

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

KARLA CRISTINNE MANCINI COSTA

**Avaliação dos efeitos do canabidiol sobre as consequências comportamentais induzidas
pelo tratamento com o ácido valproico durante o período embrionário do zebrafish**

Ribeirão Preto

2023

KARLA CRISTINNE MANCINI COSTA

Avaliação dos efeitos do canabidiol sobre as consequências comportamentais induzidas pelo tratamento com o ácido valproico durante o período embrionário do zebrafish

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na biblioteca da unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Aline Cristina de Campos

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Costa, Karla Cristinne Mancini

Avaliação dos efeitos do canabidiol sobre as consequências comportamentais induzidas pelo tratamento com o ácido valproico durante o período embrionário do zebrafish. Ribeirão Preto, 2023.

159 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Campos, Alline Cristina de.

1. Neurodesenvolvimento. 2. Transtorno do Espectro Autista. 3. Canabidiol. 4. Risperidona. 5. Zebrafish.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: COSTA, Karla Cristinne Mancini

Título: Avaliação dos efeitos do canabidiol sobre as consequências comportamentais induzidas pelo tratamento com o ácido valproico durante o período embrionário do zebrafish

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do grau de Doutora em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____/____/2023

Banca examinadora

Presidente: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 1: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 2: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 3: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho a Deus!

O Seu amor cobre as minhas fraquezas e a Sua fidelidade é maior do que todos os obstáculos na minha vida!

À minha família,
meus pais Oswaldo e Helena, meus irmãos
Paula e Kaio, por sempre me incentivarem a
seguir em frente e fazerem de meus sonhos, os
seus. Sem vocês, nada disso seria possível!

À Lucilene, Gabriel, Guilherme, Beatriz,
Lécio, Rosângela, Breno, Ivone e Afonso, por
terem me acolhido com tanto carinho e por todo
o apoio.

Ao Gustavo,
que sempre esteve ao meu lado, não deixando
que minhas inseguranças fossem mais fortes
que meus sonhos! Obrigada pelo cuidado,
amor, cumplicidade e pelos bons momentos.

À Alline,

pelo acolhimento e por toda confiança em todo o meu processo de formação. Nunca vou me esquecer da oportunidade que me permitiu reafirmar a ciência como uma paixão. Obrigada por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, pelos desafios, pela paciência e dedicação em tornar possível a realização deste trabalho. É uma honra imensurável ter sido sua aluna! Seu brilhantismo profissional é inspirador. A você, minha eterna gratidão e respeito.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus pensamentos e por toda proteção ao longo dessa caminhada.

À minha família, pelo amor incondicional. Vocês são minha base!

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que possibilitou a continuidade da minha trajetória profissional na busca por novos horizontes.

À minha orientadora Prof^a Alline Cristina de Campos. Obrigada pela confiança, por apoiar minhas ideias, pelo incentivo e disponibilidade. A oportunidade de trabalhar ao seu lado foi um dos melhores presentes que a Ciência me proporcionou. Obrigada por tanto!

À minha coorientadora Prof^a Danielle Palma de Oliveira, por todo suporte ao longo da realização deste trabalho, fornecendo-nos o acesso ao zebrafish, modelo que conquistou meu coração! Obrigada pela acolhida em seu laboratório e por todo apoio.

Ao Prof. Francisco Silveira Guimarães, pelos ensinamentos científicos, por dividir suas experiências culturais e por sempre nos abrir as portas de seu laboratório. Sua contribuição foi muito importante para a realização deste trabalho!

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia da (Neuro)Plasticidade, que desde o primeiro dia me acolheram com tanto carinho e respeito. Aos que já estiveram no laboratório: Eduardo, Jordan, Mariana, Paula, Rafael, Erika, Vinícius, Giu, Fernanda, Murilo, Gabriel, Isabela, Ju Silva e Luísa, agradeço imensamente pelos conhecimentos e momentos compartilhados. Aos que estão atualmente no laboratório: Rafael (Rafq), Davi (Pacu), Franciele (Fran), Pedro, Maria José (Zezé), Maria Adrielle (Dri), Tamires, Lucas, Melissa, Fábio, Bárbara, Bianca, Ju Bueno, Matheus, Lucas (Roger), Diego e Bruno. Muito obrigada pela vivência diária, por toda ajuda nos muitos experimentos realizados, por não terem desistido de mim em nenhum segundo e por me reerguerem nos momentos difíceis. Não tenho palavras suficientes para demonstrar tamanha gratidão e apreço que tenho por todos e cada um de vocês que fizeram/fazem parte dessa família!

Ao eterno e maravilhoso *Team Peixe*: Pós-doc Rafq, Doutorando Pacu, Doutoranda Fran, Mestre Isa e Doutorando Pedro. Sou imensamente grata por ter tido a oportunidade de conhecer vocês e por tê-los como amigos! Só tenho a agradecer por tudo que fizeram por mim, tanto na parte profissional, quanto pessoal. Vocês foram luz em tantos momentos de ansiedade e desespero. Obrigada por aceitarem minhas maluquices, por passarem vergonha alheia comigo, pelas tardes de *shopping* regadas a muita risada e café (como isso me faz falta!), pelos passeios em busca dos melhores perfumes, pelos rolês no supermercado, pelos dias, noites e às vezes madrugadas fazendo experimentos (comemorando cada etapa concluída com os melhores donuts, rs), por serem essas pessoas incríveis! Foi uma honra ter trabalhado ao lado de amigos, os quais levarei no coração para sempre. Sem vocês nada disso seria possível!

Às maravilhosas amigas e Pós-docs Zezé e Dri. Vocês são anjos na minha vida! Os abraços que me acalmavam e me acolhiam. As palavras e gestos mais doces que alegravam meus dias. Obrigada por todos os momentos compartilhados, pelas noites animadas de imuno com as melhores *playlists*, por toda ajuda em meus experimentos, por tudo que me ensinaram profissionalmente e pessoalmente. Vocês foram, são e sempre serão parte essencial na minha caminhada!

À maravilhosa Pós-doc Tamires. Obrigada demais pela parceria e por sempre se fazer disponível em me ajudar nos experimentos! Seu apoio e conhecimentos foram essenciais na execução desse trabalho. Obrigada pelas risadas durante as longas noites/madrugadas de protocolo experimental. Obrigada por me apresentar o mundo do zebrafish e por ensinar tanto! Você é uma amiga querida, parceira de UNIFAL/Alfenas, a qual levarei para sempre no coração.

Ao querido amigo Gabriel, hoje aluno de Pós-doutorado na UFRJ. Gabs, só tenho a te agradecer por tudo! Obrigada por compartilhar seu brilhantismo, por sua linda amizade (que se mantém independente da distância), pela ajuda nos experimentos, pelos rolês ao McDonald's, por todo seu carinho e disposição em todos os momentos! Nossas risadas me ajudaram a continuar seguindo em frente.

Aos amigos (alunos e técnicos) do Laboratório EcoHumanTox, por todo auxílio e disponibilidade! Klaus, Soninha, Flavia, Andreia, Lucas, Taísa, Carolina e Bianca, obrigada pela acolhida, pela ajuda nos experimentos, por dividirem as reproduções do zebrafish, pelas

conversas, risadas e cafezinhos da tarde compartilhados (Soninha alegrando nossos dias com o melhor pão de queijo e sobremesas do universo)!

Aos meus amigos de Minas Gerais, que mesmo distantes se fizeram presentes em todos os momentos, me ajudando e apoiando!

Ao apoio técnico, ensinamentos e contribuição fornecidos pelas técnicas Giuliana, Eleni e Diva ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Multifoton (LMMM), especialmente, à técnica Roberta Rosales, pela disponibilidade e por todo auxílio na aquisição das imagens de imunofluorescência apresentados em nosso trabalho.

Aos funcionários Gislaine e Ramon. Muito obrigada pela disponibilidade e eficiência em me auxiliar sempre que necessário. Vocês nos salvam!

A todos os funcionários e professores do Departamento de Farmacologia que me auxiliaram com comentários e sugestões científicas enriquecedoras.

Aos membros da Banca, pela disponibilidade, dedicação e contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

" É preciso a certeza de que tudo vai mudar; é necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós: onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração; pois a vida está nos olhos de quem sabe ver.... Se não houve frutos, valeu a beleza das flores. Se não houve flores, valeu a sombra das folhas. Se não houve folhas, valeu a intenção da semente. "

Maurício Francisco Ceolin



RESUMO

RESUMO

COSTA, K. C. M. Avaliação dos efeitos do canabidiol sobre as consequências comportamentais induzidas pelo tratamento com o ácido valproico durante o período embrionário do zebrafish. 2023. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição neuropsiquiátrica multifatorial que se caracteriza pelo comprometimento dos domínios da comunicação social e comportamental. Além dos fatores genéticos, estudos reforçam a relação de componentes ambientais, como a exposição ao ácido valproico (AVP) gestacional, à etiologia do TEA. A heterogeneidade sintomática inerente ao TEA torna o desenvolvimento de novas farmacoterapias um grande desafio. Até então, risperidona (RISP) e aripiprazol são os únicos medicamentos aprovados, mas com risco potencial para efeitos adversos. A busca por novas abordagens eficazes e seguras tem estimulado o reposicionamento e desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, o canabidiol (CBD), um fitocanabinoide capaz de modular os mais diversos sistemas fisiológicos e que vem demonstrando ampla gama de atividades terapêuticas, desperta a atenção. Ademais, o desenvolvimento de modelos TEA rápidos e confiáveis como ferramenta para triagens farmacológicas torna-se essencial. Neste cenário, o zebrafish surge como alternativa valiosa, uma vez que, apresentam vantagens logísticas e econômicas sobre os demais modelos animais, compartilhando, ainda, considerável semelhança genética com mamíferos. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o perfil farmacoterapêutico do CBD em um modelo TEA zebrafish obtido por meio de exposição embrionária ao AVP. Para isso, embriões de zebrafish foram expostos a diferentes concentrações de AVP até 48 horas pós-fertilização (hpf) e tratados com RISP (controle positivo) ou CBD de 48 a 96 hpf. Com 24 hpf, embriões expostos a 125 μ M de AVP apresentaram aumento nos movimentos espontâneos, enquanto embriões expostos a 1.250 μ M de AVP apresentaram redução nesse parâmetro. Aos 5 dias pós-fertilização (dpf), animais expostos a 625 μ M e 1.250 μ M de AVP durante período embrionário obtiveram maior taxa de mortalidade e malformações. Análises comportamentais das larvas com 7dpf retornaram resultados de hiperlocomoção e aumento da agressividade/impulsividade em animais expostos a 125 μ M de AVP. Ainda, ensaios por imunofluorescência revelaram que o AVP promoveu alterações nos níveis de marcadores de proliferação celular (PCNA), astrócitos (GFAP) e calmodulina (CaM). Comparado a RISP, o tratamento com 0,06 μ M de CBD mostrou-se mais eficaz, tendo em vista que, reverteu as alterações comportamentais e os padrões de imunomarcção induzidos pelo AVP. Além disso, o CBD, mas não a RISP, exibiu ação antioxidante sobre a lipoperoxidação. Tratamento prolongado com RISP, mas não com CBD, prejudicou o desenvolvimento da bexiga natatória de animais, independentemente da exposição ao AVP. Em conclusão, nosso modelo TEA no zebrafish por exposição ao AVP mostrou mudanças comportamentais robustas compatíveis com o amplo espectro fenotípico do autismo, sendo o tratamento com RISP capaz de reduzir apenas o comportamento agressivo, enquanto o CBD promoveu melhorias nos perfis de locomoção, agressividade e impulsividade. A partir de nossos dados, é possível sugerir que tais efeitos possam estar vinculados a ação do CBD sobre vias antioxidantes e/ou mecanismos atrelados à modulação da proliferação celular, da atividade astrocitária e da regulação da excitabilidade neuronal. Nossas evidências pré-clínicas abrem margem para uma melhor compreensão acerca dos mecanismos potencialmente envolvidos na terapia com CBD na clínica do TEA.

Palavras-chave: Neurodesenvolvimento. Transtorno do Espectro Autista. Canabidiol. Risperidona. Zebrafish.

ABSTRACT

ABSTRACT

COSTA, K. C. M. **Cannabidiol effects on the behavioral consequences induced by valproic acid treatment during the embryonic period of zebrafish.** 2023. Thesis (Doctorate). Medical School of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Autistic Spectrum Disorder (ASD) is a multifactorial neuropsychiatric condition that is characterized by impairments in social communication and behavioral domains. In addition to genetic factors, studies reinforce the relationship of environmental components, such as exposure to valproic acid (VPA) during pregnancy, to ASD etiology. The ASD symptomatic heterogeneity makes the development of new pharmacotherapies a major challenge. So far, only risperidone (RISP) and aripiprazole drugs are approved, but with potential risk for adverse effects. The search for new effective and safe approaches has stimulated the repositioning and development of new drugs. In this context, cannabidiol (CBD), a phytocannabinoid capable of modulating the most diverse physiological systems, and which has demonstrated a wide range of therapeutic activities, draws attention. Furthermore, the development of fast and reliable TEA models as a tool for pharmacological screenings becomes essential. In this scenario, zebrafish emerge as a valuable alternative, since they have logistical and economic advantages over other animal models, also sharing considerable genetic similarities with mammals. Thus, the present study aimed to evaluate the CBD pharmacotherapeutic profile in a zebrafish TEA model obtained through VPA embryonic exposure. For this, zebrafish embryos were exposed to different concentrations of VPA up to 48 hours post-fertilization (hpf) and treated with RISP (positive control) or CBD from 48 to 96 hpf. At 24 hpf, embryos exposed to 125 μ M of VPA showed an increase in spontaneous movements, while embryos exposed to 1,250 μ M showed a reduction in this same parameter. At 5 days post-fertilization (dpf), animals exposed to 625 μ M and 1,250 μ M of VPA during the embryonic period displayed a higher mortality and malformations rate. Behavioral analyzes of larvae with 7dpf that were exposed to 125 μ M of VPA exhibited hyperlocomotion and increased aggressiveness/impulsivity. Also, immunofluorescence assays revealed that embryonic VPA promoted changes in cell proliferation (PCNA), astrocytes (GFAP), and calmodulin (CaM) markers levels. Compared to RISP, treatment with 0.06 μ M of CBD proved to be more effective, given its ability to reverse changes in behavioral and immunostaining patterns induced by VPA. Still, CBD, but not RISP, exhibited antioxidant action on lipid peroxidation. Regardless of VPA exposure, prolonged treatment with RISP, but not with CBD, impaired animals' swim bladder development. In conclusion, our zebrafish ASD model by VPA embryonic exposure showed robust behavioral changes compatible with the broad phenotypic spectrum of autism, with RISP treatment being able to reduce only aggressive behavior, while CBD promoted improvements in locomotion, aggressiveness, and impulsivity profiles. From these data, it is possible to suggest that such effects may be linked to the CBD action on antioxidant pathways and/or mechanisms associated with cell proliferation modulation, astrocytic activity, and neuronal excitability regulation. These preclinical pieces of evidence pave the way for a better understanding of the mechanisms potentially involved in CBD therapy in the ASD clinic.

Keywords: Neurodevelopment. Autistic Spectrum Disorder. Cannabidiol. Risperidone. Zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Prevalência mundial do TEA, para cada 10.000 habitantes, entre os anos de 2012 a 2021 | 28 |
| Figura 2: Modelo de copo ilustrando a interação multifatorial do TEA em uma família.. | 29 |
| Figura 3: Encéfalo de zebrafish adulto versus encéfalo humano demonstrando a organização do Sistema Nervoso Central entre as espécies..... | 41 |
| Figura 4: Timeline comparativa entre seres humanos e zebrafish referente às etapas iniciais de desenvolvimento..... | 42 |
| Figura 5: Tail coiling behavior em embriões. | 49 |
| Figura 6: Delineamento experimento 1: padronização do modelo TEA zebrafish por exposição embrionária ao AVP..... | 52 |
| Figura 7: Delineamento experimento 2: padronização da RISP para utilização como controle positivo no tratamento das alterações induzidas pelo AVP no modelo TEA zebrafish.. | 54 |
| Figura 8: Delineamento experimento 3: análise do potencial do CBD como farmacoterapia no tratamento das alterações induzidas pela exposição ao AVP | 56 |
| Figura 9: Exposição ao AVP promoveu alterações no perfil de movimentação espontânea (porcentagem do tempo de movimentação) de embriões, ainda dentro do córion | 64 |
| Figura 10: Exposição ao AVP (4-48hpf) promoveu alterações no tempo de eclosão dos embriões, malformações e aumento na taxa de mortalidade de larvas de zebrafish com 5dpf.. | 65 |
| Figura 11: Teste de campo aberto para avaliação da distância total percorrida por larvas de zebrafish com 7dpf expostas a diferentes concentrações de AVP durante o período embrionário | 66 |
| Figura 12: Teste de ataque ao espelho para avaliação do perfil de agressividade de larvas de zebrafish com 7dpf expostas a diferentes concentrações de AVP durante o período embrionário..... | 67 |
| Figura 13: Teste de interação social para avaliação do perfil de socialização entre larvas de zebrafish (7dpf) expostas a diferentes concentrações de AVP durante o período embrionário. | 68 |
| Figura 14: Teste de campo aberto para avaliação da atividade motora de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de RISP. | 70 |

| | |
|--|----|
| Figura 15: Teste de ataque ao espelho para avaliação do perfil de agressividade de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de RISP | 72 |
| Figura 16: Teste de interação social para avaliação do perfil de socialização entre larvas de zebrafish com 7dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de RISP | 73 |
| Figura 17: Teste de campo aberto para avaliação da atividade motora de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de CBD..... | 75 |
| Figura 18: Teste de ataque ao espelho para avaliação do perfil de agressividade de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de CBD..... | 77 |
| Figura 19: Teste de interação social para avaliação do perfil de socialização entre larvas de zebrafish com 7dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de CBD..... | 78 |
| Figura 20: Ensaios bioquímicos para quantificação de biomarcadores de estresse oxidativo de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com RISP ou CBD | 80 |
| Figura 21: Análise morfológica para avaliação da área da bexiga natatória (µm ²) de larvas de zebrafish (7dpf) expostas ao AVP durante o período embrionário e tratadas por tempo prolongado com concentrações padronizadas de RISP e CBD.. | 82 |
| Figura 22: ELISAs para quantificação de neurotransmissores em larvas de zebrafish com 7dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com RISP ou CBD | 84 |
| Figura 23: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de proliferação celular por pHH3 (punctas maiores e menores em zoom) no encéfalo de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de 1µM de RISP ou 0,06µM de CBD..... | 86 |
| Figura 24: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de proliferação celular por PCNA no encéfalo de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de 1µM de RISP ou 0,06µM de CBD | 88 |
| Figura 25: Ensaios de imunofluorescência para quantificação de marcador de apoptose por Caspase-3 no encéfalo de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de 1µM de RISP ou 0,06µM de CBD | 90 |
| Figura 26: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de astrócitos por GFAP no encéfalo de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de 1µM de RISP ou 0,06µM de CBD | 92 |

Figura 27: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de proteína ligante de Ca^{2+} por PV no encéfalo de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à concentração de $125\mu\text{M}$ de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de $1\mu\text{M}$ de RISP ou $0,06\mu\text{M}$ de CBD 94

Figura 28: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de proteína ligante de Ca^{2+} por CaM no encéfalo de larvas de zebrafish com 7dpf expostas à concentração de $125\mu\text{M}$ de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de $1\mu\text{M}$ de RISP ou $0,06\mu\text{M}$ de CBD 96

SUMÁRIO

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 | O CONTEXTO HISTÓRICO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA..... | 23 |
| 1.2 | NEURODESENVOLVIMENTO E O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: O QUE É, ONDE ESTÁ E QUAIS AS CAUSAS CONHECIDAS? | 25 |
| 1.3 | FARMACOTERAPIA NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA | 31 |
| 1.4 | A RELAÇÃO ENTRE O SISTEMA ENDOCANABINOIDE, NEURODESENVOLVIMENTO E O AUTISMO | 33 |
| 1.5 | O CANABIDIOL NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA | 37 |
| 1.6 | ZEBRAFISH COMO MODELO PARA ESTUDO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA | 40 |
| 1.7 | HIPÓTESE | 43 |
| 2 | OBJETIVOS | 45 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 45 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 45 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 47 |
| 3.1 | ZEBRAFISH: MANUTENÇÃO, AQUISIÇÃO DE OVOS E EUTANÁSIA | 47 |
| 3.2 | DROGAS..... | 48 |
| 3.3 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 48 |
| 3.3.1 | Experimento 1: padronização do AVP para indução do modelo animal TEA | 48 |
| 3.3.2 | Experimento 2: padronização do tratamento com RISP | 52 |
| 3.3.3 | Experimento 3: avaliação do perfil farmacoterapêutico do CBD no modelo | 54 |
| 3.4 | ENSAIOS BIOQUÍMICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO..... | 56 |
| 3.4.1 | Atividade de GST | 57 |
| 3.4.2 | Atividade de CAT | 57 |
| 3.4.3 | Conteúdo do produto LPO | 58 |
| 3.5 | AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA BEXIGA NATATÓRIA FRENTE A EXPOSIÇÃO PROLONGADA AOS TRATAMENTOS RISP E CBD | 58 |
| 3.6 | ENSAIOS DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA | 59 |
| 3.6.1 | Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para quantificação total de neurotransmissores | 59 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.6.2 | Ensaio de Imunofluorescência | 59 |
| 3.7 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 61 |
| 4 | RESULTADOS | 63 |
| 4.1 | EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA DO ZEBRAFISH AO AVP COMO MODELO TRANSLACIONAL PARA ESTUDO DO TEA | 63 |
| 4.1.1 | Maiores concentrações de AVP promoveram alterações na movimentação espontânea dos embriões após 24 horas de exposição | 63 |
| 4.1.2 | Exposição embrionária a 625µM e 1250µM de AVP causou malformações e aumento na taxa de mortalidade de larvas | 64 |
| 4.1.3 | Maior concentração não-tóxica de AVP promove hiperatividade motora em larvas expostas durante o período embrionário | 66 |
| 4.1.4 | Maior concentração não-toxica de AVP promove aumento do comportamento tipo-agressivo em larvas expostas durante o período embrionário | 67 |
| 4.1.5 | Nenhuma concentração de AVP foi capaz de promover alterações no teste de interação social de larvas de zebrafish | 68 |
| 4.2 | PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE RISP COMO CONTROLE POSITIVO DO TRATAMENTO DO MODELO TEA INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA AO AVP | 69 |
| 4.2.1 | Nenhuma concentração de RISP foi capaz de reverter a hiperatividade motora causada pela exposição embrionária a 125µM de AVP | 69 |
| 4.2.2 | Menor concentração de RISP foi capaz de reduzir o perfil de agressividade induzido pela exposição embrionária ao AVP | 70 |
| 4.2.3 | Nenhuma concentração de RISP foi capaz de promover alterações no perfil de interação social de larvas de zebrafish expostas ao AVP durante o período embrionário | 72 |
| 4.3 | AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOTERAPÊUTICO DO CBD COMO TRATAMENTO DO MODELO TEA INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA AO AVP | 73 |
| 4.3.1 | Todas as concentrações de CBD foram capazes de reverter a hiperatividade motora causada pela exposição embrionária à 125µM de AVP | 74 |
| 4.3.2 | Menor concentração de CBD foi capaz de reduzir o perfil de agressividade induzido pela exposição embrionária ao AVP | 75 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 4.3.3 | Nenhuma concentração de CBD foi capaz de promover alterações no perfil de interação social de larvas de zebrafish expostas ao AVP durante o período embrionário | 77 |
| 4.3.4 | Efeito da exposição embrionária ao AVP e tratamento com RISP ou CBD sobre biomarcadores de estresse oxidativo | 79 |
| 4.3.5 | Tratamento prolongado com RISP, mas não com CBD, promove alterações no desenvolvimento da bexiga natatória de larvas expostas ao AVP durante o período embrionário | 81 |
| 4.3.6 | Nenhum dos tratamentos com RISP ou CBD, nem a exposição embrionária ao AVP foi capaz de promover alterações sobre os níveis de 5-HT, DA ou dos endocanabinoides AEA e 2-AG | 83 |
| 4.3.7 | Alterações nos níveis de marcadores para proliferação celular, astrócitos e calmodulina promovidas pela exposição embrionária do zebrafish ao AVP são modificadas pelo tratamento com RISP e/ou CBD | 84 |
| 5 | DISCUSSÃO | 98 |
| 6 | CONCLUSÃO | 124 |
| | REFERÊNCIAS | 126 |
| | ANEXO A | 156 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CONTEXTO HISTÓRICO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Em 1943, o psiquiatra austríaco (radicado nos Estados Unidos) Leo Kanner teve seu nome associado ao autismo mediante publicação de um relatório intitulado “*Autistic disturbances of affective contact*”, no qual descreveu detalhadamente onze estudos de caso de crianças (8 do sexo masculino e 3 do sexo feminino) com idades variando entre 2 a 11 anos, as quais apresentavam em comum um isolamento extremo e persistente refletido pela incapacidade de relacionar com outras pessoas, além de um desejo obsessivo pela preservação da “mesmice”. Kanner denominou essas crianças como autistas (KANNER, 1943). A palavra autismo vem do grego *autos*, que significa “si mesmo”, traduzindo uma condição humana, na qual o indivíduo vive para si mesmo estando imerso em si próprio. Com a observação de que esses comportamentos apareciam de forma muito precoce, ou seja, as crianças provavelmente já nasciam com a condição, o psiquiatra inseriu uma distinção do que seria o autismo e a Esquizofrenia Infantil, esta definida anteriormente por Eugen Bleuler (MASI et al., 2017).

Simultaneamente ao comportamento de isolamento social, Kanner também observou um desenvolvimento incomum da linguagem marcado pela presença de falhas em alguns aspectos comunicativos da fala, interpretações literais e ecolalias. Atrelado a essas observações, também relatou sensibilidades sensoriais e comportamentos restritivos e repetitivos (MASI et al., 2017).

Frente ao contato contínuo com os pais dessas crianças, Kanner começou a mudar de opinião quanto ao início dos sintomas, descrevendo a falta de contato afetivo como a causa do autismo nos filhos, introduzindo pela primeira vez o termo “mãe-geladeira” para referir-se às mães de crianças autistas. O psiquiatra acreditava que esse distanciamento materno promovia uma resposta de hostilidade que, posteriormente, era direcionada a situações sociais do cotidiano. Esses conceitos foram abolidos tão logo quando da inserção de novas tecnologias de estudo, as quais permitiam uma investigação mais minuciosa do cérebro, indo além das perspectivas psicodinâmicas (THOMPSON, 2013).

Apenas em 1980, mediante a publicação do *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 3ªed.* (DSM-III), o autismo infantil como diagnóstico foi assegurado (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1980). Os critérios definidos na época delinearam o Autismo Infantil como uma condição com início antes de 30 meses de idade, com a presença de falha na comunicação responsiva, déficits severos na linguagem e extrema responsividade a estímulos

ambientais. Entretanto, esses critérios foram ampliados na revisão da DSM-III (DSM-III-R) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1987), na qual reconsiderou-se a natureza generalizada do autismo, sendo esta uma condição não limitada apenas a bebês, uma vez que, existia um subgrupo de indivíduos com sintomas não identificados na infância, os quais eram excluídos por não terem recebido o diagnóstico precoce, mas que exibiam as mesmas alterações preconizadas pela DSM-III. Dessa forma, a DSM-III-R instituiu a troca da terminologia “Autismo Infantil” para “Transtorno Autista”, reconhecendo uma cartela mais ampla de critérios, reduzindo a extrema especificidade e aumentando a sensibilidade do diagnóstico (VOLKMAR et al., 1988).

Em 1994, o DSM-IV, dentro de uma classificação de Transtornos Globais do Desenvolvimento, introduziu um conjunto de critérios definidos para a Síndrome de Asperger, os quais se distinguiam do Transtorno Autista pela ausência de prejuízos na linguagem ou na função cognitiva (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994; WING, 1981),

Em 2013, com o lançamento da quinta edição do DSM (DSM-V) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), foram inseridas mudanças significativas nos critérios diagnósticos do autismo, sendo removidos os diagnósticos isolados de Transtorno Autista, Síndrome de Asperger e Transtorno Invasivo do Desenvolvimento – Sem Outra Especificação (TID-SOE), reagrupando-os em dois grandes grupos: o Transtorno do Espectro Autista (TEA) e o Transtorno da Comunicação Social. Agora representado por um amplo espectro, o autismo passou a ser classificado de acordo com o grau de severidade e suporte necessário para o indivíduo (leve, moderado e severo).

Já em 2022, foi publicada a revisão textual do DSM-V, o DSM-V-TR, o qual traz como novas alterações para o TEA a retomada de critérios diagnósticos mais conservadores, sendo necessário que o indivíduo se encaixe em todas as subcaracterísticas presentes no domínio de déficits na comunicação social para que receba o laudo de TEA. A revisão foi realizada com o intuito de esclarecer alguns pontos redundantes nos critérios de diagnóstico diferencial e aumentar a consistência do DSM com a Classificação Internacional de Doenças (CID, do inglês *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems – ICD*) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2022).

Decerto, no que se refere ao diagnóstico do TEA, além do DSM, é comum nos depararmos com a utilização da CID. Ambos representam manuais que abrangem diferentes classificações de doenças, funcionando como referências para profissionais da área da saúde ao redor do mundo. Todavia, em um contexto de saúde mental, o DSM costuma ser a opção mais empregada. Isso deve-se ao fato de que a CID detalha definições de doenças, lesões, transtornos

e condições em um âmbito geral da saúde, ou seja, não se restringe ao contexto mental observado no DSM. No Brasil a CID é aplicada, por exemplo, pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e por planos de saúde como ferramenta essencial na organização de procedimentos, laudos e exames relativos a cada condição. De fato, essa abrangência classificatória amplificada justifica, por exemplo, a demora na adoção do termo TEA pela CID, sendo inserido apenas na última edição publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2018 (CID-11), atualização vigente desde 1º de janeiro de 2022. Enquanto a versão anterior (CID-10, lançada em 1990) apresentava aproximadamente 14 mil códigos, a CID-11 conta com cerca de 55 mil códigos de classificação, englobando novos capítulos não contemplados até então (transtornos dos jogos eletrônicos, saúde sexual, medicina tradicional e outros) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Agora pareada ao DSM-V-TR, a CID-11 classifica o TEA dentro de níveis no espectro, considerando ainda a existência ou não de déficits na linguagem funcional e intelectual. Essa padronização entre os manuais favorece o consenso da comunidade científica e médica sobre o TEA, viabilizando a aplicação de critérios unificados para o diagnóstico e o tratamento de pacientes dentro do espectro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

1.2 NEURODESENVOLVIMENTO E O TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: O QUE É, ONDE ESTÁ E QUAIS AS CAUSAS CONHECIDAS?

Em humanos, o processo de neurodesenvolvimento inicia-se a partir do folheto embrionário denominado ectoderma, por volta da terceira semana gestacional. O posicionamento celular ao longo da linha média do embrião, mediante a diferenciação de células progenitoras, dá origem a placa neural. Entre o oitavo ao décimo dia embrionário ocorre o processo de invaginação da placa neural, processo que resulta na formação do tubo neural. Ao longo do processo de expansão o tubo neural passa por dilatações, dando origem a três vesículas primárias: o prosencéfalo (que formará o telencéfalo e diencéfalo), mesencéfalo e o rombencéfalo (que se divide formando o cerebelo e o tronco encefálico). Simultaneamente ao aparecimento dos sulcos e cristas neurais ocorre o aumento no número de células progenitoras neurais (CPNs), as quais proliferam por meio de dois processos distintos: a divisão simétrica para garantir a manutenção do *pool* neurogênico; e a divisão assimétrica, marcada pela diferenciação em novas linhagens comprometidas com fenótipos neuronais ou gliais, as quais seguirão para maturação e integração celular, processos esses os quais viabilizam a organização e formação da citoarquitetura encefálica. Ao longo desse período metuculoso de formação e

“amadurecimento” do Sistema Nervoso Central (SNC), muitos são os fatores reguladores envolvidos, incluindo-se a plasticidade sináptica e os mais diversos sistemas de neurotransmissão, mesmo após o nascimento. Nesse contexto, a presença de estímulos agressores externos nessa janela embrionária representa importante fator de risco para disrupção do neurodesenvolvimento, podendo comprometer as sinalizações embrionárias essenciais para a correta formação da circuitaria neural, bem como interferir na organização e estruturação encefálica (DARNELL; GILBERT, 2017; GILBERT; BARRESI, 2016), aumentando a probabilidade de desencadear Transtornos do Neurodesenvolvimento, dentre as quais destaca-se o TEA.

Segundo o DSM-V-TR, edição mais recente do DSM, o TEA é caracterizado como um transtorno do neurodesenvolvimento, com casos variando em um amplo espectro clínico de severidade. Trata-se de uma condição neuropsiquiátrica multigênica e multifatorial diagnosticada pela presença de disfunção em dois grandes domínios: comunicação social e padrão de comportamento motor restritivo/repetitivo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2022). Indivíduos com TEA, em sua grande maioria, apresentam diferentes condições concomitantes, das quais pode-se citar a irritabilidade, ansiedade, depressão, crises convulsivas, hiperatividade e problemas de atenção (GESCHWIND, 2009).

É válido ressaltar que o TEA tem seu início durante a infância podendo persistir durante a adolescência e a vida adulta do paciente, sendo que, os primeiros sinais e sintomas inerentes a condição já são aparentes logo nos primeiros meses de vida (FEIN et al., 2013; HOWLIN et al., 2004). O diagnóstico do TEA, comumente realizado por uma equipe multidisciplinar atuando em conjunto (psiquiatras, neurologistas, pediatras, fonoaudiólogos, psicólogos), é essencialmente clínico observacional, uma vez que não apresenta biomarcadores específicos. O diagnóstico clínico precoce, logo na primeira infância, torna-se de extrema importância tendo em vista uma maior probabilidade de um prognóstico favorável, garantindo o desenvolvimento adequado do paciente, bem como uma melhor qualidade de vida, tanto para o paciente quanto para seus familiares. A classificação da gravidade do TEA baseia-se nas necessidades individuais de cada paciente, avaliando-se os níveis de suporte necessários para suprir o comprometimento das áreas social e comportamental (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2022; EMBERTI GIALLORETI; CURATOLO, 2018; MASI et al., 2017; TALEB et al., 2021).

Antes caracterizado como um distúrbio global do desenvolvimento relativamente raro, o TEA teve sua prevalência significativamente aumentada nos últimos anos, sendo reportado que, atualmente, 1 a cada 100 pessoas no mundo apresenta-se no espectro. Muitas podem ser

as explicações para o visível e constante aumento no número de casos, dentre elas: a expansão dos critérios diagnósticos; melhor preparo e conhecimento por parte do profissional; maior conscientização da população sobre o tema; e a melhora dos recursos e ferramentas de diagnóstico. Essa taxa de prevalência representa um valor médio calculado frente a diferentes estudos epidemiológicos já realizados, sendo válido ressaltar que, os critérios de inclusão e exclusão adotados na coleta de dados ainda representam um fator limitante para a precisão dessas estimativas. Grande parte dos dados relativos ao levantamento periódico da prevalência do TEA são oriundos dos Estados Unidos da América (EUA). Estudo recente conduzido nos EUA demonstrou que 1 a cada 44 crianças de até 8 anos apresentam algum grau de autismo, sendo esta prevalência 4,3 vezes maior em meninos do que meninas. (CDC, 2022; MAENNER et al., 2021; OPAS/OMS, 2023; ZEIDAN et al., 2022). Entretanto, é importante ressaltar que, em países de baixa e média renda, a prevalência do TEA ainda é desconhecida. No Brasil, até então, não há dados epidemiológicos oficiais sobre o número de pessoas com diagnóstico para TEA, existindo apenas uma estimativa, frente a taxa de prevalência mundial, de que aproximadamente 2 milhões de pessoas dentro do espectro estejam alocadas no país. Nesse sentido, a partir do ano de 2019, após a sanção da Lei 13.861/2019, foi estabelecido a obrigatoriedade da inclusão de dados específicos sobre autismo nos censos demográficos realizados no Brasil (BRASIL, 2019; OPAS/OMS, 2023). A Figura 1 ilustra as estimativas de prevalência em diferentes países.

