11, p. 1171–1177, 2013.

BRINGAS, M. E.; CARVAJAL-FLORES, F. N.; LOPEZ-RAMIREZ, T. A.; ATZORI, M.; FLORES, G. Rearrangement of the dendritic morphology in limbic regions and altered exploratory behavior in a rat model of autism spectrum disorder. **Neuroscience**, v. 241, p. 170–187, 2013.

BRISTOT SILVESTRIN, R.; BAMBINI-JUNIOR, V.; GALLAND, F.; DANIELE BOBERMIM, L.; QUINCOZES- SANTOS, A.; TORRES ABIB, R.; ZANOTTO, C.; BATASSINI, C.; BROLESE, G.; GONÇALVES, C. A.; RIESGO, R.; GOTTFRIED, C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. **Brain Research**, v. 1495, p. 52–60, 2013.

BROADSTOCK, M.; DOUGHTY, C.; EGGLESTON, M. Systematic review of the effectiveness of pharmacological treatments for adolescents and adults with autism spectrum disorder. **Autism**, v. 11, n. 4, p. 335–348, 30 jul. 2007.

BROMEK, E.; HADUCH, A.; GOŁEMBIOWSKA, K.; DANIEL, W. A. Cytochrome

P450 mediates dopamine formation in the brain in vivo. **Journal of Neurochemistry**, v. 118, n. 5, p. 806–815, 2011.

BROMLEY, R. L.; BAKER, G. A.; MEADOR, K. J. Cognitive abilities and behaviour of children exposed to antiepileptic drugs in utero. **Current opinion in neurology**, v. 22, n. 2, p. 162–6, 2009.

BROMLEY, R.; WESTON, J.; ADAB, N.; GREENHALGH, J.; SANNITI, A.; MCKAY, A. J.; TUDUR SMITH, C.; MARSON, A. G. Treatment for epilepsy in pregnancy: neurodevelopmental outcomes in the child. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2020, n. 6, 30, 2014.

BRUMBACK, A. C.; ELLWOOD, I. T.; KJAERBY, C.; IAFRATI, J.; ROBINSON, S.; LEE, A. T.; PATEL, T.; NAGARAJ, S.; DAVATOLHAGH, F.; SOHAL, V. S. Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 10, p. 2078–2089, 2018.

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. 517–28, 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.

CAI, Y.; XING, L.; YANG, T.; CHAI, R.; WANG, J.; BAO, J.; SHEN, W.; DING, S.; CHEN, G. The neurodevelopmental role of dopaminergic signaling in neurological disorders. **Neuroscience Letters**, v. 741, n. 8, p. 135540, 2021.

CAMPBELL, S. B.; LEEZENBAUM, N. B.; MAHONEY, A. S.; MOORE, E. L.; BROWNELL, C. A. Pretend Play and Social Engagement in Toddlers at High and Low Genetic Risk for Autism Spectrum Disorder. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 46, n. 7, p. 2305–2316, 2016. CAMPOLONGO, M.; KAZLAUSKAS, N.; FALASCO, G.; URRUTIA, L.; SALGUEIRO, N.; HÖCHT, C.; DEPINO, A. M. Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. **Molecular Autism**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2018.

CANITANO, R. Self injurious behavior in autism: clinical aspects and treatment with risperidone. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 3, p. 425–431, 2006.

CANNELL, J. J.; GRANT, W. B. What is the role of vitamin D in autism? **Dermato-Endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 199–204, 2013.

CARIA, A.; CIRINGIONE, L.; DE FALCO, S. Morphofunctional alterations of the hypothalamus and social behavior in autism spectrum disorders. **Brain Sciences**, v. 10, n. 7, p. 1–18, 2020.

CARLI, M.; INVERNIZZI, R. W. Serotoninergic and dopaminergic modulation of cortico-striatal circuit in executive and attention deficits induced by NMDA receptor hypofunction in the 5-choice serial reaction time task. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 8, n. JUNE, p. 1–20, 2014.

CARPER, R. A.; MOSES, P.; TIGUE, Z. D.; COURCHESNE, E. Cerebral lobes in autism: Early hyperplasia and abnormal age effects. **NeuroImage**, v. 16, n. 4, p. 1038–1051, 2002.

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

CARTER, A. S.; BLACK, Æ. D. O.; TEWANI, Æ. S.; CONNOLLY, C. E.; BETH, Æ. M.; TAGER-FLUSBERG, H. Sex Differences in Toddlers with Autism Spectrum Disorders. J. Autism Dev. Disord, v. 37, n. 1, p. 86–97, 2007.

CARTOCCI, V.; CATALLO, M.; TEMPESTILLI, M.; SEGATTO, M.; PFRIEGER, F. W.; BRONZUOLI, M. R.; SCUDERI, C.; SERVADIO, M.; TREZZA, V.; PALLOTTINI, V. Altered Brain Cholesterol/Isoprenoid Metabolism in a Rat Model of Autism Spectrum Disorders. **Neuroscience**, v. 372, p. 27–37, 2018

CARTOCCI, V.; TONINI, C.; DI PIPPO, T.; VUONO, F.; SCHIAVI, S.; MARINO, M.; TREZZA, V.; PALLOTTINI, V. Prenatal exposure to valproate induces sex-, age-, and tissue-dependent alterations of cholesterol metabolism: Potential implications on autism. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 4, p. 4362–4374, 2019.

CASADO-SAINZ, A.; GUDMUNDSEN, F.; BAERENTZEN, S. L.; LANGE, D.; RINGSTED, A.; MARTINEZ-TEJADA, I.; MEDINA, S.; LEE, H.; SVARER, C.; KELLER, S. H.; SCHAIN, M.; KJAERBY, C.; FISHER, P. M.; CUMMING, P.; PALNER, M. Dorsal striatal dopamine induces fronto-cortical hypoactivity and attenuates anxiety and compulsive behaviors in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 47, n. 2, p. 454–464, 2022.

CASANOVA, M. F.; HERBERT, M. R.; ZIEGLER, D. A. White matter volume increase and minicolumns in autism [1] (multiple letters). **Annals of Neurology**, v. 56, n. 3, p. 453, 2004.

CELADA, P.; PUIG, M. V.; ARTIGAS, F.; WONG-LIN, K.; GRUBER, A. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. **Front Integr Neurosci**, v. 7, n. 25, 2013.

CEZAR, L. C. **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.

CEZAR, L. C.; KIRSTEN, T. B.; DA FONSECA, C. C. N.; DE LIMA, A. P. N.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 84, n. Pt A, p. 173–180, 2018.

CHALIHA, D.; ALBRECHT, M.; VACCAREZZA, M.; TAKECHI, R.; LAM, V.; AL-SALAMI, H.; MAMO, J. A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. **Developmental Neuroscience**, v. 42, n. 1, p. 12-48, 2020.

CHALLMAN, T. D.; LIPSKY, J. J. Methylphenidate: Its Pharmacology and Uses. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 75, n. 7, p. 711–721, 2000.

CHAO, J.; NESTLER, E. J. Molecular neurobiology of drug addiction. **Annual Review of Medicine**, v. 55, n. 2, p. 113–132, 2004.

CHEAHA, D.; BUMRUNGSRI, S.; CHATPUN, S.; KUMARNSIT, E. Characterization of in utero valproic acid mouse model of autism by local field potential in the hippocampus and the olfactory bulb. **Neuroscience Research**, v. 98, p. 1–7, 2015.

CHELARU, M. I.; YANG, P. B.; DAFNY, N. Sex differences in the behavioral

response to methylphenidate in three adolescent rat strains (WKY, SHR, SD). **Behavioural Brain Research**, v. 226, n. 1, p. 8–17, 2012.

CHEN, C.; CHEN, C.; MOYZIS, R.; STERN, H.; HE, Q.; LI, H.; LI, J.; ZHU, B.; DONG, Q. Contributions of Dopamine-Related Genes and Environmental Factors to Highly Sensitive Personality: A Multi-Step Neuronal System-Level Approach. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21636, 13, 2011.

CHEN, J. A.; PEÑAGARIKANO, O.; PEÑAGARIKANO, P.; GRANT BELGARD, T.; SWARUP, V.; GESCHWIND, D. H. The Emerging Picture of Autism Spectrum Disorder: Genetics and Pathology. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**, v. 10, p. 111–144, 2015.

CHEN, S.; GUTTRIDGE, D. C.; YOU, Z.; ZHANG, Z.; FRIBLEY, A.; MAYO, M. W.; KITAJEWSKI, J.; WANG, C. Y. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating β -catenin/T cell factor-mediated transcription. **Journal of Cell Biology**, v. 152, n. 1, p. 87–96, 2001.

CHEN, X. F.; CHEN, Z. F.; LIU, R. Y.; DU, Y. C. Neonatal administrations of a vasopressin analog (DDAVP) and hypertonic saline enhance learning behavior in rats. **Peptides**, v. 9, n. 4, p. 717–721, 1988.

CHENN, A. Wnt/β-catenin signaling in cerebral cortical development. **Organogenesis**, v. 4, n. 2, p. 76–80, 2008.

CHESS, S.; FERNANDEZ, P.; KORN, S. Behavioral consequences of congenital rubella. **The Journal of Pediatrics**, v. 93, n. 4, p. 699–703, 1978.

CHEUNG, P. P. P.; LAU, B. W. M. Neurobiology of sensory processing in autism spectrum disorder. *In*: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier B.V., 2020. p. 161–181.

CHEVALLIER, C.; KOHLS, G.; TROIANI, V.; BRODKIN, E. S.; SCHULTZ, R. T. The social motivation theory of autism. **Trends in Cognitive Sciences**, Elsevier Ltd, 2012.

CHO, H.; KIM, C. H.; KNIGHT, E. Q.; OH, H. W.; PARK, B.; KIM, D. G.; PARK, H. J. Changes in brain metabolic connectivity underlie autistic-like social deficits in a rat model of autism spectrum disorder. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

CHOI, C. S.; HONG, M.; KIM, K. C.; KIM, J. W.; YANG, S. M.; SEUNG, H.; KO, M. J.; CHOI, D. H.; YOU, J. S.; SHIN, C. Y.; BAHN, G. H. Effects of atomoxetine on hyperlocomotive activity of the prenatally valproate-exposed rat offspring. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 406–413, 2014.

CHOMIAK, T.; HU, B. Alterations of neocortical development and maturation in autism: Insight from valproic acid exposure and animal models of autism. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 36, p. 57–66, 2013.

CHONG, S. L.; CLAUSSEN, C. M.; DAFNY, N. Nucleus accumbens neuronal activity in freely behaving rats is modulated following acute and chronic methylphenidate administration. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 4–5, p. 445–456, 2012.

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, 1 abr. 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.

CHUGANI, H. T.; CHUGANI, D. C. Imaging of Serotonin Mechanisms in Epilepsy. **Epilepsy Currents**, v. 5, n. 6, p. 201–206, 9, 2005.

CILIAX, B. J.; HEILMAN, C.; DEMCHYSHYN, L. L.; PRISTUPA, Z. B.; INCE, E.; HERSCH, S. M.; NIZNIK, H. B.; LEVEY, A. I. The dopamine transporter: Immunochemical characterization and localization in brain. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 3 I, p. 1714–1723, 1995.

CILIAX, B. J.; NASH, N.; HEILMAN, C.; SUNAHARA, R.; HARTNEY, A.; TIBERI, M.; RYE, D. B.; CARON, M. G.; NIZNIK, H. B.; LEVEY, A. I. Dopamine D5 receptor immunolocalization in rat and monkey brain. **Synapse**, v. 37, n. 2, p. 125–145, 2000.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 11–24, 2005.

CONNER, C. M.; WHITE, S. W.; LAWRENCE, S.; MAZEFSKY, C. A. the Experience of Anxiety in Autism. v. 24, n. 4, p. 931–940, 2021.

COPF, T. Impairments in dendrite morphogenesis as etiology for neurodevelopmental disorders and implications for therapeutic treatments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 946–978, 2016.

CORNFORTH, C.; SONUGA-BARKE, E.; COGHILL, D. Stimulant Drug Effects on Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: A Review of the Effects of Age and Sex of Patients. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 22, p. 2424–2433, 1 jul. 2010.

COSGROVE, K. P.; MAZURE, C. M.; STALEY, J. K. Evolving Knowledge of Sex Differences in Brain Structure, Function, and Chemistry. **Biological Psychiatry**, v. 62, n. 8, p. 847–855, 2007.

COSTA, L. G.; COLE, T. B.; COBURN, J.; CHANG, Y. C.; DAO, K.; ROQUE, P. Neurotoxicants are in the air: Convergence of human, animal, and in vitro studies on the effects of air pollution on the brain. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

COSTALL, B.; NAYLOR, R. J.; CANNON, J. G.; LEE, T. Differentiation of the dopamine mechanisms mediating stereotyped behaviour and hyperactivity in the nucleus accumbens and caudate-putamen. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 29, n. 1, p. 337–342, 12, 2011.

COURCHESNE, E.; PIERCE, K. Why the frontal cortex in autism might be talking only to itself: Local over-connectivity but long-distance disconnection. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 15, n. 2, p. 225–230, 2005.

CRAFT, R. M. Sex differences in drug- and non-drug-induced analgesia. Life Sciences, v. 72, n. 24, p. 2675–2688, 2003.

CRAWFORD, L. K.; RAHMAN, S. F.; BECK, S. G. Social stress alters inhibitory synaptic input to distinct subpopulations of raphe serotonin neurons. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 1, p. 200–209, 2013.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 13, n. 2, p. 167–170, 1980.
CROEN, L. A.; ZERBO, O.; QIAN, Y.; MASSOLO, M. L.; RICH, S.; SIDNEY, S.; KRIPKE, C. The health status of adults on the autism spectrum. **Autism**, v. 19, n. 7, p. 814–823, 24 out. 2015.

CROMPTON, G. K.; BARNES, P. J.; BROEDERS, M.; CORRIGAN, C.; CORBETTA, L.; DEKHUIJZEN, R.; DUBUS, J. C.; MAGNAN, A.; MASSONE, F.; SANCHIS, J.; VIEJO, J. L.; VOSHAAR, T. The need to improve inhalation technique in Europe: A report from the Aerosol Drug Management Improvement Team. **Respiratory Medicine**, v. 100, n. 9, p. 1479–1494, 2006.

CRUTCHLEY, A.; TEMLETT, J. A. Methylphenidate (ritalin) use and abuse. **S Afr Med J**. v. 89, n. 10, p. 1076-9, 1999.

CUEVAS-OLGUIN, R.; ROYCHOWDHURY, S.; BANERJEE, A.; GARCIA-OSCOS, F.; ESQUIVEL-RENDON, E.; BRINGAS, M. E.; KILGARD, M. P.; FLORES, G.; ATZORI, M. Cerebrolysin prevents deficits in social behavior, repetitive conduct, and synaptic inhibition in a rat model of autism. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 12, p. 2456–2468, 2017.

D'SOUZA, A.; ONEM, E.; PATEL, P.; LA GAMMA, E. F.; NANKOVA, B. B. Valproic acid regulates catecholaminergic pathways by concentration-dependent threshold effects on TH mRNA synthesis and degradation. **Brain Research**, v. 1247, p. 1–10, 2009.

DAFNY, N.; YANG, P. B. The role of age, genotype, sex, and route of acute and chronic administration of methylphenidate: A review of its locomotor effects. **Brain Research Bulletin**, v. 68, n. 6, p. 393–405, 2006.

DAHLSTRÖM, A.; FUXE, K. Localization of monoamines in the lower brain stem. **Experientia**, v. 20, n. 7, p. 398–399,1964..

DAI, X.; YIN, Y.; QIN, L. Valproic acid exposure decreases the mRNA stability of Bcl-2 via up-regulating miR-34a in the cerebellum of rat. **Neuroscience Letters**, v. 657, p. 159–165, 2017.

DE KROM, M.; STAAL, W. G.; OPHOFF, R. A.; HENDRIKS, J.; BUITELAAR, J.; FRANKE, B.; DE JONGE, M. V.; BOLTON, P.; COLLIER, D.; CURRAN, S.; VAN ENGELAND, H.; VAN REE, J. M. A Common Variant in DRD3 Receptor Is Associated with Autism Spectrum Disorder. **Biological Psychiatry**, v. 65, n. 7, p. 625–630, 2009. DE LA TORRE-UBIETA, L.; WON, H.; STEIN, J. L.; GESCHWIND, D. H. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. **Nature Medicine**, v. 22, n. 4, p. 345–361, 2016.

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

DEADWYLER, S. A.; HAYASHIZAKI, S.; CHEER, J.; HAMPSON, R. E. Reward, memory and substance abuse: Functional neuronal circuits in the nucleus accumbens. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 8, p. 703–711, 2004.

DEGROOTE, S.; HUNTING, D.; SÉBIREA, G.; TAKSER, L. Autistic-like traits in Lewis rats exposed perinatally to a mixture of common endocrine disruptors. **Endocrine Disruptors**, v. 2, n. 1, 2014.

DEL CAMPO, N.; CHAMBERLAIN, S. R.; SAHAKIAN, B. J.; ROBBINS, T. W. The roles of dopamine and noradrenaline in the pathophysiology and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 12, 2011.

DELA PEÑA, I.; YOON, S. Y.; LEE, J. C.; DELA PEÑA, J. B.; SOHN, A. R.; RYU, J. H.; SHIN, C. Y.; CHEONG, J. H. Methylphenidate treatment in the spontaneously hypertensive rat: Influence on methylphenidate self-administration and reinstatement in comparison with Wistar rats. **Psychopharmacology**, v. 221, n. 2, p. 217–226, 2012.

DELONG, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. **Trends in Neurosciences**, v. 13, n. 7, p. 281–285, 1990.

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. **Behav Brain Res.** v. 187, p. 207–220, 2008.

DEMETRIOU, E. A.; LAMPIT, A.; QUINTANA, D. S.; NAISMITH, S. L.; SONG, Y. J. C.; PYE, J. E.; HICKIE, I.; GUASTELLA, A. J. Autism spectrum disorders: A metaanalysis of executive function. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 5, p. 1198–1204, 2018.

DEVLIN, B.; BOONE, B. E.; LEVY, S. E.; LIHM, J.; BUXBAUM, J. D.; WU, Y.; LEWIS, L.; HAN, Y.; BOERWINKLE, E.; GIBBS, R. A.; FROMER, M.; SHAKIR, K.; FENNELL, T.; GARIMELLA, K.; BANKS, E.; POPLIN, R.; GABRIEL, S.; DE PRISTO, M.; SUNYAEV, S.; DALY, M. J. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 242–246, 2012.

DEVLIN, B.; SCHERER, S. W. Genetic architecture in autism spectrum disorder. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 22, n. 3, p. 229–237, 2012.

DICARLO, G. E.; AGUILAR, J. I.; MATTHIES, H. J. G.; HARRISON, F. E.; BUNDSCHUH, K. E.; WEST, A.; HASHEMI, P.; HERBORG, F.; RICKHAG, M.; CHEN, H.; GETHER, U.; WALLACE, M. T.; GALLI, A. Autism-linked dopamine transporter mutation alters striatal dopamine neurotransmission and dopaminedependent behaviors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 8, p. 3407–3419, 2019.

DICARLO, G. E.; MABRY, S. J.; CAO, X.; MCMILLAN, C.; WOYNAROSKI, T. G.; HARRISON, F. E.; REDDY, I. A.; MATTHIES, H. J. G.; FLYNN, C. R.; WALLACE, M. T.; WU, H.; GALLI, A. Autism-Associated Variant in the SLC6A3 Gene Alters the Oral Microbiome and Metabolism in a Murine Model. **Frontiers in Psychiatry**, v. 12, n. April, p. 1–10, 2021.

DICARLO, G. E.; WALLACE, M. T. Modeling dopamine dysfunction in autism spectrum disorder: From invertebrates to vertebrates. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 133, n. 12 p. 104494, 2022.

DICHTER, G. S.; DAMIANO, C. A.; ALLEN, J. A. Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: animal models and clinical findings. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 4, n. 1, p. 19, 2012.

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. 473–81, 1984.

DING, Y.-S.; FOWLER, J. S.; VOLKOW, N. D.; GATLEY, S. J.; LOGAN, J.; DEWEY, S. L.; ALEXOFF, D.; FAZZINI, E.; WOLF, A. P. Pharmacokinetics and in vivo specificity of [LLC]dl-threo-methylphenidate for the presynaptic dopaminergic neuron. **Synapse**, v. 18, n. 2, p. 152–160,1994.

DODERO, L.; DAMIANO, M.; GALBUSERA, A.; BIFONE, A.; TSAFTSARIS, S. A. Neuroimaging Evidence of Major Morpho-Anatomical and Functional Abnormalities in the BTBR T+TF/J Mouse Model of Autism. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 76655, 2013. DÖLEN, G.; DARVISHZADEH, A.; HUANG, K. W.; MALENKA, R. C. Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. **Nature**, 2013.

DONOVAN, A. P. A.; BASSON, M. A. The neuroanatomy of autism – a developmental perspective. **Journal of Anatomy**, v. 230, n. 1, p. 4–15, 2017.

DU, L.; ZHAO, G.; DUAN, Z.; LI, F. Behavioral improvements in a valproic acid rat model of autism following vitamin D supplementation. **Psychiatry Research**, v. 253, n. 126, p. 28–32, 2017.

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.; VOURC'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.

DWORZYNSKI, K.; RONALD, A.; BOLTON, P.; HAPPÉ, F. How Different Are Girls and Boys Above and Below the Diagnostic Threshold for Autism Spectrum Disorders? **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 51, n. 8, p. 788–797, 2012.

EBSTEIN, R. P.; KNAFO, A.; MANKUTA, D.; CHEW, S. H.; LAI, P. S. The contributions of oxytocin and vasopressin pathway genes to human behavior. **Hormones and Behavior**, v. 61, n. 3, p. 359–379, 2012.

EDALATMANESH, M. A.; NIKFARJAM, H.; VAFAEE, F.; MOGHADAS, M. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. **Brain Research**, v. 1526, p. 15–25, 2013.

EGNOR, S. E. R.; SEAGRAVES, K. M. The contribution of ultrasonic vocalizations to mouse courtship. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 1–5, 2016.

EIDEN, L. E.; WEIHE, E. VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1216, n. 1, p. 86–98, 2011.

EISENHOFER, G.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Catecholamine Metabolism: A

Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 331–349, 2004.

EMOND, V.; JOYAL, C.; POISSANT, H. Structural and functional neuroanatomy of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Encephale**, v. 35, n. 2, p. 107–114, 2009.

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

ESCALONA, A.; FIELD, T.; SINGER-STRUNCK, R.; CULLEN, C.; HARTSHORN, K. Brief report: improvements in the behavior of children with autism following massage therapy. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 31, n. 5, p. 513–6, out. 2001.

FANOUS, A. H.; NEALE, M. C.; STRAUB, R. E.; WEBB, B. T.; O'NEILL, A. F.; WALSH, D.; KENDLER, K. S. Clinical Features of Psychotic Disorders and Polymorphisms in HT2A, DRD2, DRD4, SLC6A3 (DAT1), and BDNF: A Family Based Association Study. **American Journal of Medical Genetics -Neuropsychiatric Genetics**, v. 125 B, n. 1, p. 69–78, 2004.

FARAJ, B. A.; ISRAILI, Z. H.; PEREL, J. M.; JENKINS, M. L.; HOLTZMAN, S. G.; CUCINELL, S. A.; DAYTON, P. G. Metabolism and disposition of methylphenidate-14C: studies in man and animals. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 191, n. 3, p. 535–47, 1974.

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. 5, p. 88, 2013.

FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 253–256, 1996.

FENTRESS, J. C. Expressive Contexts, Fine Structure, and Central Mediation of Rodent Grooming. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 525, n. 1 Neural Mechan, p. 18–26, 1988.

FERNSTROM, J. D.; FERNSTROM, M. H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 6,

p. 1539–1547, 2007.

FERRI, S. L.; ABEL, T.; BRODKIN, E. S. Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: a Review. **Current Psychiatry Reports**, v. 20, n. 2, p. 9, 5 fev. 2018. FETIT, R.; HILLARY, R. F.; PRICE, D. J.; LAWRIE, S. M. The neuropathology of autism: A systematic review of post-mortem studies of autism and related disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 129, n. May, p. 35–62, 2021.

FISCHER, A. G.; ULLSPERGER, M. An Update on the Role of Serotonin and its Interplay with Dopamine for Reward. **Front. Hum. Neurosci**, v. 11, p. 484, 2017.

FOMBONNE, E. The prevalence of autism. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 1, p. 87–89, 2003.

FOMBONNE, E. Epidemiology of Autistic Disorder and Other Pervasive Developmental Disorders. **J Clin Psychiatry**, v. 66, n. suppl 10, p. 3–8, 2005.

FOMBONNE, E.; QUIRKE, S.; HAGEN, A. Prevalence and interpretation of recent trends in rates of pervasive developmental disorders. **McGill journal of medicine : MJM : an international forum for the advancement of medical sciences by students**, v. 12, n. 2, p. 73, 2009.

FOWLER, J. S.; VOLKOW, N. D.; DING, Y. S.; WANG, G. J.; DEWEY, S.; FISCHMAN, M. W.; FOLTIN, R.; HITZEMANN, R. Positron emission tomography studies of dopamine-enhancing drugs. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, n. 8 SUPPL., p. 13–16, 1999.

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, 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.

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, 11, 2002.

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.

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.

FURLONG, M. A.; ENGEL, S. M.; BARR, D. B.; WOLFF, M. S. Prenatal exposure to organophosphate pesticides and reciprocal social behavior in childhood. **Environment International**, v. 70, p. 125–131, 2014.

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. 919–29, jun. 2014.

GADOW, K. D.; DEVINCENT, C. J.; OLVET, D. M.; PISAREVSKAYA, V.; HATCHWELL, E. Association of DRD4 polymorphism with severity of oppositional defiant disorder, separation anxiety disorder and repetitive behaviors in children with autism spectrum disorder. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 6, p. 1058– 1065, 2010.

GADOW, K. D.; ROOHI, J.; DEVINCENT, C. J.; HATCHWELL, E. Association of ADHD, tics, and anxiety with dopamine transporter (DAT1) genotype in autism spectrum disorder. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 49, n. 12, p. 1331–1338, 2008.

GAGE, G. J.; KIPKE, D. R.; SHAIN, W. Whole animal perfusion fixation for rodents. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 65, p. 1–9, 2012.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: A physicochemical examination. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 1–16, 2011.

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.

GANDAL, M. J.; EDGAR, J. C.; EHRLICHMAN, R. S.; MEHTA, M.; ROBERTS, T. P. L.; SIEGEL, S. J. Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 12, p. 1100–1106, 2010.

GARCIA-GARCIA, A. L.; MENG, Q.; CANETTA, S.; GARDIER, A. M.; GUIARD, B. P.; KELLENDONK, C.; DRANOVSKY, A.; LEONARDO, E. D. Serotonin Signaling through Prefrontal Cortex 5-HT1A Receptors during Adolescence Can Determine Baseline Mood-Related Behaviors. **Cell Reports**, v. 18, n. 5, p. 1144–1156, 2017.

GARNIER, C.; COMOY, E.; BARTHELEMY, C.; LEDDET, I.; GARREAU, B.; MUH, J. P.; LELORD, G. Dopamine-beta-hydroxylase (DBH) and homovanillic acid (HVA) in autistic children. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 16, n. 1, p. 23–29, 1986.

GARRAWAY, S. M.; HOCHMAN, S. Pharmacological characterization of serotonin receptor subtypes modulating primary afferent input to deep dorsal horn neurons in the neonatal rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 8, p. 1789–1798, 2001.

GARRIS, P. A.; CIOLKOWSKI, E. L.; PASTORE, P.; WIGHTMAN, R. M. Efflux of dopamine from the synaptic cleft in the nucleus accumbens of the rat brain. **Journal** of **Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 6084–6093, 1994.

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. THE DEVELOPMENTAL ROLE OF SEROTONIN: NEWS FROM MOUSE MOLECULAR GENETICS. v. 4, 2003.

GATA-GARCIA, A.; PORAT, A.; BRIMBERG, L.; VOLPE, B. T.; HUERTA, P. T.; DIAMOND, B. Contributions of Sex Chromosomes and Gonadal Hormones to the Male Bias in a Maternal Antibody-Induced Model of Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Neurology**, v. 12, n. October, p. 1–17, 2021.

GATLEY, S. J.; PAN, D.; CHEN, R.; CHATURVEDI, G.; DING, Y.-S. Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. **Life Sciences**, v. 58, n. 12, p. PL231–PL239, fev. 1996.

GATLEY, S. J.; VOLKOW, N. D.; GIFFORD, A. N.; FOWLER, J. S.; DEWEY, S. L.; DING, Y. S.; LOGAN, J. Dopamine-transporter occupancy after intravenous doses of cocaine and methylphenidate in mice and humans. **Psychopharmacology**, v. 146,

n. 1, p. 93–100, 1999.

GAYTAN, O.; GHELANI, D.; MARTIN, S.; SWANN, A.; DAFNY, N. Dose response characteristics of methylphenidate on different indices of rats' locomotor activity at the beginning of the dark cycle. **Brain Research**, v. 727, n. 1–2, p. 13–21, jul. 1996.

GAYTAN, O.; GHELANI, D.; MARTIN, S.; SWANN, A.; DAFNY, N. Methylphenidate: Diurnal effects on locomotor and stereotypic behavior in the rat. **Brain Research**, v. 777, n. 1–2, p. 1–12, 1997.

GAYTAN, O.; YANG, P.; SWANN, A.; DAFNY, N. Diurnal differences in sensitization to methylphenidate. **Brain Research**, v. 864, n. 1, p. 24–39, 2000.

GERASIMOV, M. R.; FRANCESCHI, M.; VOLKOW, N. D.; GIFFORD, A.; GATLEY, S. J.; MARSTELLER, D.; MOLINA, P. E.; DEWEY, S. L. Comparison between intraperitoneal and oral methylphenidate administration: A microdialysis and locomotor activity study. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 1, p. 51–57, 2000.

GERSHON, M. D.; DREYFUS, C. F.; PICKEL, V. M.; JOH, T. H.; REIS, D. J. Serotonergic neurons in the peripheral nervous system: Identification in gut by immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 7, p. 3086–3089, 1977.

GESCHWIND, D. H. Essay Autism : Many Genes , Common Pathways ? **Cell**, v. 135, n. 3, p. 391–395, 2008.

GEURTS, H. M.; CORBETT, B.; SOLOMON, M. The paradox of cognitive flexibility in autism. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 13, n. 2, p. 74–82, 2009.

GILLOTT, A.; FURNISS, F.; WALTER, A. Anxiety in high-functioning children with autism. **Autism**, v. 5, n. 3, p. 277–286, 2001.

GIRAULT, J. A.; GREENGARD, P. The Neurobiology of Dopamine Signaling. **Archives of Neurology**, v. 61, n. 5, p. 641–644, 2004.

GIROS, B.; JABER, M.; JONES, S. R.; WIGHTMAN, R. M.; CARON, M. G. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 606–612, 1996.

GLASER, P. E. A.; THOMAS, T. C.; JOYCE, B. M.; CASTELLANOS, F. X.; GERHARDT, G. A. Differential effects of amphetamine isomers on dopamine release in the rat striatum and nucleus accumbens core. **Psychopharmacology**, v. 178, n. 2–3, p. 250–258, 2005.

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. 903–17, 2005.

GONZÁLEZ-BURGOS, I.; FERIA-VELASCO, A. Serotonin/dopamine interaction in memory formation. **Progress in Brain Research**, v. 172, n. 08, p. 603–623, 2008.

GOTHAM, K.; BRUNWASSER, S. M.; LORD, C. Depressive and Anxiety Symptom Trajectories From School Age Through Young Adulthood in Samples With Autism Spectrum Disorder and Developmental Delay. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 369- 376.e3, 2015.

GOULD, G. G.; HENSLER, J. G.; BURKE, T. F.; BENNO, R. H.; ONAIVI, E. S.; DAWS, L. C. Density and function of central serotonin (5-HT) transporters, 5-HT 1A and 5-HT2A receptors, and effects of their targeting on BTBR T+tf/J mouse social behavior. **Journal of Neurochemistry**, v. 116, n. 2, p. 291–303, 2011.