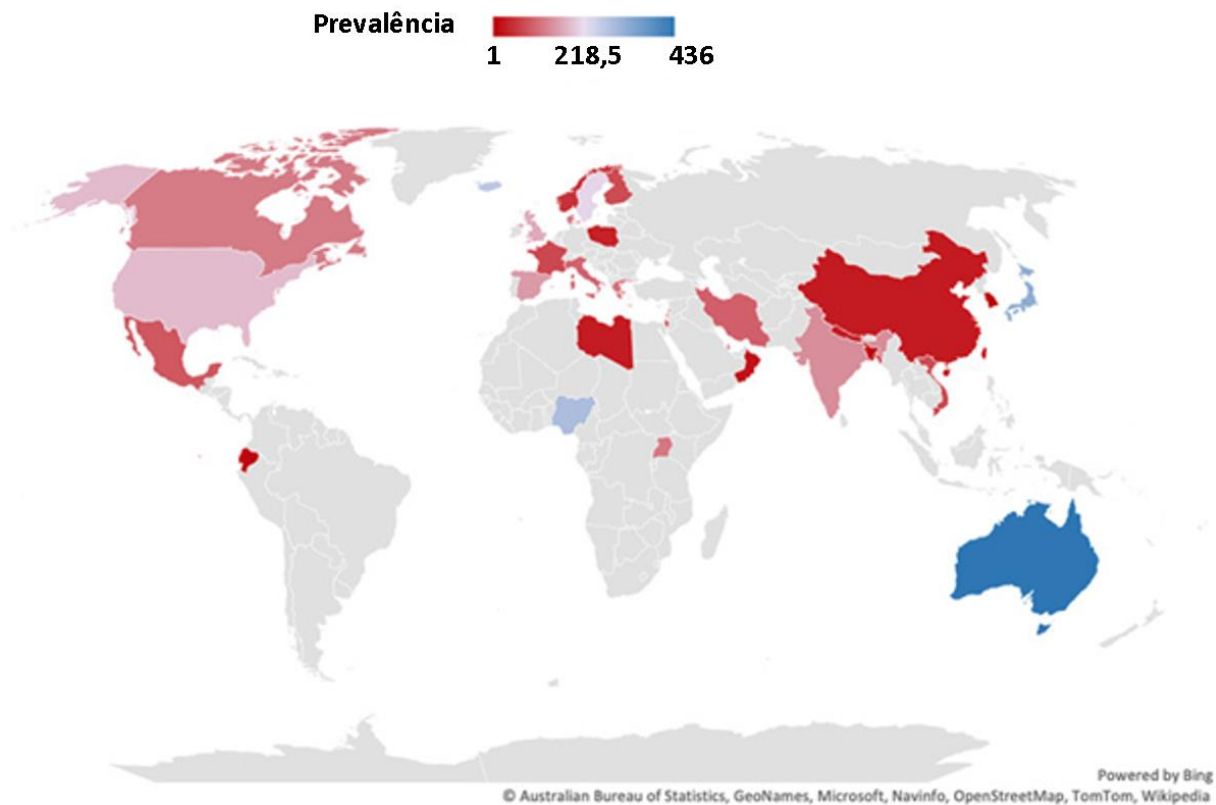


Fig. 1: Prevalência mundial do TEA, para cada 10.000 habitantes, entre os anos de 2012 a 2021.

Fonte: Modificado de Zeidan et al. (2022).

O fenótipo comportamental e neurocognitivo do TEA é resultante de um conjunto complexo e heterogêneo de fatores genéticos e ambientais, os quais podem inclusive interagir entre si em uma combinação aditiva. Essa interação multigênica e multifatorial inerente ao TEA foi demonstrada através do “modelo de copo”, o qual representa a combinação de impactos genéticos e ambientais por meio de círculos de tamanhos variados de acordo com o maior ou menor risco associado ao TEA, sendo a borda do copo o fator limitante (HOANG; CYTRYNBAUM; SCHERER, 2018). Nesse caso, os indivíduos que acumulam fatores suficientes para exceder a borda do copo estão no espectro (Figura 2).

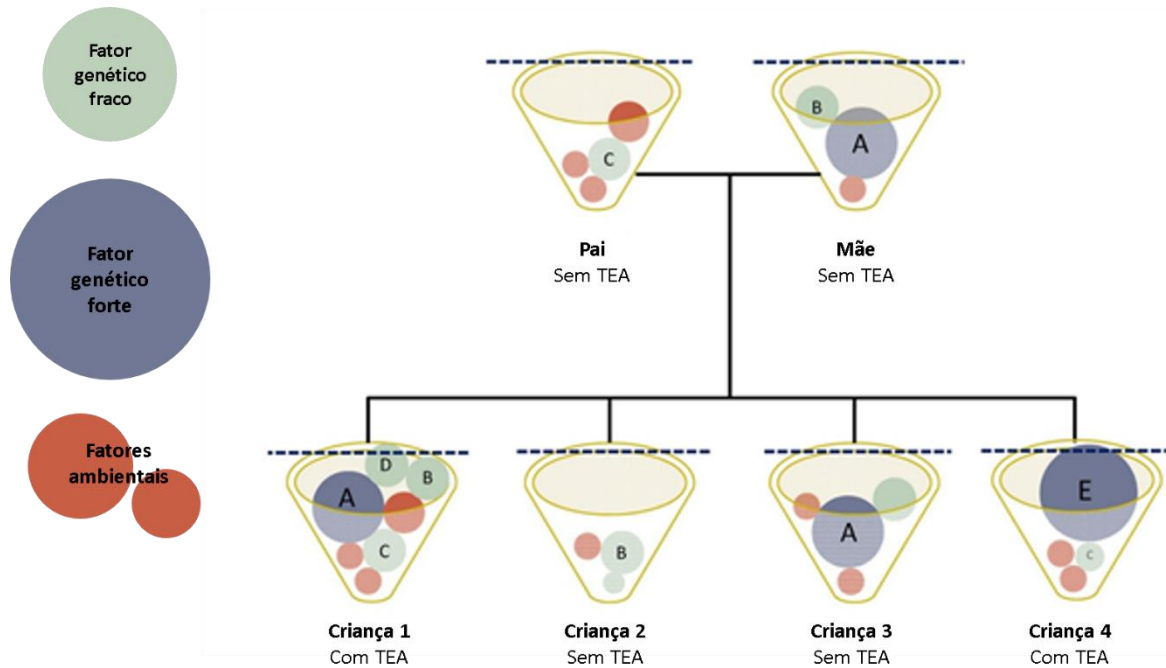


Fig. 2: Modelo de copo ilustrando a interação multifatorial do TEA em uma família. Na criança 1, o limiar do TEA é atingido frente a combinação de variantes genéticas (fortes e fracas) e fatores ambientais. Na criança 4, uma forte variante genética, que nesse caso é o principal fator que favorece o extrapolamento do limiar do TEA, também se associa a fatores genéticos mais fracos e a fatores ambientais. As crianças 2 e 3 apresentam fatores de risco insuficientes para atingir esse limiar.

Fonte: Modificado de Hoang; Cytrynbaum; Scherer (2018).

Por sua vez, essa interação entre os diferentes fatores causais do TEA ao longo do processo de neurodesenvolvimento pode desencadear diferentes mecanismos patológicos. A somatória dessas alterações culmina em um complexo e diversificado quadro clínico que abrange o espectro autista (BAI et al., 2019; DENG et al., 2015; KIM; LEVENTHAL, 2015; LACIVITA et al., 2017; MCPARTLAND; VOLKMAR, 2012).

O TEA é um transtorno que possui uma prevalência genética significativa, apresentando um número expressivo de genes já identificados e relacionados como fatores de risco em potencial (BETANCUR, 2011; MATSUNAMI et al., 2013; MOLDIN; RUBENSTEIN, 2006; SULLIVAN; DALY; O'DONOVAN, 2012). No entanto, é importante ressaltar que os fatores ambientais também parecem exercer considerável papel como desencadeadores ou potencializadores do TEA (DENG et al., 2015; FOMBONNE, 2009; KIM; LEVENTHAL, 2015). Alguns exemplos já estudados e bem estabelecidos como fatores de risco relevantes incluem as infecções durante o período gestacional (rubéola, por exemplo) e a exposição gestacional a agentes com potencial toxicidade/teratogenicidade, tais como o etanol, a talidomida e o ácido valproico (AVP), sendo este último um dos compostos mais estudados

quanto sua relação causal com o TEA (CHESS, 1971; CHRISTENSEN et al., 2013; LANDRIGAN, 2010; NANSON, 1992; ORNOY, 2009; ROULLET; LAI; FOSTER, 2013; STRÖMLAND et al., 1994; TORDJMAN et al., 2014).

Descoberto como um composto com propriedades anticonvulsivantes (MEUNIER et al., 1963), o AVP continua sendo uma das principais escolhas no tratamento de epilepsias, sendo empregado também como estabilizador do humor no tratamento do Transtorno Bipolar. Trata-se de um ácido graxo de cadeia curta proveniente do ácido valérico, o qual foi aprovado como fármaco anticonvulsivante em 1967 na França e em 1978 nos EUA (ROMOLI et al., 2019).

Muitas e diferentes são as formas pelas quais o AVP exerce seus efeitos anticonvulsivantes, estabilizadores do humor e neuroprotetores no SNC. Apresentando um amplo espectro de ação, o AVP pode atuar aumentando a síntese e liberação do ácido- γ -aminobutírico (GABA), funcionando como um potencializador da transmissão GABAérgica. Além disso, reduz a excitação neuronal promovida pela ativação de receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA, receptor ionotrópico ativado por glutamato) e atenua os disparos neuronais de alta frequência frente sua ação bloqueadora sobre canais iônicos voltagem-dependentes, tais como os canais para sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+). Possui ainda, atividade modulatória sobre os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, alvos fundamentais para eficácia como tratamento de transtornos psiquiátricos e neurológicos. Arelado a todos esses mecanismos, o AVP também se classifica como um inibidor da enzima histona desacetilase (iHDAC), atuando sobre processos epigenéticos que modificam a expressão gênica sem causar alterações no genoma, ou seja, ativando ou silenciando um ou mais genes. Nesse contexto, já foi demonstrado que o AVP, como um iHDAC, pode regular a expressão de genes intimamente relacionados ao processo de proliferação e apoptose celular, sendo inclusive proposto como um candidato antitumoral associado a administração de quimioterápicos. Em doses baixas, o AVP apresenta inclusive ação anti-inflamatória e antinociceptiva via inibição de fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) (ROMOLI et al., 2019).

Sucintamente, o AVP representa um fármaco multialvo de grande valia, sendo empregado no tratamento de diferentes condições. No entanto, quando utilizado durante o período crítico do neurodesenvolvimento, pode atuar nas mais diversas vias de sinalização que regulam o desenvolvimento do SNC embrionário, revelando seu potencial risco neurotóxico (GOTTLICHER, 2001; TALEB et al., 2021).

Nesse contexto, sua utilização como medicamento antiepiléptico durante a gravidez despertou preocupações. De uma forma geral, quase todas as drogas anticonvulsivantes apresentam potencial de teratogenicidade. De fato, o tratamento da epilepsia ao longo de uma

gestação ainda representa um grande desafio clínico, sendo necessário gerir e equilibrar o potencial risco teratogênico fetal associado ao medicamento com os possíveis efeitos adversos resultantes das crises convulsivas gestacionais (CHEN et al., 2009; HARDEN et al., 2009a, 2009b, 2009c). Muitos riscos associados ao uso gestacional do AVP já foram identificados na clínica, incluindo-se a presença de malformações congênitas, déficits no desenvolvimento e na função cognitiva, além do aumento substancial do risco de TEA (DECKMANN et al., 2018; GOTLIB et al., 2017; MEADOR, 2008; MEADOR et al., 2009, 2011; NADEBAUM et al., 2011; OGAWA et al., 2007; ORNOY, 2009; ORNOY; WEINSTEIN-FUDIM; ERGAZ, 2015; QIU et al., 2021; SHALLCROSS et al., 2011; WOOD et al., 2015).

Identificada pela primeira vez em 1984, a então relatada “Síndrome do Valproato”, foi caracterizada por alterações no crescimento, desenvolvimento e no atraso comportamental dos bebês expostos ao AVP gestacional (DILIBERTI et al., 1984). A exposição *in utero* ao AVP, principalmente durante o primeiro trimestre gestacional, apresenta grande potencial de neurotoxicidade sobre o desenvolvimento do SNC fetal, sendo capaz de induzir alterações semelhantes às observadas no TEA (DIETERT; DIETERT; DEWITT, 2011; HERTZ-PICCIOTTO et al., 2006; NICOLINI; FAHNESTOCK, 2018; OGAWA et al., 2007; ORNOY; WEINSTEIN-FUDIM; ERGAZ, 2015).

Uma ampla gama de sinais e sintomas do TEA já foi relatada em trabalhos clínicos e em diferentes modelos animais, os quais demonstraram aumento relativo do volume cerebral com presença de ventrículos ampliados, alterações na organização e arborização celular em diferentes regiões encefálicas, alterações nos mais diversos sistemas de neurotransmissão, aumento do estresse oxidativo, astrogliose, desequilíbrio na expressão de proteínas ligantes de Ca^{2+} , além de alterações cognitivas e comportamentais relativas aos padrões sociais e motores. Tais achados conseguem ser reproduzidos, em sua grande maioria, entre os mais diversos estudos do TEA por exposição pré-natal ao AVP, reforçando a validade do modelo como ferramenta para a melhor compreensão dessa condição (AL-AMIN et al., 2015; HASHEMI et al., 2017; JUAREZ; MARTÍNEZ CERDEÑO, 2022; LAUBER; FILICE; SCHWALLER, 2016; RANGER; ELLENBROEK, 2016; ROULLET; LAI; FOSTER, 2013; TALEB et al., 2021).

1.3 FARMACOTERAPIA NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

A heterogeneidade clínica e molecular inerente ao TEA representa um grande desafio para o estudo da fisiopatologia desta condição, o que por sua vez, dificulta o desenvolvimento

e a aplicação de farmacoterapias mais eficientes e seguras. Além de terapias comportamentais e cognitivo-comportamentais (*Applied Behavior Analysis* – ABA), abordagens farmacológicas são comumente recomendadas em pacientes TEA, principalmente como opção para melhora de comorbidades associadas (ansiedade, depressão, alterações de humor, convulsões), uma vez que, os tratamentos disponíveis não tratam com eficiência os sintomas e alterações centrais da condição (HÖFER; HOFFMANN; BACHMANN, 2017). Entretanto, além da limitação na eficácia, esses fármacos apresentam potencial capacidade de gerar efeitos adversos, ou seja, respostas indesejadas e muitas vezes prejudiciais ao paciente (GOEL et al., 2018).

A falta de medicamentos com respostas significativas no tratamento do TEA viabiliza a alta prevalência de polifarmácia nesses pacientes. Dentre as diferentes classes de fármacos prescritas (isoladamente ou em conjunto), pode-se citar os antipsicóticos, estimulantes, antidepressivos, agentes glutamatérgicos e GABAérgicos, antagonistas opioides, agentes colinérgicos, oxitocina, melatonina, entre outros. No entanto, é válido ressaltar que, os únicos fármacos até então aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do TEA são os antipsicóticos atípicos risperidona (RISP) e aripiprazol, sendo empregados, principalmente, no tratamento sintomático da irritabilidade, incluindo agressividade (auto e heteroagressão) e, em alguns casos, no tratamento da hiperatividade (GOEL et al., 2018; MASI et al., 2017; TURNER, 2020).

De uma forma geral, a classe de antipsicóticos divide-se em típicos (ou de primeira geração) e atípicos (ou de segunda geração), tomando-se por base que estes últimos raramente induzem efeitos adversos. Entretanto, há uma proposta de nova classificação desses fármacos fundamentada no conceito de espectro de atipias, sendo a RISP o antipsicótico menos atípico (nível I) e a clozapina, o mais atípico (nível III), com os demais antipsicóticos inseridos entre os dois extremos (nível II) (CARLI et al., 2021). Nessa abordagem, os alvos moleculares vão se somando entre os estratos.

A RISP exerce suas funções, principalmente, por meio do bloqueio de receptores dopaminérgicos (especialmente D₂) e serotoninérgicos (especialmente 5-HT_{2A}), mostrando-se uma opção significativamente eficaz no tratamento de sintomas positivos e negativos da esquizofrenia (MCCRACKEN et al., 2002). Todavia, essa eficácia muitas vezes é superada pelo aparecimento de efeitos adversos consideráveis, condição que limita sua aplicação clínica. De fato, os antipsicóticos atípicos atuam, em variáveis níveis de afinidade, mediante distintos alvos moleculares, dentre os quais cita-se os receptores dopaminérgicos (antagonismo D₂ e D₃), serotoninérgicos (agonismo parcial 5-HT_{1A}/5-HT_{2A}/5-HT_{2C}), muscarínicos (antagonismo M₃ e M₄/alosterismo positivo M₁), adrenérgicos (antagonismo α_2), histamínicos (antagonismo H₁),

além do bloqueio do transportador de glicina e produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (da sigla em inglês BDNF). Essa ampla frente de ação representa uma característica que também associa-se à alta taxa de incidência de efeitos indesejados durante o tratamento com essa classe farmacológica, principalmente frente a esquemas posológicos de médio a longo prazo (CARLI et al., 2021; LEMMON; GREGAS; JESTE, 2011).

A busca por tratamentos mais eficazes e seguros para o TEA tem impulsionado vários pesquisadores ao redor do mundo, estimulando o reposicionamento de fármacos com usos aprovados para outras doenças e o desenvolvimento de novos compostos promissores. Nesse contexto, o canabidiol (CBD), um fitocanabinoide que apresenta propriedades sobre uma vasta gama de sistemas fisiológicos, incluindo sua ação modulatória via Sistema Endocanabinoide (SEC), já demonstrou diversas atividades terapêuticas, despertando cada vez mais a atenção da comunidade científica quanto ao seu potencial terapêutico no tratamento de diversas patologias (MANNUCCI et al., 2017; PISANTI et al., 2017), sendo recentemente introduzido na clínica do TEA como uma alternativa *off-label* (ARAN et al., 2019a; BARCHEL et al., 2019).

1.4 A RELAÇÃO ENTRE O SISTEMA ENDOCANABINOIDE, NEURODESENVOLVIMENTO E O AUTISMO

Com impulso a partir de 1930, o estudo farmacológico dos canabinoides ganhou forte evidência frente aos inúmeros estudos que visavam o isolamento de compostos da *Cannabis sativa*, planta que já apresentava diferentes registros de aplicações com finalidades medicinais em épocas mais antigas pela população chinesa (ABEL, 1980). Inicialmente isolado por Adams e colaboradores em 1940, o canabidiol (CBD) teve sua estrutura descrita por Mechoulam e Shvo em 1963, sendo definido como um dos principais compostos fitocanabinoides (ADAMS; HUNT; CLARK, 1940; MECHOULAM; SHVO, 1963). Contrário ao Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), outro composto também isolado da *Cannabis*, o CBD não apresentava propriedades psicomiméticas, destacando-se por seus efeitos antiepilépticos, ansiolíticos, antidepressivos e antipsicóticos demonstrados em estudos pré-clínicos conduzidos a partir de 1970 (CARLINI et al., 1973; GUIMARÃES et al., 1990; KARNIOL et al., 1974; ZUARDI et al., 1982; ZUARDI; ANTUNES RODRIGUES; CUNHA, 1991). O isolamento e maior conhecimento a respeito desses novos compostos canabinoides somados ao vasto repertório terapêutico milenar atribuído à *Cannabis sativa* fomentaram a investigação de potenciais mecanismos associados aos efeitos observados, resultando na descoberta do SEC em meados dos anos 80. De uma forma geral, a revelação do SEC foi resultado de um acúmulo de evidências que refletiram a

existência de receptores, inclusive no SNC, dos chamados receptores canabinoides tipo 1 (CBR1) e tipo 2 (CBR2). Além disso, também foi identificada a existência de ligantes endógenos, os denominados endocanabinoides (eCBs) anandamida (AEA) e 2-araquidonoil glicerol (2-AG). Posteriormente, enzimas de síntese (N-acil fosfatidiletanolamina fosfolipase D - NAPE-PLD; e a diacilglicerol lipase - DAGL) e degradação (do inglês *fatty acid amide hydrolase* – FAAH; e monoacilglicerol lipase – MAGL) desses eCBs também foram detectados (BISOGNO et al., 2003; CRAVATT et al., 1996; DEVANE et al., 1988, 1992; MATSUDA et al., 1990; MECHOULAM et al., 1995; MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993).

De fato, a elucidação do funcionamento do SEC despertou a atenção da comunidade científica na época, uma vez que a sinalização desse novo sistema se daria de forma retrógrada, modulando a liberação de outros neurotransmissores. Os eCBs são usualmente sintetizados “*on demand*” (não ficam armazenados) em neurônios pós-sinápticos, atuando como mensageiros em sinapses retrógradas. Mediante ligação de eCBs, a ativação de receptores CBR1 presentes em neurônios pré-sinápticos resulta na redução da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, reduzindo a atividade de circuitos hiperativados. A finalização da sinalização é marcada pela degradação desses eCBs (CADOGAN et al., 1997; GIFFORD; ASHBY, 1996).

Muitos trabalhos já demonstraram que o SEC exerce importante papel em muitos transtornos do neurodesenvolvimento (incluindo-se o TEA) e neuropsiquiátricos, uma vez que desempenha atividades sobre os processos que constituem o neurodesenvolvimento (para revisão, ver DE OLIVEIRA et al., 2019; SINISCALCO, 2014).

Diferentes são os mecanismos reguladores que regem o neurodesenvolvimento, os quais podem atuar favorecendo ou interrompendo os processos de proliferação, diferenciação, migração e maturação celular. A presença de enzimas de síntese e de degradação, bem como de receptores canabinoides em células tronco-neurais (CTNs) e CPNs, sugere que o SEC apresenta funções relevantes no controle desses processos durante a formação do SNC (HARKANY et al., 2008; KATONA et al., 2006; KINTNER, 2002). Em CPNs e em neurônios imaturos, o aumento do Ca^{2+} intracelular parece favorecer a produção de eCBs (MACCARRONE et al., 2014). Além disso, diferentes fatores de crescimento também parecem contribuir com o aumento nos níveis de 2-AG, que por sua vez, favorece a proliferação celular e a maturação neuronal (KEIMPEMA et al., 2013a, 2013b; OUDIN; HOBBS; DOHERTY, 2011). De fato, a inibição farmacológica da enzima responsável pela síntese do 2-AG, a DAGL, gerou uma resposta de redução na proliferação de CTNs embrionárias em um modelo *in vitro*, reforçando seu importante papel na regulação desse processo (GONCALVES et al., 2008). No se que refere a AEA, seu papel ao longo do neurodesenvolvimento ainda não é muito claro,

tendo em vista que a inibição de NAPE-PLD ou de FAAH geraram respostas finais semelhantes, culminando com a indução da proliferação de CTNs embrionárias (AGUADO et al., 2005; CAMPOS et al., 2013).

Sugere-se que esses efeitos provenientes dos eCBs ao longo do desenvolvimento do SNC já sejam mediados por receptores CBR1 e CBR2, os quais apresentam variações em suas expressões durante as etapas de proliferação, diferenciação, migração e maturação celular. De maneira geral, o CBR2 parece ser mais expresso em células pouco comprometidas. Em contrapartida, o CBR1 parece ser mais abundante em células com comprometimento neuronal já estabelecido (HARKANY et al., 2007; MATO; OLMO; PAZOS, 2003). A funcionalidade desses receptores durante o neurodesenvolvimento de fato já foi comprovada, uma vez que a ablação genética de CBR1 no córtex embrionário mostrou inibir a proliferação de CTNs, enquanto favoreceu o comprometimento celular com o fenótipo neuronal (KEIMPEMA et al., 2013a). Ademais, a ativação farmacológica de CBR1 em precursores neurais corticais estimulou um aumento no *pool* de CTNs, bem como favoreceu a sobrevivência dessas células (AGUADO et al., 2006). Sugere-se ainda que, a ativação desses receptores canabinoides mediada por canabinoides endógenos ou exógenos também parece favorecer a diferenciação de células astrogliais em um modelo *in vitro* (AGUADO et al., 2006). Animais nocaute para CBR1, apesar de não exibirem alterações morfológicas aparentes no encéfalo, demonstram maior taxa de mortalidade, déficits motores e hipoalgesia quando comparados a animais heterozigotos provenientes da mesma reprodução (MARSICANO et al., 2003; ZIMMER et al., 1999).

A regulação da proliferação de progenitores de células piramidais, assim como a migração de células piramidais imaturas no córtex, é mediada pela sinalização endocanabinoide (MULDER et al., 2008). Sabe-se que CBR1 é expresso em células progenitoras intermediárias (CPIs), as quais se diferenciam posteriormente em células piramidais (BISOGLIO et al., 2003; MULDER et al., 2008). Nesse contexto, foi sugerido que o receptor CBR1 também esteja envolvido na organização das camadas corticais, tendo em vista que, camundongos nocaute para CBR1 em neurônios glutamatérgicos durante a fase de desenvolvimento cortical exibiram uma desorganização na camada cortical V, gerando respostas motoras deficitárias nesses animais (DÍAZ-ALONSO et al., 2015; KEIMPEMA et al., 2013b; MAISON et al., 2009).

Ainda com relação a fase de desenvolvimento cortical, a sinalização via CBR1 também parece ser fundamental para integração de interneurônios GABAérgicos (BERGHUIS et al., 2005; ROLAND et al., 2014). Por certo, foi observado a existência de receptores CBR1 em interneurônios GABAérgicos embrionários migrando para se diferenciarem em interneurônios

CBR1/colecistocinina ou CBR1/calretinina. A ativação desse receptor canabinoide nessas células, via canabinoides endógenos ou exógenos, parece regular o crescimento axonal e o formato de arborização dendrítica (BERGHUIS et al., 2005; GONCALVES et al., 2008; MOROZOV; TORII; RAKIC, 2009; ROLAND et al., 2014).

As funções atribuídas aos receptores CBR2 ao longo das etapas do neurodesenvolvimento ainda permanecem sob investigação. Frente a ação de um antagonista CBR2, observou-se uma redução na capacidade proliferativa de CTNs (PALAZUELOS et al., 2012), enquanto a ação de um agonista CBR2 favoreceu o ciclo celular e a diferenciação neural (MOLINA-HOLGADO et al., 2007). Além disso, exercendo sua atividade via CBR2, o 2-AG demonstrou favorecer a diferenciação precoce de oligodendrócitos (ALPÁR et al., 2014).

Somados, esses achados reiteram o importante papel da sinalização endocanabinoide ao longo do neurodesenvolvimento.

Existem evidências que reforçam a participação do SEC na fisiopatologia do TEA. Estudo clínico conduzido em crianças com diagnóstico TEA revelou uma conectividade anormal no encéfalo desses pacientes, sugerindo que a ausência de receptores CBR1 possam estar envolvidos na orientação inadequada de axônios (MCFADDEN; MINSHEW, 2013). Ademais, níveis reduzidos de eCBs circulantes também já foram relatados em pacientes no espectro, podendo refletir uma redução do tônus canabinoide no SNC (ARAN et al., 2019b).

Em modelo animal TEA por exposição embrionária ao AVP foram identificados déficits nos padrões comportamentais relacionados a comunicação e interação social. Nesses animais, os receptores CBR1 exibiam fosforilação alterada a depender da região encefálica, alterações essas acompanhadas de uma modificação no metabolismo de AEA. De fato, em animais expostos ao AVP, a expressão de NAPE-PLD encontrava-se reduzida, enquanto a expressão de FAAH, aumentada, sugerindo-se que a sinalização endocanabinoide mediada por AEA nesse modelo TEA apresentava significativa redução. A administração de um inibidor da enzima FAAH como estratégia para aumentar a sinalização via AEA foi capaz de reverter os comportamentos deficitários previamente identificados, reforçando um possível envolvimento do SEC no TEA (KERR; GILMARTIN; ROCHE, 2016; SERVADIO et al., 2016). Atrelado a esses achados, outro estudo também conduzido em modelo animal TEA por exposição ao AVP demonstrou que, no córtex pré-frontal e no hipocampo, existia uma redução na expressão de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma tipo alfa e gama (PPAR α/γ) e receptores acoplado à proteína G 55 (GPR55). Esses receptores são alvos alternativos adicionais dos eCBS e que podem estar envolvidos nas alterações comportamentais presentes no TEA (KERR et al., 2013).

Trabalho descrito por Földy e colaboradores (2013) mostra que mutações da neurologina-3 comumente associadas ao TEA contribuem com a interrupção da sinalização tônica do SEC (FÖLDY; MALENKA; SÜDHOF, 2013).

De uma forma geral, diferentes evidências reforçam a potencial participação do SEC na fisiopatologia do TEA. Entretanto, os mecanismos possivelmente atrelados a essas alterações ainda permanecem sob investigação.

1.5 O CANABIDIOL NO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O CBD é o segundo fitocanabinoide de maior concentração presente na *Cannabis sativa*, sendo caracterizado pela ausência de efeitos psicotomiméticos. Com trabalhos datados desde o início dos anos 70, muitos são os grupos de pesquisadores ao redor do mundo engajados na caracterização das mais diversas propriedades e aplicações farmacoterapêuticas do CBD (CAMPOS; GUIMARÃES, 2008, 2009; CARLINI et al., 1973; GUIMARÃES et al., 1990, 1994; HAMPSON et al., 1998; KARNIOL et al., 1974; MOREIRA; GUIMARÃES, 2005; ZUARDI et al., 2009, 1993). Como resultados desses esforços, inúmeros foram os dados demonstrando evidências de diferentes ações terapêuticas do CBD sobre condições patológicas, incluindo funções neuroprotetoras em doenças neurodegenerativas, ação antioxidante, analgésica, antipsicótica, ansiolíticas, antidepressiva e antiepiléptica (CAMPOS et al., 2016; MARTÍN-MORENO et al., 2011; PRYCE et al., 2015; ZLEBNIK; CHEER, 2016; ZUARDI et al., 2012). Esse vasto repertório terapêutico é reflexo da interação do CBD sobre os mais diversos tipos de alvos farmacológicos presentes em diferentes tipos celulares (neurônios, células da glia) (CAMPOS et al., 2012; SCARANTE et al., 2021).

No que diz respeito ao SEC, estudos de *binding* evidenciaram uma baixa afinidade do CBD pelos receptores canabinoides CBR1 e CBR2 (SHOWALTER et al., 1996). Sua ação sobre CBR1 pode estar relacionada a sua atuação como um modulador alostérico negativo nesse receptor (LAPRAIRIE et al., 2015; THAM et al., 2019). Curiosamente, no entanto, já foi demonstrado que muitos dos efeitos observados frente a administração de CBD eram revertidos pela ação de agonistas inversos de CBR1 ou até mesmo ausentes em modelos animais que não expressavam este receptor canabinoide (CAMPOS et al., 2013; CASAROTTO et al., 2010). Ademais, estudo *in vitro* evidenciou que o CBD pode atuar como um antagonista de CBR1 e ainda como um agonista inverso de CBR2 (THOMAS et al., 2007). Bisogno e colaboradores (2001) observaram que o CBD também promovia uma potencialização da neurotransmissão mediada por AEA mediante sua ação inibitória sobre a enzima de degradação FAAH

(BISOGNO et al., 2001), mecanismo o qual parece estar associado aos seus efeitos tipo-anticompulsivo, de facilitação da neurogênese hipocampal adulta e do bloqueio ansiogênico frente a protocolos de estresse crônico imprevisível (para detalhes, ver CAMPOS et al., 2012). Além do SEC, outros alvos já foram identificados como potencialmente envolvidos nos efeitos exercidos pelo CBD. No que se refere às suas propriedades ansiolíticas e antidepressivas agudas, achados pontuam principalmente o envolvimento de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} (BISOGNO et al., 2001; CAMPOS; GUIMARÃES, 2008; RUSSO et al., 2005; SAMUELS; HEN, 2011; SANTARELLI et al., 2003; ZUARDI et al., 1993). O CBD exibe potente ação antioxidante, neuroprotetora e anti-inflamatória de forma independente de CBR1/CBR2, diminuindo dano neuronal pelo depósito de proteína β -amiloide; reduzindo a produção de NADPH oxidases responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO); e atenuando a geração de superóxido mitocondrial e a ativação de NF- κ B (fator de transcrição relacionado à respostas celulares por estímulos de estresse, citocinas, radicais livres, antígenos virais e bacterianos) mediada por altas concentrações de glicose (ESPOSITO et al., 2006, 2011; GARCÍA-ARENCIBIA et al., 2007; RAJESH et al., 2007). Ainda, a ativação do receptor vaniloide de potencial transitório 1 (TRPV1) por esse fitocanabinoide exibe efeitos antipsicóticos e anticonvulsivantes (BISOGNO et al., 2001; DE PETROCELLIS et al., 2011; IANNOTTI et al., 2014). Somados a esses achados, o CBD também parece atuar inibindo a captação de adenosina (CARRIER; AUCHAMPACH; HILLARD, 2006; LIOU et al., 2008), antagonizando GPR55 (RYBERG et al., 2007), como um agonista de PPAR γ (ESPOSITO et al., 2011) e favorecendo o aumento de Ca²⁺ intracelular (DRYSDALE et al., 2006). Todavia, mais estudos em modelos animais tornam-se necessários para uma melhor compreensão acerca do envolvimento desses alvos sobre os efeitos comportamentais do CBD.

É de suma importância considerarmos a possibilidade de que, em diferentes contextos patológicos, exista uma variação no perfil farmacológico exercido pelo CBD, ou seja, um mesmo efeito pode estar atrelado a diferentes mecanismos de ação a depender do distúrbio neurológico ou neuropsiquiátrico avaliado.

Atrelado ao seu vasto repertório terapêutico, o CBD também parece ter um bom desempenho no perfil de segurança, características essas que o evidenciam dentre os quase 150 fitocanabinoides já identificados (HANUŠ et al., 2016). Como citado anteriormente, o CBD apresenta-se substancialmente útil em muitos distúrbios que afetam o SNC, sendo inclusive, analisado quanto ao seu potencial terapêutico na clínica do TEA (LOSS et al., 2021; PEDRAZZI et al., 2022; POLEG et al., 2019).

Atualmente, os mecanismos exatos por meio dos quais o CBD gera seus efeitos benéficos ainda não são bem elucidados. No entanto, a administração terapêutica desse fitocanabinoide demonstrou minimizar sintomas inerentes ao TEA na clínica. Ensaio clínico com tratamento oral de CBD em crianças com TEA demonstrou melhorias comportamentais e também na ansiedade e comunicação. Com uma taxa de 60 a 70% de respostas positivas frente ao tratamento, os efeitos colaterais mais relatados foram sonolência e perda de apetite, sendo, no entanto, bem tolerados pelos pacientes durante o estudo (ARAN et al., 2019a; BARCHEL et al., 2019).

Ensaio de fase 1b-2 da farmacoterapia com CBD no TEA exibiram respostas positivas no que se refere ao perfil de agressividade, hiperatividade e ansiedade. Outros estudos em fases mais avançadas de investigação também encontram-se em andamento, no entanto, avaliando o perfil terapêutico do CBD no tratamento de casos de autismo síndrômicos, tais como na Síndrome do X Frágil, exibindo melhorias na interação social, irritabilidade e sintomas emocionais (HEUSSLER et al., 2019; TARTAGLIA; BONN-MILLER; HAGERMAN, 2019).

Apesar de estudos clínicos evidenciarem resultados promissores para o efeito terapêutico do CBD no TEA, melhorando aspectos comportamentais nos padrões motores e sociais (BARCHEL et al., 2019; LOSS et al., 2021), é importante destacar que, a maioria das metodologias empregadas utiliza extratos de *Cannabis* de composição errática, ou seja, óleos enriquecidos com CBD na presença de outros fitocanabinoides, principalmente Δ^9 -THC, em diferentes proporções e graus de pureza.

Ainda, revisão conduzida por Loss e colaboradores relata que, em relação aos ensaios pré-clínicos em modelos TEA, até o momento nenhum estudo utilizando CBD foi realizado durante a fase de neurodesenvolvimento (LOSS et al., 2021).

De uma forma geral, os mecanismos de ação inerentes ao CBD no tratamento do TEA ainda permanecem especulativos. Nesse sentido, além de ensaios clínicos de forte impacto mostrarem-se extremamente necessários para uma melhor elucidação do potencial de eficácia e segurança do CBD em diferentes doses, esquemas posológicos e faixas etárias (tendo em vista que o TEA representa uma condição constitutiva que se estende por toda vida), também torna-se essencial o desenvolvimento de modelos experimentais capazes de mimetizar as alterações inerentes ao TEA e que funcionem como ferramentas para triagem e avaliação de diferentes compostos de interesse farmacológico, como o CBD.

1.6 ZEBRAFISH COMO MODELO PARA ESTUDO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Atrelado a ausência de mecanismos bem estabelecidos está o desafio em mimetizar transtornos complexos, tal como o TEA, principalmente no que se refere a translação de resultados para a clínica. Nesse contexto, torna-se imprescindível optar por um modelo que garanta uma representação mais fidedigna da condição a qual pretende-se avaliar e que, ainda, seja capaz de reduzir significativamente os diferentes graus de vieses no estudo.

Muitos modelos animais foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a compreensão da neurobiologia do TEA (CHEN et al., 2020b; RANGER; ELLENBROEK, 2015; SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005). Mesmo que um único modelo não reproduza completamente todas as alterações associadas, os principais sintomas conseguem ser mimetizados e são suficientes para permitir o estudo e uma avaliação mais meticulosa das alterações moleculares, proteômicas, celulares e comportamentais inerentes a esse transtorno. Nesse contexto, temos o zebrafish (*Danio rerio*), denominado popularmente como paulistinha ou peixe-zebra, um teleósteo de pequeno porte (3-4 cm), pertencente à família dos *Cyprinidae*, à ordem dos *Cypriniformes*, nativo de rios do Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão) (LAWRENCE, 2007; SCHOLZ et al., 2008). Apresentando uma arquitetura neural altamente conservada, o zebrafish permite comparações com outras espécies mais comumente usadas, tais como roedores, sendo inclusive um modelo amplamente considerado frente suas numerosas vantagens econômicas e logísticas, quando comparados aos modelos de mamíferos (BAILEY et al., 2016). Na neurociência a utilidade do zebrafish durante os estágios adulto e embrio-larval tem crescido de forma considerável nas últimas décadas, pois trata-se de um vertebrado que possui seu genoma completamente caracterizado (JONES; NORTON, 2015; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014) e que possui alta homologia quando comparado aos humanos, apresentando cerca de 70% de genes ortólogos, característica que viabiliza o estudo de muitas doenças e condições humanas.

No que se refere ao SNC, o encéfalo do zebrafish compartilha muitas semelhanças ao nível organizacional, morfológico e funcional quando comparado ao ser humano (Figura 3), características que o configuram como uma ferramenta de grande valia para modelagem de distúrbios que atingem o SNC. Assim como em todos os vertebrados, o encéfalo do zebrafish origina-se do neuroectoderma e é organizado em telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Além de conservados os diferentes sistemas de neurotransmissão e neuromodulação (GABAérgico, glutamatérgico, dopaminérgico, noradrenérgico,

serotonérgico, acetilcolinérgico, endocanabinoide, entre outros), o modelo zebrafish também possui as células da glia (astrócitos/astroglia, micróglia, oligodendrócitos) com funções e estruturas muito semelhantes às dos humanos (ASTELL; SIEGER, 2017; CHEN et al., 2020a; HORZMANN; FREEMAN, 2016; JURISCH-YAKSI; YAKSI; KIZIL, 2020; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; OLTRABELLA et al., 2017; PINZON-OLEJUA et al., 2017; STEWART et al., 2014).

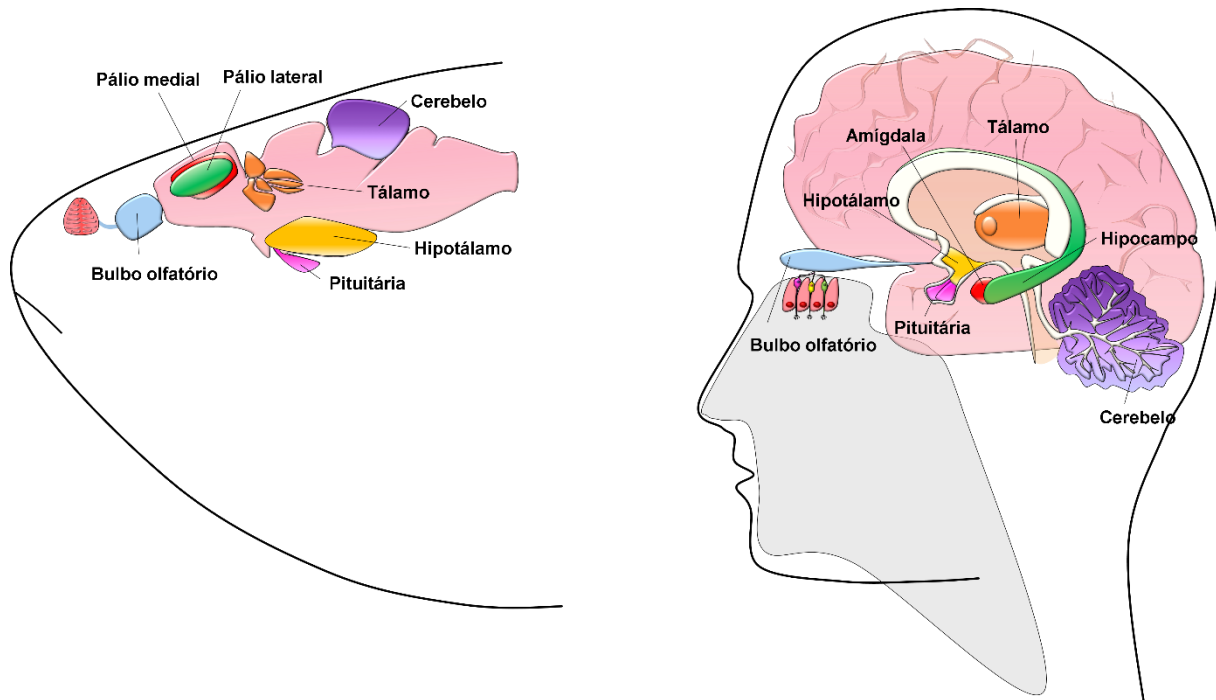


Fig. 3: Encéfalo de zebrafish adulto *versus* encéfalo humano demonstrando a organização do Sistema Nervoso Central entre as espécies.

Fonte: modificado de Costa et al., (2021).

Aliado as semelhanças no SNC, o zebrafish apresenta homologia em todas as funções sensoriais típicas (visão, tato, olfato, paladar e audição) (BYRD et al., 1996; WULLIMANN; PUELLES, 1999). Dessa forma, testes comportamentais também podem ser avaliados no modelo. Cerca de 190 fenótipos comportamentais distintos (fases embrio-larval, larval e adulta) já foram documentados e catalogados na última década, incluindo aqueles que podem ser observados logo nas primeiras horas de vida do animal (KALUEFF et al., 2013). Ainda, assim como realizado em modelos mamíferos, diferentes enzimas podem ser avaliadas com o auxílio de ensaios bioquímicos no zebrafish, viabilizando, por exemplo, a quantificação de marcadores relacionados ao estresse oxidativo (EROs, peroxidação lipídica, atividade enzimática da catalase, glutatona-S-transferase) (DINIZ et al., 2015; JIN et al., 2015; SARASAMMA et al., 2019).

Sabe-se que os modelos animais existentes para o estudo do TEA são significativamente demorados e trabalhosos, sendo necessário o desenvolvimento de abordagens mais simples e rápidas para a análise dos subconjuntos de alterações associadas ao TEA, permitindo uma melhor compreensão da condição (DWIVEDI et al., 2019). Tendo em vista que a raiz das alterações do neurodesenvolvimento envolvidos no TEA está compreendida no período de desenvolvimento *in utero*, características tais quais a fertilização *ex vivo* de embriões, uma alta taxa de fecundidade (cerca de 100 a 200 ovos por dia), transparência embrionária, desenvolvimento rápido e a facilidade na administração de compostos de interesse (solubilização/absorção em água) fazem do zebrafish uma das principais ferramentas de escolha para o estudo da fisiopatologia do autismo (STEWART et al., 2014; TROPEPE; SIVE, 2003), particularmente frente a exposição ao AVP (CHEN et al., 2018; DWIVEDI et al., 2019; ZIMMERMANN et al., 2015). A Figura 4 traz uma comparação das fases que compreendem o período embrionário/fetal entre o zebrafish e os seres humanos.

Atrelado a essas vantagens, já foi demonstrado que com apenas 24-48 horas de vida, embriões de zebrafish já apresentam muitos dos componentes que constituem os sistemas neurotransmissores/neuromoduladores, bem como as subpopulações neurais presentes em mamíferos (ASTELL; SIEGER, 2017; CHEN et al., 2020a; OLTRABELLA et al., 2017; PINZON-OLEJUA et al., 2017; STEWART et al., 2015). Em linhas gerais, muitas das abordagens comportamentais, genéticas, moleculares e bioquímicas previamente estabelecidas em modelos mamíferos, também são passíveis de aplicação no zebrafish, porém com a vantagem da agilidade associada à confiabilidade e reprodutibilidade dos dados.

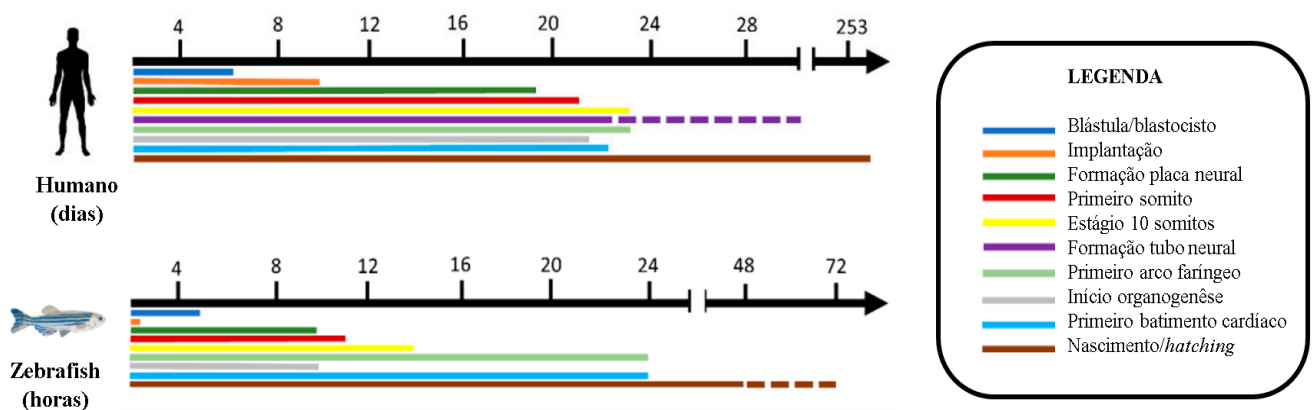


Fig. 4: *Timeline* comparativa entre seres humanos e zebrafish referente às etapas iniciais de desenvolvimento.

Fonte: modificado de Chahardehi; Arsad; Lim, (2020).

1.7 HIPÓTESE

Muitos são os esforços na busca pelo entendimento da fisiopatologia do TEA, assim como na investigação de novos compostos capazes de melhorar a qualidade de vida de pacientes no espectro. Nesse contexto, a melhor compreensão acerca dos mecanismos pelos quais o CBD atua promovendo as melhorias observadas na clínica do TEA tornam-se de grande valia, uma vez que, é imprescindível compreender como o tratamento com esse fitocanabinoide modifica diferentes componentes do SNC no contexto TEA. Além disso, conhecer a dinâmica farmacológica de um composto viabiliza a adequação de esquemas posológicos e a previsão de possíveis efeitos adversos.

A partir disso e, tendo em vista que, i) o TEA compreende um conjunto heterogêneo de alterações ao nível do SNC, as quais resultam em déficits nos padrões comportamentais motores e sociais; ii) que o AVP, quando utilizado durante o período crítico do neurodesenvolvimento, consegue mimetizar alterações compatíveis com as observadas na clínica do TEA; iii) e que o CBD apresenta um vasto repertório terapêutico frente sua modulação sobre os mais diversos sistemas fisiológicos, os quais também se encontram alterados no curso do TEA, a hipótese do presente estudo propõe que o CBD é capaz de atenuar as alterações comportamentais induzidas pela exposição ao AVP durante o período embrionário do zebrafish.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo animal zebrafish rápido e eficaz para estudo da fisiopatologia do TEA, gerando uma ferramenta robusta para avaliação do potencial farmacotepêutico do CBD sobre as alterações comportamentais em um modelo translacional de autismo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar o modelo TEA no zebrafish pela exposição embrionária ao AVP;
- b) Para definição do controle positivo do tratamento, padronizar a melhor concentração de RISP;
- c) Avaliar o potencial farmacoterapêutico do CBD no modelo zebrafish TEA-AVP ;
- d) Avaliar o desenvolvimento morfológico do modelo TEA-AVP frente a exposição prolongada aos tratamentos RISP e CBD nas concentrações padronizadas;
- e) Avaliar o *status* do sistema antioxidante no modelo animal TEA mediante a quantificação de biomarcadores de estresse oxidativo: glutational-S-transferase, catalase e peroxidação lipídica;
- f) Quantificar os níveis de 5-HT, DA, AEA e 2-AG em larvas expostas previamente ao AVP e tratadas com RISP ou CBD;
- g) Investigar o efeito da exposição embrionária ao AVP, seguida ou não dos tratamentos com RISP ou CBD, sobre as populações neurais nesses animais, quantificando marcadores para avaliação da apoptose e proliferação celular; astrócitos e o perfil sináptico inibitório/excitatório pela marcação de proteínas ligantes de Ca^{2+} .

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ZEBRAFISH: MANUTENÇÃO, AQUISIÇÃO DE OVOS E EUTANÁSIA

Zebrafish (*Danio rerio*) adultos produzidos na unidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP/USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil) foram utilizados para a obtenção dos embriões/larvas utilizados no presente estudo. Os adultos foram mantidos em sistema de recirculação ZebTEC (Tecniplast, Itália) utilizando água obtida por sistema de osmose reversa, em condições padrão (pH $7,5 \pm 0,5$, temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido a 95% de saturação e condutividade $750 \pm 50 \mu\text{s/cm}$, 14h:10h fotoperíodo de luz/escuridão), sendo alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (TetraMin Tropical Flakes[®]).

Para a aquisição dos ovos, no dia anterior à desova, reprodutores machos e fêmeas foram colocados (na proporção de 2 machos:1 fêmea) e mantidos separados em aquários de 1L *overnight*. No início da manhã seguinte, o separador era removido do aquário permitindo o contato direto entre machos e fêmea, viabilizando a reprodução. Após a desova, os lotes de ovos foram cuidadosamente coletados e lavados em água osmótica autoclavada. Ovos fertilizados em período de clivagem (4 a 64 células) foram selecionados aleatoriamente com o auxílio de um estereomicroscópio (Stemi 508, Zeiss) para os experimentos.

A manipulação dos embriões/larvas em cada ensaio pode provocar possíveis danos mecânicos nos organismos-teste, que por sua vez podem afetar os resultados subsequentes. Dessa forma, um número suficiente de embriões foi utilizado de forma isolada para cada teste, tendo por objetivo minimizar ao máximo a inclusão desse erro. Cada teste/ensaio foi realizado em triplicata para cada grupo analisado.

O procedimento de eutanásia dos animais atendeu o *Guideline for Use of Zebrafish do National Institutes of Health* (2009), bem como a Resolução Normativa nº 13 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (2013) obedecendo as recomendações preconizadas.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Instituição (CEUA-FCFRP) sob o número de protocolo: 19.1.243.60.4 (ANEXO A).

3.2 DROGAS

As drogas Valproato de Sódio (Prati-Donaduzzi), Risperidona (Prati-Donaduzzi) e Canabidiol (BSPG) foram dissolvidas em seus respectivos solventes (água ultrapura para AVP e RISP; dimetilsulfóxido - DMSO para CBD) e preparadas em concentrações maiores para alíquotagem e estoque (AVP: 12,5 mM; RISP: 0,030 mM; CBD: 9,54 mM).

As soluções-estoque foram diluídas em água reconstituída (padrão ISO-7346) (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO, 1996), imediatamente e somente antes da utilização para preparo das concentrações de trabalho. É importante ressaltar que, para o preparo das concentrações-teste de CBD, as soluções-estoque (previamente dissolvidas em 100% DMSO) foram diluídas garantindo, simultaneamente, as concentrações de interesse da droga e respeitando o limite máximo de exposição ao DMSO estabelecido em estudo prévio de toxicidade (0,01% v/v) (VALIM BRIGANTE et al., 2018).

Para os protocolos de exposição, os embriões foram alocados individualmente em placas de 24 poços contendo 2 mL de solução da(s) droga(s) (ou, para o controle negativo, seus respectivos veículos) por um período de tempo previamente estabelecido. Durante todo o protocolo experimental, os embriões/larvas foram mantidos em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (*Biochemical Oxygen Demand* - BOD; Solab SL 224/170) sob condições ideais de desenvolvimento ($26 \pm 1^\circ\text{C}$ em ciclo de 14/10h claro-escuro). No período de isenção total de drogas, os animais foram mantidos na densidade de 1 larva/poço contendo 2mL de água reconstituída até o dia dos experimentos.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Tendo em vista os diferentes objetivos do presente estudo, o mesmo foi dividido em três experimentos distintos: 1) padronização do modelo animal TEA pela utilização do AVP; 2) padronização da concentração de RISP como controle positivo do tratamento do modelo TEA induzido pela exposição embrionária ao AVP; 3) avaliação do potencial farmacoterapêutico do CBD como tratamento do modelo TEA induzido pela exposição embrionária ao AVP.

3.3.1 Experimento 1: padronização do AVP para indução do modelo animal TEA

Para a padronização do AVP, embriões de zebrafish foram expostos continuamente (exposição única) às concentrações de 5, 25, 125, 625 ou 1.250 μM de AVP a partir de 4 horas

pós-fertilização (hpf) até 48 hpf, sendo monitorados a cada 24h a fim de estabelecer a melhor concentração do composto capaz de gerar fenótipos comportamentais associados ao TEA no zebrafish (CHEN et al., 2018; ZIMMERMANN et al., 2015). Após esse período de exposição, os embriões foram removidos da droga e mantidos em água reconstituída até 7 dias pós-fertilização (dpf). Assim, os seguintes grupos foram avaliados:

- 1) **Grupo VEÍCULO (controle negativo):** embriões expostos apenas ao veículo (água OECD);
- 2) **Grupo AVP 5:** embriões expostos à 5 μM de AVP de 4-48 hpf;
- 3) **Grupo AVP 25:** embriões expostos à 25 μM de AVP de 4-48 hpf;
- 4) **Grupo AVP 125:** embriões expostos à 125 μM de AVP de 4-48 hpf;
- 5) **Grupo AVP 625:** embriões expostos à 625 μM de AVP de 4-48 hpf;
- 6) **Grupo AVP 1250:** embriões expostos à 1.250 μM de AVP de 4-48 hpf.

3.3.1.1 Ensaio de movimentação embrionária espontânea: *tail coiling*

Após 24 horas da exposição ao AVP, foi realizado o ensaio de movimentação espontânea dos embriões ainda no córion, analisando se as concentrações-teste de AVP seriam capazes de modificar um dos primeiros padrões motores desenvolvidos pelo zebrafish nas primeiras horas de vida, o *tail coiling behavior* (enrolamento espontâneo de cauda, Figura 5), refletindo assim um possível perfil de neurotoxicidade do AVP (DE OLIVEIRA; BRIGANTE; OLIVEIRA, 2021).

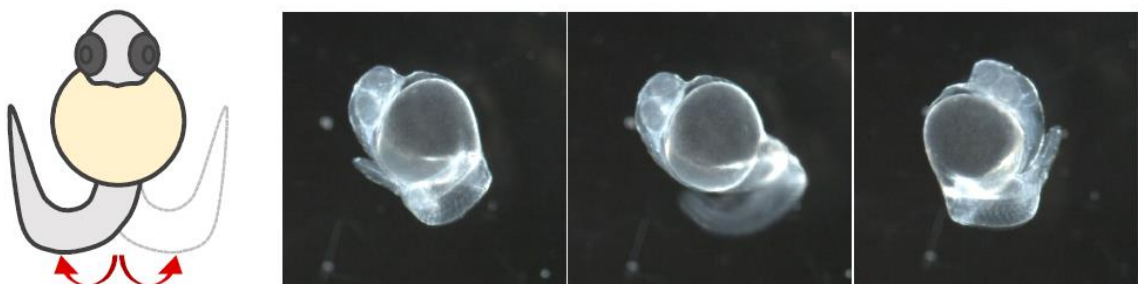


Fig. 5: *Tail coiling behavior* em embriões. À esquerda, desenho com representação esquemática do padrão de movimentos caudais espontâneos. À direita, três fotos representativas de embriões, manualmente decorionados para melhor visualização, em posições de enrolamento de cauda. Amplificação de 1X em estereomicroscópio.

Fonte: De Oliveira; Brigante; Oliveira (2021).

Para isso, os embriões foram acondicionados em uma lâmina escavada contendo suas respectivas soluções-teste de AVP, sendo aclimatados por 5 minutos (visando reduzir possíveis distúrbios causados pela transferência). O comportamento foi gravado por 3 minutos com o auxílio de uma câmera (AxioCam ICc 5, Zeiss, Alemanha) acoplada ao estereomicroscópio (Stemi 508, Carl Zeiss, Alemanha) com iluminação de campo claro. Os dados de porcentagem de tempo de movimentação embrionária espontânea obtidos foram extraídos e analisados pelo *software* DanioScope (Noldus, versão: 1.1, Wageningen, Holanda) (DE OLIVEIRA; BRIGANTE; OLIVEIRA, 2021; VALIM BRIGANTE et al., 2018).

3.3.1.2 Taxa de mortalidade e malformações induzidas pelo AVP

Após o período de exposição ao AVP, as larvas de zebrafish com 5 dpf foram avaliadas quanto a indicadores de mortalidade e malformações. A mortalidade dos embriões foi analisada pela presença de coagulação, irregularidades na formação dos somitos, problemas na liberação da cauda e perda de batimentos cardíacos. Para avaliação de malformações, os indicadores foram a presença de alterações no saco vitelino, defeitos na inflagem da bexiga natatória, edemas do pericárdico e saco vitelino, deformações esqueléticas e a incapacidade de eclosão (KIMMEL et al., 1995). As imagens foram capturadas por uma câmera digital (AxioCam ICc 5, Zeiss, Alemanha) acoplada ao estereomicroscópio (Stemi 508, Carl Zeiss, Alemanha) e analisadas pelo experimentador.

3.3.1.3 Ensaio comportamentais

Com o auxílio de uma placa de 24 poços modificada especialmente para o presente estudo (8 poços para campo aberto; 8 poços para teste de ataque ao espelho; 8 poços para interação social), todos os parâmetros comportamentais foram avaliados em uma única idade larval (7 dpf), período no qual as larvas já não se encontravam sob nenhuma das exposições ou tratamentos farmacológicos propostos. Os dados relacionados aos perfis de atividade motora, agressividade e interação social foram obtidos a partir do rastreamento e a quantificação automatizada pelo equipamento ZebraBox (ViewPoint Behavior Technology).

3.3.1.3.1 Teste para avaliação da atividade motora: campo aberto

Foi realizado o teste de campo aberto para avaliação do perfil de atividade motora das larvas, sendo a arena de exploração representada por um poço de uma placa de 24 poços.

Sucintamente, as larvas foram transferidas individualmente para novos poços de uma placa inédita ao animal. Cada poço-arena continha 2 mL de água reconstituída. Os dados relativos à distância total percorrida pelas larvas foram coletados (DWIVEDI et al., 2019). O ensaio foi realizado sob iluminação padronizada e registrado durante 15 min/larva, sendo 5 minutos de aclimatação e 10 minutos de teste.

3.3.1.3.2 Teste para avaliação da agressividade: ataque ao espelho

A interação à imagem refletida por um espelho é um parâmetro de avaliação comportamental bem estabelecido para o zebrafish, sendo muito utilizado em estudos do comportamento social e agressivo desses animais (PHAM et al., 2012). Nesse contexto, as larvas foram transferidas individualmente para novos poços de uma placa inédita ao animal, sendo que os poços-teste apresentavam uma semicircunferência espelhada voltada para o centro. Cada poço continha 2 mL de água reconstituída. Os dados relativos ao número de movimentos (investidas) no espelho, bem como o tempo total despendido na área do espelho foram coletados. O ensaio foi realizado sob iluminação padronizada e registrado durante 15 min/larva, sendo 5 minutos de aclimatação e 10 minutos de teste.

3.3.1.3.3 Teste de interação social

Para avaliação do perfil de interação social (CHEN et al., 2018), as larvas foram transferidas individualmente para novos poços de uma placa inédita ao animal, sendo que cada poço-teste apresentava uma larva inédita isolada fisicamente em aparato transparente (poço de aproximadamente 6,6 mm de diâmetro), permitindo o contato visual. Cada poço continha 2 mL de água reconstituída. Os dados relativos ao tempo de permanência na região de interação (quando a distância do aparato contendo a larva de interação for ≤ 1 comprimento do corpo da larva) foram coletados. O ensaio foi realizado sob iluminação padronizada e registrado durante 15 min/larva, sendo 5 minutos de aclimatação e 10 minutos de teste.

Todas as larvas submetidas aos protocolos comportamentais descritos foram eutanasiadas e armazenadas adequadamente para posterior realização de ensaios de imunofluorescência. A Figura 6 ilustra o delineamento adotado no “Experimento 1” do presente estudo.

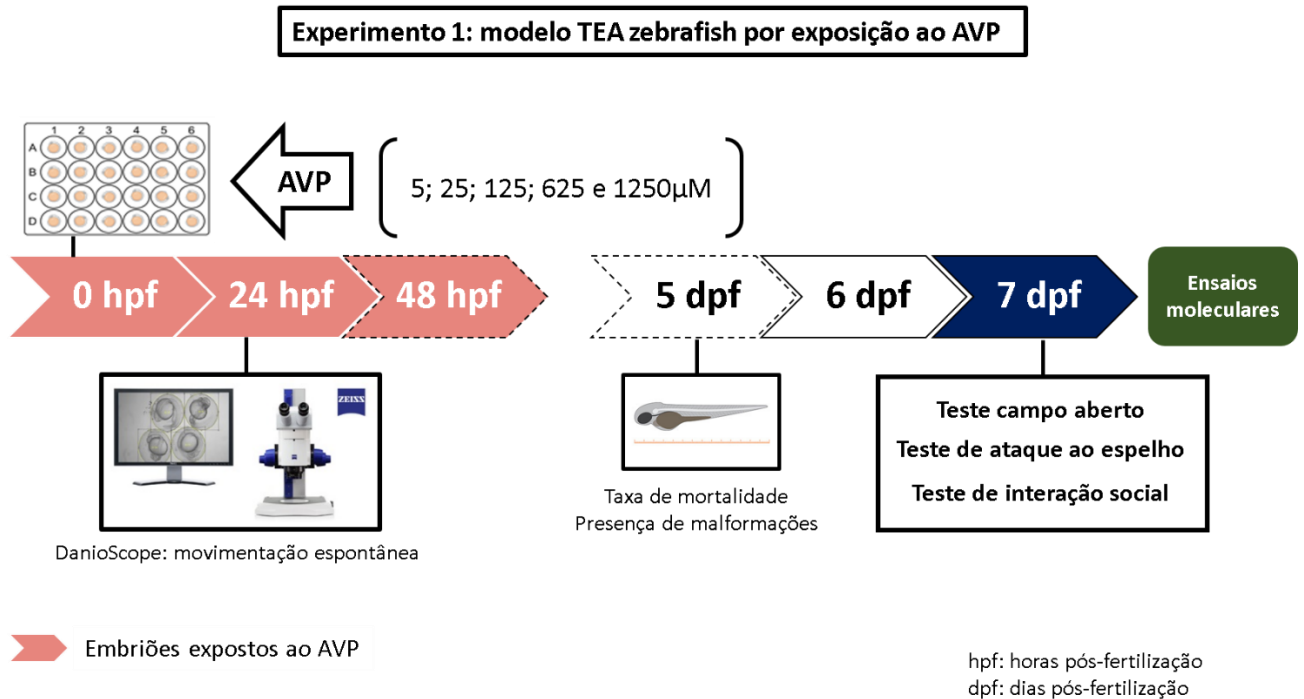


Fig. 6: Delineamento experimento 1: padronização do modelo TEA zebrafish por exposição embrionária ao AVP. Embriões foram expostos a diferentes concentrações de AVP até 48 hpf. Com 24 hpf, esses embriões, ainda expostos ao AVP, foram avaliados quanto à movimentação espontânea dentro do córion. Com 5 dpf, já na ausência de AVP, foram mensuradas taxas de mortalidade e malformações nas larvas. Com 7 dpf, as larvas foram submetidas aos testes comportamentais para avaliação da atividade motora, perfil de agressividade e interação social. Para os ensaios moleculares propostos foram utilizados embriões e larvas de zebrafish provenientes dos ensaios comportamentais realizados.

3.3.2 Experimento 2: padronização do tratamento com RISP

Após o experimento para padronização do AVP, foram avaliadas diferentes concentrações de RISP, um dos fármacos aprovados pelo FDA e mais empregados no tratamento do TEA (GOEL et al., 2018), a fim de utilizá-lo como controle positivo do tratamento para nosso modelo, marcando a reversão, parcial ou total, das manifestações induzidas pela exposição embrionária ao AVP. Baseado em estudo anterior (DWIVEDI et al., 2019), os embriões previamente expostos ou não ao AVP durante 4 a 48 hpf foram tratados

continuamente (exposição única) com as concentrações não-tóxicas de 1 ou 3 μM de RISP no período compreendido entre 2 a 4 dpf, sendo monitorados a cada 24h. Após esse período de exposição, os embriões foram removidos da droga e mantidos em água reconstituída até 7 dpf. Assim, os seguintes grupos foram avaliados:

- 1) **Grupo VEÍCULO/VEÍCULO (controle negativo):** embriões sem exposição ao AVP ou à RISP, apenas aos veículos (água OECD);
- 2) **Grupo VEÍCULO/1 RISP:** embriões sem exposição ao AVP padronizado e tratados com 1 μM de RISP entre 2-4 dpf;
- 3) **Grupo VEÍCULO/3 RISP:** embriões sem exposição ao AVP padronizado e tratados com 3 μM de RISP entre 2-4 dpf.
- 4) **Grupo AVP/VEÍCULO:** embriões expostos apenas ao AVP padronizado e sem tratamento (veículo da RISP entre 2-4 dpf);
- 5) **Grupo AVP/1 RISP:** embriões expostos ao AVP padronizado e tratados com 1 μM de RISP entre 2-4 dpf;
- 6) **Grupo AVP/3 RISP:** embriões expostos ao AVP padronizado e tratados com 3 μM de RISP entre 2-4 dpf.

Conforme descrito previamente no item “3.3.1 Experimento 1” deste trabalho, após a exposição ao AVP e tratamento com RISP, as larvas com 7 dpf, período no qual já não se encontravam sob nenhuma das exposições ou tratamentos farmacológicos propostos, foram submetidas aos ensaios comportamentais para avaliação dos perfis de atividade motora, agressividade e interação social a partir do rastreamento e quantificação automatizada pelo equipamento ZebraBox (ViewPoint Behavior Technology) em uma placa de 24 poços previamente modificada para o presente estudo. Todas as larvas submetidas aos protocolos comportamentais foram eutanasiadas e armazenadas adequadamente para posterior realização de ensaios de imunofluorescência. A Figura 7 ilustra o delineamento adotado no “Experimento 2” do presente estudo.

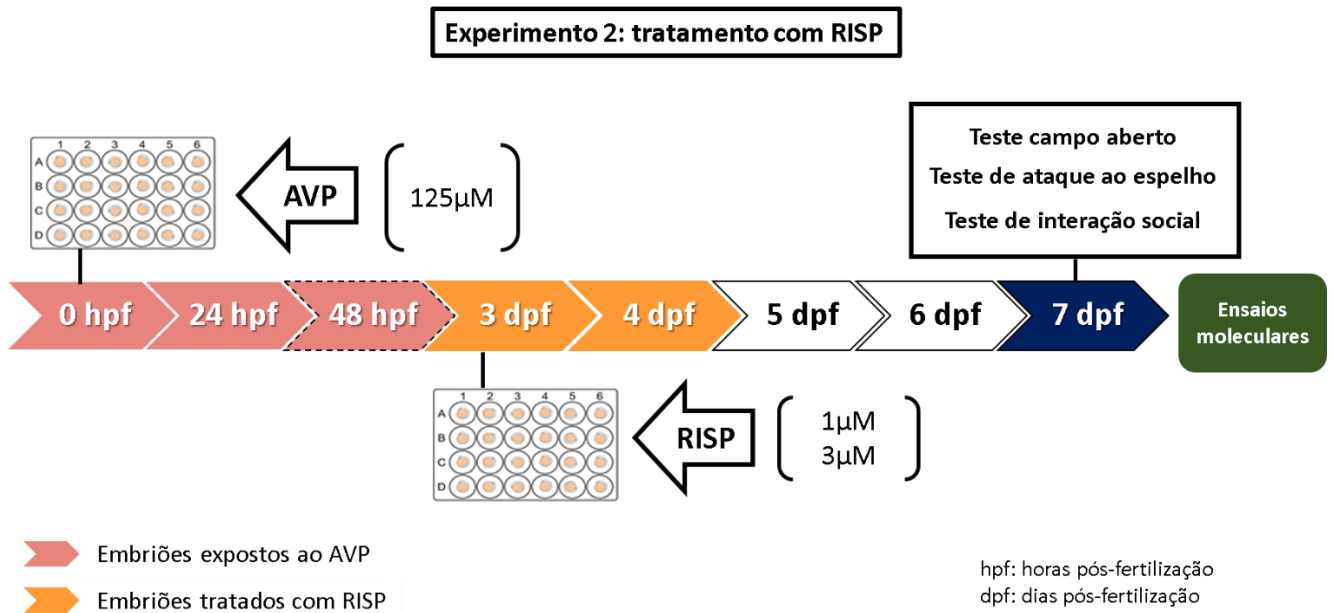


Fig. 7: Delineamento experimento 2: padronização da RISP para utilização como controle positivo no tratamento das alterações induzidas pelo AVP no modelo TEA zebrafish. Embriões foram expostos à concentração padronizada de AVP até 48 hpf, seguido do tratamento com diferentes concentrações de RISP de 2-4 dpf. Com 7 dpf, as larvas foram submetidas aos testes comportamentais para avaliação da atividade motora, perfil de agressividade e interação social. Para os ensaios moleculares propostos foram utilizados embriões e larvas de zebrafish provenientes dos ensaios comportamentais realizados.

3.3.3 Experimento 3: avaliação do perfil farmacoterapêutico do CBD no modelo

Após o experimento para padronização da RISP, foram avaliadas diferentes concentrações de CBD com o objetivo de analisar seu potencial como farmacoterapia no tratamento das alterações comportamentais induzidas pela exposição embrionária ao AVP, comparando ainda, sua eficácia ao controle positivo RISP. Tomando por base estudo prévio (VALIM BRIGANTE et al., 2018), os embriões previamente expostos ou não ao AVP durante 4 a 48 hpf foram tratados continuamente (exposição única) com as concentrações não-tóxicas de 20, 150 ou 300 µg/L de CBD (valores equivalentes a 0,06; 0,48 e 0,95 µM CBD) no período compreendido entre 2 a 4 dpf, sendo monitoradas a cada 24h. Após esse período de exposição, os embriões foram removidos da droga e mantidos em água reconstituída até 7 dpf. Assim, os seguintes grupos foram analisados:

- 1) **Grupo VEÍCULO/VEÍCULO (controle negativo):** embriões expostos apenas ao veículo (água OECD).
- 2) **Grupo VEÍCULO/DMSO:** embriões sem exposição ao AVP ou CBD, apenas aos seus respectivos veículos (água OECD e DMSO 0,01%);
- 3) **Grupo VEÍCULO/CBD 0,06:** embriões sem exposição ao AVP padronizado e tratados com 0,06 μM de CBD entre 2-4 dpf;
- 4) **Grupo VEÍCULO/CBD 0,48:** embriões sem exposição ao AVP padronizado e tratados com 0,48 μM de CBD entre 2-4 dpf;
- 5) **Grupo VEÍCULO/CBD 0,95:** embriões sem exposição ao AVP padronizado e tratados com 0,95 μM de CBD entre 2-4 dpf.
- 6) **Grupo AVP/VEÍCULO:** embriões expostos apenas ao AVP padronizado e sem tratamento (veículo: água OECD);
- 7) **Grupo AVP/DMSO:** embriões expostos apenas ao AVP padronizado e sem tratamento (veículo: DMSO 0,01%);
- 8) **Grupo AVP/CBD 0,06:** embriões expostos ao AVP padronizado e tratados com 0,06 μM de CBD entre 2-4 dpf;
- 9) **Grupo AVP/CBD 0,48:** embriões expostos ao AVP padronizado e tratados com 0,48 μM de CBD entre 2-4 dpf;
- 10) **Grupo AVP/CBD 0,95:** embriões expostos ao AVP padronizado e tratados com 0,95 μM de CBD entre 2-4 dpf;
- 11) **Grupo AVP/RISP (controle positivo do tratamento):** embriões expostos ao AVP padronizado e tratados com a concentração padronizada de RISP entre 2-4 dpf;

Conforme descrito previamente no item “3.3.1 Experimento 1” do presente trabalho, após a exposição ao AVP e tratamento com CBD, as larvas com 7 dpf, período no qual já não se encontravam sob nenhuma das exposições ou tratamentos farmacológicos propostos, foram submetidas aos ensaios comportamentais para avaliação dos perfis de atividade motora, agressividade e interação social a partir do rastreamento e a quantificação automatizada pelo equipamento ZebraBox (ViewPoint Behavior Technology) em uma placa de 24 poços previamente modificada para o presente estudo. Todas as larvas submetidas aos protocolos comportamentais foram eutanasiadas e armazenadas adequadamente para posterior realização de ensaios de imunofluorescência. A Figura 8 ilustra o delineamento adotado no “Experimento 3” do presente estudo.