GRAY, J. D.; PUNSONI, M.; TABORI, N. E.; MELTON, J. T.; FANSLOW, V.; WARD, M. J.; ZUPAN, B.; MENZER, D.; RICE, J.; DRAKE, C. T.; ROMEO, R. D.; BRAKE, W. G.; TORRES-REVERON, A.; MILNER, T. A. Methylphenidate administration to juvenile rats alters brain areas involved in cognition, motivated behaviors, appetite, and stress. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 27, p. 7196–7207, 2007.

GREEN, R. M.; TRAVERS, A. M.; HOWE, Y.; MCDOUGLE, C. J. Women and Autism Spectrum Disorder: Diagnosis and Implications for Treatment of Adolescents and Adults. **Current Psychiatry Reports**, v. 21, n. 4, 2019.

GRUSS, M.; BOCK, J.; BRAUN, K. Haloperidol impairs auditory filial imprinting and modulates monoaminergic neurotransmission in an imprinting-relevant forebrain area of the domestic chick. **Journal of Neurochemistry**, v. 87, n. 3, p. 686–696, 2003.

GRZADZINSKI, R.; DI MARTINO, A.; BRADY, E.; MAIRENA, M. A.; O'NEALE, M.; PETKOVA, E.; LORD, C.; CASTELLANOS, F. X. Examining autistic traits in children with ADHD: Does the Autism Spectrum Extend to ADHD? **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 41, n. 9, p. 1178–1191, 2011. GULINELLO, M.; SMITH, S. S. Anxiogenic effects of neurosteroid exposure: Sex differences and altered GABAA receptor pharmacology in adult rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 2, p. 541–548, 2003.

GUNAYDIN, L. A.; DEISSEROTH, K. Dopaminergic dynamics contributing to social behavior. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 79, p. 221–227, 2014.

GUNAYDIN, L. A.; GROSENICK, L.; FINKELSTEIN, J. C.; KAUVAR, I. V.; FENNO, L. E.; ADHIKARI, A.; LAMMEL, S.; MIRZABEKOV, J. J.; AIRAN, R. D.; ZALOCUSKY, K. A.; TYE, K. M.; ANIKEEVA, P.; MALENKA, R. C.; DEISSEROTH, K. Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior. **Cell**, v. 157, n. 7, p. 1535–1551, 2014.

GUR, R. C.; GUR, R. E. Complementarity of sex differences in brain and behavior: From laterality to multimodal neuroimaging. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 1–2, p. 189–199, 2017.

GZIELO, K.; POTASIEWICZ, A.; HOŁUJ, M.; LITWA, E.; POPIK, P.; NIKIFORUK, A. Valproic acid exposure impairs ultrasonic communication in infant, adolescent and adult rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 52–62, 2020.

HABER, S. N. The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. **Neuroscience**, v. 282, p. 248–257, 2014.

HAENLEIN, M.; CAUL, W. F. Attention deficit disorder with hyperactivity: a specific hypothesis of reward dysfunction. Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, v. 26, n. 3, p. 356–62, 1987.

HAGMEYER, S.; HADERSPECK, J. C.; GRABRUCKER, A. M. Behavioral impairments in animal models for zinc deficiency. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, n. January, p. 443, 2014.

HALL, A. C.; BRENNAN, A.; GOOLD, R. G.; CLEVERLEY, K.; LUCAS, F. R.; GORDON-WEEKS, P. R.; SALINAS, P. C. Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 257–270, 2002.

HALL, A. C.; LUCAS, F. R.; SALINAS, P. C. Axonal Remodeling and Synaptic Differentiation in the Cerebellum Is Regulated by WNT-7a Signaling becomes multilobulated as it interdigitates with GC den- drites (Hamori and Somogyi, 1983).

The increase in mossy fiber surface area permits the formation of. **Cell**, v. 100, p. 525–535, 2000.

HALL, C. S. Emotional Behavior in the Rat. **Journal of comparative psychology**, v. 18, n. 5, p. 385–403, 1941.

HALLADAY, A. K.; BISHOP, S.; CONSTANTINO, J. N.; DANIELS, A. M.; KOENIG, K.; PALMER, K.; MESSINGER, D.; PELPHREY, K.; SANDERS, S. J.; SINGER, A. T.; TAYLOR, J. L.; SZATMARI, P. Sex and gender differences in autism spectrum disorder: summarizing evidence gaps and identifying emerging areas of priority. **Mol Autism**, v. 6, n. 36, 2012.

HAMILTON, P. J.; CAMPBELL, N. G.; SHARMA, S.; ERREGER, K.; HERBORG HANSEN, F.; SAUNDERS, C.; BELOVICH, A. N.; DALY, M. J.; GIBBS, R. A.; BOERWINKLE, E.; BUXBAUM, J. D.; COOK, E. H.; DEVLIN, B.; LIM, E. T.; NEALE, B. M.; ROEDER, K.; SABO, A.; SCHELLENBERG, G. D.; STEVENS, C.; SUTCLIFFE, J. S.; SAHAI, M. A.; COOK, E. H.; GETHER, U.; MCHAOURAB, H. S.; MATTHIES, H. J. G.; SUTCLIFFE, J. S.; GALLI, A. De novo mutation in the dopamine transporter gene associates dopamine dysfunction with autism spectrum disorder, **Mol Psychiatry**,v. 18, n. 12, p. 1315-23, 2013.

HARA, Y.; AGO, Y.; TARUTA, A.; KATASHIBA, K.; HASEBE, S.; TAKANO, E.; ONAKA, Y.; HASHIMOTO, H.; MATSUDA, T.; TAKUMA, K. Improvement by methylphenidate and atomoxetine of social interaction deficits and recognition memory impairment in a mouse model of valproic acid-induced autism. **Autism Research**, v. 9, n. 9, p. 926–939, 2016.

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.

HARARI-DAHAN, O.; BERNSTEIN, A. A general approach - avoidance hypothesis of Oxytocin: Accounting for social and non-social effects of oxytocin. **Neuroscience** and **Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 506–519, 2014.

HARDAN, A. Y.; HANDEN, B. L. A Retrospective Open Trial of Adjunctive Donepezil in Children and Adolescents with Autistic Disorder. **Journal of Child and**

Adolescent Psychopharmacology, v. 12, n. 3, p. 237–241, 2002.

HARDAN, A. Y.; JOU, R. J.; KESHAVAN, M. S.; VARMA, R.; MINSHEW, N. J. Increased frontal cortical folding in autism: A preliminary MRI study. **Psychiatry Research - Neuroimaging**, v. 131, n. 3, p. 263–268, 2004.

HAZLETT, H. C.; POE, M. D.; GERIG, G.; STYNER, M.; CHAPPELL, C.; SMITH, R. G.; VACHET, C.; PIVEN, J. Early brain overgrowth in autism associated with an increase in cortical surface area before age 2 years. **Archives of General Psychiatry**, v. 68, n. 5, p. 467–476, 2011.

HEAL, D. J.; SMITH, S. L.; GOSDEN, J.; NUTT, D. J. Amphetamine, past and present – a pharmacological and clinical perspective. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, n. 6, p. 479–496, 2013.

HEBERT, L. E.; WEUVE, J.; SCHERR, P. A.; EVANS, D. A. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. **Neurology**, v. 80, n. 19, p. 1778–1783, 2013.

HEGARTY, S. V.; SULLIVAN, A. M.; O'KEEFFE, G. W. Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. **Developmental Biology**, v. 379, n. 2, p. 123–138, 2013.

HEINRICHS, M.; VON DAWANS, B.; DOMES, G. Oxytocin, vasopressin, and human social behavior. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 4, p. 548–557, 2009.

HENN, F. The Neurobiology of Dopamine. **American Journal of Psychiatry**, v. 137, n. 12, p. 1633- b-1634, 1980.

HERBORG, F.; ANDREASSEN, T. F.; BERLIN, F.; LOLAND, C. J.; GETHER, U. Neuropsychiatric disease–associated genetic variants of the dopamine transporter display heterogeneous molecular phenotypes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 19, p. 7250–7262, 2018.

HETTINGER, J. A.; LIU, X.; SCHWARTZ, C. E.; MICHAELIS, R. C.; HOLDEN, J. J. A. **A DRD1 haplotype is associated with risk for autism spectrum disorders in male-only affected sib-pair families**. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v. 147B, n. 5, 628–636 p, 2008.

HIRSCH, M. M.; DECKMANN, I.; SANTOS-TERRA, J.; STAEVIE, G. Z.; FONTES-

DUTRA, M.; CARELLO-COLLAR, G.; KÖRBES-ROCKENBACH, M.; BRUM SCHWINGEL, G.; BAUER-NEGRINI, G.; RABELO, B.; GONÇALVES, M. C. B.; CORRÊA-VELLOSO, J.; NAALDIJK, Y.; CASTILLO, A. R. G.; SCHNEIDER, T.; BAMBINI-JUNIOR, V.; ULRICH, H.; GOTTFRIED, C. Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acidinduced animal model of autism. **Neuropharmacology**, v. 167, n. 2, p. 107930, 2020.

HOBSON, J. A.; HOBSON, R. P.; MALIK, S.; BARGIOTA, K.; CALÓ, S. The relation between social engagement and pretend play in autism. **British Journal of Developmental Psychology**, v. 31, n. 1, p. 114–127, 2013.

HOMBERG, J. R.; OLIVIER, J. D. A.; VANDENBROEKE, M.; YOUN, J.; ELLENBROEK, A. K.; KAREL, P.; SHAN, L.; VAN BOXTEL, R.; OOMS, S.; BALEMANS, M.; LANGEDIJK, J.; MULLER, M.; VRIEND, G.; COOLS, A. R.; CUPPEN, E.; ELLENBROEK, B. A. The role of the dopamine D1 receptor in social cognition: Studies using a novel genetic rat model. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 9, n. 10, p. 1147–1158, 2016.

HOMBERG, J. R.; VAN DEN AKKER, M.; RAASØ, H. S.; WARDEH, G.; BINNEKADE, R.; SCHOFFELMEER, A. N. M.; DE VRIES, T. J. Enhanced motivation to self-administer cocaine is predicted by self-grooming behaviour and relates to dopamine release in the rat medial prefrontal cortex and amygdala. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 9, p. 1542–1550, 2002.

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, 2016.

HOSENBOCUS, S.; CHAHAL, R. A review of executive function deficits and pharmacological management in children and adolescents. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 21, n. 3, p. 223–229, 2012.

HOSENBOCUS, S.; CHAHAL, R. Memantine: A review of possible uses in child and adolescent psychiatry. Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry, v. 22, n. 2, p. 166–171, 2013.

HSIAO, E. Y.; MCBRIDE, S. W.; CHOW, J.; MAZMANIAN, S. K.; PATTERSON, P. H. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12776–12781, 2012.

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.

HYMAN, S. E. Use of mouse models to investigate the contributions of CNVs associated with schizophrenia and autism to disease mechanisms. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 68, p. 99–105, 2021.

IMAMURA, A.; MORIMOTO, Y.; ONO, S.; KUROTAKI, N.; KANEGAE, S.; YAMAMOTO, N.; KINOSHITA, H.; TSUJITA, T.; OKAZAKI, Y.; OZAWA, H. Genetic and environmental factors of schizophrenia and autism spectrum disorder: insights from twin studies. **Journal of Neural Transmission**, v. 127, n. 11, p. 1501–1515, 2020.

INSEL, T. R. The Challenge of Translation in Social Neuroscience: A Review of Oxytocin, Vasopressin, and Affiliative Behavior. **Neuron**, v. 65, n. 6, p. 768–779, 2010.

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. 1263–7, 1986.

INSEL, T. R.; HULIHAN, T. J. A gender-specific mechanism for pair bonding: Oxytocin and partner preference formation in monogamous voles. **Behavioral Neuroscience**, v. 109, n. 4, p. 782–789, 1995.

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. 381–92, 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, p. 59–65, 9, 2008.

ISINGRINI, E.; CAMUS, V.; LE GUISQUET, A. M.; PINGAUD, M.; DEVERS, S.; BELZUNG, C. Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

ISRAEL, S.; LERER, E.; SHALEV, I.; UZEFOVSKY, F.; RIEBOLD, M.; LAIBA, E.; BACHNER-MELMAN, R.; MARIL, A.; BORNSTEIN, G.; KNAFO, A.; EBSTEIN, R. P. The Oxytocin Receptor (OXTR) Contributes to Prosocial Fund Allocations in the Dictator Game and the Social Value Orientations Task. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5535, 2009.

IZENWASSER, S.; COY, A. E.; LADENHEIM, B.; LOELOFF, R. J.; CADET, J. L.; FRENCH, D. Chronic methylphenidate alters locomotor activity and dopamine transporters differently from cocaine. **European Journal of Pharmacology**, v. 373, n. 2–3, p. 187–193, 1999.

JEON, S. J.; GONZALES, E. L.; MABUNGA, D. F. N.; VALENCIA, S. T.; KIM, D. G.; KIM, Y.; ADIL, K. J. L.; SHIN, D.; PARK, D.; SHIN, C. Y. Sex-specific Behavioral Features of Rodent Models of Autism Spectrum Disorder. **Experimental Neurobiology**, v. 27, n. 5, p. 321–343, 2018.

JIN, Y.; CHOI, J.; WON, J.; HONG, Y. The relationship between autism spectrum disorder and melatonin during fetal development. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 1–9, 2018.

JOHANNESSEN, C. U. Mechanisms of action of valproate: A commentatory. **Neurochemistry International**, v. 37, n. 2–3, p. 103–110, 2000.

JONES, S. R.; GAINETDINOV, R. R.; WIGHTMAN, R. M.; CARON, M. G. Mechanisms of Amphetamine Action Revealed in Mice Lacking the Dopamine Transporter. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 6, p. 1979–1986, 15 mar. 1998.

JONES, Z.; DAFNY, N. Acute and chronic dose-response effect of methylphenidate on ventral tegmental area neurons correlated with animal behavior. **Journal of Neural Transmission**, v. 121, n. 3, p. 327–345, 2014.

JUNG, G. A.; YOON, J. Y.; MOON, B. S.; YANG, D. H.; KIM, H. Y.; LEE, S. H.; BRYJA, V.; ARENAS, E.; CHOI, K. Y. Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK- p21 Cip/WAF1 pathway. **BMC Cell Biology**, v. 9, p. 1–12, 2008.

KAAT, A. J.; GADOW, K. D.; LECAVALIER, L. Psychiatric symptom impairment in children with autism spectrum disorders. **Journal of Abnormal Child Psychology**, v. 41, n. 6, p. 959–969, 2013.

KALIVAS, P. W.; WEBER, B. Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 245, n. 3, p. 1095–1102, 1988.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; BERRIDGE, K. C.; GRAYBIEL, A. M.; FENTRESS, J. C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 1 jan. 2016.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: Potential utility for neurobehavioural stress research. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 143, n. 2, p. 169–177, 2005.

KALUEFF, A. V.; WAYNE ALDRIDGE, J.; LAPORTE, J. L.; MURPHY, D. L.; TUOHIMAA, P. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. **Nature Protocols 2007 2:10**, v. 2, n. 10, p. 2538–2544, 2007a.

KALUEFF, A. V; ALDRIDGE, J. W.; LAPORTE, J. L.; MURPHY, D. L.; TUOHIMAA, P. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. **Nature Protocols**, v. 2, n. 10, p. 2538–2544, 2007b.

KAŁUZNA-CZAPLIŃSKA, J.; SOCHA, E.; RYNKOWSKI, J. Determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in urine of autistic children by gas chromatography/mass spectrometry. **Medical Science Monitor**, v. 16, n. 9, p. 445–450, 2010.

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

KARIM, T. J.; AKSEL, C.; KHARAS, N.; DAFNY, N.; REYES-VASQUEZ, C. Caudate nucleus neurons participate in methylphenidate function: Behavioral and neuronal recordings from freely behaving adolescent rats. **Brain Research Bulletin**, v. 142, n. March, p. 241–252, 2018.

KARIM, T. J.; REYES-VAZQUEZ, C.; DAFNY, N. Comparison of the VTA and LC response to methylphenidate: a concomitant behavioral and neuronal study of adolescent male rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 118, n. 3, p. 1501–1514, 2017.

KATAOKA, S.; TAKUMA, K.; HARA, Y.; MAEDA, Y.; AGO, Y.; MATSUDA, T. Autismlike behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. **The international journal of neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 91–103, 18 fev. 2013.