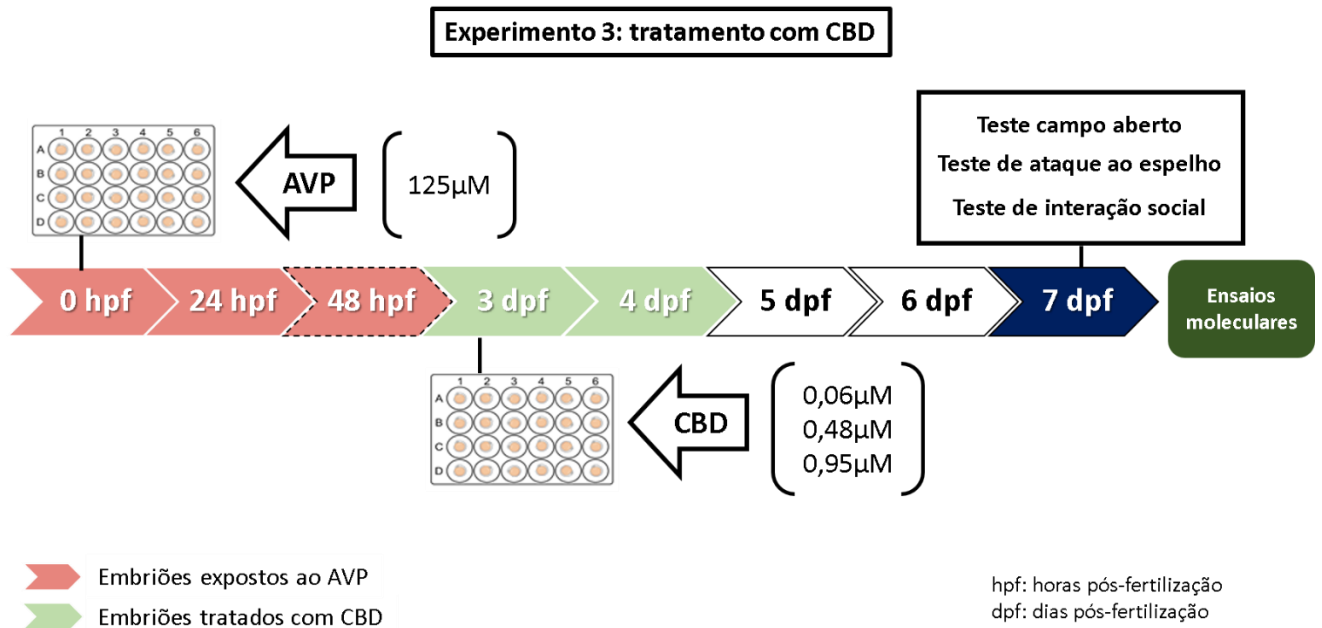


Fig. 8: Delineamento experimento 3: análise do potencial do CBD como farmacoterapia no tratamento das alterações induzidas pela exposição ao AVP. Embriões foram expostos à concentração padronizada de AVP até 48 hpf, seguido do tratamento com diferentes concentrações de CBD de 2-4 dpf. Com 7 dpf, as larvas foram submetidas aos testes comportamentais para avaliação da atividade motora, perfil de agressividade e interação social. Para os ensaios moleculares propostos foram utilizados embriões e larvas de zebrafish provenientes dos ensaios comportamentais realizados.

3.4 ENSAIOS BIOQUÍMICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Novo lote de embriões foi submetido a protocolo de exposição semelhante ao descrito anteriormente no “Experimento 3”, sendo primeiramente expostos ao AVP de 4 a 48hpf e, em seguida, tratados com as concentrações padronizadas de RISP ou CBD de 2 a 4 dpf. Após esse período, os embriões foram removidos de qualquer substância, sendo mantidos em água reconstituída até o 7dpf. Para a análise dos biomarcadores, foram coletados 6 *clusters* de 30 embriões para cada grupo (n=6 réplicas/*pool* de 30 embriões/grupo). Após protocolo de exposição às substâncias de interesse, as larvas foram coletadas em criotubos de 2 mL e eutanasiadas por hipotermia (congelamento em nitrogênio líquido) e imediatamente armazenadas a -80°C até análise.

No dia da análise as amostras obtidas foram descongeladas e imediatamente homogeneizadas com 1.500 µL de KPBS 0,1M (pH 7.4) utilizando homogeneizador ultrassônico. Parte do homogeneizado tecidual foi separado em microtubos contendo solução

de hidroxitolueno butilado a 4% (BHT) previamente pipetada para análise da peroxidação lipídica (LPO). O restante foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C para isolamento do sobrenadante pós-mitocondrial, o qual foi separado em novos microtubos individuais para quantificação das atividades de catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e determinação de proteínas totais (PTN). Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em placas de 96 poços e utilizando o espectrofotômetro de microplacas Multiskan Sky e o *software* SkanIt (versão 6.0.2, Thermo Scientific, EUA) para análise.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) adaptado a microplacas (GUILHERMINO et al., 1996), usando γ -globulina bovina como padrão, e determinado por espectrofotometria (600 nm).

3.4.1 Atividade de GST

A atividade de GST foi monitorada continuamente em 340 nm durante 5 minutos (leitura a cada 20 segundos) (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974) adaptado para microplaca (FRASCO; GUILHERMINO, 2002), quantificando a conjugação de glutathione reduzida (GSH) com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). Em resumo, foram pipetados 50 μL de amostra ou tampão de homogeneização (para o branco da reação) em cada poço. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta multicanal, foram adicionados 250 μL de solução reagente (KPBS 0,2M - pH 6,5; GSH 10 mM; CDNB 60 mM diluído em etanol) em todos os poços (amostras e branco), sendo a leitura das absorbâncias imediatamente efetuada. A atividade foi expressa em nmol/min/mg de proteína.

3.4.2 Atividade de CAT

A atividade da CAT foi monitorada continuamente a 240 nm durante 2 minutos (leitura a cada 20 segundos) (CLAIRBORNE, 1985), medindo a diminuição da absorbância devido ao consumo de H_2O_2 . Sucintamente, foram pipetados 20 μL de amostra ou tampão de homogeneização (para o branco da reação) adicionados de 130 μL de tampão KPBS (0,05M - pH 7,0) em cada poço. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta multicanal, foram adicionados 150 μL de tampão reagente (H_2O_2 0,074%) em todos os poços (amostras e branco), sendo a leitura das absorbâncias imediatamente efetuadas. A atividade foi expressa em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

3.4.3 Conteúdo do produto LPO

O homogenato de LPO foi separado previamente com BHT 4% (v/v) diluído em metanol para interromper a auto oxidação lipídica. A quantificação foi realizada em duas etapas. Primeiramente, em uma capela de exaustão, foram adicionados 100 µL de ácido tricloroacético 100% (TCA 100%) gelado em todos os microtubos que continham as amostras e o branco (tampão de homogeneização + BHT 4%). Todos os microtubos foram vortexados, sendo, em seguida, adicionados de 1 mL de ácido 2-tiobarbitúrico 0,73% (TBA) à temperatura ambiente. Após serem novamente vortexados, todos os microtubos foram acondicionados por 1 hora em forno a 100°C (foram feitos pequenos buracos nas tampas de cada microtubo para viabilizar a saída de gases durante essa etapa). Em um segundo momento, após atingirem a temperatura ambiente e protegidos da luz, os microtubos foram centrifugados a 6000 × g por 10 minutos a 25°C. Após, foram transferidos 950 µL do sobrenadante para novos microtubos. Para proceder com a leitura, o sobrenadante foi pipetado (amostras e branco) em seus respectivos poços em uma placa de 96 poços. Os níveis de produtos endógenos de LPO foram determinados em 535nm como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico por larva (pmol TBARS/larva) (BIRD; DRAPER, 1984; OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979) adaptado por Aloísio Torres et al. (2002) e Wilhelm Filho et al. (2001).

3.5 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA BEXIGA NATATÓRIA FRENTE A EXPOSIÇÃO PROLONGADA AOS TRATAMENTOS RISP E CBD

A fim de avaliar a influência do tratamento prolongado com RISP e CBD em nosso modelo animal induzido por AVP, uma nova abordagem terapêutica foi realizada. Assim como descrito anteriormente, novo lote de embriões expostos ou não previamente ao AVP de 4 a 48hpf foram tratados continuamente (exposição única) com as concentrações já padronizadas de RISP e CBD, agora por um período compreendido entre 2 a 7 dpf. Após esse período, as larvas foram coletadas aleatoriamente respeitando-se os grupos experimentais e transferidas individualmente para uma lâmina escavada para aquisição de imagens capturadas por uma câmera digital (AxioCam ICc 5, Zeiss, Alemanha) acoplada ao estereomicroscópio (Stemi 508, Carl Zeiss, Alemanha). As análises morfológicas relativas à bexiga natatória dos animais foram realizadas com o auxílio do *software* DanioScope (Noldus, Netherlands).

3.6 ENSAIOS DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA E IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para o ensaio de imunoabsorção enzimática, novos lotes de ovos foram utilizados. Para os ensaios de imunofluorescência, foram utilizadas larvas de zebrafish provenientes dos ensaios comportamentais realizados anteriormente.

3.6.1 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para quantificação total de neurotransmissores

Os níveis dos neurotransmissores 5-HT, DA, AEA e 2-AG foram quantificados em amostras de larvas de zebrafish com 7 dpf previamente expostas ao mesmo protocolo de exposição descrito anteriormente. Para isso, foram coletados 3 *clusters* de 30 embriões para cada grupo (n=3 réplicas/*pool* de 30 embriões/grupo). O protocolo de eutanásia, armazenamento e preparo das amostras seguiu as mesmas etapas descritas no item 3.4 deste capítulo. As quantificações foram realizadas através de kits comerciais *ST/5-HT (Serotonin/5-Hydroxytryptamine) ELISA Kit* (Cat. N°. MBS2513872, MyBioSource), *Fish Dopamine (DA) ELISA Kit* (Cat. N°. MBS912178, MyBioSource), *General Anandamide (AEA) ELISA Kit* (Cat. N°. MBS2097802, MyBioSource) e *General 2-Arachidonoylglycerol ELISA Kit* (Cat. N°. MBS2031975, MyBioSource) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

3.6.2 Ensaios de Imunofluorescência

As larvas íntegras provenientes dos ensaios comportamentais realizados no presente trabalho foram eutanasiadas por hipotermia (acondicionamento em gelo) e fixadas a 4°C em solução de paraformaldeído (PFA) 4% *overnight* e sob agitação (300 rpm). No dia seguinte, as amostras foram submetidas a 3 lavagens de 5 minutos cada, sob agitação, com solução tampão PBS (0,01M; pH 7,4). Em seguida, foram gradualmente desidratadas em concentrações crescentes de solução metanol diluído em PBS (25% MetOH; 50% MetOH; 75% MetOH e 100% MetOH) por 5 minutos cada, sendo as larvas posteriormente armazenadas em freezer -20°C em solução de metanol 100% até análise.

No dia da análise, as larvas de cada grupo foram selecionadas aleatoriamente respeitando-se os grupos experimentais e acondicionadas em pequenos *vials* de vidro, sendo submetidas a 3 lavagens de 5 minutos com PBS-Triton 1%. Em seguida, passaram por processo gradual de reidratação, sendo incubadas em soluções decrescentes de metanol diluído em PBS

(75%MetOH; 50%MetOH e 25%MetOH), por 5 minutos cada. Após, foram novamente lavadas em PBS-Triton 1% 3 vezes de 5 minutos. Para despigmentação dos espécimes, os mesmos foram incubados por 5 minutos com H₂O₂ 3% + KOH 1% em PBS 0,01M (pH 7,4) e em seguida, lavados com solução PBS-Triton 1% por 3 vezes de 5 minutos. Após as lavagens, as amostras foram incubadas em solução de Proteinase K (10 µg/mL) por 40 minutos para recuperação antigênica. Após, realizou-se uma lavagem de 5 minutos com PBS-Triton 1% seguida de incubação por 20 minutos em solução de PFA 4% à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram novamente lavadas com solução PBS-Triton 1% 3 vezes de 5 minutos. Após as lavagens, foi adicionada solução de bloqueio (soro fetal bovino 5%; albumina sérica bovina 4mg/mL; Triton X-100 1%; DMSO 1% diluídos em PBS 0,01M) por 2h a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as larvas foram incubadas, *overnight* a 4°C e sob branda agitação, em diferentes anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio (descritos na Tabela 1). No dia seguinte, procedeu-se 6 lavagens de 30 minutos com PBS-Triton 1% e, em seguida, as amostras foram incubadas, *overnight* a 4°C e sob branda agitação, em seus respectivos anticorpos secundários diluídos em PBS 0,01M (descritos na Tabela 1). No dia seguinte, as amostras foram incubadas por 1 hora com *Hoechst* (1:10.000, Invitrogen - H1399) diluído em solução PBS-Triton 1%, sendo posteriormente lavadas 6 vezes de 30 minutos com solução PBS-Triton 1% e mais 2 vezes de 30 minutos com solução PBS. Após, as larvas foram transferidas para lâminas de vidro, posicionadas adequadamente com o auxílio de um estereomicroscópio (Olympus SZ61) e montadas em meio *Fluormount* G (Invitrogen, Massachusetts, EUA). As lâminas foram fechadas com lamínulas, seladas e armazenadas sob refrigeração. As imagens foram obtidas e construídas em “*z-stacks*” (planos focais) no aumento de 40X por meio de microscopia multifoton (LSM 780 Axio Observer, Carl Zeiss, Ostalbkreis, BW, Alemanha) e analisadas com o programa Zen 3.5 (Carl Zeiss, Ostalbkreis, BW, Alemanha). A quantificação foi mensurada no encéfalo total de cada larva e representada em porcentagem de intensidade de fluorescência relativa para cada imunomarcção.

Tabela 1: Relação de anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência.

| ANTICORPO | CATEGORIA | HOSPEDEIRO/ALVO | Nº CAT./MARCA | DILUIÇÃO |
|--------------------------|------------|--------------------|--------------------------|----------|
| Histona H3 | Primário | Rabbit | ab183626/Abcam | 1:400 |
| Caspase-3 | Primário | Rabbit | ab13847/Abcam | 1:400 |
| GFAP | Primário | Goat | ab53554/Abcam | 1:400 |
| PCNA | Primário | Rabbit | ab18197/Abcam | 1:400 |
| Parvalbumina | Primário | Mouse | SAB4200545/Sigma-Aldrich | 1:50 |
| Calmodulina | Primário | Rabbit | ab45689/Abcam | 1:120 |
| Alexa Fluor 594nm | Secundário | Goat anti-rabbit | Invitrogen | 1:500 |
| Alexa Fluor 594nm | Secundário | Goat anti-mouse | Invitrogen | 1:500 |
| Alexa Fluor 594nm | Secundário | Donkey anti-goat | Invitrogen | 1:500 |
| Alexa Fluor 647nm | Secundário | Goat anti-rabbit | Invitrogen | 1:500 |
| Alexa Fluor 488nm | Secundário | Donkey anti-rabbit | Invitrogen | 1:500 |

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Quando respeitados os requisitos de normalidade e homocedasticidade, as diferenças significativas entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste *one-way* ANOVA (um fator: “exposição embrionária ao AVP” ou “tratamento com RISP ou CBD apenas em animais expostos ao AVP) ou *two-way* ANOVA (dois fatores: “exposição embrionária ao AVP” e “tratamento com RISP ou CBD”), seguido pelo teste *post hoc* de Duncan, sendo os dados apresentados na forma de média \pm EPM.

Para dados não-paramétricos, as diferenças significativas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn, sendo os dados apresentados na forma de mediana e intervalos interquartis (*box plot*).

Para todas as análises, foram considerados valores significativos quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados descritos a seguir também foram organizados seguindo a divisão dos experimentos descritos anteriormente: i) padronização do modelo por exposição embrionária ao AVP; ii) padronização do tratamento com RISP como controle positivo no tratamento das alterações induzidas pela exposição embrionária ao AVP; iii) avaliação do tratamento com CBD como alternativa terapêutica para o tratamento das alterações induzidas pela exposição embrionária ao AVP.

4.1 EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA DO ZEBRAFISH AO AVP COMO MODELO TRANSLACIONAL PARA ESTUDO DO TEA

4.1.1 Maiores concentrações de AVP promoveram alterações na movimentação espontânea dos embriões após 24 horas de exposição

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=61-63 embriões/grupo), para avaliação de parâmetro relativo à movimentação espontânea (*tail coiling behavior*) de embriões de zebrafish, ainda no córion, após 24 horas de exposição a diferentes concentrações de AVP. A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença estatística entre os grupos avaliados ($\chi^2=125,81$; $p<0,001$), sendo possível observar um aumento estatisticamente significativo na movimentação espontânea de embriões expostos a 125 μ M ($p<0,05$) e 625 μ M ($p<0,01$) de AVP, quando comparados aos embriões do grupo veículo. Entretanto, embriões expostos a 1.250 μ M de AVP demonstraram uma redução estatisticamente significativa no perfil de movimentação espontânea quando comparados aos demais grupos ($p<0,001$).

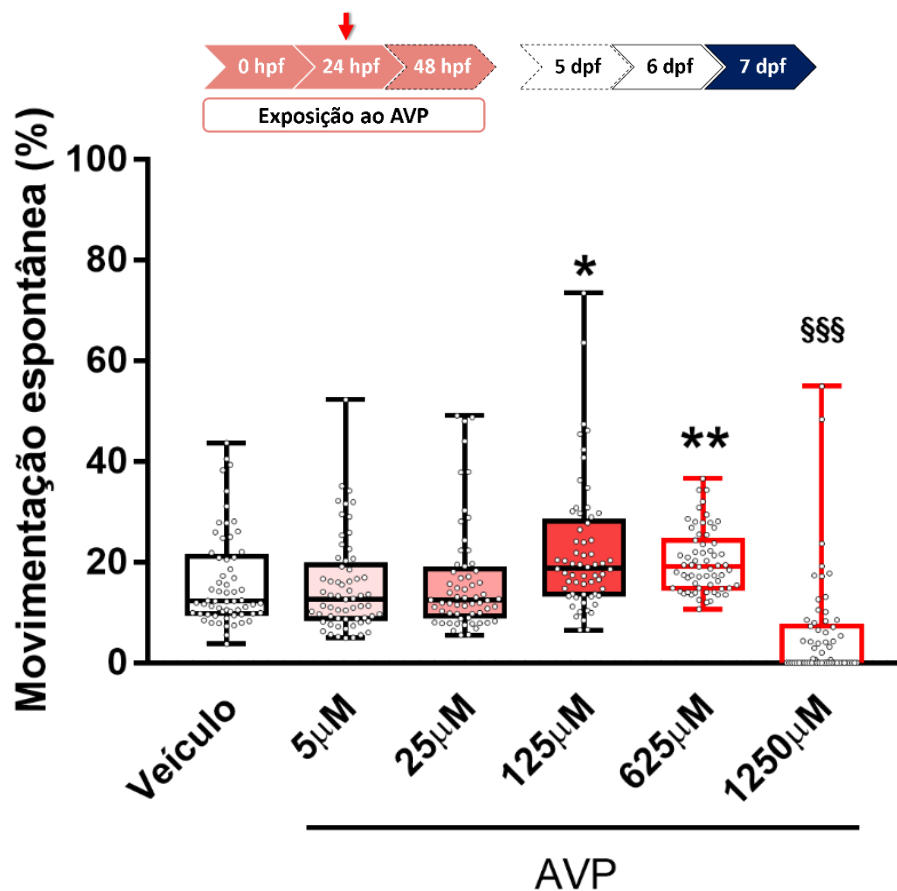


Fig. 9: Exposição ao AVP promoveu alterações no perfil de movimentação espontânea (porcentagem do tempo de movimentação) de embriões, ainda dentro do córion, após 24 horas de exposição durante avaliação em lâmina escavada ($t = 8$ min, sendo 5 min de aclimatação e 3 min de teste). Dados em triplicata ($n=61-63$ embriões/grupo) e expressos em porcentagem como mediana e intervalos interquartis. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ comparado ao grupo veículo; \$\$\$ $p<0,001$ comparado a todos os grupos.

4.1.2 Exposição embrionária a 625µM e 1.250µM de AVP causou malformações e aumento na taxa de mortalidade de larvas

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos, em triplicata, na avaliação de malformações e taxa de mortalidade em larvas de zebrafish com 5 dpf expostos a diferentes concentrações de AVP.

A análise estatística da taxa de malformações dos embriões (Fig. 10A) pelo teste *One-way* ANOVA resultou em efeito estatístico para exposição ao AVP ($F_{5,12} = 346,12$; $p<0,001$), sendo possível observar que os embriões expostos às concentrações de 625µM ($p<0,001$) e 1250µM ($p<0,001$) de AVP apresentaram um aumento estatisticamente significativo na taxa de

malformações quando comparados aos animais dos demais grupos. A Figura 10C traz imagens representativas das malformações presentes nas larvas com 5 dpf, sendo observadas, principalmente, alterações no tempo de eclosão e pigmentação dos embriões expostos a altas concentrações de AVP, bem como malformação crânio-caudal, bexiga natatória não-inflada, edemas no saco vitelínico e pericárdio.

No que se refere a taxa de mortalidade dos embriões (Fig. 10B), a análise dos dados pelo teste *One-way* ANOVA também demonstrou efeito estatístico para exposição ao AVP ($F_{5,12} = 358,53$; $p < 0,001$), sendo possível observar que os embriões expostos às concentrações de $625\mu\text{M}$ ($p < 0,001$) e $1250\mu\text{M}$ ($p < 0,001$) de AVP apresentaram um aumento estatisticamente significativo na taxa de mortalidade, quando comparados aos animais dos demais grupos.

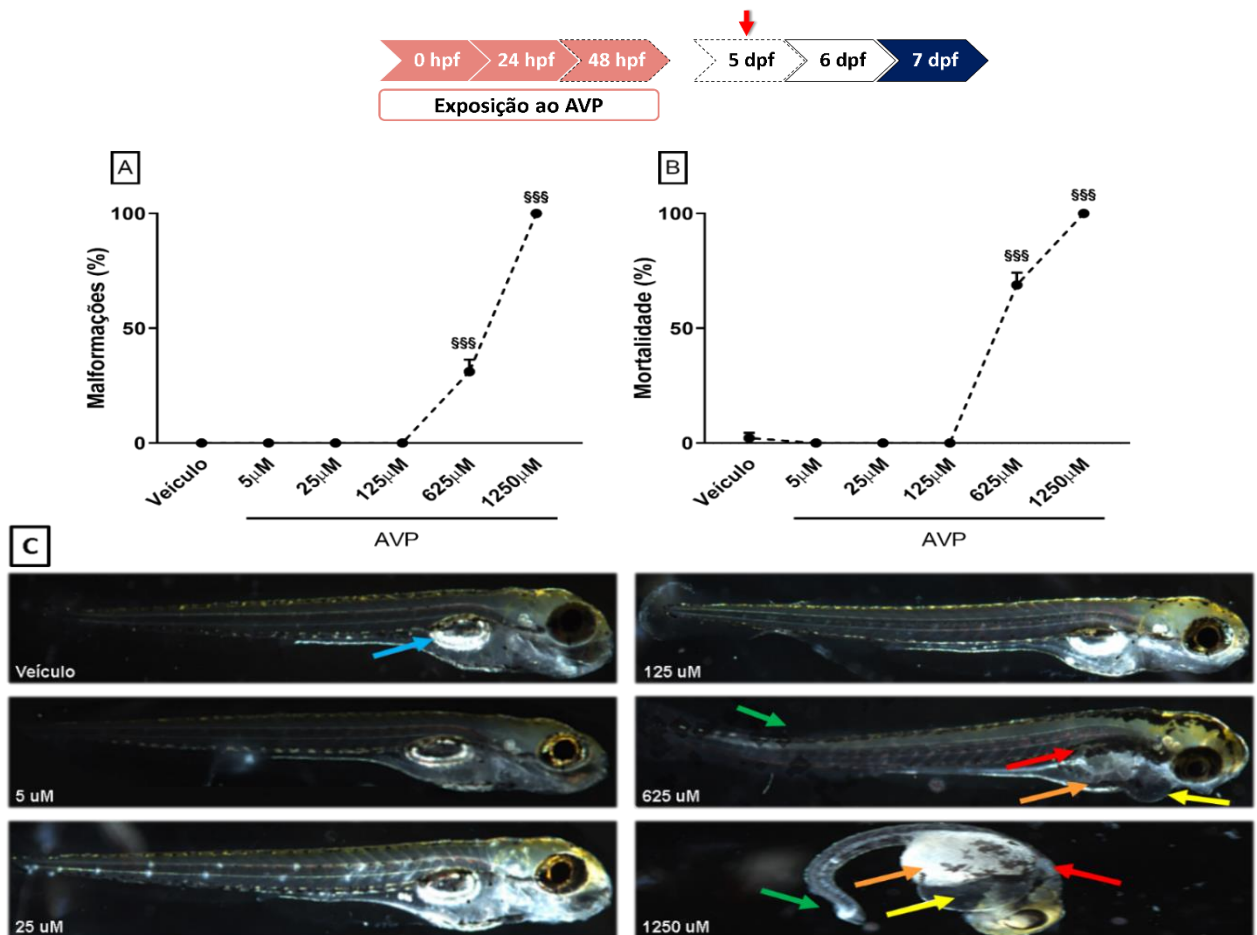


Fig. 10: Exposição ao AVP (4-48hpf) promoveu alterações no tempo de eclosão dos embriões, malformações e aumento na taxa de mortalidade de larvas de zebrafish com 5dpf. (A) Taxa de malformações; (B) Taxa de mortalidade; (C) Imagens representativas das malformações em larvas de zebrafish expostas ou não a diferentes concentrações de AVP (seta azul: bexiga natatória inflada corretamente; setas vermelhas: bexiga natatória não-inflada; setas laranjas: edema no saco vitelínico; setas amarelas: edema pericárdico; setas verdes: malformação de cauda). Dados em triplicata ($n = 61-63$ larvas/grupo) expressos em porcentagem (média \pm EPM). *One-way* ANOVA, seguida pelo teste *post-hoc* Duncan. §§§ $p < 0,001$ comparado a todos os grupos.

Tendo em vista que as concentrações de 625 μ M e 1.250 μ M de AVP apresentaram grande potencial de toxicidade para os embriões expostos, aumentando significativamente o percentual de malformações e mortalidade, os mesmos foram excluídos dos ensaios comportamentais propostos no presente estudo.

4.1.3 Maior concentração não-tóxica de AVP promove hiperatividade motora em larvas expostas durante o período embrionário

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=21-24 larvas/grupo), na avaliação da atividade locomotora de larvas de zebrafish com 7dpf expostas a diferentes concentrações de AVP.

A análise estatística da distância total percorrida pelo teste *One-way* ANOVA resultou em efeito estatístico para exposição ao AVP ($F_{3,86}=3,42$; $p<0,05$), sendo possível observar um aumento estatisticamente significativo no perfil motor de animais expostos à concentração de 125 μ M AVP quando comparados ao grupo veículo/controle ($p<0,05$).

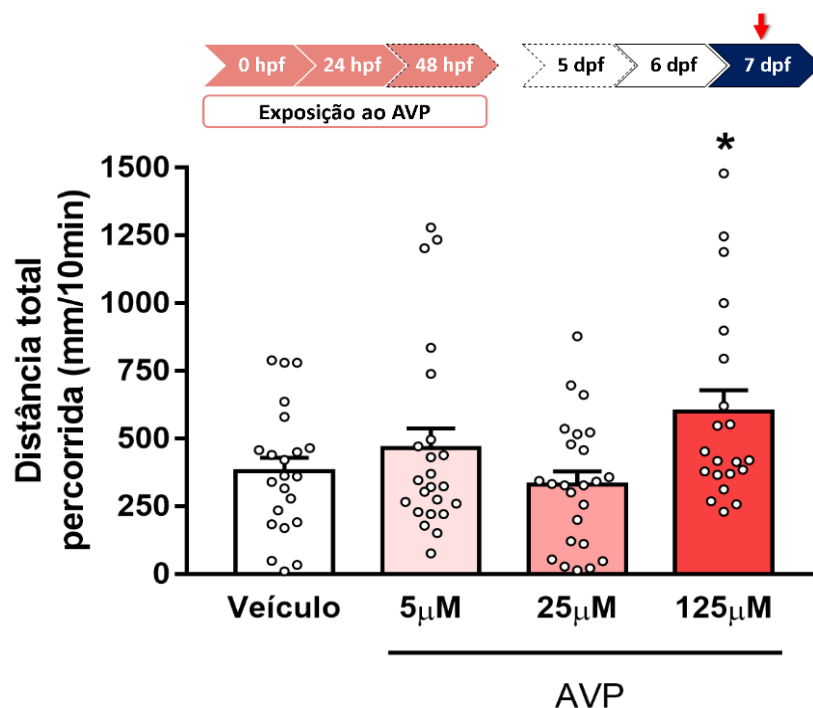


Fig. 11: Teste de campo aberto para avaliação da distância total percorrida por larvas de zebrafish com 7 dpf expostas a diferentes concentrações de AVP durante o período embrionário. Dados em triplicata (n=21-24 larvas/grupo) e expressos em milímetros/tempo (média \pm EPM). *One-way* ANOVA, seguida pelo teste *post-hoc* Duncan. * $p<0,05$ comparado ao grupo veículo.

4.1.4 Maior concentração não-toxica de AVP promove aumento do comportamento tipo-agressivo em larvas expostas durante o período embrionário

A Figura 12 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=22-24 larvas/grupo), na avaliação do perfil de agressividade de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas a diferentes concentrações de AVP, através do ensaio de ataque ao espelho.

A análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferenças entre os grupos avaliados tanto para a variável número absoluto de movimentos na área do espelho ($\chi^2=16,02$; $p<0,01$ – Fig 12A), quanto para a variável tempo despendido na área do espelho ($\chi^2=15,82$; $p<0,01$ – Fig 12B), sendo possível observar um aumento estatisticamente significativo no perfil de agressividade de animais expostos à concentração de $125\mu\text{M}$ AVP quando comparados aos animais do grupo veículo ($p<0,05$).

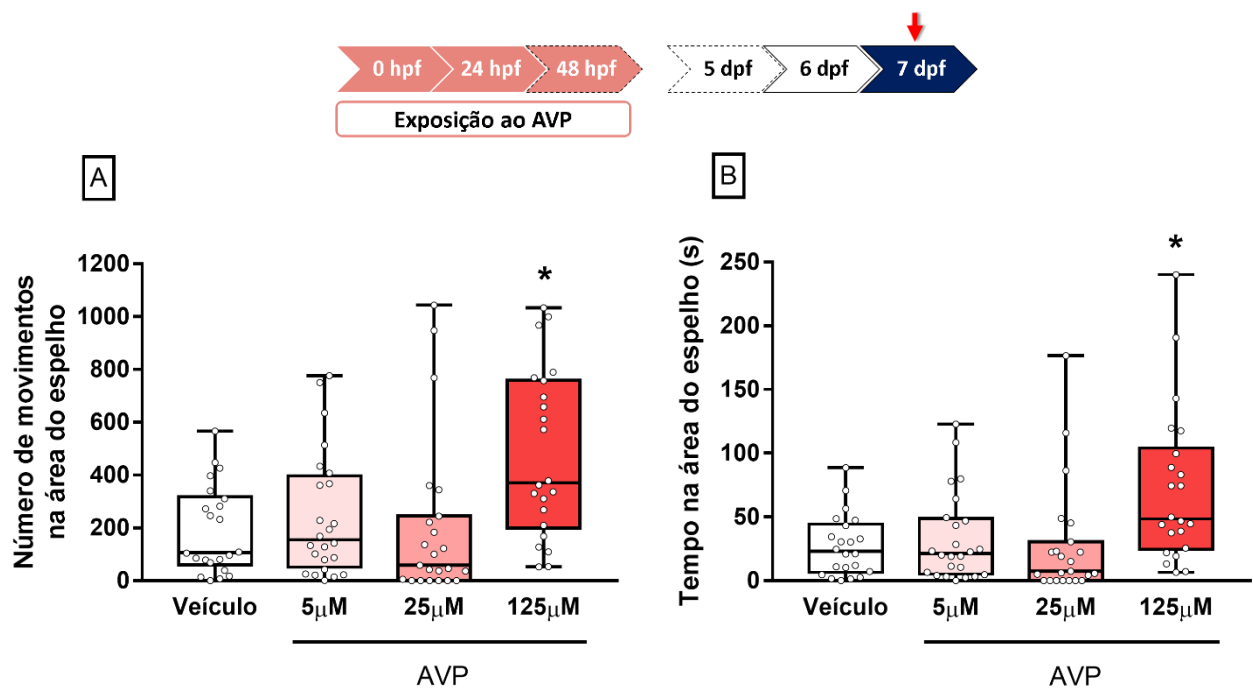


Fig. 12: Teste de ataque ao espelho para avaliação do perfil de agressividade de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas a diferentes concentrações de AVP durante o período embrionário. (A) Número de movimentos na área do espelho expresso em valores absolutos; (B) Tempo na área do espelho expresso em segundos (s). Dados em triplicata (n=22-24 larvas/grupo) e expressos como mediana e intervalos interquartis. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. * $p<0,05$ comparado ao grupo veículo.

4.1.5 Nenhuma concentração de AVP foi capaz de promover alterações no teste de interação social de larvas de zebrafish

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=22-23 larvas/grupo), na avaliação da interação social entre larvas de zebrafish com 7 dpf expostos a diferentes concentrações de AVP.

A análise do tempo total de permanência na região de interação pelo teste *One-way* ANOVA não retornou efeito estatístico para exposição ao AVP ($F_{3,86} = 0,71$; $p > 0,05$), ou seja, a exposição ao AVP não promoveu alterações no perfil de interação social das larvas de zebrafish na idade avaliada.

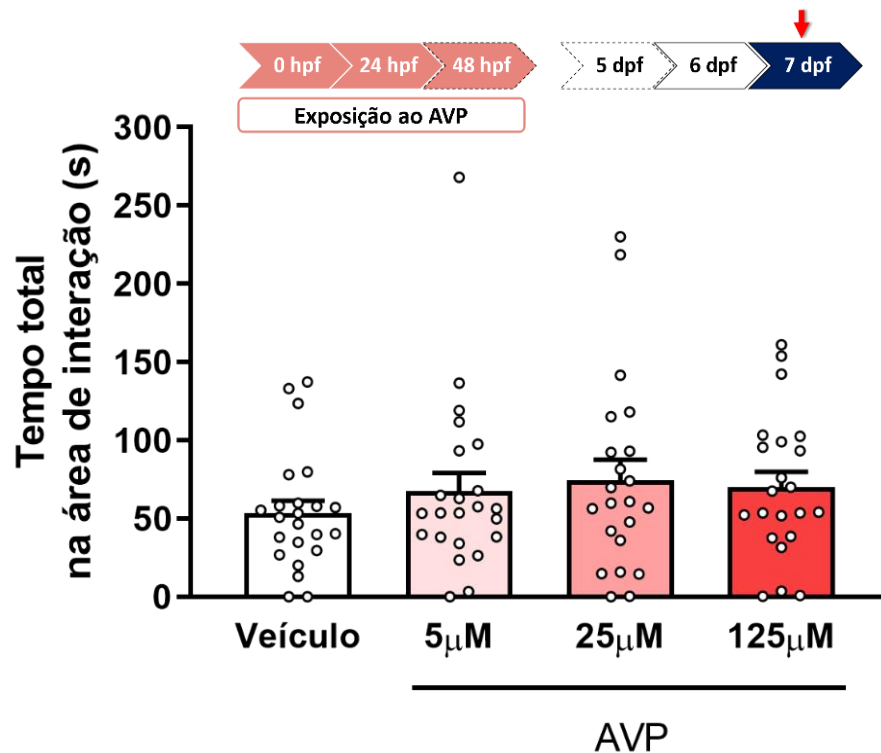


Fig. 13: Teste de interação social para avaliação do perfil de socialização entre larvas de zebrafish (7 dpf) expostas a diferentes concentrações de AVP durante o período embrionário. Dados em triplicata (n=22-23 larvas/grupo) e expressos em segundos (média ± EPM). *One-way* ANOVA, seguida pelo teste post-hoc Duncan.