KAZLAUSKAS, N.; SEIFFE, A.; CAMPOLONGO, M.; ZAPPALA, C.; DEPINO, A. M. Sex-specific effects of prenatal valproic acid exposure on sociability and neuroinflammation: Relevance for susceptibility and resilience in autism.

Psychoneuroendocrinology, v. 110, 2019.

KEIL, A.; DANIELS, J. L.; FORSSEN, U.; HULTMAN, C.; CNATTINGIUS, S.; SÖDERBERG, K. C.; FEYCHTING, M.; SPAREN, P. Parental Autoimmune Diseases Associated With Autism Spectrum Disorders in Offspring. **Epidemiology**, v. 21, n. 6, p. 805–808, nov. 2010.

KEMPER, T. L.; BAUMAN, M. Neuropathology of infantile autism. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 57, n. 7, p. 645–52, jul. 1998.

KENDRICK, K. M.; GUASTELLA, A. J.; BECKER, B. Overview of Human Oxytocin Research. *In*: [s.l: s.n.]p. 321–348.

KERBESHIAN, J.; BURD, L.; AVERY, K. Pharmacotherapy of Autism: A Review and Clinical Approach. **Journal of Developmental and Physical Disabilities**, v. 13, n. 3, p. 199–228, 2001.

KERR, D. M.; DOWNEY, L.; CONBOY, M.; FINN, D. P.; ROCHE, M. Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism. **Behavioural Brain Research**, v. 249, p. 124–132, 2013.

KIM, J. W.; PARK, K.; KANG, R. J.; GONZALES, E. L. T.; KIM, D. G.; OH, H. A.; SEUNG, H.; KO, M. J.; KWON, K. J.; KIM, K. C.; LEE, S. H.; CHUNG, C. H.; SHIN, C. Y. Pharmacological modulation of AMPA receptor rescues social impairments in animal models of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 2, p. 314–323, 2019.

KIM, J. W.; SEUNG, H.; KIM, K. C.; GONZALES, E. L. T.; OH, H. A.; YANG, S. M.; KO, M. J.; HAN, S. H.; BANERJEE, S.; SHIN, C. Y. Agmatine rescues autistic behaviors in the valproic acid-induced animal model of autism. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 71–81, 2017.

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.; PARK, J. H.; KIM, H. J.; JEON, S. J.; DELA PENA, I. C.; HAN, S. H.; CHEONG, J. H.; RYU, J. H.; SHIN, C. Y. Malespecific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. **Journal of Neurochemistry**, v. 124, n. 6, p. 832–843, 2013. 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 and Adolescent Psychiatry**, v. 53, n. 5, p. 500–508, 2014c.

KING, R. B. Mathematical Inorganic Chemistry: From Gas-Phase Metal Clusters to Superconducting Solids. **Accounts of Chemical Research**, v. 25, n. 6, p. 247–253, 1992.

KING, S.; CHAMBERS, C. T.; HUGUET, A.; MACNEVIN, R. C.; MCGRATH, P. J.; PARKER, L.; MACDONALD, A. J. The epidemiology of chronic pain in children and adolescents revisited: A systematic review. **Pain**, v. 152, n. 12, p. 2729–2738, 2011.

KINI, P.; WONG, J.; MCINNIS, S.; GABANA, N.; BROWN, J. W. The effects of gratitude expression on neural activity. **NeuroImage**, v. 128, p. 1–10, 2016.

KINJO, T.; ITO, M.; SEKI, T.; FUKUHARA, T.; BOLATI, K.; ARAI, H.; SUZUKI, T. Prenatal exposure to valproic acid is associated with altered neurocognitive function and neurogenesis in the dentate gyrus of male offspring rats. **Brain Research**, v. 1723, n. 6, p. 146403, 2019.

KIRSCH, I. Antidepressants and the Placebo Effect. **Zeitschrift für Psychologie**, v. 222, n. 3, p. 128–134, 2014.

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.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive selfgrooming and stereotypies. **Behavioural Brain Research**, v. 331, n. 5, p. 25–29, 2017.

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.; PALERMO- NETO, 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. 1903–1912, 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. e82244, 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. 240–51, 2010.

KLEIN, M. O.; BATTAGELLO, D. S.; CARDOSO, A. R.; HAUSER, D. N.; BITTENCOURT, J. C.; CORREA, R. G. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019.

KLEINHANS, N. M.; SCHWEINSBURG, B. C.; COHEN, D. N.; MÜLLER, R. A.; COURCHESNE, E. N-acetyl aspartate in autism spectrum disorders: Regional effects and relationship to fMRI activation. **Brain Research**, v. 1162, n. 1, p. 85–97, 2007.

KLIN, A. Autismo e síndrome de Asperger : uma visão geral Autism and Asperger syndrome : an overview. 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. 580–1, 1997.

KNOBLOCH, H. S.; CHARLET, A.; HOFFMANN, L. C.; ELIAVA, M.; KHRULEV, S.; CETIN, A. H.; OSTEN, P.; SCHWARZ, M. K.; SEEBURG, P. H.; STOOP, R.; GRINEVICH, V. Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. **Neuron**, v. 73, n. 3, p. 553–566, 2012.

KODA, K.; AGO, Y.; CONG, Y.; KITA, Y.; TAKUMA, K.; MATSUDA, T. Effects of acute and chronic administration of atomoxetine and methylphenidate on extracellular levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the prefrontal cortex and striatum of mice. Journal of Neurochemistry, v. 114, n. 1, p. 259–270, 2010. KODAK, T.; BERGMANN, S. Autism Spectrum Disorder: Characteristics, Associated Behaviors, and Early InterventionPediatric Clinics of North AmericaW.B. Saunders, 2020.

KOGAN, M. D.; BLUMBERG, S. J.; SCHIEVE, L. A.; BOYLE, C. A.; PERRIN, J. M.; GHANDOUR, R. M.; SINGH, G. K.; STRICKLAND, B. B.; TREVATHAN, E.; VAN DYCK, P. C. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. **Pediatrics**, v. 124, n. 5, p. 1395–1403, 2009.

KOLLINS, S.; GREENHILL, L.; SWANSON, J.; WIGAL, S.; ABIKOFF, H.; MCCRACKEN, J.; RIDDLE, M.; MCGOUGH, J.; VITIELLO, B.; WIGAL, T.; SKROBALA, A.; POSNER, K.; GHUMAN, J.; DAVIES, M.; CUNNINGHAM, C.; BAUZO, A. Rationale, Design, and Methods of the Preschool ADHD Treatment Study (PATS). **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 45, n. 11, p. 1275–1283, 2006.

KONSTENIUS, M.; JAYARAM-LINDSTRÖM, N.; GUTERSTAM, J.; BECK, O.; PHILIPS, B.; FRANCK, J. Methylphenidate for attention deficit hyperactivity disorder and drug relapse in criminal offenders with substance dependence: a 24-week randomized placebo-controlled trial. **Addiction**, v. 109, n. 3, p. 440–449, mar. 2014.

KOSILLO, P.; BATEUP, H. S. Dopaminergic Dysregulation in Syndromic Autism Spectrum Disorders: Insights From Genetic Mouse Models. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 15, n. 4, 2021.

KRISHNAN, M. C. Sex differences in autism spectrum disorder. **The Complexity of Autism Spectrum Disorders**, v. 20, n. 2, p. 69–86, 2018. KRUK, M. R.; WESTPHAL, K. G. C.; VAN ERP, A. M. M.; JUDITH VAN ASPEREN; CAVE, B. J.; SLATER, E.; DE KONING, J.; HALLER, J. The hypothalamus: Crossroads of endocrine and behavioural regulation in grooming and aggression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 2, p. 163–177, 1998.

KRUMM, N.; TURNER, T. N.; BAKER, C.; VIVES, L.; MOHAJERI, K.; WITHERSPOON, K.; RAJA, A.; COE, B. P.; STESSMAN, H. A.; HE, Z. X.; LEAL, S. M.; BERNIER, R.; EICHLER, E. E. Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. Nature Genetics, v. 47, n. 6, p. 582–588, 2015.

KUBRUSLY, R. C. C.; BHIDE, P. G. Cocaine exposure modulates dopamine and adenosine signaling in the fetal brain. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 2, p. 436–443, 2010.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: Comparison with amphetamine. **Journal of Neurochemistry**, v. 68, n. 5, p. 2032–2037, 1997.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S. Exposure of adolescent rats to oral methylphenidate: Preferential effects on extracellular norepinephrine and absence of sensitization and cross-sensitization to methamphetamine. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 16, p. 7264–7271, 2002.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S.; CHO, A. K.; MELEGA, W. Hippocampus norepinephrine, caudate dopamine and serotonin, and behavioral responses to the stereoisomers of amphetamine and methamphetamine. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 1308–1317, 1995.

KUMAR, H.; SHARMA, B. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. **Brain Research**, v. 1630, p. 83–97, 2016.

KUPERSTEIN, F.; EILAM, R.; YAVIN, E. Altered expression of key dopaminergic regulatory proteins in the postnatal brain following perinatal n-3 fatty acid dietary deficiency. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 2, p. 662–671, 2008.

LAI, M.-C.; LOMBARDO, M. V; PASCO, G.; RUIGROK, A. N. V; WHEELWRIGHT, S. J. A Behavioral Comparison of Male and Female Adults with High Functioning Autism Spectrum Conditions. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. 20835, 2011.

LAI, M.; LOMBARDO, M. V; BARON-COHEN, S. Autism. v. 383, p. 896–910, 2014. LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 91–104, 2002.

LAM, K. S. L.; AMAN, M. G.; ARNOLD, L. E. Neurochemical correlates of autistic disorder: A review of the literature. **Research in Developmental Disabilities**, v. 27, n. 3, p. 254–289, 2006.

LANGE, N.; TRAVERS, B. G.; BIGLER, E. D.; PRIGGE, M. B. D.; FROEHLICH, A. L.; NIELSEN, J. A.; CARIELLO, A. N.; ZIELINSKI, B. A.; ANDERSON, J. S.; FLETCHER, P. T.; ALEXANDER, A. A.; LAINHART, J. E. Longitudinal Volumetric Brain Changes in Autism Spectrum Disorder Ages 6-35 Years. **Autism Research**, v. 8, n. 1, p. 82–93, 2015.

LARSEN, F. W.; MOURIDSEN, S. E. The outcome in children with childhood autism and Asperger syndrome originally diagnosed as psychotic. A 30-year follow-up study of subjects hospitalized as children. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 6, n. 4, p. 181–190, 1997.

LEE, M.; MARTIN-RUIZ, C.; GRAHAM, A.; COURT, J.; JAROS, E.; PERRY, R.; IVERSEN, P.; BAUMAN, M.; PERRY, E. Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. **Brain**, v. 125, n. 7, p. 1483–1495, 2002.

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 . **Clinical Review**, v. 61, p. 421–424, 2015.

LENZ, W.; KNAPP, K. Thalidomide embryopathy. **Archives of environmental health**, v. 5, p. 100–5, 1962.

LEONARD, B. E.; MCCARTAN, D.; WHITE, J.; KING, D. J. Methylphenidate: a review of its neuropharmacological, neuropsychological and adverse clinical effects. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 19, n. 3, p. 151–180, 2004.

LEVIN, F. R.; KLEBER, H. D. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder and Substance Abuse: Relationships and Implications for Treatment. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 2, n. 5, p. 246–258, 1995.

LEVITT, P.; HARVEY, J. A.; FRIEDMAN, E.; SIMANSKY, K.; MURPHY, H. E. New evidence for neurotransmitter influences on brain development. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 6, p. 269–274, 1997.

LEWIS, M. H.; TANIMURA, Y.; LEE, L. W.; BODFISH, J. W. Animal models of restricted repetitive behavior in autism. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 1, p. 66–74, 2007.

LEYFER, O. T.; FOLSTEIN, S. E.; BACALMAN, S.; DAVIS, N. O.; DINH, E.; MORGAN, J.; TAGER-FLUSBERG, H.; LAINHART, J. E. Comorbid psychiatric disorders in children with autism: Interview development and rates of disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 36, n. 7, p. 849–861, 2006.

LI, J.; LUCY FIEDLER, J.; MURPHY, D.; Y-C, D.; H-F, Z.; S-P, H.; J-S, H.; DAI, Y.-C.; ZHANG, H.-F.; SCHÖN, M.; BÖCKERS, T. M.; HAN, S.-P.; HAN, J.-S.; ZHANG, R. Neonatal Oxytocin Treatment Ameliorates Autistic-Like Behaviors and Oxytocin Deficiency in Valproic Acid-Induced Rat Model of Autism. **Front. Cell. Neurosci**, v. 12, p. 355, 2018.

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. e20152206, 2016.

LI, S.; SHI, Y.; KIROUAC, G. J. The hypothalamus and periaqueductal gray are the sources of dopamine fibers in the paraventricular nucleus of the thalamus in the rat. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, n. November, p. 1–10, 2014.

LIDOW, M. S.; ROBERTS, A.; ZHANG, L.; KOH, P.-O.; LEZCANO, N.; BERGSON, C. Receptor crosstalk protein, calcyon, regulates affinity state of dopamine D1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 427, n. 3, p. 187–193, 2001.

LINGAM, R.; SIMMONS, A.; ANDREWS, N.; MILLER, E.; STOWE, J. Prevalence of autism and parentally reported triggers in a north east London population. **Arch Dis Child**, v. 88, p. 666–670, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LLANA, M. E.; CRISMON, M. L. Methylphenidate: increased abuse or appropriate use? Journal of the American Pharmaceutical Association (Washington, D.C.: 1996), v. 39, n. 4, p. 526–530, 1999.

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

LOOMES, R.; HULL, L.; MANDY, W. P. L. What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of the** American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, v. 56, n. 6, p. 466–474, 2017.

LORD, C.; BISHOP, S. L. Recent Advances in Autism Research as Reflected in DSM-5 Criteria for Autism Spectrum Disorder. 2015.

LORD, C.; ELSABBAGH, M.; BAIRD, G.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. Autism spectrum disorder, **The Lancet**, Publishing Group, 2018.

LÖSCHER, W. Basic pharmacology of valproate: A review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. **CNS Drugs**, v. 16, n. 10, p. 669–694, 2002.

LOVENBERG, W.; JEQUIER, E.; SJOERDSMA, A. Tryptophan Hydroxylation: Measurement in Pineal Gland, Brainstem, and Carcinoid Tumor. **Science**, v. 155, n. 3759, p. 217–219,1967.

LOVICK, T. A.; ADAMEC, R. The Periaqueductal Gray (PAG). **Neural Plasticity**, v. 2009, 2009.

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. 187–97, 2000.

LUCK, S. J.; GOLD, J. M. The Construct of Attention in Schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 1, p. 34–39, 2008.

LUD CADET, J.; JAYANTHI, S.; T. MCCOY, M.; BEAUVAIS, G.; SHENG CAI, N. Dopamine D1 Receptors, Regulation of Gene Expression in the Brain, and Neurodegeneration. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 5, p. 526–538, 1 nov. 2010.

LUO, M.; LI, Y.; ZHONG, W. Do dorsal raphe 5-HT neurons encode "beneficialness"? **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 135, p. 40–49, 2016.

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, 2014a.

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. 443–64, abr. 2014b.

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.

MAENNER, M. J.; SHAW, K. A.; BAKIAN, A. V.; BILDER, D. A.; DURKIN, M. S.; ESLER, A.; FURNIER, S. M.; HALLAS, L.; HALL-LANDE, J.; HUDSON, A.; HUGHES, M. M.; PATRICK, M.; PIERCE, K.; POYNTER, J. N.; SALINAS, A.; SHENOUDA, J.; VEHORN, A.; WARREN, Z.; CONSTANTINO, J. N.; DIRIENZO, M.; FITZGERALD, R. T.; GRZYBOWSKI, A.; SPIVEY, M. H.; PETTYGROVE, S.; ZAHORODNY, W.; ALI, A.; ANDREWS, J. G.; BAROUD, T.; GUTIERREZ, J.; HEWITT, A.; LEE, L. C.; LOPEZ, M.; MANCILLA, K. C.; MCARTHUR, D.; SCHWENK, Y. D.; WASHINGTON, A.; WILLIAMS, S.; COGSWELL, M. E. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 70, n. 11, p. 1–16, 2021.