4.2 PADRONIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE RISP COMO CONTROLE POSITIVO DO TRATAMENTO DO MODELO TEA INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA AO AVP

Após definida a concentração de 125 μ M de AVP para exposição embrionária visando a indução do modelo TEA no zebrafish, novo experimento foi realizado para a padronização do grupo controle positivo do tratamento com RISP.

4.2.1 Nenhuma concentração de RISP foi capaz de reverter a hiperatividade motora causada pela exposição embrionária a 125 μ M de AVP

A Figura 14 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=21-24 larvas/grupo), na avaliação da atividade locomotora de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125 μ M de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de RISP.

A análise estatística da distância total percorrida pelo teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferenças entre os grupos avaliados ($\chi^2=26,40$; $p<0,001$), sendo possível observar que, animais expostos à concentração de 125 μ M AVP e sem tratamento (125AVP/Veículo) apresentaram um aumento estatisticamente significativo no perfil motor, quando comparados aos animais do grupo veículo ($p<0,05$). Nenhuma das concentrações de RISP avaliadas foi capaz de reverter, de forma sustentada, essa alteração no perfil motor.

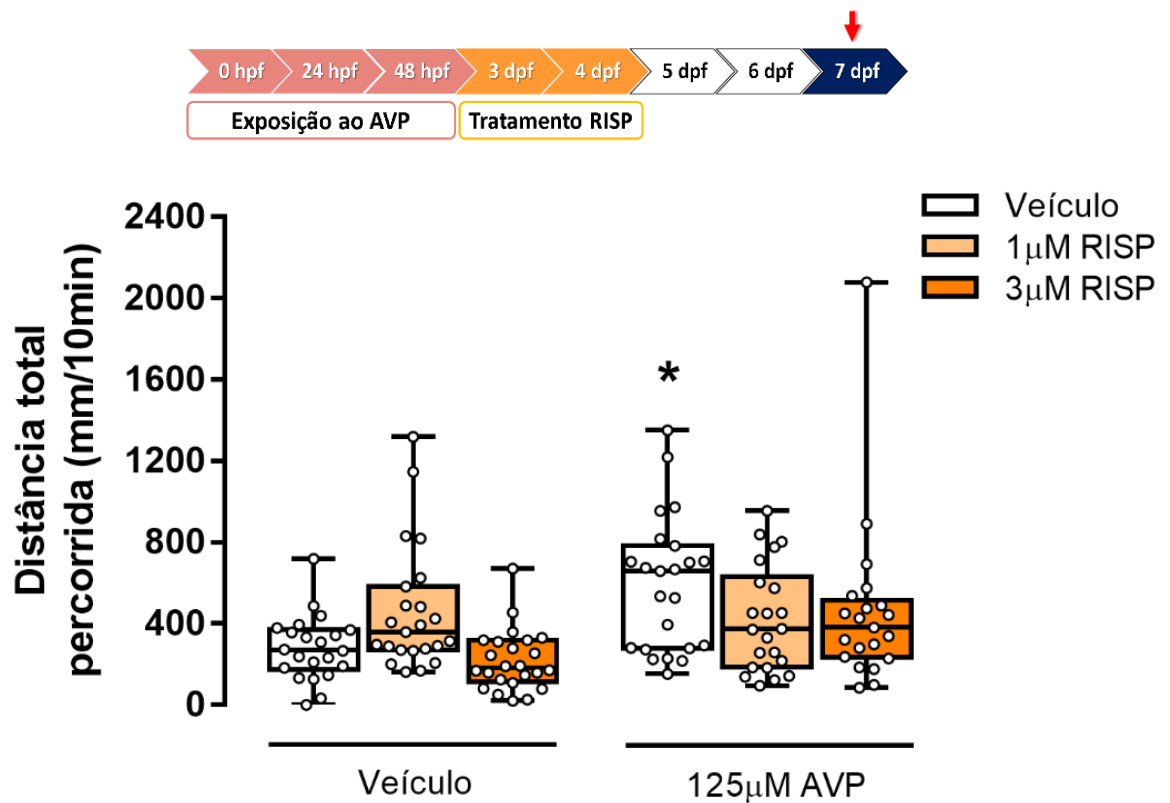


Fig. 14: Teste de campo aberto para avaliação da atividade motora de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de RISP. Dados em triplicata (n=21-24 larvas/grupo) expressos em milímetros (mm) como mediana e intervalos interquartis. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. *p<0,05 comparado ao grupo veículo.

4.2.2 Menor concentração de RISP foi capaz de reduzir o perfil de agressividade induzido pela exposição embrionária ao AVP

A Figura 15 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=21-23 larvas/grupo), na avaliação do perfil de agressividade de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de RISP.

A análise do número absoluto de movimentos na área do espelho (Fig. 15A) pelo teste *Two-way* ANOVA demonstrou efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,127}=28,98$; $p<0,001$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento com RISP ($F_{2,127}=0,56$; $p>0,05$). Entretanto, a análise retornou a interação estatística entre as variáveis exposição × tratamento ($F_{2,127}=5,37$; $p<0,01$). Assim, é possível observar que, animais do grupo Veículo/1RISP demonstraram um aumento estatisticamente significativo no número de movimentos no

espelho, quando comparados ao grupo veículo ($p < 0,05$). Além disso, animais expostos à $125\mu\text{M}$ de AVP e tratados ou não com as diferentes concentrações de RISP (125AVP/Veículo; 125AVP/1RISP e 125AVP/3RISP) demonstraram um aumento estatisticamente significativo no número absoluto de movimentos no espelho, quando comparados aos animais do grupo veículo ($p < 0,01$). Ainda, animais do grupo 125AVP/1RISP apresentaram uma redução estatisticamente significativa no número absoluto de movimentos na área do espelho, quando comparados aos animais do grupo 125AVP/Veículo ($p < 0,05$).

No que se refere a variável tempo despendido na área do espelho (Fig. 15B), a análise pelo teste *Two-way* ANOVA demonstrou novamente efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,127}=33,08$; $p < 0,001$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento com RISP ($F_{2,127}=0,19$; $p > 0,05$). Entretanto, a análise retornou a interação estatística entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,127}=4,11$; $p < 0,05$). Assim, é possível observar que, animais expostos à $125\mu\text{M}$ de AVP e tratados ou não com as diferentes concentrações de RISP (125AVP/Veículo; 125AVP/1RISP e 125AVP/3RISP) apresentaram um aumento estatisticamente significativo no tempo na área do espelho, quando comparados aos animais do grupo veículo ($p < 0,01$). Ainda, animais do grupo 125AVP/1RISP apresentaram uma redução estatisticamente significativa no tempo despendido na área do espelho, quando comparados aos animais do grupo 125AVP/Veículo ($p < 0,05$).

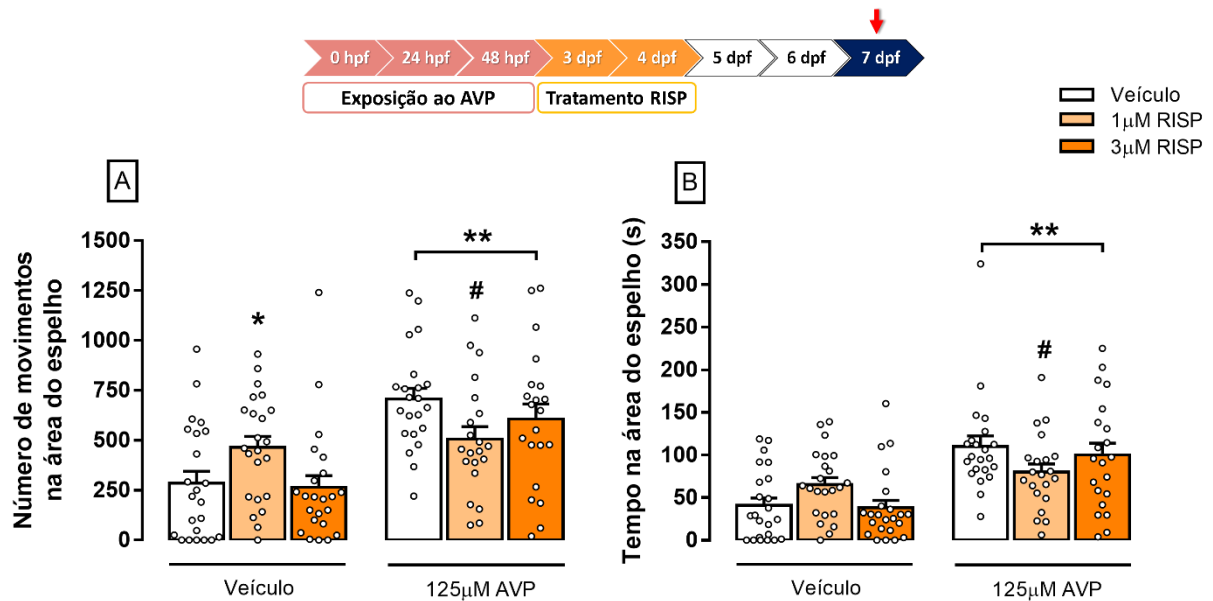


Fig. 15: Teste de ataque ao espelho para avaliação do perfil de agressividade de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de RISP. (A) Número de movimentos na área do espelho expresso em valores absolutos; (B) Tempo na área do espelho expresso em segundos (s). Dados em triplicata (n=21-23 larvas/grupo) expressos como média ± EPM. Two-way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Duncan. *p<0,05 e **p<0,01 comparado ao grupo veículo; # p<0,05 comparado ao grupo 125AVP/Veículo.

4.2.3 Nenhuma concentração de RISP foi capaz de promover alterações no perfil de interação social de larvas de zebrafish expostas ao AVP durante o período embrionário

A Figura 16 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=18-22 larvas/grupo), na avaliação da interação social entre larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de RISP.

A análise do tempo total de permanência na região de interação pelo teste Kruskal-Wallis não demonstrou diferenças entre os grupos avaliados ($\chi^2=10,64$; $p>0,05$), ou seja, tanto a exposição ao AVP quanto o tratamento com RISP não promoveram alterações no perfil de interação social das larvas de zebrafish na idade avaliada.

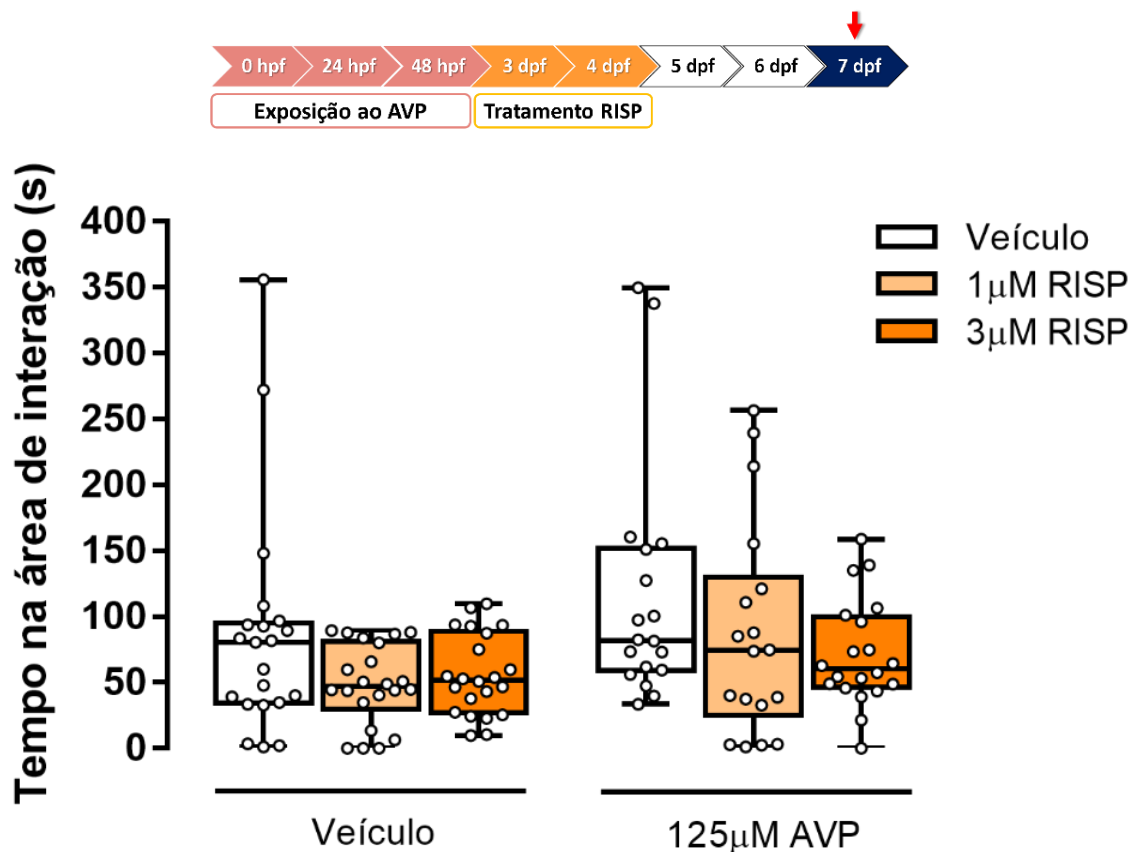


Fig. 16: Teste de interação social para avaliação do perfil de socialização entre larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à 125μM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de RISP. Dados em triplicata (n=18-22 larvas/grupo) expressos em segundos (s) como mediana e intervalos interquartis. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas.

4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOTERAPÊUTICO DO CBD COMO TRATAMENTO DO MODELO TEA INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO EMBRIONÁRIA AO AVP.

Após definidas as concentrações de 125μM de AVP para exposição embrionária visando a indução do modelo TEA no zebrafish e, a concentração de 1μM de RISP como controle positivo do tratamento, novo experimento foi realizado para a avaliação do perfil terapêutico do CBD no modelo.

4.3.1 Todas as concentrações de CBD foram capazes de reverter a hiperatividade motora causada pela exposição embrionária à 125µM de AVP

A Figura 17 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=21-22 larvas/grupo), na avaliação da atividade locomotora de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de CBD.

A análise da distância total percorrida pelo teste *Two-way* ANOVA demonstrou efeito estatístico para a exposição ao AVP ($F_{1,205}=15,44$; $p<0,001$), para o tratamento com CBD ($F_{1,205}=4,08$; $p<0,01$), além de interação estatística entre as variáveis exposição × tratamento ($F_{4,205}=3,58$; $p<0,01$). É possível observar que, tanto os animais expostos à 125µM de AVP não tratados ($p<0,001$) ou tratados com o veículo 0,01% DMSO ($p<0,05$) apresentaram um aumento estatisticamente significativo na distância total percorrida, quando comparados aos animais do grupo veículo. Os grupos expostos à 125µM de AVP e tratados com as concentrações de CBD preconizadas (125AVP/0,06CBD; 125AVP/0,48CBD e 125AVP/0,95CBD) apresentaram uma redução estatisticamente significativa na distância total percorrida, quando comparados ao grupo exposto ao AVP e não tratado ($p<0,001$).

A análise pelo *One-way* ANOVA realizada apenas com os grupos da condição de exposição embrionária à 125µM de AVP, visando a comparação entre os tratamentos com CBD e o controle positivo do tratamento (RISP), retornou efeito estatístico ($F_{5,124}=2,86$; $p<0,05$) demonstrando novamente que, todos os animais tratados com CBD apresentaram uma redução estatisticamente significativa na distância total percorrida, quando comparados aos animais do grupo 125AVP/Veículo ($p<0,05$). Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o grupo 125AVP/1RISP, quando comparado aos animais dos grupos 125AVP/Veículo e 125AVP/DMSO ($p>0,05$) ou quando comparados aos animais dos grupos tratados com CBD (125AVP/0,06CBD, 125AVP/0,48CBD e 125AVP/0,95CBD; $p>0,05$).

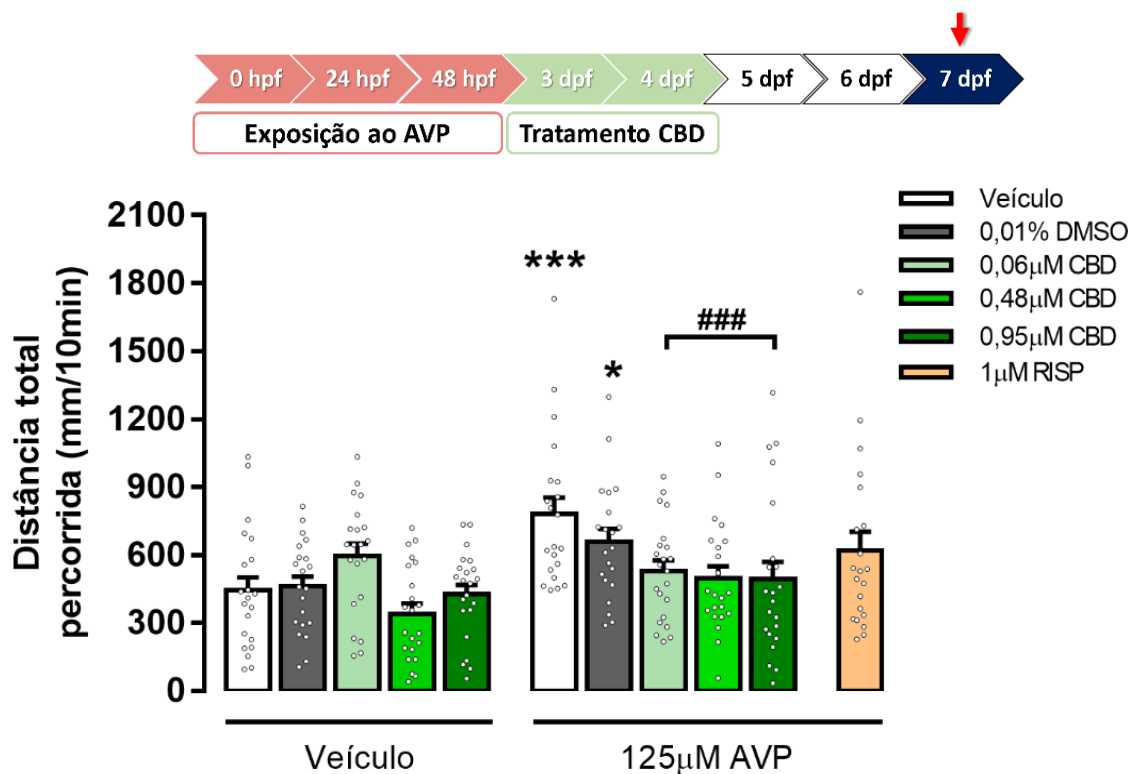


Fig. 17: Teste de campo aberto para avaliação da atividade motora de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de CBD. Dados em triplicata (n=21-22 larvas/grupo) expressos em milímetros/tempo (média ± EPM). *Two-way* e *One-way* ANOVA, seguidos pelo teste post-hoc Duncan. ***p<0,001 e *p<0,05 comparado ao grupo veículo; ### p<0,001 comparado ao grupo 125AVP/Veículo.

4.3.2 Menor concentração de CBD foi capaz de reduzir o perfil de agressividade induzido pela exposição embrionária ao AVP

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=21-23 larvas/grupo), na avaliação do perfil de agressividade de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de CBD.

A análise do número absoluto de movimentos na área do espelho (Fig. 18A) pelo teste *Two-way* ANOVA demonstrou efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,205}=6,51$; $p<0,05$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento com CBD ($F_{4,206}=1,43$; $p>0,05$). Entretanto, a análise retornou a interação estatística entre as variáveis exposição × tratamento ($F_{4,205}=2,45$; $p<0,05$). É possível observar que, tanto os animais expostos à 125µM de AVP não tratados ou tratados com o veículo 0,01% DMSO apresentaram um aumento estatisticamente significativo

no número absoluto de movimentos na área do espelho, quando comparados aos animais do grupo veículo ($p < 0,05$). Ainda, o grupo exposto à $125\mu\text{M}$ de AVP e tratado com a menor concentração de CBD (125AVP/0,06CBD) apresentou uma redução estatisticamente significativa no número absoluto de movimentos na área do espelho, quando comparados aos animais do grupo 125AVP/Veículo e 125AVP/DMSO ($p < 0,05$).

A análise pelo *One-way* ANOVA do número absoluto de movimentos na área do espelho realizada apenas com os grupos da condição de exposição embrionária à $125\mu\text{M}$ de AVP, visando a comparação entre os tratamentos com CBD e o controle positivo do tratamento (RISP), retornou efeito estatístico ($F_{5,120}=2,27$; $p=0,05$) demonstrando novamente que, os animais do grupo 125AVP/0,06CBD apresentaram uma redução estatisticamente significativa no número absoluto de movimentos na área do espelho, quando comparados aos animais dos grupos 125AVP/Veículo e 125AVP/DMSO ($p < 0,05$). Também foi possível observar que, o grupo 125AVP/1RISP apresentou uma redução estatisticamente significativa no número de movimentos na área do espelho, quando comparado aos animais dos grupos 125AVP/Veículo e 125AVP/DMSO ($p < 0,05$). Além disso, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o grupo 125AVP/0,06CBD e o grupo 125AVP/1RISP ($p > 0,05$).

No que se refere a variável tempo despendido na área do espelho (Fig. 18B), a análise pelo teste *Two-way* ANOVA demonstrou novamente efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,205}=5,78$; $p < 0,05$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento com CBD ($F_{4,205}=1,46$; $p > 0,05$). É possível observar que, tanto os animais expostos à $125\mu\text{M}$ de AVP não tratados ou tratados com o veículo 0,01% DMSO apresentaram um aumento estatisticamente significativo no tempo na área do espelho, quando comparados aos animais do grupo veículo ($p < 0,05$). Ainda, o grupo exposto à $125\mu\text{M}$ de AVP e tratado com a menor concentração de CBD (125AVP/0,06CBD) apresentou uma redução estatisticamente significativa no tempo na área do espelho, quando comparado aos animais do grupo 125AVP/Veículo ($p < 0,05$) e 125AVP/DMSO ($p=0,05$).

A análise pelo *One-way* ANOVA do tempo na área do espelho realizada apenas com os grupos da condição de exposição embrionária à $125\mu\text{M}$ de AVP, visando a comparação entre os tratamentos com CBD e o controle positivo do tratamento (RISP), retornou efeito estatístico ($F_{5,120}=2,32$; $p < 0,05$) demonstrando novamente que, os animais do grupo 125AVP/0,06CBD apresentaram uma redução estatisticamente significativa no tempo despendido na área do espelho, quando comparados aos animais dos grupos 125AVP/Veículo e 125AVP/DMSO ($p < 0,05$). Também é possível observar que, o grupo 125AVP/1RISP apresentou uma redução estatisticamente significativa no tempo despendido na área do espelho, quando comparado aos

animais dos grupos 125AVP/Veículo e 125AVP/DMSO ($p < 0,05$). Além disso, nenhuma diferença estatisticamente significativa para essa mesma variável foi observada entre o grupo 125AVP/0,06CBD, quando comparado ao grupo 125AVP/1RISP ($p > 0,05$).

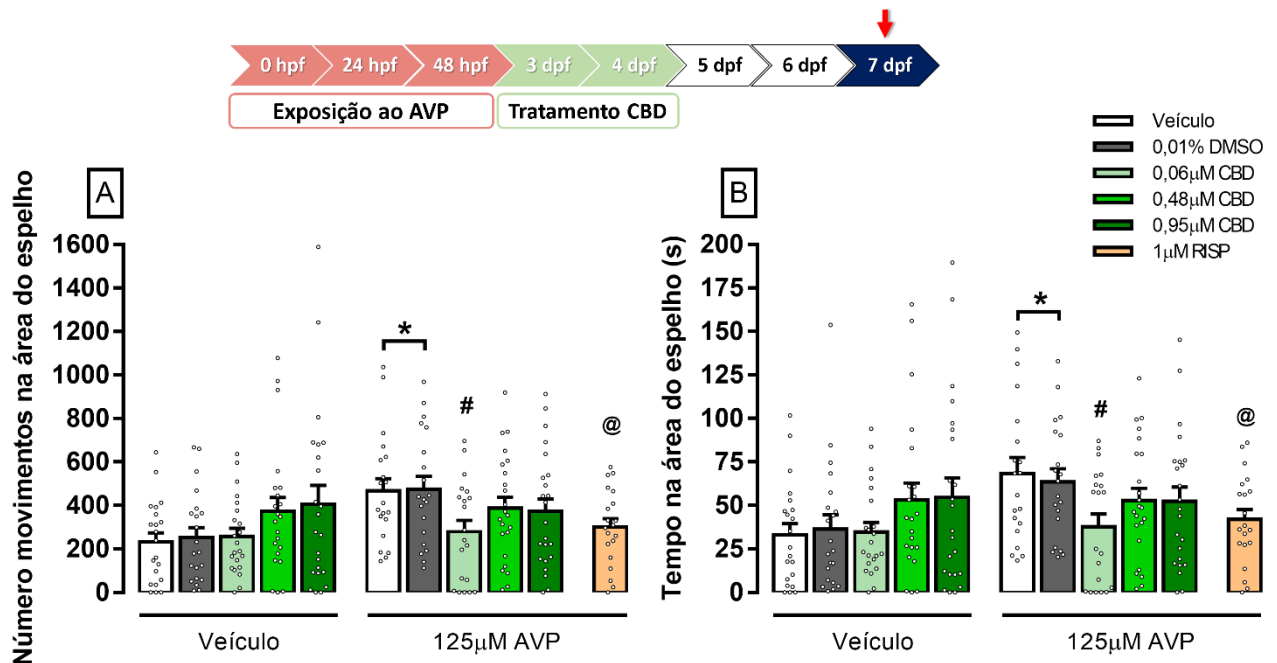


Fig. 18: Teste de ataque ao espelho para avaliação do perfil de agressividade de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de CBD. (A) Número de movimentos na área do espelho expresso em valores absolutos; (B) Tempo na área do espelho expresso em segundos (s). Dados em triplicata ($n=21-23$ larvas/grupo) expressos como média \pm EPM. *Two-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan (* $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo 125AVP/Veículo) e *One-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan (@ $p < 0,05$ comparado aos grupos 125AVP/Veículo e 125AVP/DMSO).

4.3.3 Nenhuma concentração de CBD foi capaz de promover alterações no perfil de interação social de larvas de zebrafish expostas ao AVP durante o período embrionário

A Figura 19 apresenta os resultados obtidos, em triplicata ($n=20-22$ larvas/grupo), na avaliação da interação social entre larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de CBD.

A análise do tempo total de permanência na região de interação pelo teste Kruskal-Wallis não demonstrou diferenças entre os grupos avaliados ($\chi^2=12,77$; $p > 0,05$), ou seja, tanto

a exposição ao AVP quanto o tratamento com CBD não promoveram alterações no perfil de interação social das larvas de zebrafish na idade avaliada.

Ainda, análise pelo teste Kruskal-Wallis do tempo total de permanência na região de interação realizada apenas com os grupos da condição de exposição embrionária à 125 μ M de AVP, visando a comparação entre os tratamentos com CBD e o controle positivo do tratamento (RISP), não retornou efeito estatístico ($\chi^2=4,39$; $p>0,05$), sendo possível observar que o grupo 125AVP/1RISP não apresentou diferença estatisticamente significativa no tempo despendido na área de interação, quando comparado aos animais dos grupos 125AVP/Veículo e 125AVP/DMSO ($p>0,05$). Além disso, nenhuma diferença estatisticamente significativa para essa mesma variável foi observada entre os grupos tratados com as concentrações preconizadas de CBD (125AVP/0,06CBD, 125AVP/0,48CBD e 125AVP/0,95CBD), quando comparado ao grupo 125AVP/1RISP ($p>0,05$).

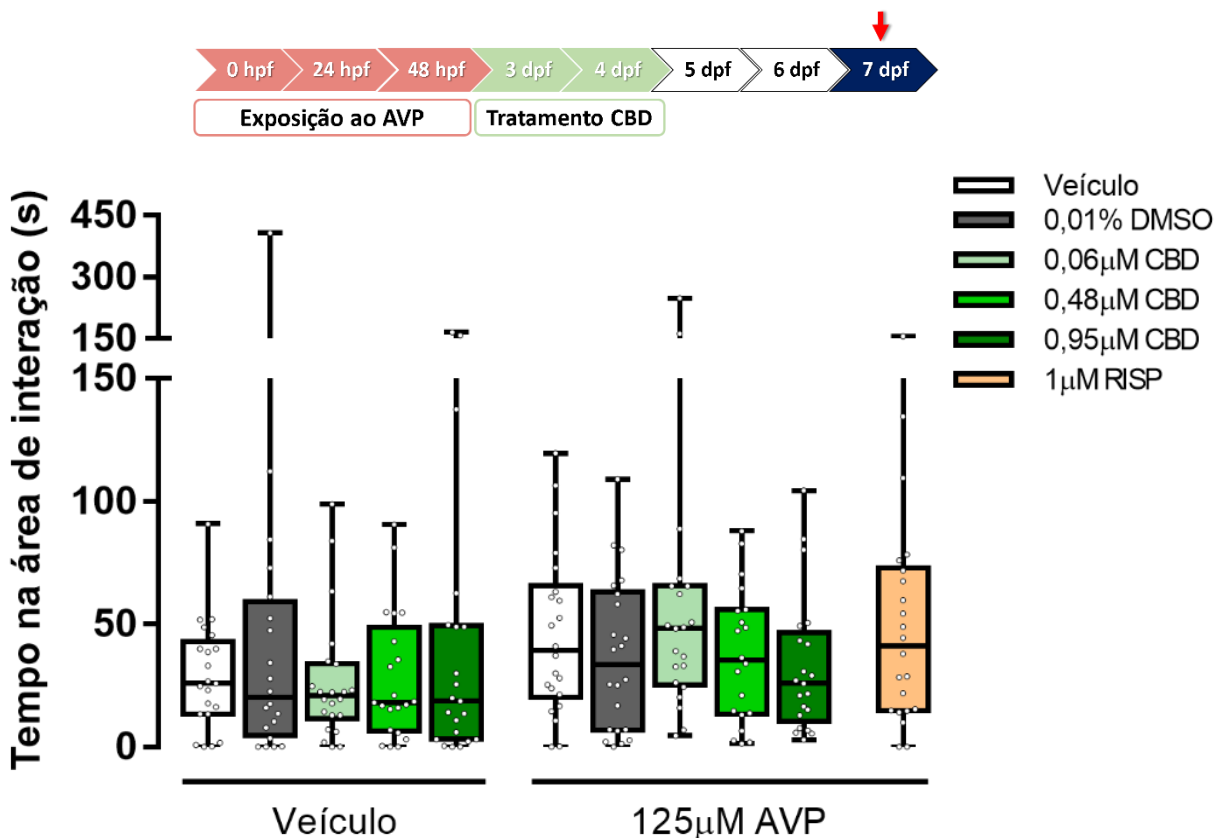


Fig. 19: Teste de interação social para avaliação do perfil de socialização entre larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à 125 μ M de AVP durante o período embrionário e tratadas com diferentes concentrações de CBD. Dados em triplicata (n=20-22 larvas/grupo) expressos em segundos (s) como mediana e intervalos interquartis. Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas.

4.3.4 Efeito da exposição embrionária ao AVP e tratamento com RISP ou CBD sobre biomarcadores de estresse oxidativo

A Figura 20 apresenta os resultados obtidos, em duas triplicatas independentes ($n=6$ pools de 30 larvas/grupo), na avaliação de diferentes biomarcadores de estresse oxidativo em larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de $125\mu\text{M}$ de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de $1\mu\text{M}$ de RISP ou $0,06\mu\text{M}$ de CBD.

A análise da atividade de GST (Fig. 20A) pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,30}=0,26$; $p>0,05$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{2,30}=0,001$; $p>0,05$). Ainda, a análise não retornou interação estatística entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,30}=0,35$; $p>0,05$). Assim, é possível observar que, tanto a exposição ao AVP quanto o tratamento com RISP ou CBD não promoveram alterações na atividade de GST das larvas de zebrafish.

A análise da atividade de CAT (Fig. 20B) pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,30}=1,56$; $p>0,05$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{2,30}=0,43$; $p>0,05$). Ainda, a análise não retornou interação estatística entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,30}=0,25$; $p>0,05$). Assim, é possível observar que, tanto a exposição ao AVP quanto o tratamento com RISP ou CBD não promoveram alterações na atividade de CAT das larvas de zebrafish.

A análise dos níveis de produtos endógenos de LPO reativos ao TBA (TBARS) (Fig. 20C) pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,30}=2,05$; $p>0,05$). Entretanto, demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{2,30}=5,33$; $p<0,05$). Ainda, a análise não retornou interação estatística entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,30}=0,22$; $p>0,05$). Assim, é possível observar que, animais tratados com $0,06\mu\text{M}$ de CBD, expostos ou não ao AVP durante o período embrionário, apresentaram uma redução estatisticamente significativa nesse biomarcador, quando comparados aos animais do grupo veículo ($p<0,05$).

A análise pelo *One-way* ANOVA, levando em consideração apenas o fator tratamento, retornou efeito estatístico ($F_{2,33}=5,41$; $p<0,01$), sendo possível observar que, animais tratados com $0,06\mu\text{M}$ de CBD apresentaram uma redução estatisticamente significativa nos níveis de TBARS, quando comparados com animais sem nenhum tratamento e tratados com $1\mu\text{M}$ de RISP ($p<0,05$).

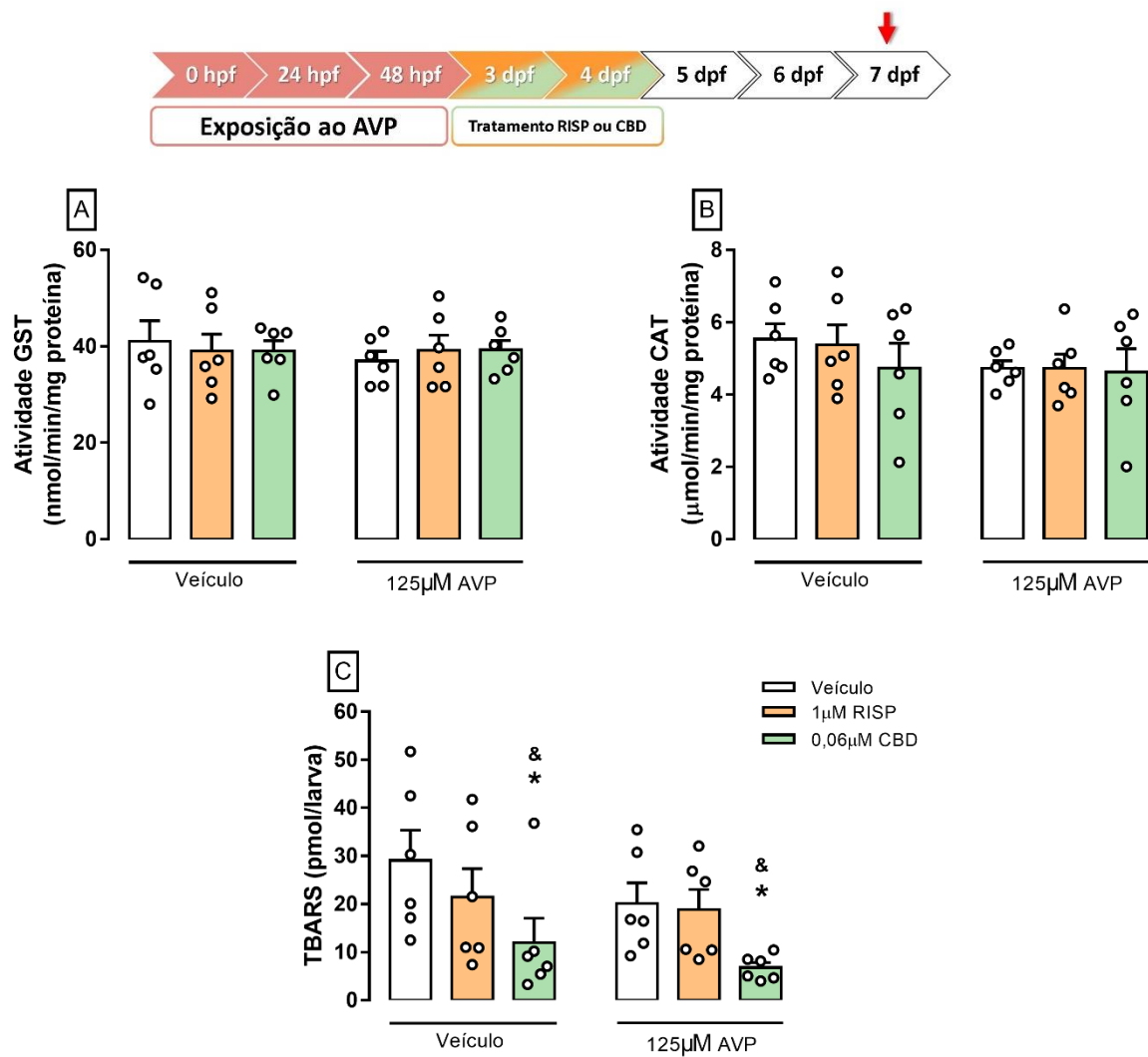


Fig. 20: Ensaios bioquímicos para quantificação de biomarcadores de estresse oxidativo de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à 125μM de AVP durante o período embrionário e tratadas com RISP ou CBD. (A) Atividade de glutatona-S-transferase (GST, nmol/min/mg de ptn); (B) Atividade de catalase (CAT, μmol/min/mg de ptn); (C) Níveis de produtos de peroxidação lipídica TBARS (LPO, pmol/larva). Dados em duas triplicatas independentes (n= 6 pools de 30 larvas/grupo) expressos como média ± EPM. *Two-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan (*p<0,05 comparado ao grupo veículo) e *One-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan (&p<0,05 comparado aos demais grupos, independente da exposição ao AVP).

4.3.5 Tratamento prolongado com RISP, mas não com CBD, promove alterações no desenvolvimento da bexiga natatória de larvas expostas ao AVP durante o período embrionário

A Figura 21 apresenta resultados da avaliação morfológica da bexiga natatória de larvas de zebrafish (7 dpf) expostas à concentração de 125 μ M de AVP durante o período embrionário e tratadas, por tempo prolongado (2 a 7 dpf), com as concentrações previamente padronizadas de 1 μ M de RISP ou 0,06 μ M de CBD.

A análise da área da bexiga natatória pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico para a exposição ao AVP ($F_{1,34}=3,53$; $p>0,05$), no entanto, apresentou efeito estatístico para o tratamento ($F_{2,34}=37,39$; $p<0,001$). Ainda, a análise não retornou interação estatística significativa entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,34}=0,003$; $p>0,05$). Dessa forma, é possível observar no gráfico da Figura 21A, um aumento estatisticamente significativo no valor da área da bexiga natatória de animais expostos ou não a 125 μ M AVP durante o período embrionário e tratados com 1 μ M RISP de 2 a 7 dpf, quando comparados aos demais grupos ($p<0,001$).

A Figura 21B traz imagens representativas do efeito do tratamento prolongado com as concentrações de 1 μ M de RISP ou 0,06 μ M de CBD sobre o desenvolvimento da bexiga natatória.

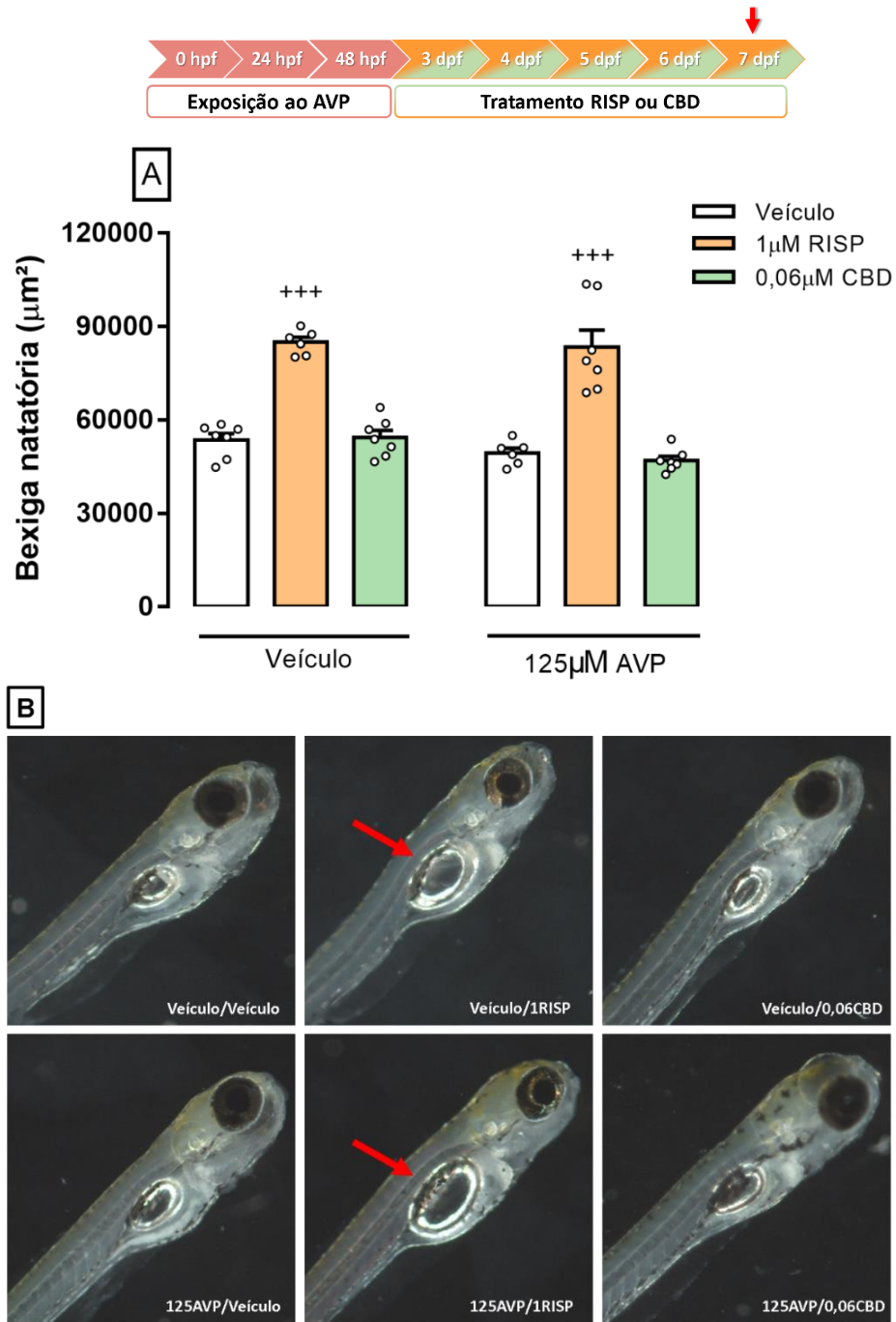


Fig. 21: Análise morfológica para (A) avaliação da área da bexiga natatória (µm²) de larvas de zebrafish (7 dpf) expostas ao AVP durante o período embrionário e tratadas por tempo prolongado com concentrações padronizadas de RISP e CBD. (B) Imagens representativas do efeito do tratamento prolongado sobre o desenvolvimento da bexiga natatória (seta vermelha: bexiga natatória com aumento na área inflada). Dados de uma réplica (n=6-7 larvas/grupo) e expressos como média ± EPM. *Two-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan. +++p<0,001 comparado aos grupos Veículo; Veículo/0,06CBD; 125AVP/Veículo e 125AVP/0,06CBD.

4.3.6 Nenhum dos tratamentos com RISP ou CBD, nem a exposição embrionária ao AVP foi capaz de promover alterações sobre os níveis de 5-HT, DA ou dos endocanabinoides AEA e 2-AG

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos, em triplicata (n=3 *pools* de 30 larvas/grupo), na quantificação de diferentes neurotransmissores em larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de 1µM de RISP ou 0,06µM de CBD.

A análise dos níveis de AEA (Fig. 22A) pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,12}=0,002$; $p>0,05$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{2,12}=1,96$; $p>0,05$). Ainda, a análise não retornou interação estatística entre as variáveis exposição × tratamento ($F_{2,12}=0,001$; $p>0,05$). Assim, é possível observar que, tanto a exposição ao AVP quanto o tratamento com RISP ou CBD não promoveram alterações nos níveis totais de AEA nas larvas de zebrafish.

Ainda, a análise dos níveis de 2-AG (Fig. 22B) pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,12}=0,71$; $p>0,05$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{2,12}=1,21$; $p>0,05$). Ainda, a análise não retornou interação estatística entre as variáveis exposição × tratamento ($F_{2,12}=1,01$; $p>0,05$). Assim, é possível observar que, tanto a exposição ao AVP quanto o tratamento com RISP ou CBD não promoveram alterações nos níveis totais de 2-AG nas larvas de zebrafish.

Para a avaliação de DA (Fig. 22C), a análise pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,12}=3,09$; $p>0,05$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{2,12}=2,09$; $p>0,05$). Ainda, a análise não retornou interação estatística entre as variáveis exposição × tratamento ($F_{2,12}=0,75$; $p>0,05$). Entretanto, análise *post-hoc* demonstrou que animais expostos à 125µM de AVP durante o período embrionário e tratados com 1µM de RISP apresentaram redução estatisticamente significativa nos níveis de DA, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,05$).

A análise dos níveis de 5-HT (Fig. 22D) pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico da exposição ao AVP ($F_{1,12}=0,12$; $p>0,05$) e não demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{2,12}=0,89$; $p>0,05$). Ainda, a análise não retornou interação estatística entre as variáveis exposição × tratamento ($F_{2,12}=0,66$; $p>0,05$). Assim, é possível observar que, tanto a exposição ao AVP quanto o tratamento com RISP ou CBD não promoveram alterações nos níveis totais de 5-HT nas larvas de zebrafish.

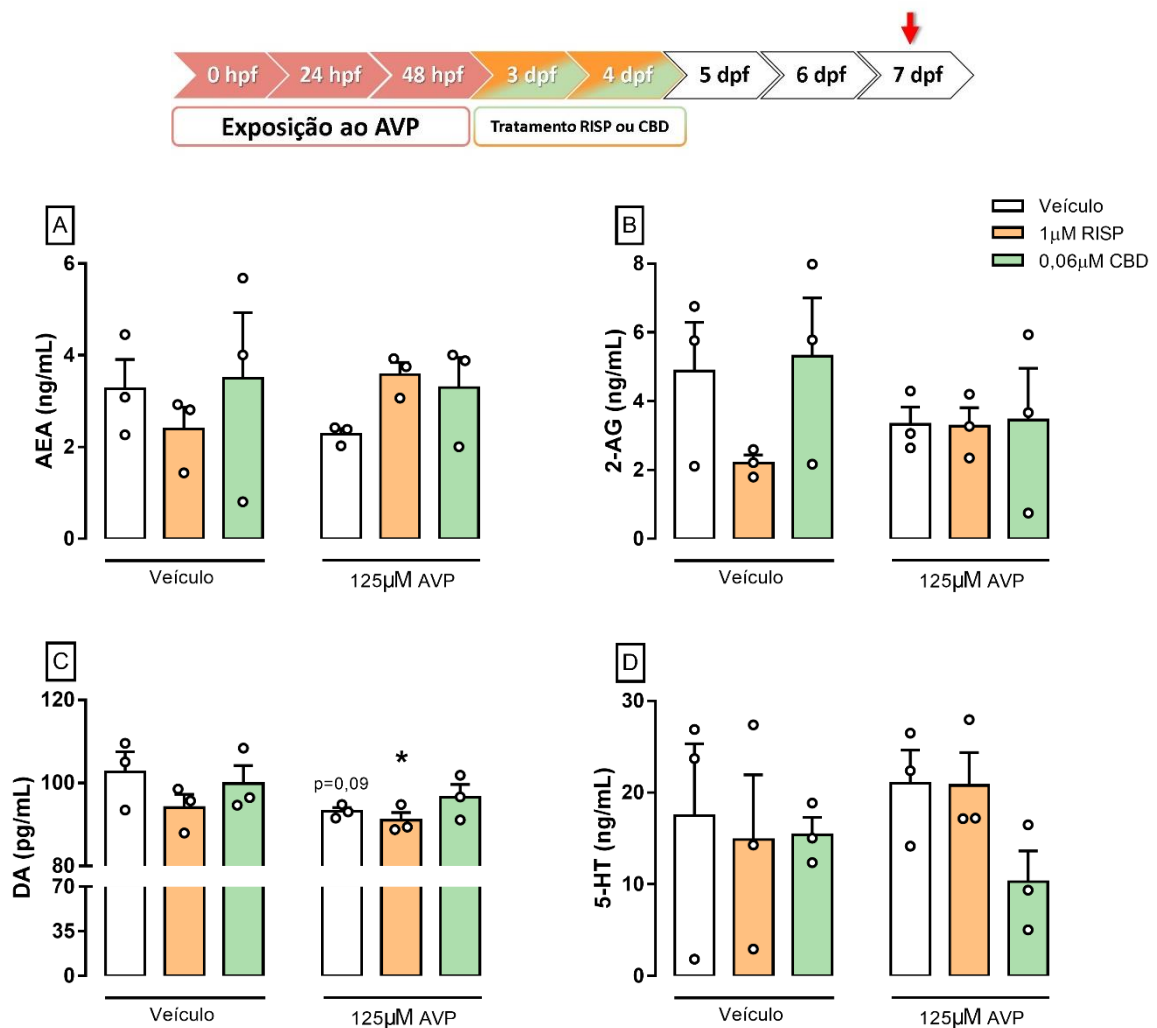


Fig. 22: ELISAs para quantificação de neurotransmissores em larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à 125 μM de AVP durante o período embrionário e tratadas com RISP ou CBD. (A) Níveis totais de anandamida (AEA, ng/mL); (B) Níveis totais de 2-araquidonoilglicerol (2-AG, ng/mL); (C) Níveis totais de dopamina (DA, pg/mL); (D) Níveis totais de serotonina (5-HT, ng/mL). Dados em triplicatas ($n=3$ pools de 30 larvas/grupo) expressos como média \pm EPM. *Two-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan (* $p<0,05$ comparado ao grupo veículo).

4.3.7 Alterações nos níveis de marcadores para proliferação celular, astrócitos e calmodulina promovidas pela exposição embrionária do zebrafish ao AVP são modificadas pelo tratamento com RISP e/ou CBD

As Figuras 23 a 28 apresentam os resultados ($n=2-6$ larvas/grupo) e as imagens representativas obtidos nos ensaios de imunofluorescência para quantificação de marcadores de proliferação celular (fosfoerina histona H3 - pHH3; e antígeno nuclear de proliferação celular - PCNA), apoptose (Caspase-3), astrócitos (proteína ácida fibrilar glial - GFAP) e proteínas

ligantes de Ca^{2+} (parvalbumina – PV; e calmodulina - CaM) no encéfalo de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de $125\mu\text{M}$ de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de $1\mu\text{M}$ de RISP ou $0,06\mu\text{M}$ de CBD.

A análise da marcação com pHH3 (Fig. 23A) pelo teste *Two-way* ANOVA efeito estatístico para o tratamento ($F_{1,16}=9,49$; $p<0,01$), para a exposição ($F_{2,16}=21,29$ $p<0,001$), além de interação estatística entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,16}=7,78$; $p<0,01$). Após teste *post-hoc* observa-se que, animais não expostos ao AVP durante o período embrionário e tratados com $1\mu\text{M}$ de RISP ou $0,06\mu\text{M}$ de CBD apresentaram redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência para pHH3, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,001$). Ainda, animais expostos ao AVP e tratados com $1\mu\text{M}$ de RISP ou $0,06\mu\text{M}$ de CBD também apresentaram redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência para pHH3, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,05$).

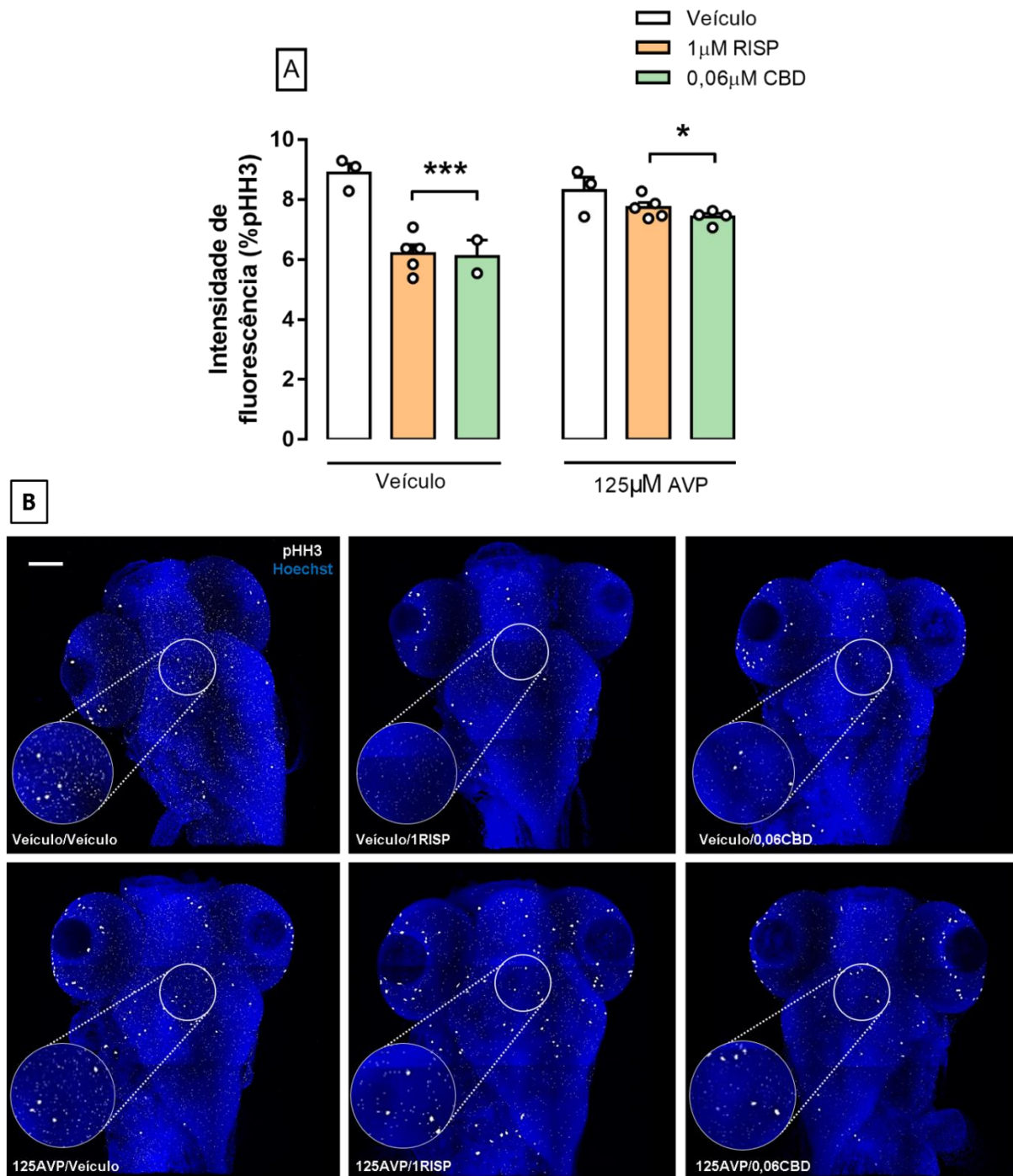


Fig. 23: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de proliferação celular por pHH3 (punctas maiores e menores em *zoom*) no encéfalo de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de 1µM de RISP ou 0,06µM de CBD. (A) Dados provenientes das triplicatas comportamentais (n= 2-5 larvas/grupo) expressos como média ± EPM da porcentagem de intensidade de fluorescência (%) *Two-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo veículo. (B) Imagens representativas em Z-stack obtidas por microscopia multifoton (40X) com marcação para pHH3 (branco, punctas maiores e menores em *zoom*) e Hoechst (azul); escala=100µm.

Em relação à marcação com PCNA (Fig. 24A), a análise pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{1,13}=0,32$; $p>0,05$) e nem para a exposição ($F_{2,13}=2,88$ $p>0,05$). Entretanto, retornou interação estatística entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,13}=35,60$; $p<0,001$). Após teste *post-hoc* foi possível observar que, animais não expostos ao AVP durante o período embrionário e tratados com $1\mu\text{M}$ de RISP, apresentaram aumento estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência para PCNA, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,01$). Ainda, animais expostos ao AVP e não tratados, assim como aqueles expostos ao AVP e tratados com $0,06\mu\text{M}$ de CBD, apresentaram um aumento estatisticamente significativo na intensidade de fluorescência para PCNA, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,05$). De forma oposta, o grupo exposto ao AVP e tratado com $1\mu\text{M}$ de RISP apresentou uma redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência para PCNA, quando comparado ao grupo controle ($p<0,05$) e ao grupo exposto ao AVP e não tratado ($p<0,01$). O tratamento com $0,06\mu\text{M}$ de CBD em animais expostos ao AVP promoveu aumento estatisticamente significativo na intensidade de fluorescência para PCNA, quando comparado aos animais expostos ao AVP e tratados com $1\mu\text{M}$ de RISP ($p<0,001$).

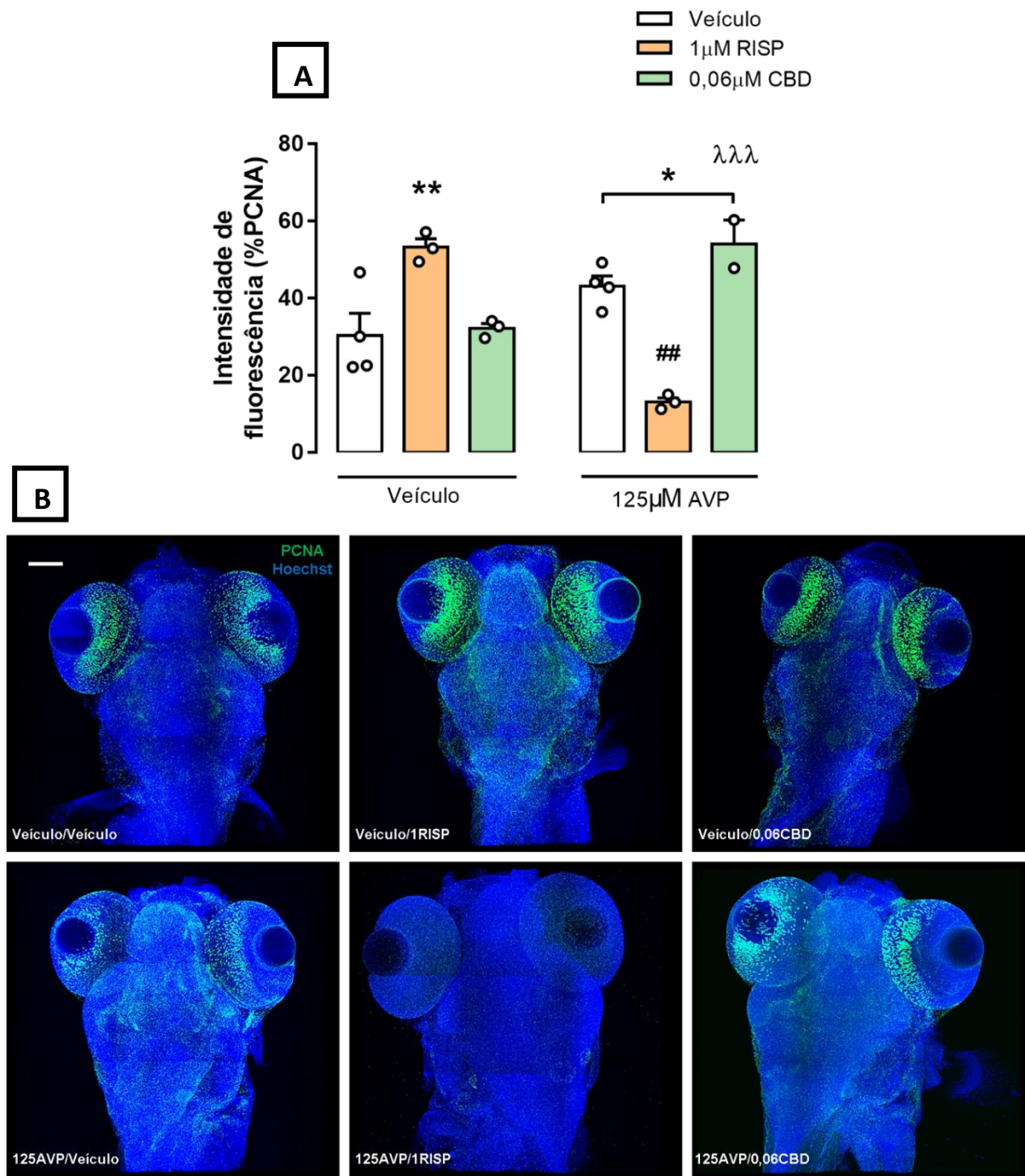


Fig. 24: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de proliferação celular por PCNA no encéfalo de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de 1µM de RISP ou 0,06µM de CBD. (A) Dados provenientes das triplicatas comportamentais (n= 2-4 larvas/grupo) expressos como média ± EPM da porcentagem de intensidade de fluorescência (%) *Two-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan *p<0,05 e **p<0,01 comparado ao grupo veículo; #p<0,01 comparado ao grupo 125AVP/Veículo; λλλ p<0,001 comparado ao grupo 125AVP/1RISP. (B) Imagens representativas em Z-stack obtidas por microscopia multifoton (40X) com marcação para PCNA (verde) e Hoechst (azul); escala=100µm.

A análise da marcação com Caspase-3 (Fig. 25A) pelo teste *Two-way* ANOVA não demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{1,14}=1,59$; $p>0,05$) e nem para a exposição ($F_{2,14}=2,22$ $p>0,05$). Também não retornou interação estatística entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,14}=1,80$; $p>0,05$). Entretanto, após teste *post-hoc* foi possível observar que, animais expostos ao AVP durante o período embrionário e tratados com $1\mu\text{M}$ de RISP, apresentaram redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência para Caspase-3, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,05$).

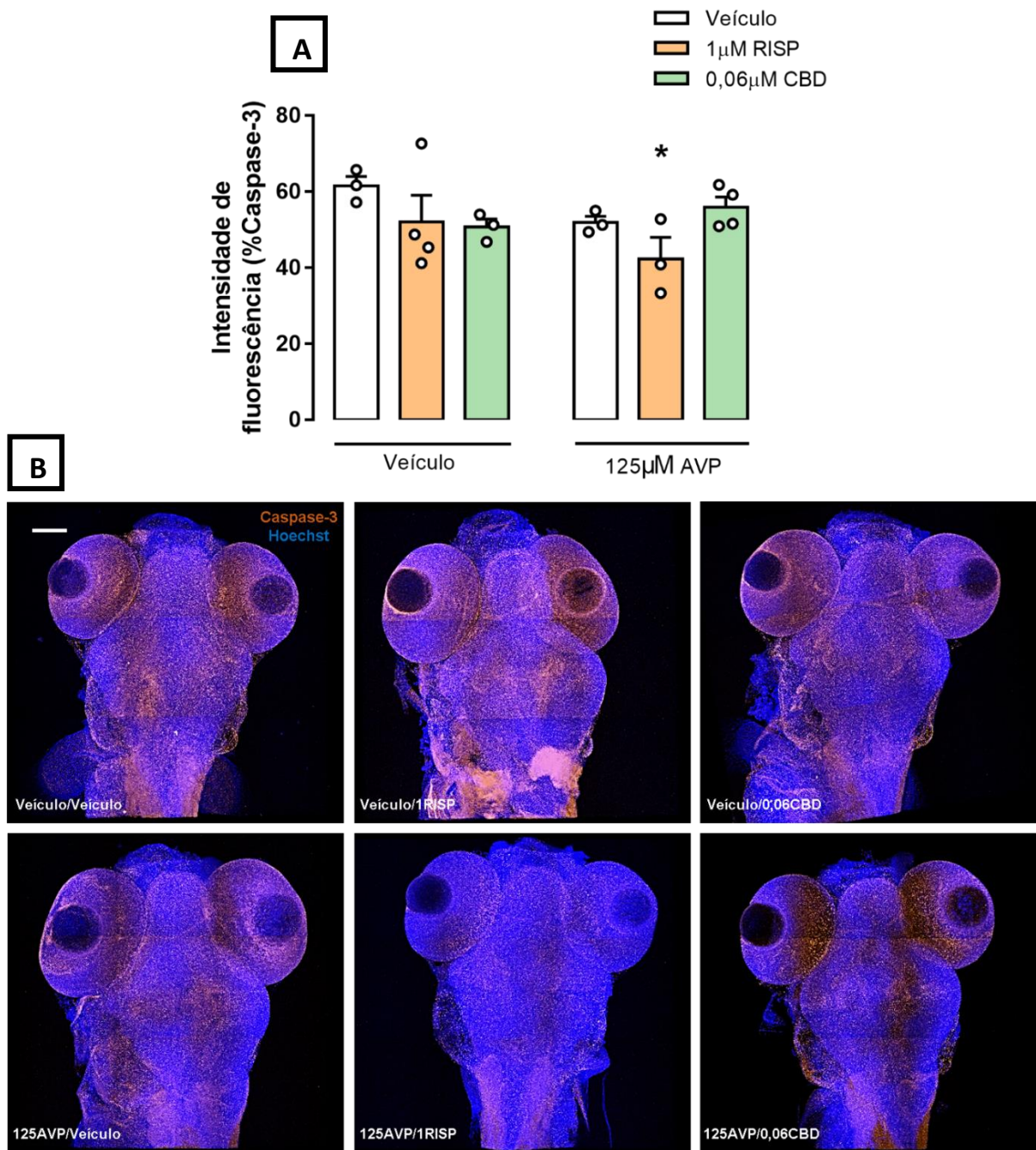


Fig. 25: Ensaios de imunofluorescência para quantificação de marcador de apoptose por Caspase-3 no encéfalo de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125µM de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de 1µM de RISP ou 0,06µM de CBD. (A) Dados provenientes das triplicatas comportamentais (n= 3-4 larvas/grupo) expressos como média ± EPM da porcentagem de intensidade de fluorescência (%) *Two-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo. (B) Imagens representativas em Z-stack obtidas por microscopia multifoton (40X) com marcação para Caspase-3 (laranja) e Hoechst (azul); escala=100µm.

Já a análise da marcação com GFAP (Fig. 26A) pelo teste *Two-way* ANOVA demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{1,13}=6,95$; $p<0,05$), para a exposição ($F_{2,13}=5,66$ $p<0,05$), além de interação estatística entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,13}=4,18$; $p<0,05$). Após teste *post-hoc* foi possível observar que, animais expostos ao AVP durante o período embrionário e não tratados, assim como aqueles expostos ao AVP e tratados com $1\mu\text{M}$ de RISP, apresentaram redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência para GFAP, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,05$). Enquanto isso, o grupo exposto ao AVP e tratado com $0,06\mu\text{M}$ de CBD apresentou aumento estatisticamente significativo na intensidade de fluorescência para GFAP, quando comparados ao grupo exposto ao AVP e não tratado ($p<0,05$) e ao grupo exposto ao AVP e tratado com $1\mu\text{M}$ de RISP ($p<0,01$).

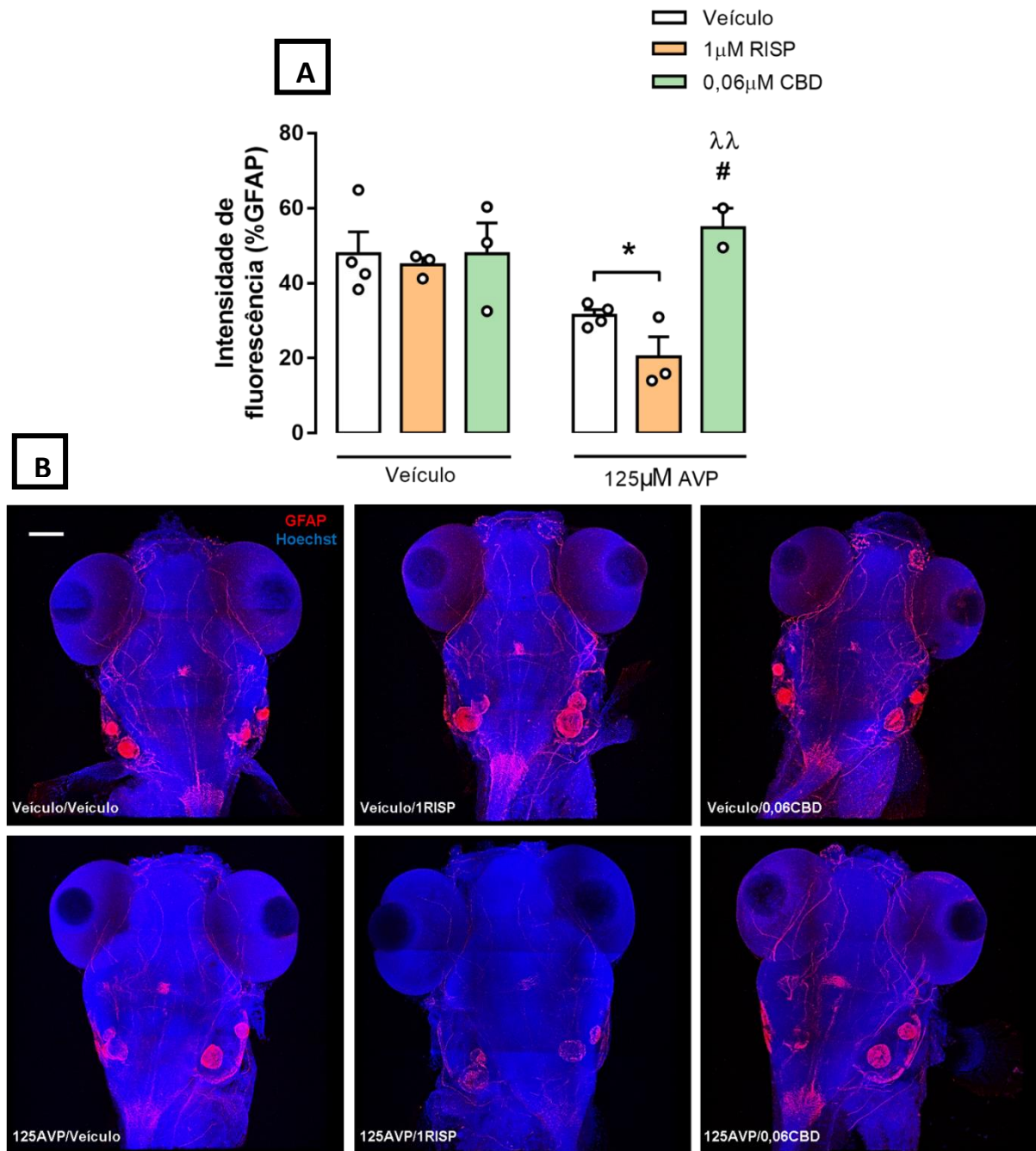


Fig. 26: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de astrócitos por GFAP no encéfalo de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125 μ M de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de 1 μ M de RISP ou 0,06 μ M de CBD. (A) Dados provenientes das triplicatas comportamentais (n= 2-4 larvas/grupo) expressos como média \pm EPM da porcentagem de intensidade de fluorescência (%) *Two-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan. * $p < 0,05$ comparado ao grupo veículo; # $p < 0,05$ comparado ao grupo 125AVP/Veículo; $\lambda\lambda$ $p < 0,01$ comparado ao grupo 125AVP/1RISP. (B) Imagens representativas em Z-stack obtidas por microscopia multifoton (40X) com marcação para GFAP (vermelho) e Hoechst (azul); escala=100 μ m.

Para a marcação com PV (Fig. 27A), análise pelo teste de Kruskal-Wallis não demonstrou diferenças entre os grupos avaliados ($\chi^2=10,93$; $p>0,05$). Dessa forma, é possível observar que, tanto a exposição embrionária ao AVP quanto o tratamento com RISP ou CBD não promoveram alterações na intensidade de fluorescência para PV no encéfalo de larvas de zebrafish.