MAILLOUX, Z.; MULLIGAN, S.; ROLEY, S. S.; BLANCHE, E.; CERMAK, S.; COLEMAN, G. G.; BODISON, S.; LANE, C. J. Verification and Clarification of Patterns of Sensory Integrative Dysfunction. **The American Journal of Occupational Therapy**, v. 65, n. 2, p. 143–151, 2011.

MIKULECKÁ, A.; ŠUBRT, M.; PAŘÍZKOVÁ, M.; MAREŠ, P.; KUBOVÁ, H. Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. II. social behavior. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. MAY, p. 1–11, 2014.

MANDY, W.; CHILVERS, R.; COMORBIDITY, H. Á. Sex Differences in Autism Spectrum Disorder : Evidence from a Large Sample of Children and Adolescents. **J Autism Dev Disord**. 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.

MARGARI, L.; DE GIACOMO, A.; CRAIG, F.; PALUMBI, R.; PESCHECHERA, A.; MARGARI, M.; PICARDI, F.; CALDAROLA, M.; MAGHENZANI, M. A.; DICUONZO, F. Frontal lobe metabolic alterations in autism spectrum disorder: A1h-magnetic resonance spectroscopy study. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 14, p. 1871–1876, 2018.

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.; MENDOLA, D. La; SANDI, C.; MARKRAM, H. Abnormal Fear Conditioning and Amygdala Processing in an Animal Model of Autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 901–912, 2008.

MAROTTA, R.; RISOLEO, M. C.; MESSINA, G.; PARISI, L.; CAROTENUTO, M.; VETRI, L.; ROCCELLA, M. The neurochemistry of autism. **Brain Sciences**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2020.

MARTINS, M. R.; REINKE, A.; PETRONILHO, F. C.; GOMES, K. M.; DAL-PIZZOL, F.; QUEVEDO, J. Methylphenidate treatment induces oxidative stress in young rat brain. **Brain Research**, v. 1078, n. 1, p. 189–197, 2006.

MASSELLO, W.; CARPENTER, D. A. A fatality due to the intranasal abuse of methylphenidate (Ritalin). **Journal of forensic sciences**, v. 44, n. 1, p. 220–1, 1999.

MATELSKI, L.; VAN DE WATER, J. Risk factors in autism: Thinking outside the brain. **Journal of Autoimmunity**, v. 67, p. 1–7, 2016.

MATSUO, K.; YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. 5-Aminolevulinic Acid Inhibits Oxidative Stress and Ameliorates Autistic-Like Behaviors in Prenatal Valproic Acid-Exposed Rats. **Neuropharmacology**, v. 168, n. 2, p. 107975, 2020.

MCALONAN, G. M.; CHEUNG, V.; CHEUNG, C.; SUCKLING, J.; LAM, G. Y.; TAI, K. S.; YIP, L.; MURPHY, D. G. M.; CHUA, S. E. Mapping the brain in autism. A voxelbased MRI study of volumetric differences and intercorrelations in autism. **Brain**, v. 128, n. 2, p. 268–276, 2005.

MCCARTHY, M. M.; ARNOLD, A. P.; BALL, G. F.; BLAUSTEIN, J. D.; DE VRIES, G. J. Sex Differences in the Brain: The Not So Inconvenient Truth. **J. Neurosci**. v. 32, n. 7, p. 2241-7, 2012.

MCDOUGALL, S. A.; COLLINS, R. L.; KARPER, P. E.; WATSON, J. B.; CRAWFORD, C. A. Effects of repeated methylphenidate treatment in the young rat: Sensitization of both locomotor activity and stereotyped sniffing. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, v. 7, n. 3, p. 208–218, 1999.

MCFARLANE, H. G.; KUSEK, G. K.; YANG, M.; PHOENIX, J. L.; BOLIVAR, V. J.; CRAWLEY, J. N. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. **Genes**,

Brain and Behavior, v. 7, n. 2, p. 152–163, 2008.

MCNAMARA, R. K.; ABLE, J.; LIU, Y.; JANDACEK, R.; RIDER, T.; TSO, P.; LIPTON, J. W. Omega-3 fatty acid deficiency during perinatal development increases serotonin turnover in the prefrontal cortex and decreases midbrain tryptophan hydroxylase-2 expression in adult female rats: dissociation from estrogenic effects. **Journal of psychiatric research**, v. 43, n. 6, p. 656–63, 2009.

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, 2008.

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

MEADOR, K.; REYNOLDS, M. W.; CREAN, S.; FAHRBACH, K.; PROBST, C. Pregnancy outcomes in women with epilepsy: A systematic review and meta-analysis of published pregnancy registries and cohorts. **Epilepsy Research**, v. 81, n. 1, p. 1–13, 2008.

MEHTA, M. V.; GANDAL, M. J.; SIEGEL, S. J. mGluR5-antagonist mediated reversal of elevated stereotyped, repetitive behaviors in the VPA model of autism. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, 2011.

MELANCIA, F.; SCHIAVI, S.; SERVADIO, M.; CARTOCCI, V.; CAMPOLONGO, P.; PALMERY, M.; PALLOTTINI, V.; TREZZA, V. Sex-specific autistic endophenotypes induced by prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 18, p. 3699–3712, 2018.

MEUNIER, H.; CARRAZ, G.; NEUNIER, Y.; EYMARD, P.; AIMARD, M. [Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid]. **Thérapie**, v. 18, p. 435–8, 1963.

MEYER-LINDENBERG, A.; DOMES, G.; KIRSCH, P.; HEINRICHS, M. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. **Nat Rev Neurosci**. v. 12, n.9 p. 524-38, 2011.

MEYER, P. J.; MORGAN, M. M.; KOZELL, L. B.; INGRAM, S. L. Contribution of dopamine receptors to periaqueductal gray-mediated antinociception. **Psychopharmacology**, v. 204, n. 3, p. 531–540, 2009.

MIANO, S.; BRUNI, O.; ELIA, M.; TROVATO, A.; SMERIERI, A.; VERRILLO, E.; ROCCELLA, M.; TERZANO, M. G.; FERRI, R. Sleep in children with autistic spectrum disorder: A questionnaire and polysomnographic study. **Sleep Medicine**, v. 9, n. 1, p. 64–70, 2007.

MICHAUD, J. L. The developmental program of the hypothalamus and its disorders. **Clinical Genetics**, v. 60, n. 4, p. 255–263, 2001. MISSALE, C.; NASH, S. R.; ROBINSON, S. W.; JABER, M.; CARON, M. G. Dopamine Receptors: From Structure to Function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 189–225, 1998.

MIYAZAKI, K.; NARITA, N.; NARITA, M. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: Implication for pathogenesis of autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2, p. 287–297, 2005.

MOHAMMADI, S.; ASADI-SHEKAARI, M.; BASIRI, M.; PARVAN, M.; SHABANI, M.; NOZARI, M. Improvement of autistic-like behaviors in adult rats prenatally exposed to valproic acid through early suppression of NMDA receptor function. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 1, p. 199–208, 2020.

MOLDRICH, R. X.; LEANAGE, G.; SHE, D.; DOLAN-EVANS, E.; NELSON, M.; REZA, N.; REUTENS, D. C. Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. **Behavioural Brain Research**, v. 257, p. 253–264, 2013.

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. 489–97, 2000.

MORALES HIDALGO, P.; VOLTAS MORESO, N.; CANALS SANS, J. Autism spectrum disorder prevalence and associated sociodemographic factors in the school population: EPINED study. **Autism**, v. 25, n. 7, p. 1999–2011, 2021.

MORTON, W. A.; STOCK, G. G. Methylphenidate Abuse and Psychiatric Side Effects. **The Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 02, n. 05, p. 159–164,2000.

MOTAGHINEJAD, M.; MOTEVALIAN, M.; LARIJANI, S.; KHAJEHAMEDI, Z. Protective effects of forced exercise against methylphenidate-induced anxiety, depression and cognition impairment in rat. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, n. 1, p. 134, 2015.

MULLER, C. L.; ANACKER, A. M. J.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. **Neuroscience**, v. 321, p. 24–41, 2016.

MUNJI, R. N.; CHOE, Y.; LI, G.; SIEGENTHALER, J. A.; PLEASURE, S. J. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 1676–1687, 2011.

MURRAY, J. B. Psychophysiological Effects of Methylphenidate (Ritalin). **Psychological Reports**, v. 61, n. 1, p. 315–336, 1987.

MURUGAN, M.; JANG, H. J.; PARK, M.; MILLER, E. M.; COX, J.; TALIAFERRO, J. P.; PARKER, N. F.; BHAVE, V.; HUR, H.; LIANG, Y.; NECTOW, A. R.; PILLOW, J. W.; WITTEN, I. B. Combined Social and Spatial Coding in a Descending Projection from the Prefrontal Cortex. **Cell**, v. 171, n. 7, p. 1663- 1677.e16, 2017.

MYCHASIUK, R.; RICHARDS, S.; NAKAHASHI, A.; KOLB, B.; GIBB, R. Effects of rat prenatal exposure to valproic acid on behaviour and neuro-anatomy. **Developmental Neuroscience**, v. 34, n. 2–3, p. 268–276, 2012.

NAAIJEN, J.; ZWIERS, M. P.; FORDE, N. J.; WILLIAMS, S. C.; DURSTON, S.; BRANDEIS, D.; GLENNON, J. C.; THE TACTICS CONSORTIUM; FRANKE, B.; LYTHGOE, D. J.; BUITELAAR, J. K. Striatal structure and its association with N-Acetylaspartate and glutamate in autism spectrum disorder and obsessive compulsive disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 118– 129, 2018.

NAKAJIMA, M.; GÖRLICH, A.; HEINTZ, N. Oxytocin modulates female sociosexual behavior through a specific class of prefrontal cortical interneurons. **Cell**, v. 159, n. 2, p. 295–305, 2014.

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. NAKASATO, A.; NAKATANI, Y.; SEKI, Y.; TSUJINO, N.; UMINO, M.; ARITA, H. Swim stress exaggerates the hyperactive mesocortical dopamine system in a rodent model of autism. **Brain Research**, v. 1193, p. 128–135, 2008.

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.

NASELLO, A. G.; FELICIO, L. F. Avoidance behavior, prolactin, HVA and DOPAC in offspring of bromopride-treated rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 37, n. 3, p. 571–575, 1990.

NAU, H. Teratogenic valproic acid concentrations: Infusion by implanted minipumps vs conventional injection regimen in the mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 243–250, 1985.

NEWSCHAFFER, C.; CROEN, L. A.; DANIELS, J.; GIARELLI, E.; GRETHER, 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. 235–58, 2007.

NEWSCHAFFER, C. J.; SCHRIVER, E.; BERRIGAN, L.; LANDA, R.; STONE, W. L.; BISHOP, S.; BURKOM, D.; GOLDEN, A.; IBANEZ, L.; KUO, A.; LAKES, K. D.; MESSINGER, D. S.; PATERSON, S.; WARREN, Z. E. Development and validation of a streamlined autism case confirmation approach for use in epidemiologic risk factor research in prospective cohorts. **Autism research : official journal of the International Society for Autism Research**, v. 12, n. 9, p. 524-38, 2016.

NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 217–227, 2018. NISSBRANDT, H.; CARLSSON, A. Turnover of Dopamine and Dopamine Metabolites in Rat Brain: Comparison Between Striatum and Substantia Nigra. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, n. 3, p. 959–967, 1987.

NOLDUS, L. P. J. J.; SPINK, A. J.; TEGELENBOSCH, R. A. J. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior** research methods, instruments, & computers : a journal of the Psychonomic

Society, Inc, v. 33, n. 3, p. 398–414, 2001.

NOLEN-HOEKSEMA, S. Sex Differences in Unipolar Depression: Evidence and Theory. **Psychological Bulletin**, v. 101, n. 2, p. 259–282, 1987.

OBER, C.; LOISEL, D. A.; GILAD, Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 12, p. 911–922, 2008.

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.

OLEXOVÁ, L.; ŠTEFÁNIK, P.; KRŠKOVÁ, L. Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amygdala and cerebellum of VPA rats — An animal model of autism. **Neuroscience Letters**, v. 629, p. 9–14, 2016.

OLINCY, A.; HARRIS, J. G.; JOHNSON, L. L.; PENDER, V.; KONGS, S.; ALLENSWORTH, D.; ELLIS, J.; ZERBE, G. O.; LEONARD, S.; STEVENS, K. E.; STEVENS, J. O.; MARTIN, L.; ADLER, L. E.; SOTI, F.; KEM, W. R.; FREEDMAN, R. Proof-of-concept trial of an α7 nicotinic agonist in schizophrenia. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 6, p. 630–638, 2006.

OLMOS-SERRANO, J. L.; CORBIN, J. G.; BURNS, M. P. The GABA A receptor agonist THIP ameliorates specific behavioral deficits in the mouse model of fragile X syndrome. **Developmental Neuroscience**, v. 33, n. 5, p. 395–403, 2011.

OMELCHENKO, N.; SESACK, S. R. Periaqueductal gray afferents synapse onto dopamine and GABA neurons in the rat ventral tegmental area. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 5, p. 981–991, 2010.

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.

ONAIVI, E. S.; MARTIN, B. R. Neuropharmacological and physiological validation of a computer-controlled two-compartment black and white box for the assessment of anxiety. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 13, n. 6, 1989.

ORNOY, A. Neuroteratogens in man: An overview with special emphasis on the teratogenicity of antiepileptic drugs in pregnancy. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 214–226, 2006.

ORNOY, A. Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 1–10, 2009a.

ORNOY, A.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; ERGAZ, Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 155–169, 2015.

OWENS, D. F.; KRIEGSTEIN, A. R. Is there more to GABA than synaptic inhibition? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 715–727, 2002.

OZONOFF, S.; JENSEN, J. Brief report: specific executive function profiles in three neurodevelopmental disorders. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 29, n. 2, p. 171–177, 1999.

PAGANI, M.; BERTERO, A.; LISKA, A.; GALBUSERA, A.; SABBIONI, M.; BARSOTTI, N.; COLENBIER, N.; MARINAZZO, D.; SCATTONI, M. L.; PASQUALETTI, M.; GOZZI, A. Deletion of autism risk gene shank3 disrupts prefrontal connectivity. **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 27, p. 5299–5310, 2019.

PANKSEPP, J.; BEATTY, W. W. Social deprivation and play in rats. **Behavioral and neural biology**, v. 30, n. 2, p. 197–206, 1980.

PANOS, J. J.; LAW, C. D.; FERGUSON, S. A. Effects of perinatal methylphenidate (MPH) treatment in male and female Sprague-Dawley offspring. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 42, p. 9–16, 2014.

PANOS, J. J.; O'CALLAGHAN, J. P.; MILLER, D. B.; FERGUSON, S. A. Effects of developmental methylphenidate (MPH) treatment on monoamine neurochemistry of male and female rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 45, p. 70–74, 2014.

PAPA, M.; DIEWALD, L.; CAREY, M. P.; ESPOSITO, F. J.; GIRONI CARNEVALE, U. A.; SADILE, A. G. A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an anterior hypo- and a posterior hyperfunctioning mesocorticolimbic system. **Behavioural Brain Research**, v. 130, n. 1–2, p. 171–179, 2002.

PASLAKIS, G.; TRÄBER, F.; ROBERZ, J.; BLOCK, W.; JESSEN, F. N-acetylaspartate (NAA) as a correlate of pharmacological treatment in psychiatric disorders: A systematic review. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 10, p. 1659– 1675, 2014.

PATRICK, K. S.; MARKOWITZ, J. S. Pharmacology of methylphenidate, amphetamine enantiomers and pemoline in attention-deficit hyperactivity disorder. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, v. 12, n. 6, p. 527–546, 1997.

PATTERSON, P. H. Maternal infection and immune involvement in autism. **Trends** in molecular medicine, v. 17, n. 7, p. 389–94, 2011.

PAVĂL, D. A Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. **Developmental Neuroscience**, v. 39, n. 5, p. 355–360, 2017.

PAVÅL, D.; MICLUTIA, I. V. The Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder Revisited: Current Status and Future Prospects. **Developmental Neuroscience**, v. 43, n. 2, p. 73–83, 2021.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1998.