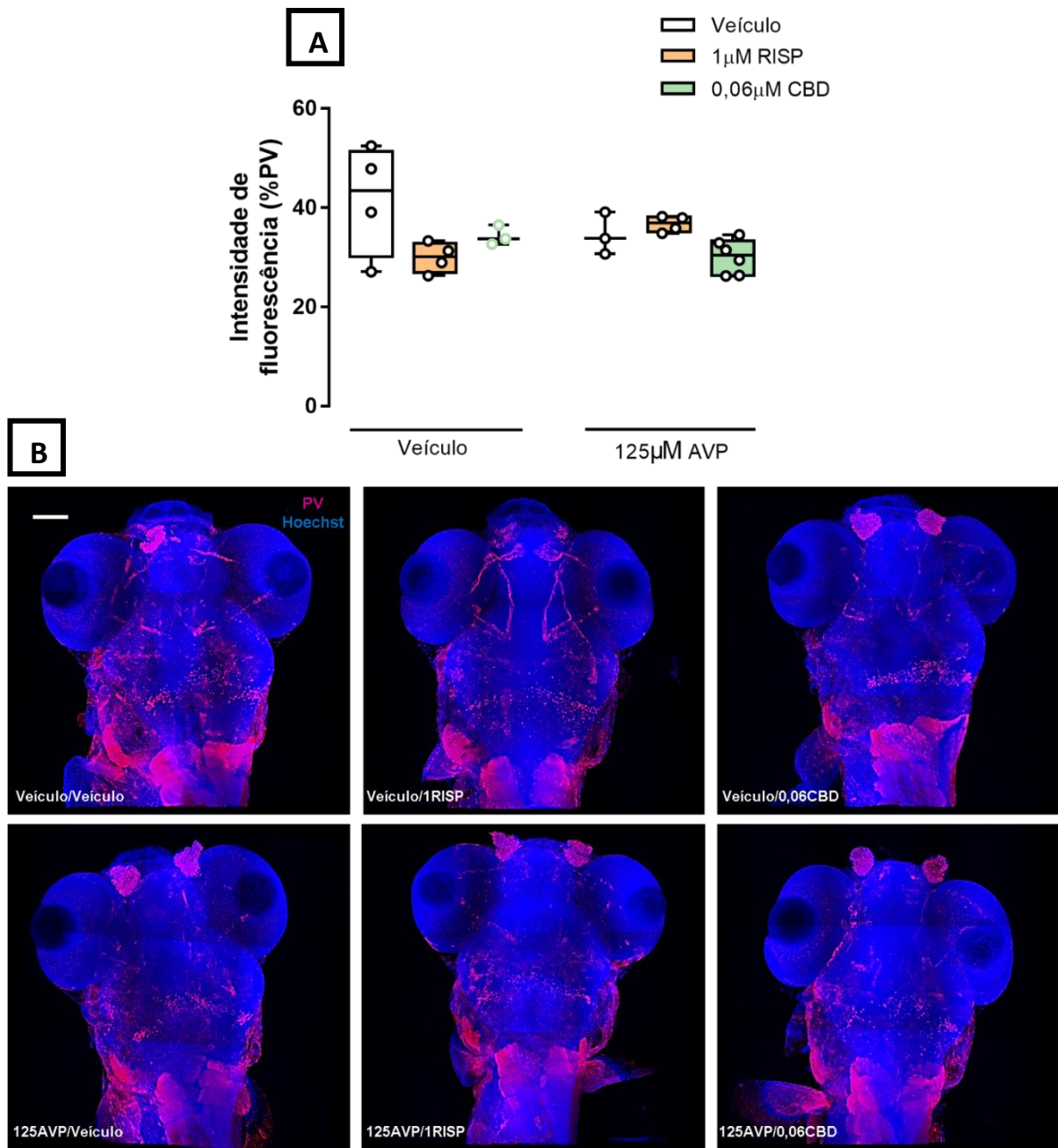


Fig. 27: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de proteína ligante de Ca^{2+} por PV no encéfalo de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de $125\mu\text{M}$ de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de $1\mu\text{M}$ de RISP ou $0,06\mu\text{M}$ de CBD. (A) Dados provenientes das triplicatas comportamentais ($n= 3-6$ larvas/grupo) expressos como mediana e intervalos interquartis da porcentagem de intensidade de fluorescência (%) (Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas). (B) Imagens representativas em Z-stack obtidas por microscopia multifotom (40X) com marcação para parvalbumina (fúcsia) e Hoechst (azul); escala= $100\mu\text{m}$.

Por fim, a análise da marcação com CaM (Fig.28A) pelo teste *Two-way* ANOVA demonstrou efeito estatístico para o tratamento ($F_{1,18}=17,27$; $p<0,001$), para a exposição ($F_{2,18}=32,31$ $p<0,001$), além de interação estatística entre as variáveis exposição \times tratamento ($F_{2,18}=10,17$; $p<0,01$). Após teste *post-hoc* observa-se que, animais não expostos ao AVP durante o período embrionário e tratados com $1\mu\text{M}$ de RISP ou $0,06\mu\text{M}$ de CBD apresentaram redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência para CaM, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,01$). Quanto aos animais expostos ao AVP e não tratados, pode-se observar um aumento estatisticamente significativo na intensidade de fluorescência para CaM, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,01$). Entretanto, o tratamento com RISP ou CBD em animais expostos ao AVP durante o período embrionário, promove uma redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência para CaM, quando comparados aqueles expostos ao AVP sem tratamento ($p<0,01$). Além disso, animais expostos ao AVP e tratados com $0,06\mu\text{M}$ de CBD apresentaram redução estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência para CaM, quando comparados aos animais do grupo controle ($p<0,001$) e aos animais do grupo exposto ao AVP e tratados com $1\mu\text{M}$ de RISP ($p<0,001$).

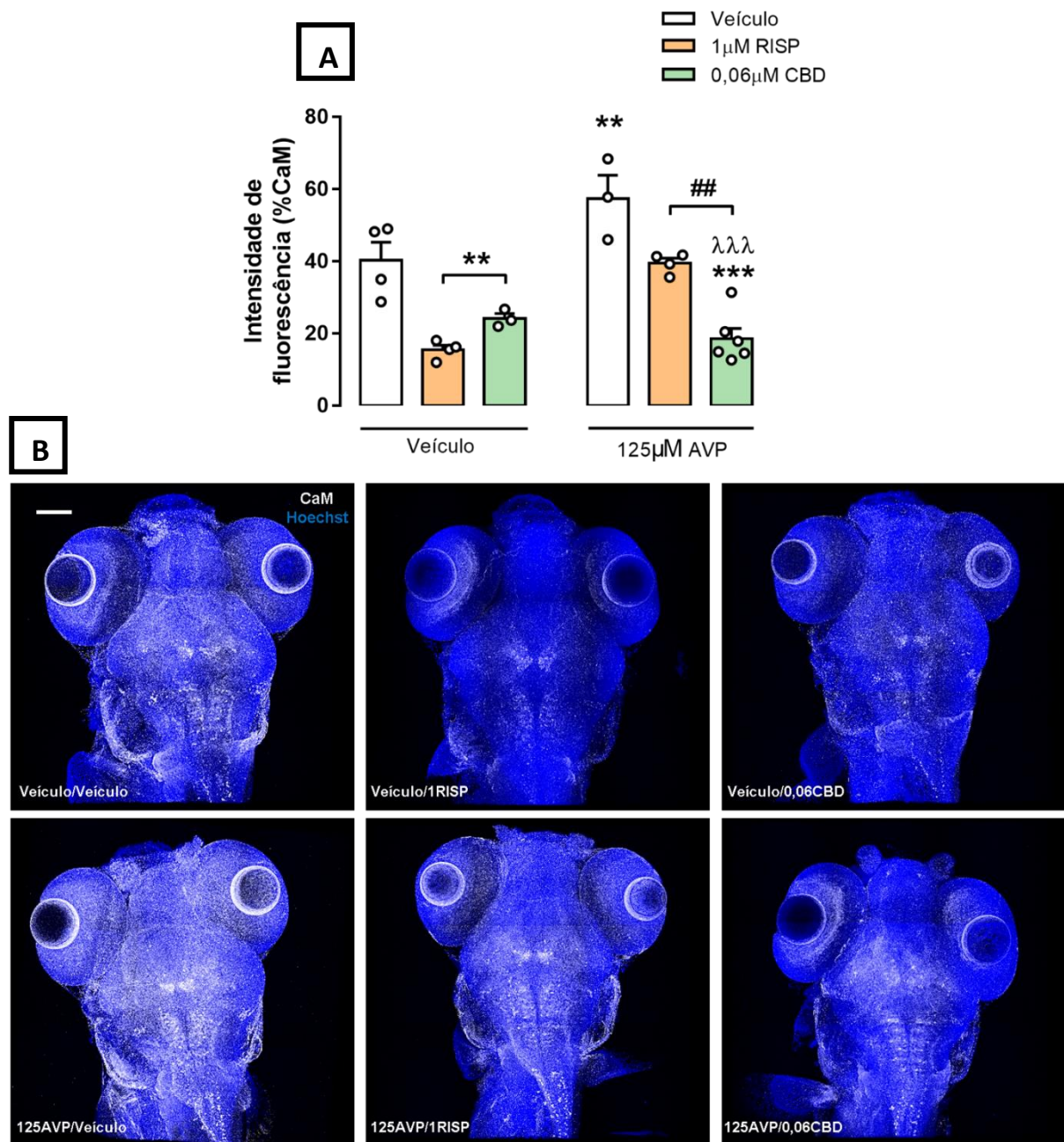


Fig. 28: Ensaio de imunofluorescência para quantificação de marcador de proteína ligante de Ca^{2+} por CaM no encéfalo de larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de $125\mu\text{M}$ de AVP durante o período embrionário e tratadas com as concentrações previamente padronizadas de $1\mu\text{M}$ de RISP ou $0,06\mu\text{M}$ de CBD. (A) Dados provenientes das triplicatas comportamentais ($n= 3-6$ larvas/grupo) expressos como média \pm EPM da porcentagem de intensidade de fluorescência (%) *Two-way* ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Duncan. ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ comparado ao grupo veículo; ## $p<0,01$ comparado ao grupo 125AVP/Veículo ; $\lambda\lambda\lambda$ $p<0,001$ comparado ao grupo 125AVP/1RISP . (B) Imagens representativas em Z-stack obtidas por microscopia multifotón (40X) com marcação para calmodulina (branco) e Hoechst (azul); escala= $100\mu\text{m}$.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que, a exposição embrionária do zebrafish à concentração de 125 μ M de AVP foi capaz de gerar um fenótipo comportamental compatível ao observado no TEA, reforçando a viabilidade do nosso modelo animal como ferramenta para estudo dessa condição. Ademais, o tratamento desses animais com a menor concentração de CBD aqui avaliada (0,06 μ M) foi capaz de reverter essas alterações comportamentais, sendo inclusive, mais eficaz e mais seguro que o tratamento com RISP (1 μ M), fármaco amplamente empregado na clínica como tratamento padrão em pacientes autistas, reiterando o potencial terapêutico desse fitocanabinoide. De maneira geral, nossos dados vão ao encontro da literatura, uma vez que, a exposição embrionária/gestacional ao AVP em diversos modelos animais é utilizada como abordagem para obtenção de modelos TEA de estudo, gerando respostas compatíveis à hiperatividade e agressividade comumente presentes nesses pacientes (CHEN et al., 2020b; MESHALKINA et al., 2018; RANGER; ELLENBROEK, 2016; SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005; STEWART et al., 2014). Apesar de ainda não existirem trabalhos avaliando o potencial do CBD em modelos pré-clínicos de autismo (LOSS et al., 2021; PEDRAZZI et al., 2022), nossos resultados corroboram com aqueles observados em estudos clínicos conduzidos em crianças diagnosticadas com TEA (ARAN et al., 2019a; BARCHEL et al., 2019; HEUSSLER et al., 2019; PEDRAZZI et al., 2022; TARTAGLIA; BONN-MILLER; HAGERMAN, 2019).

O AVP, apesar de aprovado como um medicamento utilizado no tratamento da epilepsia e alguns transtornos psiquiátricos como o transtorno bipolar e de humor, apresenta forte associação com o aumento na incidência de TEA na população, sendo caracterizado como importante fator de risco quando utilizado durante o período gestacional em humanos, principalmente no primeiro trimestre, podendo afetar significativamente o neurodesenvolvimento fetal (ROMOLI et al., 2019), uma vez que apresenta mecanismos de ação secundários que podem provocar alterações estruturais e funcionais ao longo do período crítico de desenvolvimento do SNC (TOMSON; BROMLEY, 2021). De fato, estudos pré-clínicos prévios demonstram que o AVP apresenta um papel significativo e bem estabelecido como recurso para reprodução de alterações comportamentais e moleculares características do TEA em diferentes espécies (ARNDT; STODGELL; RODIER, 2005; BOSSU; ROUX, 2019; CHEN et al., 2020b; LIU et al., 2021; NICOLINI; FAHNESTOCK, 2018), incluindo no modelo animal zebrafish (mais detalhes nas revisões MESHALKINA et al., 2018 e TAYANLOO-BEIK et al., 2022). Conforme esperado, em nosso estudo embriões de zebrafish expostos à

concentração de 125µM de AVP de 4 a 48 hpf, mesmo após a janela de ausência da exposição, apresentaram-se hiperativos e mais agressivos, comportamentos compatíveis com o quadro sintomático do TEA (GESCHWIND, 2009). Esses resultados sugerem que, os fenótipos observados possam ser resultantes de modificações provocadas pela ação do AVP durante o neurodesenvolvimento desses animais, as quais parecem ser mantidas mesmo após a retirada da droga, refletindo possíveis alterações permanentes em diferentes vias e mecanismos envolvidos nas bases etológicas que compõem tais respostas comportamentais. Além disso, assim como demonstrado em nosso trabalho, já foi relatado que a exposição à concentrações preconizadas como baixas e intermediárias de AVP, durante as primeiras horas do estágio embrionário do zebrafish, não foi capaz de aumentar a taxa de mortalidade, malformações e o tempo de eclosão dos embriões expostos, porém ainda foi capaz de induzir alterações comportamentais no início do estágio larval desses mesmos animais (DWIVEDI et al., 2019; ZIMMERMANN et al., 2015).

No presente estudo, ensaios durante os estágios embrionário e larval do zebrafish viabilizaram a identificação de alterações significativas no perfil motor dos animais expostos a concentração de 125µM de AVP, sendo observado um aumento na movimentação espontânea de embriões logo nas primeiras 24h de exposição (*tail coiling*), resultado sustentado na avaliação da atividade motora de larvas com 7 dpf em campo aberto, mesmo após 5 dias da exposição. Apesar de alterações motoras não serem incluídas como um dos principais critérios diagnósticos no TEA, apresentam-se altamente prevalentes nesses pacientes (CRIPPA et al., 2021; GOWEN; HAMILTON, 2013). Em consonância com os dados obtidos, diferentes estudos translacionais de TEA utilizando o modelo zebrafish demonstraram que, larvas de 5 a 7 dpf expostas a diferentes concentrações não-tóxicas de AVP durante a fase embrionária apresentaram maior velocidade de natação, maior número de batidas de cauda e maior distância total percorrida (CHEN et al., 2018; JOSEPH et al., 2022; ZIMMERMANN et al., 2015), condições configuradas como perfis de hiperlocomoção e que podem, inclusive, representar comportamentos de risco no modelo, uma vez que aumentam a detecção por predadores frente a maior visibilidade resultante dessa hiperatividade (WEIS et al., 2001). Em uma perspectiva translacional, podemos sugerir que nossos achados são congruentes com a literatura. As habilidades e o refinamento motor constituem padrões preditivos do funcionamento adaptativo e também da qualidade de vida e segurança de pacientes com TEA, podendo inclusive antecipar futuros déficits na área sócio-comunicativa, uma vez que, a capacidade motora está diretamente associada ao desenvolvimento da comunicação e da linguagem, assim como a processos de

interação com outros indivíduos (BREMER; LLOYD, 2016; GOWEN; HAMILTON, 2013; MOSCONI; SWEENEY, 2015; SACREY et al., 2018).

Sabe-se que o TEA apresenta uma significativa heterogeneidade em diferentes critérios de análise, incluindo no campo comportamental. Nesse sentido, comportamentos mal-adaptativos, como a agressão e irritabilidade, parecem ser mais prevalentes em indivíduos dentro do espectro (mais detalhes na revisão ERICKSON et al., 2016), prejudicando a qualidade de vida desses pacientes ao longo dos anos frente aos possíveis efeitos adversos inerentes a esses comportamentos, tais como auto e hetero lesões, além da dificuldade de socialização, a qual reduz oportunidades de emprego e aumenta o envolvimento com o sistema judicial criminal (mais detalhes na revisão IM, 2021). Conforme descrito em diferentes modelos pré-clínicos para estudo do TEA, avaliações comportamentais indicam que o AVP também seja capaz de induzir modificações no perfil de agressividade de animais expostos durante o período crítico do desenvolvimento (CHEN et al., 2018; ROULLET; LAI; FOSTER, 2013; ZIMMERMANN et al., 2015). No modelo zebrafish, a agressão representa requisito essencial para a sobrevivência e reprodução, sendo um comportamento usado principalmente no estabelecimento e manutenção da dominância territorial, interferindo também no perfil de socialização do cardume (GERLAI, 2003; LARSON; O'MALLEY; MELLONI, 2006; SPENCE; SMITH, 2006). Com o auxílio do teste de ataque ao espelho, observamos um aumento no comportamento tipo-agressivo de larvas de zebrafish expostas à concentração de 125µM de AVP durante a fase embrionária, resultado refletido pelo aumento no número de movimentos realizados, bem como no tempo total despendido na área próxima ao espelho, região em que o animal consegue visualizar sua imagem, porém interpreta como sendo um animal estranho. Nossos achados, apesar de contrários aos descritos por Chen e colaboradores (2018) e Zimmermann e colaboradores (2015) obtidos em idades mais avançadas do zebrafish, reforçam a validade do nosso modelo TEA pela ação do AVP, uma vez que reproduz de forma robusta um dos principais sintomas comportamentais presentes em pacientes no espectro (FITZPATRICK et al., 2016; GESCHWIND, 2009).

Outro parâmetro comportamental fortemente afetado em pacientes diagnosticados com TEA trata-se do perfil de interação social (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2022). Diferentes modelos animais TEA, inclusive os induzidos por exposição ao AVP, reproduzem os déficits na sociabilização característicos do autismo (BARONIO et al., 2018; HARATIZADEH et al., 2021; JOSEPH et al., 2022; NORTON, 2013; SHEN; ZUO, 2016; SILVERMAN et al., 2010; TARTAGLIONE et al., 2019). Contrário ao esperado, nossos resultados não apresentaram diferença no perfil de interação social de animais expostos ao AVP

durante o período embrionário. Talvez uma possível justificativa para nosso achado esteja no fato de que, durante a idade de 7 dpf, o constructo responsável pelo controle e regulação do comportamento de interação social no zebrafish ainda seja primitivo, o que explicaria a organização em cardumes e a preferência por manter-se próximo a coespecíficos apenas em fases mais tardias do modelo animal (BUSKE; GERLAI, 2012). Todavia, é importante ressaltar que mesmo não obtendo resultados significativos para o teste de interação social aplicado, o teste de ataque ao espelho reflete, além do perfil de agressividade, um tipo de comportamento social do zebrafish, uma vez que o ato de enfrentamento por mordidas e batidas de cauda também representa uma forma de interação interpretada como uma resposta impulsiva, sendo portanto, um dado altamente relevante para o estudo do perfil social do modelo (DESJARDINS; FERNALD, 2010; MORETZ; MARTINS; ROBISON, 2007; OLIVEIRA; SILVA; SIMÕES, 2011; PHAM et al., 2012). O estudo do comportamento social no zebrafish engloba a análise de diferentes domínios: (i) fenótipos de cardume, (ii) preferência social e (iii) as respostas de ataque ao espelho, os quais refletem dados complementares entre si (PHAM et al., 2012). Sabendo que a agressão e a impulsividade estão intimamente vinculadas ao prejuízo no estabelecimento e manutenção de relacionamentos sociais (LUISELLI, 2009), é possível sugerir que, em nosso modelo, apesar da exposição embrionária ao AVP não promover alterações no perfil de escolha/preferência social, foi capaz de aumentar o comportamento de agressão/impulsividade, refletindo um possível prejuízo no comportamento social global desses animais.

De modo geral, a exposição embrionária à concentração intermediária de AVP, aqui definida como sendo 125 μ M, induziu alterações significativas nos padrões comportamentais de larvas de zebrafish, fenótipos esses compatíveis aos sintomas observados no TEA. Já as maiores concentrações de AVP analisadas (625 μ M e 1250 μ M) demonstraram um potencial significativo de toxicidade marcado pelo aumento no número e tipo de malformação, bem como aumento na taxa de mortalidade dos animais expostos. Essa variação de resposta entre as concentrações intermediária e as mais elevadas pode estar atrelada ao envolvimento de diversos mecanismos moleculares envolvidos na ação do AVP durante a fase de exposição (efeitos antagonistas, modulação epigenética, dessensibilização de receptores, modulação metabólica), culminando em efeitos neurocomportamentais do tipo não-monotônicos, os quais já foram identificados em outros compostos (LAGARDE et al., 2015; WANG et al., 2013).

O desenvolvimento de qualquer modelo de doença ou condição humana, principalmente no âmbito da pesquisa pré-clínica, além de reproduzir alterações compatíveis com a condição em estudo e seus potenciais mecanismos inerentes, também deve garantir sua utilidade como

ferramenta para triagem de novos tratamentos, sendo a validação desse modelo dependente, ainda, da capacidade da farmacoterapia disponível em resgatar, parcial ou totalmente, as alterações patológicas induzidas na construção do modelo experimental (NESTLER; HYMAN, 2010). Contudo, até a presente data, medicamentos direcionados ao tratamento dos múltiplos fatores centrais do TEA ainda encontram-se indisponíveis, existindo apenas opções paliativas para a melhora de condições sintomáticas e comorbidades que prejudicam a qualidade de vida do paciente (GOEL et al., 2018). Nesse contexto, há uma prevalência considerável da psicofarmacoterapia e da polifarmácia em pacientes com TEA, sendo amplamente descrito a utilização de antipsicóticos; inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRSs); agentes glutamatérgicos, GABAérgicos e colinérgicos; antagonistas opioides; oxitocina e melatonina, todos aplicados nos mais diversos esquemas posológicos e com estudos de eficácia/segurança ainda muito controversos (mais detalhes na revisão (GOEL et al., 2018). Porém, apenas a RISP e o aripiprazol, ambos fármacos pertencentes a classe de antipsicóticos atípicos, possuem uso aprovado pela FDA como tratamento eficaz da irritabilidade e manifestações agressivas relacionadas, principalmente, a episódios de auto e heteroagressão presentes em pacientes com TEA, podendo exercer, em alguns casos, efeitos benéficos sobre a hiperatividade. (KIRINO, 2014; MANO-SOUSA et al., 2021).

Apesar de seu uso largamente descrito na literatura, sendo muitas vezes um dos tratamentos de primeira escolha no TEA, é válido ressaltar que a RISP apresenta eficácia tempo-limitada e considerável potencial para o desenvolvimento de efeitos adversos a médio e longo prazo, o que por sua vez dificulta a correta adesão ao tratamento pelos pacientes (MANO-SOUSA et al., 2021; WEITLAUF, 2014; ZWAIGENBAUM et al., 2015). Tais características justificam nossa estratégia em adotar um esquema terapêutico precoce e de curto prazo. No zebrafish, a faixa etária compreendida entre 2 a 4 dpf corresponde, de forma translacional, aos primeiros meses de vida de uma criança (CHAHARDEHI; ARSAD; LIM, 2020), um período crítico de neuroplasticidade e refinamento do SNC no desenvolvimento humano. Além disso, o período de tratamento aqui proposto objetivou, em um primeiro momento, minimizar efeitos indesejáveis comuns em regimes farmacológicos crônicos, focando assim na determinação de um esquema posológico que garanta uma eficácia terapêutica máxima atrelada a mínima ocorrência de efeitos adversos.

Levando em consideração os pontos abordados, após a padronização do modelo TEA no zebrafish, o presente estudo também visou a padronização da RISP como controle positivo do tratamento em nosso modelo, avaliando a melhor concentração capaz de reverter, de forma sustentada, as alterações comportamentais previamente induzidas pelo AVP. Nossos resultados

demonstraram que, larvas de zebrafish com 7 dpf expostas à concentração de 125 μ M de AVP durante o período embrionário e tratadas com 1 μ M de RISP, de 2 a 4 dpf, exibiram uma melhora sustentada apenas para o parâmetro relativo ao comportamento do tipo-agressivo/impulsividade social no modelo avaliado. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo com o esquema terapêutico aqui adotado, o qual demonstra esse efeito da RISP sobre a agressividade induzida pela exposição embrionária ao AVP no zebrafish. De fato, trabalhos descrevem, de forma inconclusiva, variações nas respostas motoras e sociais do zebrafish frente a administração da RISP, sendo válido destacar a ausência de uma investigação mais profunda do perfil agressivo do modelo nesses estudos (DWIVEDI et al., 2019; IDALENCIO et al., 2015; KALICHAK et al., 2016, 2017, 2019; PRIETO et al., 2012). Tais divergências podem, provavelmente, estar associadas ao desenho experimental aplicado (idade, concentração da droga, tempo de exposição, modelo de doença), o que de certa forma pode nos ajudar a justificar o efeito *per se* da RISP aqui observado (número de movimentos realizados na área do espelho), ou seja, em condições basais, o efeito da RISP (1 μ M) foi contrário ao observado no modelo TEA, aumentando o perfil de agressividade dos animais tratados, o que nos leva a sugerir que a RISP possa exibir efeitos condicionados à situação fisiológica na qual foi empregada. Na clínica, essa variação de resposta ao tratamento com RISP também se faz presente, sendo o efeito sobre a irritabilidade/agressividade o mais consistente e robusto entre os pacientes com TEA (mais detalhes nas revisões MANO-SOUSA et al., 2021; PERSICO et al., 2021). De uma forma geral, mesmo não observando efeito do tratamento com RISP sobre os perfis motor e de interação social, nosso resultado encontrado para a reversão do comportamento tipo-agressivo/impulsividade social torna-se de grande valia, uma vez que, mesmo após 3 dias da sua retirada, o tratamento único com a menor concentração de RISP testada demonstrou efeito sustentado sobre o sintoma alvo para o qual seu uso foi aprovado em pacientes com TEA (irritabilidade e agressividade).

O constante aumento na taxa de prevalência, bem como a ausência de medicamentos direcionados ao tratamento de sintomas centrais do TEA, reforçam a urgência na busca e/ou desenvolvimento de novas abordagens farmacoterapêuticas para esta condição (LACIVITA et al., 2017; MAENNER et al., 2020). Nesse sentido, muitos são os estudos envolvendo os efeitos do CBD sobre o heterogêneo grupo de manifestações e alterações presentes no TEA (mais detalhes nas revisões LOSS et al., 2021; PEDRAZZI et al., 2022). De fato, o amplo perfil terapêutico do CBD abrange muitos dos sintomas psiquiátricos associados ao autismo. Atrelado a isso, diferentes estudos descrevem minuciosamente os mais diversos sistemas potencialmente envolvidos na fisiopatologia do TEA, sobre os quais, em sua grande maioria, atua o CBD

(PEDRAZZI et al., 2022). Apesar de seu uso ainda *off-label* na clínica do TEA (com ressalvas para casos individualmente autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA), resultados promissores fomentam cada vez mais novas pesquisas investigando o CBD como potencial alternativa no tratamento de alterações centrais inerentes ao TEA (ARAN et al., 2019a, 2021; BARCHEL et al., 2019; SILVA JUNIOR et al., 2022).

Nesse contexto, após obtidos os requisitos para padronização de nosso modelo TEA no zebrafish, iniciamos a avaliação do perfil farmacoterapêutico de diferentes concentrações de CBD como tratamento das alterações comportamentais induzidas pela exposição embrionária ao AVP, comparando ainda sua eficácia ao controle positivo RISP. Até onde sabemos, e até a presente data, este é o primeiro estudo pré-clínico avaliando os efeitos terapêuticos do CBD em um modelo TEA (LOSS et al., 2021). A respeito da utilização do modelo zebrafish como ferramenta para avaliação do CBD, nota-se uma maior concentração de trabalhos voltados à análise de seu perfil toxicológico durante diferentes faixas etárias, inclusive durante seu período crítico de desenvolvimento (AHMED et al., 2018; CARTY et al., 2018; KANYO et al., 2021; PANDELIDES et al., 2020, 2021; TALAMANTES et al., 2021; VALIM BRIGANTE et al., 2018).

De uma forma geral, nossos resultados vão ao encontro da literatura disponível acerca dos efeitos do CBD em outros modelos de doença (mais detalhes nas revisões LOSS et al., 2021; POLEG et al., 2019), bem como dos estudos clínicos conduzidos em pacientes com TEA avaliando o uso de extratos de *Cannabis* ricos em CBD (PEDRAZZI et al., 2022). No que se refere ao perfil motor, observamos que todas as concentrações de CBD testadas (0,06 μ M; 0,48 μ M e 0,96 μ M), mas não o controle positivo RISP, promoveram a redução sustentada da hiperatividade presente em nosso modelo TEA, sem promover efeitos *per se* sobre a locomoção em condições basais. Em consonância com nossos resultados, trabalho conduzido por Moreira e Guimarães (2005), utilizando um modelo roedor de psicose/esquizofrenia, demonstrou que a administração de CBD foi capaz de inibir a hiperlocomoção induzida pelo uso de drogas psicotomiméticas, sem, no entanto, reduzir a locomoção basal desses animais, ou seja, seu efeito não é vinculado a um prejuízo na função motora. Além disso, é proposto que o CBD apresenta propriedades semelhantes aos antipsicóticos atípicos (MOREIRA; GUIMARÃES, 2005). Apesar da RISP ser um antipsicótico atípico, não observamos nenhum efeito promovido pela mesma sobre o perfil motor no modelo em questão. Entretanto, podemos sugerir que o efeito aqui demonstrado pelo CBD possa estar atrelado à sua capacidade de atuar em uma ampla gama de alvos/mecanismos de ação, modulando, de forma simultânea ou não, diferentes sistemas potencialmente envolvidos nesse comportamento (PEDRAZZI et al., 2022). De fato, estudos

clínicos, tanto observacional (BARCHEL et al., 2019), quanto randomizado, duplo-cego e controlado por placebo (SILVA JUNIOR et al., 2022), têm reportado significativa melhora no quadro sintomático de pacientes com TEA tratados com óleo de CBD ou extrato de *Cannabis* enriquecido com CBD, inclusive em parâmetros relativos a agitação/hiperatividade motora.

Voltando a atenção para o perfil de agressividade/impulsividade aqui analisado, observamos que, apenas a menor concentração de CBD (0,06 μ M), assim como o controle positivo RISP, foi capaz de reduzir, de forma sustentada, o comportamento tipo-agressivo reportado em nosso modelo TEA, sem promover alterações em condições basais. Novamente, não há na literatura, até o momento, relatos de investigações pré-clínicas conduzidas com o CBD em modelos TEA. Todavia, estudos conduzidos por Hartmann e colaboradores (2019) e Andaloussi e colaboradores (2021) corroboram com nossos resultados demonstrando que, a administração de CBD promoveu a redução do perfil de agressividade em modelos roedores de isolamento social e adicção, respectivamente, aumentando a latência de ataque e reduzindo a duração das investidas (ANDALOUSSI et al., 2021; HARTMANN et al., 2019). Apesar do comportamento agressivo ser um parâmetro ainda pouco explorado em trabalhos avaliando os efeitos do CBD, ensaios clínicos relatam significativa melhora nos padrões agressivos de pacientes no espectro após o tratamento com produtos à base de *Cannabis* enriquecida com CBD (BARCHEL et al., 2019; MOSTAFAVI; GAITANIS, 2020; SILVA JUNIOR et al., 2022).

Conforme abordado anteriormente, há uma estreita relação entre os comportamentos agressivo e social no zebrafish (OLIVEIRA; SILVA; SIMÕES, 2011; PHAM et al., 2012). Sabendo disso, mesmo frente a ausência de efeitos do CBD em nosso teste de interação social para avaliação do domínio de preferência do animal em permanecer próximo ao seu coespecífico, observamos pelo teste de ataque ao espelho que, o tratamento com 0,06 μ M de CBD reduziu o comportamento de impulsividade em nosso modelo TEA. Em concordância com nossos achados, estudos realizados por Kaplan e colaboradores (2017) e por Osborne e colaboradores (2017) utilizando modelos roedores de epilepsia e esquizofrenia, respectivamente, demonstraram que baixas doses de CBD reduziram déficits sociais “TEA-like”, diminuindo o retraimento social nesses animais sem promover alterações nos grupos controle (KAPLAN et al., 2017; OSBORNE et al., 2017). Sabendo que o prejuízo na função social se classifica como um dos mais importantes sintomas inerentes ao TEA, sendo, portanto, um dos critérios fundamentais de diagnóstico, evidências pré-clínicas destacando a ação benéfica do CBD sobre o perfil de sociabilização se mostram de grande valor. Ademais, diferentes abordagens de investigação clínica reportam esses efeitos pró-sociais do CBD em

indivíduos com TEA em diferentes idades (BILGE; EKICI, 2021; KUESTER et al., 2017; SILVA JUNIOR et al., 2022).

Embora existam inúmeros estudos sugerindo potenciais mecanismos de ação pelos quais atuaria o CBD nas mais diversas condições fisiológicas e patológicas, nenhum estudo pré-clínico investigou a farmacodinâmica desse fitocanabinoide associada a seus muitos efeitos benéficos observados na área clínica de estudo do TEA. Sabendo disso, e tomando por base os possíveis alvos de ação do CBD na vasta e complexa fisiopatologia do autismo, iniciamos nossa investigação avaliando o *status* do sistema antioxidante em nosso modelo zebrafish, adotando a menor concentração eficaz de CBD identificada nos ensaios comportamentais (0,06 μ M). Curiosamente, um dos primeiros resultados identificados refere-se ao aumento no nível de proteínas totais observado apenas em animais expostos ao AVP durante o período embrionário e que não receberam nenhum dos tratamentos (dado não demonstrado). Decerto, nosso achado pode ser explicado pelos próprios mecanismos secundários atribuídos ao AVP. Mais do que seus mecanismos clássicos relacionados a sua ação anticonvulsivante, o AVP é um importante fator epigenético por atuar como inibidor da enzima histona desacetilase (HDAC), sendo inclusive, um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do TEA. Além disso, possui efeito modulador sobre diferentes vias de sinalização apoptótica intracelular (BHANDARI; PALIWAL; KUHAD, 2020; BIELECKA; OBUCHOWICZ, 2008; RANGER; ELLENBROEK, 2016) Sua ação inibitória sobre a HDAC pode levar à hiperacetilação de histonas, alterando a estrutura da cromatina, o que por sua vez, modifica a transcrição de muitos genes (sem promover mutações na sequência de DNA), sendo importante ressaltar que, essa alteração se dá de forma heterogênea, a depender-se da estrutura, região da estrutura e do tipo celular afetado. (RANGER; ELLENBROEK, 2016). A respeito de sua modulação sobre vias apoptóticas, é descrito que o AVP, atuando em diferentes cascatas de sinalização, seja capaz de bloquear moléculas pró-apoptóticas e favorecer vias de sobrevivência (BIELECKA; OBUCHOWICZ, 2008). Nesse sentido, podemos sugerir que, as alterações epigenéticas e modulatórias exercidas pelo AVP, durante o desenvolvimento embrionário do zebrafish, modificou a transcrição gênica, aumentando a expressão de diferentes genes e a taxa de sobrevivência celular, culminando assim em uma elevação na concentração de diferentes proteínas em nosso modelo, efeito esse revertido pelos tratamentos com RISP e CBD.

Muitos trabalhos descrevem a potencial participação do sistema antioxidante na fisiopatologia do TEA, sendo relatado um desequilíbrio nos biomarcadores de estresse oxidativo em diferentes modelos TEA-AVP (AL-AMIN et al., 2015; MANIVASAGAM et al., 2020; MATSUO; YABUKI; FUKUNAGA, 2020; MORAKOTSRIWAN et al., 2016) e

também em estudos clínicos conduzidos em pacientes no espectro (mais detalhes na revisão BJØRKLUND et al., 2020). De fato, o estresse oxidativo atua sobre uma série de processos, tais como (i) na lipoperoxidação; (ii) na oxidação de moléculas de DNA e proteínas; (iii) em processos inflamatórios e resposta imune ineficaz ou exacerbada; (iv) na desregulação epigenética; entre outros (FATEMI et al., 2012). Um aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador direto de peroxidação lipídica, além da perda de simetria de lipoproteínas de membrana, já foram identificados no TEA. Ainda, comprometimento no metabolismo da glutathione também foi relatado em diferentes regiões encefálicas de indivíduos TEA, sendo reportado uma redução nos níveis de glutathione reduzida e o aumento nos níveis de glutathione oxidada no córtex temporal e cerebelo desses pacientes (ROSE et al., 2012). Com relação a enzima catalase, os achados mostram uma diminuição da atividade dessa enzima em eritrócitos, sem, no entanto, alteração evidente no plasma total (ZOROGLU et al., 2004).