PEARSON, B. L.; POBBE, R. L. H.; DEFENSOR, E. B.; OASAY, L.; BOLIVAR, V. J.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; PEARSON, B. L. Motor and cognitive stereotypies in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **Genes, Brain and Behavior**, v. 10, p. 228–235, 2011.

PEARSON, C. A.; PLACZEK, M. **Development of the Medial Hypothalamus: Forming a Functional Hypothalamic-Neurohypophyseal Interface**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., p. 10649–88, 2013.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PERRY, E. K.; LEE, M. L. W.; MARTIN-RUIZ, C. M.; COURT, J. A.; VOLSEN, S. G.; MERRIT, J.; FOLLY, E.; IVERSEN, P. E.; BAUMAN, M. L.; PERRY, R. H.; WENK, G. L. Cholinergic activity in autism: Abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 7, p. 1058–1066, 2001. 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. 349–58, jul. 2006.

PERSICO, A. M.; NAPOLIONI, V. Autism genetics. **Behavioural Brain Research**, v. 251, p. 95–112, 2013.

PESSIGLIONE, M.; SEYMOUR, B.; FLANDIN, G.; DOLAN, R. J.; FRITH, C. D. Dopamine-dependent prediction errors underpin reward-seeking behaviour in humans. **Controlled clinical Trial.** v. 442, n. 7106, p. 1042-5, 2006.

PETROFF, O. A. C. Book Review: GABA and Glutamate in the Human Brain. **The Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 562–573, 29, 2002.

PFAENDER, S.; GRABRUCKER, A. M. Characterization of biometal profiles in neurological disorders. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 6, n. 5, p. 960–77, 2014.

PHIEL, C. J.; ZHANG, F.; HUANG, E. Y.; GUENTHER, M. G.; LAZAR, M. A.; KLEIN, P. S. Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36734–36741, 2001.

PIERCE, R. C.; KALIVAS, P. W. Amphetamine produces sensitized increases in locomotion and extracellular dopamine preferentially in the nucleus accumbens shell of rats administered repeated cocaine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 2, p. 1019–1029, 1995.

PIETRO, N.; SEAMANS, J. Dopamine and Serotonin Interactions in the Prefrontal Cortex: Insights on Antipsychotic Drugs and Their Mechanism of Action. **Pharmacopsychiatry**, v. 40, n. S 1, p. S27–S33, 2007.

PINARES-GARCIA, P.; STRATIKOPOULOS, M.; ZAGATO, A.; LOKE, H.; LEE, J. Sex: A significant risk factor for neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. **Brain Sciences**, v. 8, n. 8, p. 1–27, 2018.

PIVEN, J.; TSAI, G.; NEHME, E.; COYLE, J. T.; CHASE, G. A.; FOLSTEIN, S. E. Platelet serotonin, a possible marker for familial autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 21, n. 1, p. 51–59, 1991.

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, abr. 1999.

POMPEIARTO, M.; PALACIOS, J. M.; MENGODB, G. Distribution and Cellular Localization of mRNA Coding for SHT, Receptor in the Rat Brain: Correlation with Receptor Binding. **J Neurosci**. v. 12, n. 2, p. 440-53, 1992.

POSEY, D. J.; AMAN, M. G.; MCCRACKEN, J. T.; SCAHILL, L.; TIERNEY, E.; ARNOLD, L. E.; VITIELLO, B.; CHUANG, S. Z.; DAVIES, M.; RAMADAN, Y.; WITWER, A. N.; SWIEZY, N. B.; CRONIN, P.; SHAH, B.; CARROLL, D. H.; YOUNG, C.; WHEELER, C.; MCDOUGLE, C. J. Positive Effects of Methylphenidate on Inattention and Hyperactivity in Pervasive Developmental Disorders: An Analysis of Secondary Measures. **Biological Psychiatry**, v. 61, n. 4, p. 538–544, 2007.

POSTORINO, V.; KERNS, C. M.; VIVANTI, G.; BRADSHAW, J.; SIRACUSANO, M.; MAZZONE, L. Anxiety Disorders and Obsessive-Compulsive Disorder in Individuals with Autism Spectrum Disorder. **Current Psychiatry Reports**, v. 19, n. 12, 2017. PREVIC, F. H. Prenatal influences on brain dopamine and their relevance to the rising incidence of autism. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 46–60, 2007.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

PUIG, M. V.; GULLEDGE, A. T. Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. **Molecular neurobiology**, v. 44, n. 3, p. 449–464, 2011.

QIAN, Y.; CHEN, M.; FORSSBERG, H.; DIAZ HEIJTZ, R. Genetic variation in dopamine-related gene expression influences motor skill learning in mice. **Genes**, **Brain and Behavior**, v. 12, n. 6, p. 604–614, 2013.

QIAN, Y.; MELIKIAN, H. E.; RYE, D. B.; LEVEY, A. I.; BLAKELY, R. D. Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. **Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 1261–1274, 1995.

QUANSAH, E.; SGAMMA, T.; JADDOA, E.; ZETTERSTRÖM, T. S. C. Chronic methylphenidate regulates genes and proteins mediating neuroplasticity in the juvenile rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 654, p. 93-98, 2017.
QUANSAH, E.; ZETTERSTRÖM, T. S. C. Chronic methylphenidate preferentially alters catecholamine protein targets in the parietal cortex and ventral striatum. **Neurochemistry International**, v. 124, n. 11, p. 193–199, 2019.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition and Metabolic Insights**, v. 6, n. 21, p. 775–777, 2005.

RANALDI, R.; BAUCO, P.; MCCORMICK, S.; COOLS, A. R.; WISE, R. A. Equal sensitivity to cocaine reward in addiction-prone and addiction-resistant rat genotypes. **Behavioural Pharmacology**, v. 12, n. 6–7, p. 527–534, 2001.

RASALAM, A.; HAILEY, H.; WILLIAMS, J.; MOORE, S.; TURNPENNY, P.; LLOYD, D.; DEAN, J. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 47, n. 8, p. 551–555, 2005.

REEP, R. L.; CHEATWOOD, J. L.; CORWIN, J. V. The Associative Striatum: Organization of Cortical Projections to the Dorsocentral Striatum in Rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 3, p. 271–292, 2003.

REIMHERR, F. W.; MARCHANT, B. K.; GIFT, T. E.; STEANS, T. A. ADHD and Anxiety: Clinical Significance and Treatment Implications. **Current Psychiatry Reports**, v. 19, n. 12, p. 109, 2017.

REITH, M. E. A.; KORTAGERE, S.; WIERS, C. E.; SUN, H.; KURIAN, M. A.; GALLI, A.; VOLKOW, N. D.; LIN, Z. The dopamine transporter gene SLC6A3: multidisease risks. **Molecular Psychiatry**. v. 27, n. 2, p. 1031-1046, 2021.

REITH, R. M.; MCKENNA, J.; WU, H.; HASHMI, S. S.; CHO, S. H.; DASH, P. K.; GAMBELLO, M. J. Loss of Tsc2 in Purkinje cells is associated with autistic-like behavior in a mouse model of tuberous sclerosis complex. **Neurobiology of Disease**, v. 51, p. 93–103, 2013.

REYNOLDS, S.; URRUELA, M.; DEVINE, D. P. Effects of Environmental Enrichment on Repetitive Behaviors in the BTBR T+tf/J Mouse Model of Autism. **Autism Res**, v. 6, p. 337–343, 2013.

REZVANI, A. H.; LEVIN, E. D. Adolescent and adult rats respond differently to nicotine and alcohol: motor activity and body temperature; Adolescent and adult rats respond differently to nicotine and alcohol: motor activity and body temperature. **Int. J. Devl Neuroscience**, v. 22, p. 349–354, 2004.

RICCERI, L.; MOLES, A.; CRAWLEY, J. Behavioral phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders: Relevant social behavior patterns across the life span. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 1, p. 40–52, 2007.

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. suppl 3, p. 511–533, jun. 2000.

RIDDLE, E. L.; FLECKENSTEIN, A. E.; HANSON, G. R. Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. **The AAPS journal**, v. 8, n. 2, p. E413–E418, 2006.

RIMMELE, U.; HEDIGER, K.; HEINRICHS, M.; KLAVER, P. Oxytocin Makes a Face in Memory Familiar. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 38–42, 2009.

RIMMER, E. M.; RICHENS, A. An update on sodium valproate. **Pharmacotherapy**, v. 5, n. 3, p. 171–84, 1985.

RINALDI, T.; SILBERBERG, G.; MARKRAM, H. Hyperconnectivity of local neocortical microcircuitry induced by prenatal exposure to valproic acid. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 4, p. 763–770, 2008.

RIPHAGEN, C. L.; PITTMAN, Q. J. Arginine vasopressin as a central neurotransmitter. **Federation proceedings**, v. 45, n. 9, p. 2318–2322, 1986.

RITZ, M. C.; LAMB, R. J. .; GOLDBERG, S. R.; KUHAR, M. J. Cocaine Receptors on Dopamine Transporters Are Related to Self-Administration of Cocaine. **Science**, v. 237, n. 4819, p. 1219–1223, 1987.

ROBERT, E.; GUIBAUD, P. MATERNAL VALPROIC ACID AND CONGENITAL NEURAL TUBE DEFECTS. **The Lancet**, v. 320, n. 8304, p. 937, 1982.

ROBINSON, E. B.; LICHTENSTEIN, P.; ANCKARSÄTER, H.; HAPPÉ, F.; RONALD, A. Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 13, p. 5258–5262, 2013.

ROBINSON, T. E.; BERRIDGE, K. C. The neural basis of drug craving: An incentivesensitization theory of addiction. **Brain Research Reviews**, v. 18, n. 3, p. 247–291, 1993. RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 21, n. 6, p. 801–810, 1997.

RODIER, P. M. Converging evidence for brain stem injury in autism. **Development** and psychopathology, v. 14, n. 3, p. 537–57, 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. 319–25,1997.

RODIER, P. M.; INGRAM, J. L.; TISDALE, B.; NELSON, S.; ROMANO, J. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. **Journal of Comparative Neurology**, v. 370, n. 2, p. 247–261, 1996.

ROELING, T. A. P.; VEENING, J. G.; KRUK, M. R.; PETERS, J. P. W.; VERMELIS, M. E. J.; NIEUWENHUYS, R. Efferent connections of the hypothalamic "aggression area" in the rat. **Neuroscience**, v. 59, n. 4, p. 1001–1024, 1994.

ROGEL-SALAZAR, G.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C. Evaluation of the anxiolytic-like effects of clomipramine in two rat strains with different anxiety vulnerability (Wistar and Wistar-Kyoto rats). **Behavioural Pharmacology**, v. 22, n. 2, p. 136–146, 2011.

ROTH, A.; KYZAR, E. J.; CACHAT, J.; STEWART, A. M.; GREEN, J.; GAIKWAD, S.; O'LEARY, T. P.; TABAKOFF, B.; BROWN, R. E.; KALUEFF, A. V. Potential translational targets revealed by linking mouse grooming behavioral phenotypes to gene expression using public databases. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 40, n. 1, p. 312–325, 2013.

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.

ROULLET, F. I.; WOLLASTON, L.; DECATANZARO, D.; FOSTER, J. A. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. **Neuroscience**, v. 170, n. 2, p. 514–522, 2010.

RUMSEY, J. M.; RAPOPORT, J. L.; SCEERY, W. R. Autistic children as adults: psychiatric, social, and behavioral outcomes. **Journal of the American Academy of Child Psychiatry**, v. 24, n. 4, p. 465–473, 1985.

SAHA, S.; CHATTERJEE, M.; SHOM, S.; SINHA, S.; MUKHOPADHYAY, K. Functional SLC6A3 polymorphisms differentially affect autism spectrum disorder severity: a study on Indian subjects. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, n. 2, p. 397– 410, 2022.

SALISBURY, B. J.; HARE, E. H. "Ritalin" and Chlorpromazine in Chronic Schizophrenia: a Controlled Clinical Trial. **Journal of Mental Science**, v. 103, n. 433, p. 830–834, 1957.

SALMAN, T.; AFROZ, R.; NAWAZ, S.; MAHMOOD, K.; HALEEM, D. J.; ZARINA, S. Differential effects of memory enhancing and impairing doses of methylphenidate on serotonin metabolism and 5-HT1A, GABA, glutamate receptor expression in the rat prefrontal cortex. **Biochimie**, v. 191, p. 51–61, 2021.

SALMAN, T.; NAWAZ, S.; WARAICH, R. S.; HALEEM, D. J. Repeated administration of methylphenidate produces reinforcement and downregulates 5-HT-1A receptor expression in the nucleus accumbens. **Life Sciences**, v. 218, n. 12, p. 139–146, 2019.

SAMACO, R. C.; MCGRAW, C. M.; WARD, C. S.; SUN, Y.; NEUL, J. L.; ZOGHBI, H. Y. Female Mecp2+/- mice display robust behavioral deficits on two different genetic backgrounds providing a framework for pre-clinical studies. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 1, p. 96–109, 2013.

SANCHEZ, C.; BISKUP, C.; HERPERTZ, S.; GABER, T.; KUHN, C.; HOOD, S.; ZEPF, F. The Role of Serotonin (5-HT) in Behavioral Control: Findings from Animal Research and Clinical Implications. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 10, p. pyv050, 2015.

SANDHYA, T.; SOWJANYA, J.; VEERESH, B. Bacopa monniera (L.) Wettst ameliorates behavioral alterations and oxidative markers in sodium valproate induced autism in rats. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 5, p. 1121–1131, 2012.

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, 7 maio 2014.

SANDINI, T. M.; REIS-SILVA, T. M.; MOREIRA, N.; BERNARDI, M. M.; LEBRUN, I.; SPINOSA, H. de S. Effects of isoflavones on behavior, estradiol, glutamate, and GABA levels in intact middle-aged female rats. **Nutr Neurosci**., v. 22, n. 11, p. 805–816, 2018.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A.; BATTAGLIA, F.; DULAWA, S.; WEISSTAUB, N.; LEE, J.; DUMAN, R.; ARANCIO, O.; BELZUNG, C.; HEN, R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–809, 2003.

SARAFF, V.; SHAW, N. Sunshine and Vitamin D. Archives of Disease in Childhood, v. 101, n. 2, p. 190–192, 2016.

SAXENA, R.; BABADI, M.; NAMVARHAGHIGHI, H.; ROULLET, F. I. **Role of environmental factors and epigenetics in autism spectrum disorders**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., p. 17335–60, 2020.

SCATTONI, M. L.; CRAWLEY, J.; RICCERI, L. Ultrasonic vocalizations: A tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 4, p. 508–515, 2009.

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.

SCHAIN, R. J.; FREEDMAN, D. X. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. **The Journal of Pediatrics**, v. 58, n. 3, p. 315–320, 1961.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 80–9, 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, p. 36–46, 2006.

SCHNEIDER, T.; ZIÒŁKOWSKA, B.; GIERYK, A.; PRZEWŁOCKI, A. T. & R. Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic system functioning, basal hedonic tone, and emotional responses in an animal model of autism. Psychopharmacology, v. 193, n. 4, p. 547–555, 2007.

SCHRANTEE, A.; TAMMINGA, H. G. H.; BOUZIANE, C.; MARCO, A.; BRON, E. E.; MUTSAERTS, H. M. M.; AEILKO, H.; GROOTE, I. R.; ROMBOUTS, S. A. R. B.; KLEIN, S.; NIESSEN, W. J.; OPMEER, B. C.; LUCASSEN, P. J.; ANDERSEN, S. L.; GEURTS, H. M.; RENEMAN, L.; IMAGING, B.; BRAIN, A.; IMAGING, B.; ROTTERDAM, G.; IMAGING, B.; ROTTERDAM, G.; UNIVERSITAIR, L.; CENTRUM, M.; MEDICAL, A.; BASCULE, D. HHS Public Access. v. 73, n. 9, p. 955–962, 2017. SCHROER, R. J.; PHELAN, M. C.; MICHAELIS, R. C.; CRAWFORD, E. C.; SKINNER, S. A.; CUCCARO, M.; SIMENSEN, R. J.; BISHOP, J.; SKINNER, C.; FENDER, D.; STEVENSON, R. E. Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. **American Journal of Medical Genetics**, v. 76, n. 4, p. 327–336. 1998.

SCHUETZE, M.; PARK, M. T. M.; CHO, I. K.; MACMASTER, F. P.; CHAKRAVARTY, M. M. Morphological alterations in the thalamus, striatum and pallidum in Autism Spectrum Disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 11, p. 1–11, 2016.

SCHULTZ, W. Dopamine reward prediction error coding. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 23–32, 2016.

SCOTT-VAN ZEELAND, A. A.; DAPRETTO, M.; GHAHREMANI, D. G.; POLDRACK, R. A.; BOOKHEIMER, S. Y. Reward processing in autism. **Autism Research**, p. n/a-n/a, 2010.

SEEMAN, P.; LEE, T.; CHAU-WONG, M.; WONG, K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. **Nature**, v. 261, n. 5562, p. 717–719, 1976.

SEGATTO, M.; DI GIOVANNI, A.; MARINO, M.; PALLOTTINI, V. Analysis of the protein network of cholesterol homeostasis in different brain regions: An age and sex dependent perspective. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 7, p. 1561–1567, 2013.

SEGEV, A.; GVIRTS, H. Z.; STROUSE, K.; MAYSELESS, N.; GELBARD, H.; LEWIS, Y. D.; BARNEA, Y.; FEFFER, K.; SHAMAY-TSOORY, S. G.; BLOCH, Y. A possible effect of methylphenidate on state anxiety: A single dose, placebo controlled, crossover study in a control group. **Psychiatry Research**, v. 241, p. 232– 235, 2016.

SERVADIO, M.; MANDUCA, A.; MELANCIA, F.; LEBOFFE, L.; SCHIAVI, S.; CAMPOLONGO, P.; PALMERY, M.; ASCENZI, P.; DI MASI, A.; TREZZA, V. Impaired repair of DNA damage is associated with autistic-like traits in rats prenatally exposed to valproic acid. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 85– 96, 2018.

SERVADIO, M.; MELANCIA, F.; MANDUCA, A.; DI MASI, A.; SCHIAVI, S.; CARTOCCI, V.; PALLOTTINI, V.; CAMPOLONGO, P.; ASCENZI, P.; TREZZA, V. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Nature Publishing Group**, v. 6, p. 902, 2016.

SERVADIO, M.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; TREZZA, V. Modeling autismrelevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do "autistic" rodents exist? **Behavioural pharmacology**, v. 26, n. 6, p. 522–540, 2015.

SHAMSI MEYMANDI, M.; SEPEHRI, G.; MOSLEMIZADEH, A.; VAKILI SHAHRBABAKI, S. S.; BASHIRI, H. Prenatal pregabalin is associated with sexdependent alterations in some behavioral parameters in valproic acid-induced autism in rat offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 80, n. 6, p. 500–511, 2020.

SHENOUDA, J.; BARRETT, E.; DAVIDOW, A. L.; HALPERIN, W.; SILENZIO, V. M. B.; ZAHORODNY, W. Prevalence of autism spectrum disorder in a large, diverse metropolitan area: Variation by sociodemographic factors. **Autism Research**, v. 15, n. 1, p. 146–155, 2022.

SHIMADA, K.; FUJIKAWA, K.; YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative Properties of Xanthan on the Autoxidation of Soybean Oil in Cyclodextrin Emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 6, p. 945–948, 1992.

SILVEIRA, L. F. G.; TRARBACH, E. B.; LATRONICO, A. C. Genetics basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 324, n. 1–2, p. 30–38, 2010.

SILVERMAN, J. L.; TOLU, S. S.; BARKAN, C. L.; CRAWLEY, J. N. Repetitive Self-Grooming Behavior in the BTBR Mouse Model of Autism is Blocked by the mGluR5 Antagonist MPEP. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 976–989, 2009.

SIMONOFF, E.; PICKLES, A.; CHARMAN, T.; CHANDLER, S.; LOUCAS, T.; BAIRD, G. Psychiatric Disorders in Children With Autism Spectrum Disorders: Prevalence, Comorbidity, and Associated Factors in a Population-Derived Sample. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, v. 47, n. 8, p. 921–929, 1 ago. 2008.

SIRACUSANO, M.; RICCIONI, A.; ABATE, R.; BENVENUTO, A.; CURATOLO, P.; MAZZONE, L. Vitamin D Deficiency and Autism Spectrum Disorder. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 21, p. 2460–2474, 2020.

SODA, T.; MAPELLI, L.; LOCATELLI, F.; BOTTA, L.; GOLDFARB, M.; PRESTORI, F.; D'ANGELO, E. U. Erratum: Hyperexcitability and hyperplasticity disrupt cerebellar signal transfer in the ib2 ko mouse model of autism (2383-2397) **Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 35, p. 7029, 2019.

SOLANTO, M. V. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: A review and integration. **Behavioural Brain Research**, v. 94, n. 1, p. 127–152, 1998.

SONG, C.; BERRIDGE, K. C.; KALUEFF, A. V. "Stressing" rodent self-grooming for neuroscience research. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 591, 2016.

SONUGA-BARKE, E. J. S. The dual pathway model of AD/HD: an elaboration of neuro-developmental characteristics. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 27, n. 7, p. 593–604, nov. 2003.

SPAIN, D.; ZIVRALI YARAR, E.; HAPPÉ, F. Social anxiety in adults with autism: a qualitative study. **International Journal of Qualitative Studies on Health and Well-being**, v. 15, n. 1, 2020.

SPRUIJT, B. M.; DE GRAAN, P. N. E.; EBERLE, A. N.; GISPEN, W. H. Comparison of structural requirements of α -MSH and ACTH for inducing excessive grooming and pigment dispersion. **Peptides**, v. 6, n. 6, p. 1185–1189, 1985.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological reviews**, v. 72, n. 3, p. 825–852, 1992.

SRINATH, S.; KUTTY, B. M.; ANSHU, K.; LAXMI, T. R.; KUMARESAN, U. D.; NAIR, A. K. Altered attentional processing in male and female rats in a prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. **Autism Research**, v. 10, n. 12, p. 1929–1944, 2017.

STEEB, H.; RAMSEY, J. M.; GUEST, P. C.; STOCKI, P.; COOPER, J. D.; RAHMOUNE, H.; INGUDOMNUKUL, E.; AUYEUNG, B.; RUTA, L.; BARON-COHEN, S.; BAHN, S. Serum proteomic analysis identifies sex-specific differences in lipid metabolism and inflammation profiles in adults diagnosed with Asperger syndrome. Molecular Autism, v. 5, n. 1, p. 4, 27 dez. 2014.

ŠTEFÁNIK, P.; OLEXOVÁ, L.; KRŠKOVÁ, L. Increased sociability and gene expression of oxytocin and its receptor in the brains of rats affected prenatally by valproic acid. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 131, p. 42–50, 2015.

STEINHARDT, R. A.; BI, G.; ALDERTON, J. M. Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. **Science**, v. 263, n. 5145, p. 390–393, 1994.

STORM, E. E.; TECOTT, L. H. Social circuits: Peptidergic regulation of mammalian social behavior. **Neuron**, v. 47, n. 4, p. 483–486, 2005.

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.

SUN, W.; POSCHMANN, J.; CRUZ-HERRERA DEL ROSARIO, R.; PARIKSHAK, N. N.; HAJAN, H. S.; KUMAR, V.; RAMASAMY, R.; BELGARD, T. G.; ELANGGOVAN, B.; WONG, C. C. Y.; MILL, J.; GESCHWIND, D. H.; PRABHAKAR, S. Histone Acetylome-wide Association Study of Autism Spectrum Disorder. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1385-1397.e11, 2016.

SURGET, A.; BELZUNG, C. Involvement of vasopressin in affective disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, n. 2–3, p. 340–349, 2008. SWAAB, D. F. Neuropeptides in Hypothalamic Neuronal Disorders. *In*: [s.l: s.n.]p. 305–375.

SWANSON, J.; GUPTA, S.; GUINTA, D.; FLYNN, D.; AGLER, D.; LERNER, M.; WILLIAMS, L.; SHOULSON, I.; WIGAL, S. Acute tolerance to methylphenidate in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 66, n. 3, p. 295–305, 1999.

SWANSON, J.; GUPTA, S.; LAM, A.; SHOULSON, I.; LERNER, M.; MODI, N.; LINDEMULDER, E.; WIGAL, S. Development of a new once-a-day formulation of methylphenidate for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: Proof-ofconcept and proof-of-product studies. **Archives of General Psychiatry**, v. 60, n. 2, p. 204–211, 2003.

SWEENEY, J. A.; SCHOLKMANN, F.; ZÜRICH, H.; WANG, S. Z.; BRIDGEMOHAN, C.; COCHRAN, D. M.; HOWE, Y. J.; PAWLOWSKI, K.; ZIMMERMAN, A. W.;

ANDERSON, G. M.; CHOUEIRI, R.; SICES, L.; MILLER, K. J.; ULTMANN, M.; HELT, J.; FORBES, P. W.; FARFEL, L.; BREWSTER, S. J.; FRAZIER, J. A.; NEUMEYER, A. M. Investigating Potential Biomarkers in Autism Spectrum Disorder on behalf of the Autism Consortium Biomarkers Study Clinicians Investigating Potential Biomarkers in Autism. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 1, 2019.

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, 2012.

TAKUMI, T.; TAMADA, K.; HATANAKA, F.; NAKAI, N.; BOLTON, P. F. Behavioral neuroscience of autism. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 110, n. 5, p. 60–76, 2020.

TARTAGLIONE, A. M.; CIPRIANI, C.; CHIAROTTI, F.; PERRONE, B.; BALESTRIERI, E.; MATTEUCCI, C.; SINIBALDI-VALLEBONA, P.; CALAMANDREI, G.; RICCERI, L. Early Behavioral Alterations and Increased Expression of Endogenous Retroviruses Are Inherited Across Generations in Mice Prenatally Exposed to Valproic Acid. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 5, p. 3736–3750, 2019.

TARTAGLIONE, A. M.; SCHIAVI, S.; CALAMANDREI, G.; TREZZA, V. Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. **Neuropharmacology**, v. 159, n. October 2018, p. 107477, 2019b.

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. 908–19, 1995.

TAYLOR, L. J.; EAPEN, V.; MAYBERY, M. T.; MIDFORD, S.; PAYNTER, J.; QUARMBY, L.; SMITH, T.; WILLIAMS, K.; WHITEHOUSE, A. J. O. Diagnostic evaluation for autism spectrum disorder: a survey of health professionals in Australia. **BMJ Open**, v. 6, n. 9, p. e012517, 2016.

TEISSIER, A.; SOIZA-REILLY, M.; GASPAR, P. Refining the role of 5-HT in postnatal development of brain circuits. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. May, p. 1–9, 2017.

TEODOROV, E.; BERNARDI, M. M.; FERRARI, M. F. R.; FIOR-CHADI, D. R.; FELICIO, L. F. Plasticity of opioid receptors in the female periaqueductal gray: Multiparity-induced increase in the activity of genes encoding for Mu and Kappa receptors and a post-translational decrease in Delta receptor expression. **Journal of** Molecular Neuroscience, v. 43, n. 2, p. 175–181, 2011.

THESLEFF, S.; QUASTEL, D. M. J. Neuromuscular Pharmacology. **Annual Review** of **Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 263–284, 1965.

THOR, D. H.; HOLLOWAY, W. R. Social play in juvenile rats: A decade of methodological and experimental research. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 8, n. 4, p. 455–464, 1984.

THORNTON, A. M.; HUMPHREY, R. M.; KERR, D. M.; FINN, D. P.; ROCHE, M. Increasing endocannabinoid tone alters anxiety-like and stress coping behaviour in female rats prenatally exposed to valproic acid. **Molecules**, v. 26, n. 12, 2021.

THORNTON, I. M. Out of time: A possible link between mirror neurons, autism and electromagnetic radiation. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 2, p. 378–382, 2006.

THYE, M. D.; BEDNARZ, H. M.; HERRINGSHAW, A. J.; SARTIN, E. B.; KANA, R. K. The impact of atypical sensory processing on social impairments in autism spectrum disorder. **Developmental Cognitive Neuroscience**, v. 29, n. September 2016, p. 151–167, 2018.

TOMA, C.; HERVÁS, A.; BALMAÑA, N.; SALGADO, M.; MARISTANY, M.; VILELLA, E.; AGUILERA, F.; OREJUELA, C.; CUSCÓ, I.; GALLASTEGUI, F.; PÉREZ-JURADO, L. A.; CABALLERO-ANDALUZ, R.; DIEGO-OTERO, Y. De; GUZMÁN-ALVAREZ, G.; RAMOS-QUIROGA, J. A.; RIBASÉS, M.; BAYÉS, M.; CORMAND, B. Neurotransmitter systems and neurotrophic factors in autism: association study of 37 genes suggests involvement of DDC, **World J Biol Psychiatry**. v. 14, n. 7, p. 516–527, 2013.

TOMASI, D.; WANG, G.-J.; STUDENTSOVA, Y.; VOLKOW, N. D. Dissecting Neural Responses to Temporal Prediction, Attention, and Memory: Effects of Reward Learning and Interoception on Time Perception. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 10, p. 3856–3867, 2015.

TORDJMAN, S.; NAJJAR, I.; BELLISSANT, E.; ANDERSON, G. M.; BARBUROTH, M.; COHEN, D.; JAAFARI, N.; SCHISCHMANOFF, O.; FAGARD, R.; LAGDAS, E.; KERMARREC, S.; RIBARDIERE, S.; BOTBOL, M.; FOUGEROU, C.; BRONSARD, G.; VERNAY-LECONTE, J. Advances in the research of melatonin in autism spectrum disorders: Literature review and new perspectives. **Int J Mol Sci**. v. 14, n. 10, p. 20508–20542, 2013. 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. 266–74, 2013.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P. J. J.; VANDERSCHUREN, L. J. M. J. The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 10, p. 463–469, 2010.

TROBIANI, L.; FAVALORO, F. L.; DI CASTRO, M. A.; DI MATTIA, M.; CARIELLO, M.; MIRANDA, E.; CANTERINI, S.; DE STEFANO, M. E.; COMOLETTI, D.; LIMATOLA, C.; DE JACO, A. UPR activation specifically modulates glutamate neurotransmission in the cerebellum of a mouse model of autism. **Neurobiology of Disease**, v. 120, n. 5, p. 139–150, 2018.

TSUJI, C.; FUJISAKU, T.; TSUJI, T. Oxytocin ameliorates maternal separationinduced ultrasonic vocalisation calls in mouse pups prenatally exposed to valproic acid. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 32, n. 4, p. 1–9, 2020.

TUNG, E. W. Y.; WINN, L. M. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 248, n. 3, p. 201–209, 2010.

TYZIO, R.; COSSART, R.; KHALILOV, I.; MINLEBAEV, M.; HÜBNER, C. A.; REPRESA, A.; BEN-ARI, Y.; KHAZIPOV, R. Maternal Oxytocin Triggers a Transient Inhibitory Switch in GABA Signaling in the Fetal Brain During Delivery. **Science**, v. 314, n. 5806, p. 1788–1792, 2006.

UDENFRIEND, S.; WYNGAARDEN, J. B. Precursors of adrenal epinephrine and norepinephrine in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 20, p. 48–52, 1956.

UNG, D.; WOOD, J. J.; EHRENREICH-MAY, J.; ARNOLD, E. B.; FUJI, C.; RENNO, P.; MURPHY, T. K.; LEWIN, A. B.; MUTCH, P. J.; STORCH, E. A. Spectrum Disorder and Anxiety. **Neuropsychiatry (London)**, v. 3, n. 2, p. 1–15, 2014.

URBANO, M.; OKWARA, L.; MANSER, P.; HARTMANN, K.; HERNDON, A.; DEUTSCH, S. I. A trial of D-cycloserine to treat stereotypies in older adolescents and young adults with autism spectrum disorder. **Clinical Neuropharmacology**, v. 37, n. 3, p. 69–72, 2014.

VAN DEN EEDEN, S. K.; TANNER, C. M.; BERNSTEIN, A. L.; FROSS, R. D.;

BLOCH, D. A.; NELSON, L. M. Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, n. 11, p. 1015–1022, 2003.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; ACHTERBERG, E. J. M.; TREZZA, V. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 70, p. 86–105, 2016.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; SCHMIDT, E. D.; DE VRIES, T. J.; VAN MOORSEL, C. A. P.; TILDERS, F. J. H.; SCHOFFELMEER, A. N. M. A Single Exposure to Amphetamine Is Sufficient to Induce Long-Term Behavioral, Neuroendocrine, and Neurochemical Sensitization in Rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 21, p. 9579–9586, 1999.

VEENSTRA-VANDERWEELE, J.; COOK, E. H. Molecular genetics of autism spectrum disorder. **Molecular psychiatry**, v. 9, n. 9, p. 819–32, 2004.

VENDRUSCOLO, L. F.; IZÍDIO, G. S.; TAKAHASHI, R. N.; RAMOS, A. Chronic methylphenidate treatment during adolescence increases anxiety-related behaviors and ethanol drinking in adult spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 21–27, 2008.

VENERO, J. L.; MACHADO, A.; CANO, J. Turnover of Dopamine and Serotonin and Their Metabolites in the Striatum of Aged Rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 56, n. 6, p. 1940–1948, 1991.

VENKATARAMAN, S.; CLAUSSEN, C.; DAFNY, N. D1 and D2 specific dopamine antagonist modulate the caudate nucleus neuronal responses to chronic methylphenidate exposure. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 2, p. 159–170, 2017.

VINKHUYZEN, A. A. E.; EYLES, D. W.; BURNE, T. H. J.; BLANKEN, L. M. E.; KRUITHOF, C. J.; VERHULST, F.; JADDOE, V. W.; TIEMEIER, H.; MCGRATH, J. J. Gestational Vitamin D deficiency and autism-related traits: The Generation R Study. **Molecular Psychiatry**, v. 23, n. 2, p. 240–246, 2018.

VINTEN, J.; ADAB, N.; KINI, U.; GORRY, J.; GREGG, J.; BAKER, G. A. Neuropsychological effects of exposure to anticonvulsant medication in utero. **Neurology**, v. 64, n. 6, p. 949–954, 2005.

VITIELLO, B.; SEVERE, J. B.; GREENHILL, L. L.; ARNOLD, L. E.; ABIKOFF, H. B.;

BUKSTEIN, O. G.; ELLIOTT, G. R.; HECHTMAN, L.; JENSEN, P. S.; HINSHAW, S. P.; MARCH, J. S.; NEWCORN, J. H.; SWANSON, J. M.; CANTWELL, D. P. Methylphenidate Dosage for Children With ADHD Over Time Under Controlled Conditions: Lessons From the MTA. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, v. 40, n. 2, p. 188–196, 2001.

VOLKOW, N. D.; DING, Y. S.; FOWLER, J. S.; WANG, G. J.; LOGAN, J.; GATLEY, J. S.; DEWEY, S.; ASHBY, C.; LIEBERMANN, J.; HITZEMANN, R.; WOLF, A. P. Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. **Archives of general psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 456–463, 1995.

VOLKOW, N. D.; WANG, G.-J.; FOWLER, J. S.; FISCHMAN, M.; FOLTIN, R.; ABUMRAD, N. N.; GATLEY, S. J.; LOGAN, J.; WONG, C.; GIFFORD, A.; DING, Y.-S.; HITZEMANN, R.; PAPPAS, N. Methylphenidate and cocaine have a similar in vivo potency to block dopamine transporters in the human brain. **Life Sciences**, v. 65, n. 1, p. PL7–PL12, 1999.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; FOWLER, J. S.; GATLEY, S. J.; LOGAN, J.; DING, Y. S.; HITZEMANN, R.; PAPPAS, N. Dopamine transporter occupancies in the human brain induced by therapeutic doses of oral methylphenidate. **American Journal of Psychiatry**, v. 155, n. 10, p. 1325–1331, 1998.

VOLKOW, N. D.; WANG, G. J.; FOWLER, J. S.; HITZEMANN, R.; ANGRIST, B.; GATLEY, S. J.; LOGAN, J.; DING, Y. S.; PAPPAS, N. Association of methylphenidate-induced craving with changes in right striato-orbitofrontal metabolism in cocaine abusers: Implications in addiction. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 1, p. 19–26, 1999b.

WAHLSTROM, D.; COLLINS, P.; WHITE, T.; LUCIANA, M. Developmental changes in dopamine neurotransmission in adolescence: Behavioral implications and issues in assessment. **Brain and Cognition**, v. 72, n. 1, p. 146–159, 2010.

WAHLSTROM, D.; WHITE, T.; LUCIANA, M. Neurobehavioral evidence for changes in dopamine system activity during adolescence. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 34, n. 5, p. 631–648, abr. 2010.

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, 2008a.

WALTHER, D. J.; PETER, J.-U.; BASHAMMAKH, S.; HÖRTNAGL, H.; VOITS, M.; FINK, H.; BADER, M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science (New York, N.Y.)**, v. 299, n. 5603, p. 76, 2003.

WAMSLEY, J. K.; GEHLERT, D. R.; FILLOUX, F. M.; DAWSON, T. M. Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 2, n. 3, p. 119–37, 1989.

WANG, R.; HAUSKNECHT, K.; SHEN, R. Y.; HAJ-DAHMANE, S. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission onto dorsal raphe serotonergic neurons in the valproic acid model of autism, **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 1185, 2018a.

WANG, R.; TAN, J.; GUO, J.; ZHENG, Y.; HAN, Q.; SO, K. F.; YU, J.; ZHANG, L. Aberrant development and synaptic transmission of cerebellar cortex in a VPA induced mouse autism model. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. 12, p. 1–13, 2018b.

WANG, Z.; DING, R.; WANG, J. The Association between Vitamin D Status and Autism. **Nutrients.** v. 13, n. 1, p. 86, 2021.

WEINSHILBOUM, R.; AXELROD, J. Serum Dopamine-Beta-Hydroxylase Activity. **Circulation Research**, v. 28, n. 3, p. 307–315, 1971.

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. 430–9, 2015.

WEISSMAN, M. M.; BLAND, R. C.; CANINO, G. J.; FARAVELLI, C.; GREENWALD, S.; HWU, H. G.; JOYCE, P. R.; KARAM, E. G.; LEE, C. K.; LELLOUCH, J.; LÉPINE, J. P.; NEWMAN, S. C.; RUBIO-STIPEC, M.; WELLS, J. E.; WICKRAMARATNE, P. J.; WITTCHEN, H.; YEH, E. K. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. **JAMA**, v. 276, n. 4, p. 293–9, 1986.

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.

WENTHUR, C. J. Classics in Chemical Neuroscience: Methylphenidate. **ACS** Chemical Neuroscience, v. 7, n. 8, p. 1030–1040, 17 ago. 2016.

WERLING, D. M.; GESCHWIND, D. H. Sex differences in autism spectrum disorders. **Current Opinion in Neurology**, v. 26, n. 2, p. 146–153, 2013.

WEST, L.; WALDROP, J.; BRUNSSEN, S. Pharmacologic Treatment for the Core Deficits and Associated Symptoms of Autism in Children. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 23, n. 2, p. 75–89, 2009.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 479–485, 2001.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: A role in autism? **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 75–83, 2005.

WHITE, F. J.; KALIVAS, P. W. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 51, n. 1–2, p. 141–153, 1998.

WHITE, S. W.; SIMMONS, G. L.; GOTHAM, K. O.; CONNER, C. M.; SMITH, I. C.; BECK, K. B.; MAZEFSKY, C. A. Psychosocial Treatments Targeting Anxiety and Depression in Adolescents and Adults on the Autism Spectrum: Review of the Latest Research and Recommended Future Directions. **Current Psychiatry Reports**, v. 20, n. 10, 2018.

WILENS, T. E.; BIEDERMAN, J.; MICK, E.; FARAONE, S. V.; SPENCER, T. Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is Associated with Early Onset Substance Use Disorders. **The Journal of Nervous & amp Mental Disease**, v. 185, n. 8, p. 475–482, 1997.

WILLEMSEN-SWINKELS, S. H. N. Failure of Naltrexone Hydrochloride to Reduce Self-Injurious and Autistic Behavior in Mentally Retarded Adults. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, n. 9, p. 766, 1 1995.

WILLIAMS, J. Working toward a neurobiological account of ADHD: Commentary on Gail Tripp and Jeff Wickens, Dopamine transfer deficit. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 49, n. 7, p. 705–711, 2008.

WILLIAMS, J. H. G.; WAITER, G. D.; GILCHRIST, A.; PERRETT, D. I.; MURRAY, A. D.; WHITEN, A. Neural mechanisms of imitation and "mirror neuron" functioning in autistic spectrum disorder. **Neuropsychologia**, v. 44, n. 4, p. 610–621, 2006.

WILLIAMS, O. O. F.; COPPOLINO, M.; PERREAULT, M. L. Sex differences in neuronal systems function and behaviour: beyond a single diagnosis in autism spectrum disorders. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021a.

WILLIAMS, P. G.; HERSH, J. H. A male with fetal valproate syndrome and autism. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 39, n. 9, p. 632–634, 29, 2008.

WINTER, S. L.; KRIEL, R. L.; NOVACHECK, T. F.; LUXENBERG, M. G.; LEUTGEB, V. J.; ERICKSON, P. A. Perioperative blood loss: The effect of valproate. **Pediatric Neurology**, v. 15, n. 1, p. 19–22, 1996.

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, 2008.

WOLF, M. E. The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. **Progress in Neurobiology**, v. 54, n. 6, p. 679–720, 1998.

WOOLLEY, C.; MCEWEN, B. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat [published erratum appears in J Neurosci 1992 Oct;12(10):following table of contents]. **The Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 2549–2554, 1992.

WORBE, Y.; PALMINTERI, S.; SAVULICH, G.; DAW, N. D.; FERNANDEZ-EGEA, E.; ROBBINS, T. W.; VOON, V. Valence-dependent influence of serotonin depletion on model-based choice strategy. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 5, p. 624–629, 2016.

WU, J.; DAI, Y. C.; LAN, X. Y.; ZHANG, H. F.; BAI, S. Z.; HU, Y.; HAN, S. P.; HAN, J. S.; ZHANG, R. Postnatal AVP treatments prevent social deficit in adolescence of valproic acid-induced rat autism model. **Peptides**, v. 137, n. 1, p. 170493, 2021.

WU, M.; BRUDZYNSKI, S. M.; MOGENSON, G. J. Functional interaction of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens in the regulation of locomotion, v. 71, n. 5–6, p. 407–413, 2011.

WURTMAN, R. J.; FERNSTROM, J. D. Control of brain neurotransmitter synthesis by precursor availability and nutritional state. **Biochemical Pharmacology**, v. 25, n. 15, p. 1691–1696, 1976.

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

YAMASUE, H.; OKADA, T.; MUNESUE, T.; KURODA, M.; FUJIOKA, T.; UNO, Y.; MATSUMOTO, K.; KUWABARA, H.; MORI, D.; OKAMOTO, Y.; YOSHIMURA, Y.; KAWAKUBO, Y.; ARIOKA, Y.; KOJIMA, M.; YUHI, T.; OWADA, K.; YASSIN, W.; KUSHIMA, I.; BENNER, S.; OGAWA, N.; ERIGUCHI, Y.; KAWANO, N.; UEMURA, Y.; YAMAMOTO, M.; KANO, Y.; KASAI, K.; HIGASHIDA, H.; OZAKI, N.; KOSAKA, H. Effect of intranasal oxytocin on the core social symptoms of autism spectrum disorder: a randomized clinical trial. **Molecular Psychiatry**, v. 25, n. 8, p. 1849– 1858, 2020.

YANG, C. J.; TAN, H. P.; DU, Y. J. The developmental disruptions of serotonin signaling may involved in autism during early brain development. **Neuroscience**, v. 267, p. 1–10, 2014.

YANG, M.; ZHODZISHSKY, V.; CRAWLEY, J. N. Social deficits in BTBR T + tf /J mice are unchanged by cross-fostering with C57BL/6J mothers. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 8, p. 515–521, 2007.

YANG, P. B.; AMINI, B.; SWANN, A. C.; DAFNY, N. Strain differences in the behavioral responses of male rats to chronically administered methylphenidate. **Brain Research**, v. 971, n. 2, p. 139–152, 2003.

YANG, P. B.; SWANN, A. C.; DAFNY, N. Acute and chronic methylphenidate doseresponse assessment on three adolescent male rat strains. **Brain Research Bulletin**, v. 71, n. 1–3, p. 301–310, 2006.

YANG, T.; XIAO, T.; SUN, Q.; WANG, K. The current agonists and positive allosteric modulators of α7 nAChR for CNS indications in clinical trials. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 6, p. 611–622, 2017.

YANO, M.; BEVERLEY, J. A.; STEINER, H. Inhibition of methylphenidate-induced gene expression in the striatum by local blockade of D1 dopamine receptors: Interhemispheric effects. **Neuroscience**, v. 140, n. 2, p. 699–709, 2006.

YANO, M.; STEINER, H. Methylphenidate (Ritalin) induces Homer 1a and zif 268 expression in specific corticostriatal circuits. **Neuroscience**, v. 132, n. 3, p. 855–865, 2005a.

YANO, M.; STEINER, H. Topography of methylphenidate (Ritalin)-induced gene regulation in the striatum: Differential on c-Fos, substance P and opioid peptides. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 5, p. 901–915, 2005b.

YANO, M.; STEINER, H. Methylphenidate and cocaine: the same effects on gene regulation? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 11, p. 588–596, 2007.

YARLAGADDA, A.; ACHARYA, G.; KASARANENI, J.; HAMPE, C. S.; CLAYTON, A. H. Placental barrier and autism spectrum disorders: The roles of prolactin and dopamine in the developing fetal brain—part II. **Innovations in Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 11–12, p. 36–39, 2019.

YIZHAR, O.; FENNO, L. E.; PRIGGE, M.; SCHNEIDER, F.; DAVIDSON, T. J.; OGSHEA, D. J.; SOHAL, V. S.; GOSHEN, I.; FINKELSTEIN, J.; PAZ, J. T.; STEHFEST, K.; FUDIM, R.; RAMAKRISHNAN, C.; HUGUENARD, J. R.; HEGEMANN, P.; DEISSEROTH, K. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. **Nature**, v. 477, n. 7363, p. 171–178, 2011.

YOO, H. J.; CHO, I. H.; PARK, M.; YANG, S. Y.; KIM, S. A. Family based association of GRIN2A and GRIN2B with Korean autism spectrum disorders. **Neuroscience** Letters, v. 512, n. 2, p. 89–93, 2012.

YOUNG, H.; OREVE, M. J.; SPERANZA, M. Clinical characteristics and problems diagnosing autism spectrum disorder in girls. **Archives de Pediatrie**, v. 25, n. 6, p. 399–403, 2018.

ZABLOTSKY, B.; BLACK, L. I.; MAENNER, M. J.; SCHIEVE, L. A.; BLUMBERG, S. J. Estimated prevalence of autism and other developmental disabilities following questionnaire changes in the 2014 national health interview survey. **National Health Statistics Reports**, v. 2015, n. 87, 2015.

ZAMBERLETTI, E.; GABAGLIO, M.; WOOLLEY-ROBERTS, M.; BINGHAM, S.; RUBINO, T.; PAROLARO, D. Cannabidivarin Treatment Ameliorates Autism-Like Behaviors and Restores Hippocampal Endocannabinoid System and Glia Alterations Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rats. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, n. August, p. 1–15, 2019. ZHANG, R.; ZHOU, J.; REN, J.; SUN, S.; DI, Y.; WANG, H.; AN, X.; ZHANG, K.; ZHANG, J.; QIAN, Z.; SHI, M.; QIAO, Y.; REN, W.; TIAN, Y. Transcriptional and splicing dysregulation in the prefrontal cortex in valproic acid rat model of autism. **Reproductive Toxicology**, v. 77, p. 53–61, 2018.

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. 1409–19, 2012.

ZHENG, F.; KASPER, L. H.; BEDFORD, D. C.; LERACH, S.; TEUBNER, B. J. W.; BRINDLE, P. K. Mutation of the CH1 domain in the histone acetyltransferase CREBBP results in autism-relevant behaviors in mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1– 18, 2016.

ZIPPERLY, M. E.; SULTAN, F. A.; GRAHAM, G. E.; BRANE, A. C.; SIMPKINS, N. A.; CARULLO, N. V. N.; IANOV, L.; DAY, J. J. Regulation of dopamine-dependent transcription and cocaine action by Gadd45b. **Neuropsychopharmacology**, v. 46, n. 4, p. 709–720, 2021.