Atrelado a tais achados, trabalhos clínicos e pré-clínicos avaliando a intervenção terapêutica sobre diferentes marcadores envolvidos no estresse oxidativo, reforçam a participação desses processos na fisiopatologia do TEA (MANIVASAGAM et al., 2020). A administração de compostos com propriedades antioxidantes parece, de fato, atenuar tais alterações bioquímicas, bem como alterações comportamentais inerentes ao autismo (AL-AYADHI; ELAMIN, 2013; BENT et al., 2018; MOUSAVINEJAD et al., 2018; NIKOO et al., 2015; SADEK et al., 2018), inclusive em modelos animais por exposição pré-natal ao AVP (GAO et al., 2016; HAMZAWY et al., 2018; KHALAJ; HAJIZADEH MOGHADDAM; ZARE, 2018; SANDHYA; SOWJANYA; VEERESH, 2012; ZHANG et al., 2015, 2017).

Nesse sentido, verificamos a atividade de duas importantes enzimas envolvidas no controle da resposta antioxidante: a GST e a CAT. Contrário ao esperado, nenhuma diferença na atividade das enzimas foi identificada em nosso modelo frente à exposição ao AVP ou aos tratamentos com RISP e CBD. Uma possível justificativa para tais achados pode estar atrelada ao desenho experimental adotado em nosso estudo, uma vez que, a maioria dos trabalhos utilizando o modelo zebrafish descritos na literatura dispõem de análises durante os primeiros dias de vida do animal (4 a 72 hpf) (TIERBACH et al., 2018; TIMME-LARAGY et al., 2013; WANG et al., 2020). Ademais, as amostras aqui utilizadas correspondem a *pools* de larvas íntegras, contendo diferentes sistemas e estruturas, as quais podem estar compensando um possível desequilíbrio no perfil oxidativo do SNC desses animais. Dessa forma, mais estudos investigando a variabilidade da atividade enzimática no SNC de larvas de zebrafish, em idades

mais tardias, são necessários para uma melhor compreensão do envolvimento do sistema antioxidante no modelo TEA por exposição ao AVP.

Em seguida, verificamos o perfil de peroxidação lipídica, um dos processos mais importantes do estresse oxidativo, o qual resulta na oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, tais como aqueles que compõem as membranas celulares, prejudicando o correto funcionamento destas. Esses produtos gerados pelo processo de lipoperoxidação apresentam ligações químicas altamente instáveis e, portanto, muito reativas, caracterizando-se como moléculas eletrofílicas que podem facilmente formar adutos com componentes celulares de caráter nucleofílico, inclusive com o DNA. De uma forma geral, essas reações podem culminar em uma cascata de eventos intracelulares, causando distúrbios na sinalização, disfunção e até mesmo a morte celular (GASCHLER; STOCKWELL, 2017; NAM, 2011). Em relação a esse processo oxidativo, novamente, nossos resultados foram contrários ao descrito na literatura, uma vez que, Banji e colaboradores (2011) demonstraram que, a administração de AVP durante o período gestacional de camundongos prenhes promoveu o aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), um produto resultante da lipoperoxidação (BANJI et al., 2011). De fato, elevações em diferentes biomarcadores de peroxidação lipídica são relatados em pacientes TEA (BJØRKLUND et al., 2020). Possivelmente, a idade larval e o tipo de amostra (larvas inteiras) tenham sido, mais uma vez, variáveis importantes na quantificação desse analito. Todavia, é válido ressaltar que o tratamento com 0,06 μ M de CBD, mas não com RISP, reduziu os níveis de TBARS tanto nos animais expostos, quanto naqueles não expostos ao AVP durante o período embrionário, sugerindo um efeito *per se* do CBD sobre o perfil de lipoperoxidação. Apesar de, até então, não ter sido explorado em modelos TEA, esse efeito antioxidante do CBD sobre o perfil lipídico mostra-se bem descrito e investigado na literatura, sendo um dos mais notáveis efeitos desse fitocanabinoide (ATALAY; JAROCKA-KARPOWICZ; SKRZYDLEWSKA, 2019). Sun e colaboradores (2017) e Wang e colaboradores (2017) relataram que, a suplementação de CBD foi capaz de reduzir o processo de peroxidação lipídica em culturas de neurônios hipocâmpais de camundongos submetidas à privação de oxigênio e glicose, e em modelo roedor de esteatose induzida por consumo crônico de álcool, respectivamente (SUN et al., 2017; WANG et al., 2017b). Em um contexto geral, o crescente número de publicações evidenciando os efeitos diretos (alvos enzimáticos e não enzimáticos) e indiretos (aumento nos níveis de AEA) do CBD sobre o sistema de defesa antioxidante, reforçam seu potencial como abordagem terapêutica no tratamento de diferentes condições e patologias, podendo-se estender futuramente ao TEA.

O tratamento farmacológico de muitas patologias e condições pode definir-se pelo seu perfil de cronicidade, sendo comum nessas situações a administração de fármacos por um longo período de tempo ou até mesmo, durante toda a vida de um indivíduo. Esse regime terapêutico configura uma maior probabilidade no desenvolvimento de efeitos adversos relacionados ao uso do(s) medicamento(s), diminuindo assim a taxa de adesão e, conseqüentemente, a qualidade de vida e bem-estar dos pacientes (TURNER, 2020). Nesse sentido, buscamos avaliar possíveis impactos de um tratamento prolongado com RISP e CBD sobre parâmetros morfológicos em nosso modelo TEA-zebrafish. De forma interessante, observamos que o tratamento de 2 a 7 dpf com RISP, mas não com CBD, foi capaz de prejudicar o funcionamento da bexiga natatória das larvas de zebrafish, independentemente da exposição embrionária ao AVP, aumentando a área dessa estrutura, refletindo uma possível desregulação no controle do processo de inflar e desinflar da bexiga natatória, atividade responsável pela entrada e saída de gases. A bexiga natatória de peixes fisóstomos, tais como o zebrafish, conecta-se ao intestino por meio de um ducto pneumático, anatomia a qual favorece a troca direta de gases com o meio ambiente através do esôfago (SMITH; CROLL, 2011). Evidências na literatura indicam que o mecanismo associado ao desinflar da bexiga natatória em teleósteos envolve a participação do sistema autônomo presente na estrutura, sendo descrito que, a estimulação de receptores β -adrenérgicos existentes no ducto pneumático promove uma resposta de relaxamento nessa região, enquanto a estimulação de receptores α -adrenérgicos gera a contração da parede da bexiga natatória. Juntas, essas ações, presumivelmente, culminariam com a expulsão do gás contido na bexiga natatória (SMITH; CROLL, 2011).

Nesse contexto, sabe-se que a RISP executa alguns de seus efeitos adversos mediante sua afinidade e ação antagonista inespecífica sobre receptores adrenérgicos, uma característica comum entre os antipsicóticos (GARDNER, 2005). Assim, podemos sugerir que, mediante tratamento prolongado, a ação da RISP sobre esses receptores adrenérgicos, principalmente aqueles α -adrenérgicos existentes na bexiga natatória, estaria bloqueando a ação fisiológica da norepinefrina no tecido, reduzindo ou até mesmo anulando a resposta de contração na musculatura, levando ao acúmulo de gases e conseqüente aumento na área da bexiga natatória desses animais. Aqui é importante ressaltar que, esse efeito não foi observado ao longo do tratamento a curto prazo com RISP em nosso modelo, provavelmente, devido ao período de contato estipulado (2 a 4 dpf), o qual corresponde a janela de pré-inflagem da bexiga natatória no zebrafish, em que a estrutura ainda está em desenvolvimento e a inervação autonômica na região pode não estar completamente formada e organizada (LINDSEY; SMITH; CROLL, 2010; ROBERTSON et al., 2007).

Essa desregulação no controle da bexiga natatória, por sua vez, gera um comportamento de risco involuntário no modelo animal, posto que, essa estrutura regula o perfil de movimentação do zebrafish na coluna de água, ou seja, a inibição do desinflar força o animal a permanecer mais tempo na superfície da água e, portanto, mais exposto ao ataque de predadores (VILLENEUVE et al., 2014). Apesar da bexiga natatória não apresentar funções respiratórias no zebrafish, trata-se de um estrutura que possui semelhanças ontogênicas, moleculares e estruturais com o pulmão de mamíferos (FINNEY et al., 2006; WINATA et al., 2009; ZHENG et al., 2011). À vista disso, além do aumento no comportamento de risco, essa alteração morfológica identificada pode refletir, de forma translacional, um possível efeito adverso respiratório relacionado ao uso crônico da RISP. De fato, diferentes estudos clínicos evidenciam esse potencial tóxico da RISP, demonstrando uma estreita relação existente entre o uso de antipsicóticos atípicos, como a RISP, e o desenvolvimento ou agravamento de patologias associadas ao sistema respiratório, tais como, pneumonia, depressão respiratória tardia, tromboembolismo pulmonar, e falha aguda respiratória (AKYOL et al., 2005; BORRAS et al., 2008; NOSE et al., 2015; WANG et al., 2017a). A ausência desse efeito tóxico sobre a bexiga natatória do zebrafish frente ao tratamento com CBD de 2 a 7 dpf reforça, novamente, sua validade como uma alternativa farmacológica eficaz e segura no tratamento do TEA, mesmo diante de um esquema terapêutico prolongado.

Conforme previamente apresentado no presente trabalho, diferentes achados reiteram a participação do SEC na fisiopatologia do TEA. Ademais, sabe-se que a sinalização endocanabinoide apresenta atividade modulatória sobre a liberação de diferentes neurotransmissores, tais como a dopamina (DA) e a serotonina (5-HT) (ABDULAMIR; ABDUL-RASHEED; ABDULGHANI, 2018; CHEVALLIER et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2019; DICARLO et al., 2019; DICHTER; DAMIANO; ALLEN, 2012; LEWIS et al., 2007; SINISCALCO, 2014; YANG; TAN; DU, 2014).

O desequilíbrio da DA, um neurotransmissor relacionado ao controle motor, cognição social e comportamental através de sua ação por meio de diferentes vias, parece apresentar estreita relação com o TEA (DICHTER; DAMIANO; ALLEN, 2012; TIDEY; MICZEK, 1996). A DA é, de fato, um dos primeiros neurotransmissores expressos no SNC, já sendo identificado a partir da 6-8^a semana gestacional, antes mesmo da sinaptogênese e da ativação dos receptores dopaminérgicos (MONEY; STANWOOD, 2013). Alterações na via mesocorticolímbica de sinalização dopaminérgica foram identificadas em pacientes autistas, sendo relatado uma redução na liberação de DA nas regiões do córtex pré-frontal (CPF) e núcleo *accumbens* (NAcc) (CHEVALLIER et al., 2012; ERNST et al., 1997). Além disso,

Pavál (2017) sugeriu as hipóteses de que, os déficits sociais presentes no TEA eram resultantes de uma disfunção da circuitaria dopaminérgica mesocorticolímbica, enquanto as estereotipias motoras eram causadas por alterações na via nigroestriatal (PAVÁL, 2017). Estudos pré-clínicos, de fato, conseguiram mimetizar comportamentos estereotipados mediante indução de uma disfunção dopaminérgica na via nigroestriatal (LEWIS et al., 2007), sendo esse padrão comportamental revertido com a administração de antagonistas do receptor dopaminérgico D1 (PRESTI; MIKES; LEWIS, 2003). Outro estudo que também reforça a hipótese dopaminérgica do TEA demonstrou que, uma estimulação optogenética de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (ATV) promoveu a ativação de receptores D1, o que por sua vez, levou a um aumento no comportamento de interação social. Em contrapartida, a inibição dessa mesma região apresentou efeito oposto sobre o padrão de socialização (GUNAYDIN et al., 2014).

Outro neurotransmissor que também já mostrou possível envolvimento na etiologia do TEA foi a 5-HT (YANG; TAN; DU, 2014). A 5-HT é uma monoamina que, além de atuar sobre as funções de memória, aprendizado, sono e humor (JENKINS et al., 2016; ROSE' MEYER, 2013), também participa da modulação de diferentes processos no desenvolvimento, tais como divisão e proliferação celular cortical, migração e diferenciação, plasticidade neuronal e na sinaptogênese (CELADA; PUIG; ARTIGAS, 2013; GASPAR; CASES; MAROTEAUX, 2003). Já foi relatado inclusive que, durante a fase inicial da gestação, a 5-HT é suprida pela placenta. Ademais, no segundo trimestre gestacional humano, neurônios serotonérgicos formam o primeiro sistema de neurotransmissão a se projetar para o prosencéfalo (SAAD et al., 2022). Estudos mostram que, os níveis de 5-HT ou de seus transportadores (SERT/5-HTT) encontram-se aumentados, tanto em crianças no espectro quanto em modelos TEA. Ainda, achados *post-mortem* revelaram redução na ligação desse neurotransmissor com os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{1A} no encéfalo de pacientes TEA (ABDULAMIR; ABDUL-RASHEED; ABDULGHANI, 2018; MULLER; ANACKER; VEENSTRA-VANDERWEELE, 2016; SIEMANN et al., 2017).

De uma forma geral, os diferentes neurotransmissores/neuromoduladores desempenham atividade essencial ao longo do desenvolvimento do SNC, influenciando os processos de proliferação, diferenciação, migração, *pruning* sináptico e sinaptogênese. Assim, pode-se inferir que, qualquer distúrbio nesses sistemas durante o neurodesenvolvimento pode acarretar disfunções significativas no SNC, sendo inclusive um fator de risco para o TEA (QUAAK; BROUNS; VAN DE BOR, 2013). Atrelado a essas informações, é conhecido o fato de que o CBD apresenta amplo repertório terapêutico frente sua ação sobre os mais diversos sistemas fisiológicos (CAMPOS et al., 2016; SCARANTE et al., 2021; SILVESTRO et al., 2020).

Sabendo disso, avaliamos se, em nosso modelo TEA, os efeitos comportamentais observados frente à exposição ao AVP e ao tratamento com CBD poderia estar associado aos níveis de DA, 5-HT, AEA e 2-AG. Apesar das tendências à alteração mediante exposição embrionária ao AVP, não observamos modificações significativas nos níveis desses neurotransmissores/neuromoduladores em nosso modelo. Aqui, novamente, uma possível justificativa pode estar vinculada a metodologia aplicada em nosso estudo, uma vez que, utilizamos amostras provenientes de *pools* de larvas íntegras, ou seja, o potencial desequilíbrio desses neurotransmissores ao nível do SNC pode estar sendo camuflado mediante quantificação total no organismo desses animais. Alguns estudos demonstram, por exemplo, alterações neuroquímicas de maneira região-dependente no encéfalo de modelos animais TEA, ou seja, seria necessária uma avaliação mais cautelosa do SNC isolado, ou até mesmo uma análise região-específica desses encéfalos para conseguirmos observar, de forma mais eficaz, tais modificações na quantificação desses neurotransmissores (LEWIS et al., 2007).

Ainda com relação aos possíveis componentes potencialmente envolvidos nas respostas comportamentais exibidas mediante exposição embrionária ao AVP e após tratamento com CBD em nosso modelo TEA, buscamos investigar padrões de imunomarcagem para diferentes populações neurais.

O desenvolvimento neuronal inicial envolve a divisão de CPNs, as quais darão origem a neurônios jovens. Esses novos neurônios, por sua vez, migram radialmente em direção à superfície pial, organizando-se em camadas. Após a diferenciação, estes neurônios perdem a capacidade de proliferar, portanto, a densidade neuronal depende intimamente da atividade proliferativa das CPNs durante o neurodesenvolvimento, ou seja, uma proliferação em excesso pode resultar em um aumento encefálico, sendo esta uma alteração relacionada como fator neuropatológico associado ao TEA (COURCHESNE et al., 2007, 2019; GO et al., 2012) e que apresenta estreita relação ao controle exercido pelo SEC durante a formação do SNC.

Supõem-se que o supercrescimento encefálico pode ser advindo de uma desregulação da neurogênese pré-natal e o posterior processo de refinamento sináptico (COURCHESNE et al., 2001, 2007). Essa suposição resultou na descoberta de achados corroborativos, uma vez que, grande parte dos casos TEA parece realmente envolver o excessivo crescimento encefálico (CHAWARSKA, 2011; COURCHESNE et al., 2001, 2007, 2019; COURCHESNE; CARPER; AKSHOOMOFF, 2003; HAZLETT et al., 2011; SPARKS et al., 2002). Trabalho de metanálise conduzido por Sacco e colaboradores (2015) demonstrou significativo aumento global do encéfalo e do perímetro cefálico em pacientes com TEA em todas as idades; sendo, no entanto, uma alteração mais proeminente em idades mais precoces (SACCO; GABRIELE; PERSICO,

2015). Além disso, estudo realizado em crianças diagnosticadas com TEA demonstrou alterações na expressão de genes que comandam a regulação do ciclo celular, alterando por consequência, o número de neurônios, a integridade do DNA, os processos de diferenciação celular e o padrão organizacional do córtex pré-frontal. Nesse sentido, uma produção exacerbada de neurônios, atrelada ao desequilíbrio no refinamento dos circuitos neurais (*pruning* ou poda sináptica), pode culminar no aumento de conexões sinápticas aberrantes, as quais, por ventura, podem resultar em funções atípicas no cérebro (CHOW et al., 2012).

Com relação ao perfil de proliferação celular, avaliamos o padrão de marcação com pHH3 e PCNA. A identificação de populações proliferativas celulares pode ser realizada por meio da quantificação de diferentes marcadores-alvo de acordo com o objetivo almejado, dentre os quais destacam-se as proteínas de ciclo celular (tais como o PCNA) e os rastreadores de atividades relacionadas ao ciclo celular (como a pHH3). Existem diferenças as quais devem ser levadas em consideração na escolha desses marcadores, tendo em vista as diferentes fases que compõem o ciclo proliferativo celular. A pHH3 caracteriza-se por sua capacidade em marcar células apenas durante a fase M (mitose) do ciclo, refletindo assim um *status* proliferativo restrito. Já o PCNA corresponde a uma proteína expressa durante todas as fases do ciclo celular, sendo inclusive essencial nos processos de síntese e reparo do DNA (BARTON; LEVINE, 2008; PRIGENT; DIMITROV, 2003). Dessa forma, uma investigação utilizando dessas duas estratégias de marcação retornou dados mais completos acerca do perfil proliferativo em nosso modelo. Conforme observamos em nossos resultados, apenas RISP e CBD nas concentrações padronizadas reduziram a marcação por pHH3 no encéfalo das larvas, independentemente da exposição prévia ao AVP, refletindo um possível efeito associado apenas aos tratamentos. Entretanto, a marcação por PCNA foi modificada tanto pela exposição prévia ao AVP (aumento na porcentagem de fluorescência no encéfalo de animais expostos ao AVP embrionário e não tratados), quanto pelos tratamentos com RISP ou CBD (redução e aumento, respectivamente, na porcentagem de fluorescência no encéfalo de animais expostos ao AVP embrionário e tratados com RISP ou CBD).

De maneira geral, nossos resultados encontram-se em consonância com a literatura levando em consideração que, muitos modelos animais TEA apresentam aumento nas taxas de proliferação celular no SNC, incluindo aqueles por exposição embrionária ao AVP (CHEN et al., 2018; GO et al., 2012; ROULLET; LAI; FOSTER, 2013). No que concerne à interpretação paralela dos dados de marcação com pHH3 e PCNA para os tratamentos avaliados, podemos inferir que o CBD possa estar atuando por meio de mecanismos complementares sobre o *status* proliferativo. Apesar de observarmos um aumento significativo na proliferação celular

encefálica em um contexto geral, refletido pelo aumento na marcação por PCNA em animais expostos ao AVP e tratados com CBD, também observamos que o CBD, na presença ou ausência de uma exposição prévia ao AVP, reduz o número de células que se encontram na fase M do ciclo celular (marcação por pHH3). Ou seja, possivelmente o fitocanabinoide possa estar tentando reverter o aumento na taxa de proliferação celular encefálica total (PCNA) induzido pela exposição embrionária ao AVP, por meio de algum mecanismo capaz de “aprisionar” a célula em um estado não-mitótico dentro do ciclo celular, ou seja, interrompendo ou prolongando o processo de divisão enquanto na fase que antecede ou precede a mitose celular (fases G2 ou G1). Resumidamente, o número de células proliferativas está aumentado, no entanto elas não estão necessariamente em divisão. Por certo, esse efeito proliferativo sobre o SNC mediado pelo CBD já foi identificado e relatado em nosso grupo. Campos e colaboradores (2013) demonstraram que, em células progenitoras hipocampais, o tratamento com CBD promove aumento na proliferação celular, destacando a participação de receptores canabinoides nessa resposta (CAMPOS et al., 2013). Levando em consideração o potencial envolvimento do SEC na resposta proliferativa exibida em nosso modelo, torna-se válido lembrar que, a sinalização canabinoide apresenta funções regulatórias sobre uma ampla gama de processos celulares (proliferação, diferenciação e sobrevivência), modulação esta capaz de gerar resultados diversos a depender dos alvos moleculares, bem como do contexto celular no qual está inserido (GALVE-ROPERH et al., 2013). Nesse sentido, estudos com CBD em diferentes linhagens celulares também já demonstraram um perfil antiproliferativo mediado por diferentes mecanismos, incluindo o bloqueio na progressão do ciclo celular, em condições de proliferação celular exacerbada, tais como câncer (DENG et al., 2017; PELLATI et al., 2018). Juntos, esses achados sustentam nossa teoria de um provável balanço complementar entre mecanismos proliferativos e antiproliferativos mediados pelo CBD em nosso modelo TEA.

Ainda com relação ao *status* proliferativo aqui avaliado, de forma oposta, animais expostos ao AVP e tratados com RISP apresentaram redução substancial no perfil proliferativo pela marcação com PCNA. Uma das possíveis interpretações para esse resultado talvez esteja associada à capacidade da RISP em remover estas células do ciclo proliferativo, inserindo-as em um estado pós-mitótico para diferenciação. De fato, diferentes estudos desenvolvidos em modelos de distúrbios neuropsiquiátricos já demonstraram que fármacos pertencentes a classe de antipsicóticos (inclusive a RISP), assim como antiepilépticos (inclusive o AVP) conseguem modular respostas proliferativas e de maturação de diferentes populações neurais, sendo que o contexto celular no qual o tratamento encontra-se inserido desempenha grande influência sobre

essas respostas (GO et al., 2012; KASHEM et al., 2009; KEILHOFF; FUSAR-POLI; BECKER, 2012; WAKADE et al., 2002).

No que tange a avaliação da apoptose celular, processo que, assim como a atividade proliferativa, também encontra-se em desequilíbrio no TEA (CHOW et al., 2012; PIROZZI; NELSON; MIRZAA, 2018), não encontramos alterações significativas em nosso modelo, resultado que vai de encontro àqueles dispostos na literatura (GAO et al., 2016; GO et al., 2011; WANG et al., 2018). Sucintamente, a exposição embrionária ao AVP não promoveu alterações no padrão de marcação para Caspase-3, endoprotease importante na manutenção da homeostase pela regulação da apoptose. No entanto, pode-se inferir que, frente ao aumento da população proliferativa (PCNA) somada a manutenção de um *pool* celular mitótico nesses animais, a inexistência de um equilíbrio proporcional no processo de apoptose pode representar um risco em potencial para o desenvolvimento inadequado do SNC. Além disso, observamos que, animais expostos ao AVP e tratados com RISP, mas não com CBD, exibiram redução na quantificação de caspase-3 no encéfalo. Aqui, novamente em paralelo aos achados relativos à proliferação celular, a redução observada para caspase-3 possa ser oriunda de uma resposta compensatória/protetora, mediada por um possível efeito combinatório entre AVP e RISP, sobre a viabilidade celular diminuída em populações proliferativas nesses animais tratados. Nesse sentido, trabalho conduzido por Go e colaboradores (2011) e por Bai e colaboradores (2004), demonstraram, respectivamente, que, a exposição embrionária ao AVP, assim como a administração de antipsicóticos, promoveu aumento na expressão de RNA mensageiro e nos níveis da proteína Bcl-2 (proteína anti-apoptótica envolvida na cascata reacional de ativação da caspase-3), refletindo possíveis efeitos neuroprotetores exercidos por esses compostos em diferentes regiões encefálicas, uma vez que o aumento dessa proteína diminui a liberação de citocromo *c* mitocondrial, reduzindo a ativação de caspase-3 (BAI; ZHANG; LI, 2004; GO et al., 2011; YUAN; YANKNER, 2000), evidências que corroboram com nosso resultado.

Outra população neural que se mostrou alterada em nosso modelo TEA-AVP foi a população astrocitária, aqui investigada pelo padrão de marcação com GFAP. Apesar de ser considerado um bom marcador para avaliação de astrócitos, sabe-se que populações de glia radial e de CPNs também expressam essa proteína (JURGA et al., 2021). No entanto, em um âmbito funcional, chama a atenção o fato de que, no modelo zebrafish, a glia radial parece desempenhar atividades semelhantes às executadas pelos astrócitos. Essa conclusão deve-se ao fato de que, no SNC desse teleósteo, células GFAP-positivas apresentam, predominantemente, uma morfologia radial, revelando longos processos organizados sem corpo celular proeminente no telencéfalo do zebrafish, um padrão de marcação típico de glia radial (GRUPP; WOLBURG;

MACK, 2010). No zebrafish, células GFAP-positivas também podem ser denominadas astroglia radial (CUOGHI; MOLA, 2009). Estudos recentes demonstraram que, apesar da diversidade molecular, subconjuntos de células marcadas por GFAP compartilham assinaturas transcriptômicas equivalentes às observadas em astrócitos de mamíferos. Esses achados no zebrafish evidenciaram, portanto, a possibilidade de que ambas glia radial ou astroglia radial positivas para GFAP possam executar funções atribuídas aos astrócitos típicos de mamíferos (NAGAI et al., 2021). Além disso, é válido ressaltar que, estudo pioneiro descreveu um *cluster* de células positivas para GFAP presentes na medula oblonga do zebrafish, sendo estas células denominadas “astrócitos radiais” apresentando longos prolongamentos com ramificações direcionadas a extremidades mais distais e executando atividades modulatórias sobre neurônios (MU et al., 2019).

Alterações morfológicas e no perfil de atividade de astrócitos evidenciadas em diferentes modelos de estudo do TEA configuram-se como importantes fatores envolvidos na fisiopatologia desta condição (BLANCO-SUÁREZ; CALDWELL; ALLEN, 2017; EDMONSON; ZIATS; RENNERT, 2014; FATEMI et al., 2008; HAMED et al., 2018; RUSSO et al., 2018). Modelos por exposição embrionária ao AVP conseguem, inclusive, mimetizar tais alterações observadas na clínica (SORIA-ORTIZ et al., 2021; ZAMBERLETTI et al., 2019).

Já foram relatados elevados níveis plasmáticos da enzima glutamina sintetase; alteração nos níveis de proteínas astrocíticas que regulam a comunicação astrócito-neurônio e a integridade da barreira hematoencefálica, tais como a conexina 43 e aquaporina-4 em diferentes regiões encefálicas; além de uma elevada reatividade e proliferação astrogliar exacerbada no córtex pré-frontal e cerebelo em amostras *post-mortem* de pacientes com TEA (EDMONSON; ZIATS; RENNERT, 2014; FATEMI et al., 2008; HAMED et al., 2018).

De fato, os astrócitos são o principal tipo de célula glial no encéfalo, sendo uma classe altamente heterogênea de células neurais de origem neuroectodérmica. A motilidade e a cobertura sináptica dos astrócitos contribuem com o funcionamento neuronal adequado, regulando a estrutura dos espinhos dendríticos, a eficiência da transmissão, a plasticidade e a estabilidade sináptica (BERNARDINELLI et al., 2014). Podem ainda promover e contribuir com o *pruning* sináptico (ou poda sináptica) durante a fase do desenvolvimento embrionário e também no cérebro adulto (PEREZ-ALVAREZ et al., 2014). Além de suas muitas funções para a manutenção e suporte neuronal, os astrócitos também contribuem ativamente no desenvolvimento do SNC, regulando a sinaptogênese, crescimento axonal, processos de migração e proliferação neuronal, bem como a atividade sináptica (PEREA; NAVARRETE; ARAQUE, 2009), funções essas atribuídas à sua participação ativa na sinapse tripartite

(ARAQUE et al., 1999). Estudo conduzido em astrócitos e neurônios derivados de células pluripotentes obtidas de indivíduos diagnosticados com TEA reiteram a importância da integridade funcional astrocitária para o perfil neuronal, uma vez que astrócitos-TEA reduziram drasticamente a viabilidade neuronal, enquanto astrócitos-controle foram capazes de restaurar a atividade e morfologia de neurônios-TEA. (RUSSO et al., 2018). Ademais, a sinalização mediada por eCBs sobre receptores canabinoides também exerce importante função sobre a diferenciação de células astrogliais (AGUADO et al., 2006).

Sabendo disso e, levando em consideração as informações acerca das populações celulares *astrócito-like* relatadas anteriormente, podemos observar que, nossos resultados apresentaram-se contrários aos observados na literatura, tendo em vista que, a exposição embrionária ao AVP em nosso modelo induziu uma redução significativa no padrão de marcação por GFAP, refletindo uma possível diminuição na atividade “astrocitária” desses animais. Todavia, além do perfil inflamatório (astrogliose) induzido pela ação do AVP embrionário, muitas outras respostas podem estar associadas à exposição a esse anticonvulsivante, considerando que o mesmo exibe diferentes mecanismos de ação a depender do contexto e tipo celular envolvidos (RANGER; ELLENBROEK, 2016). Diante sua ação como inibidor da HDAC, trabalho conduzido por Perisic e colaboradores (2010), mostrou que, o AVP consegue executar funções modulatórias sobre a cromatina de astrócitos saudáveis, promovendo a transcrição de genes específicos (PERISIC et al., 2010). Seguindo essa linha, possivelmente em condições patológicas ou até mesmo em um ambiente amplamente ativo como o período do neurodesenvolvimento, essa modulação na expressão gênica astrogliar possa retornar desfechos diversos, tais como o observado em nosso trabalho.

Outro achado que interessantemente pode corroborar com nossos achados associa respostas comportamentais à população astrocitária. Astrócitos radiais da medula oblonga do zebrafish parecem desempenhar papel fundamental no comportamento associado a passividade como resposta adaptativa a uma falha. Mu e colaboradores (2019) explicam que essa resposta passiva do animal é causada por um desacoplamento motor somado a interação desses astrócitos radiais com neurônios noradrenérgicos e GABAérgicos. Inicialmente há uma ativação noradrenérgica como resposta a uma incompatibilidade entre a ação pretendida e a resposta obtida. Via receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, a norepinefrina liberada aumenta a sinalização por Ca^{2+} nesses astrócitos radiais presentes na região, o que por sua vez, ativa neurônios GABAérgicos no tronco encefálico, culminando com a resposta comportamental de passividade (MU et al., 2019). De fato, nossos resultados comportamentais e moleculares se alinham a esse possível mecanismo, uma vez que animais expostos ao AVP apresentaram redução na marcação para

GFAP e respostas de hiperatividade e agressividade sustentadas. Contudo, o tratamento com CBD em animais previamente expostos ao AVP embrionário foi capaz de restaurar a marcação com GFAP para valores iguais aos exibidos pelo nosso controle, resultado acompanhado pela melhora nos perfis comportamentais avaliados e que antes encontravam-se alterados. Dessa forma, sugere-se que o AVP possa estar promovendo uma redução na população ou na atividade astrocitária em nosso modelo, gerando um desequilíbrio na aquisição de respostas adaptativas funcionais vinculadas à interação astrócito-neurônio, sendo o CBD, mas não a RISP, capaz de atuar revertendo esse déficit molecular induzido, atenuando assim a hiperatividade e a agressividade observadas.

Por fim, mas não menos importante, avaliamos o padrão de marcação de duas proteínas ligantes de Ca^{2+} no encéfalo do zebrafish, a PV e a CaM. Definido como o cátion mais predominante no organismo humano, o Ca^{2+} possui grande importância na regulação de muitos e diferentes processos fisiológicos. O aumento na concentração desse íon no citoplasma celular representa uma etapa fundamental, por exemplo, na liberação de neurotransmissores e na modulação da excitabilidade de membranas celulares. Todavia, seu papel durante o neurodesenvolvimento merece destaque.

Ao longo do processo de formação e maturação do SNC, correntes rítmicas de Ca^{2+} provenientes das células em desenvolvimento funcionam como guias e reguladores de atividades. Durante a gastrulação inicia-se um processo denominado indução neural, em que células do ectoderma embrionário optam pelo destino neural e originam as CPNs. Essa tomada de decisão envolve sinais indutivos provenientes de células especializadas do mesoderma. Dentre esses sinais, evidências crescentes demonstram a participação efetiva do Ca^{2+} no controle da expressão gênica do neuroectoderma. Por certo, a ação combinada de uma grande variedade de proteínas de sinalização por Ca^{2+} participam da regulação espacial e temporal desse cátion ao longo do neurodesenvolvimento, dentre as quais incluem-se as proteínas ligantes de Ca^{2+} , controlando quais respostas celulares serão ativadas em cada momento (TOTH; SHUM; PRAKRIYA, 2016). Além disso, é válido ressaltar que o aumento do Ca^{2+} intracelular em CTNs embrionárias, assim como em neurônios imaturos, promove a produção de eCBs, os quais participam diretamente no processo de formação do SNC via sinalização endocanabinoide, conforme abordado anteriormente (MACCARRONE et al., 2014).

Embora apresentem substancialmente uma função regulatória, as proteínas ligantes de Ca^{2+} podem ser divididas em duas categorias: as proteínas gatilhos e as proteínas tamponantes. As proteínas gatilho atuam como um sistema ativo, no qual, após ligação com o Ca^{2+} , passam por uma modificação conformacional em suas estruturas, o que por sua vez, viabiliza a

modulação de outras moléculas efetoras, como enzimas e canais iônicos, dando início a cascatas reacionais diversas. Uma importante representante dessa classe é a CaM, uma proteína amplamente expressa no SNC (preferencialmente em neurônios), que ao se ligar ao Ca^{2+} pode interagir com quinases, formando complexos CaM/ Ca^{2+} /quinase, os quais apresentam a capacidade de fosforilar proteínas efetoras, ativando diferentes processos fisiológicos relacionados a sinalização intracelular, a síntese/liberação de neurotransmissores e a regulação do ciclo celular (SOLÀ; TUSELL; SERRATOSA, 1996). Em contrapartida, as proteínas tamponantes atuam via “sequestro” de Ca^{2+} quando este encontra-se em alta concentração intracelular, funcionando como um sistema passivo e, portanto, reduzindo a amplitude da sinalização de Ca^{2+} . Um exemplo valioso dessa classe de proteínas ligantes é a PV (BAIMBRIDGE; CELIO; ROGERS, 1992; CLAPHAM, 1995; HOF et al., 1999). Aqui é válido ressaltar que, um tipo de interneurônio GABAérgico expressa essa proteína citosólica PV. Interneurônios PV-positivos correspondem a aproximadamente 40% dos neurônios GABAérgicos e desempenham funções de extrema relevância, uma vez que controlam a excitabilidade de neurônios piramidais (BARTOS; VIDA; JONAS, 2007; HU; GAN; JONAS, 2014; RUDY et al., 2011).

A homeostase do Ca^{2+} mostra-se essencial para o correto funcionamento do organismo, uma vez que, seu desbalanço apresenta íntima relação com o desenvolvimento de alterações fisiopatológicas, inclusive durante o neurodesenvolvimento. De fato, alterações nos níveis de proteínas ligantes de Ca^{2+} foram correlacionadas ao TEA. Estudos em cérebros de pacientes com autismo, bem como em diferentes modelos animais TEA, (modelos genéticos ou por exposição ao AVP) demonstraram que a redução na expressão de PV parece contribuir com os fenótipos autísticos (HASHEMI et al., 2017; JUAREZ; MARTÍNEZ CERDEÑO, 2022; LAUBER; FILICE; SCHWALLER, 2016). Apesar de ainda não existirem dados demonstrando uma relação direta do envolvimento da CaM na fisiopatologia do TEA, trabalhos revelam alterações significativas em alvos modulados por essa proteína em diferentes modelos TEA. Mutações em sítios específicos de ligação da CaM em canais de sódio e em diferentes proteínas quinase dependentes de CaM promoveram uma redução na interação com CaM, modificando assim a atividade desses alvos sobre as mais diversas vias de sinalização, gerando alterações compatíveis com o TEA (HUANG; HSUEH, 2015; JIA et al., 2021; STEPHENSON et al., 2017).

Nesse sentido e, sabendo que a sinalização por Ca^{2+} participa efetivamente dos processos envolvidos no desenvolvimento encefálico, alterações em proteínas que regulam a

concentração desse cátion durante fases críticas do neurodesenvolvimento tornam-se fatores de risco significativos para o TEA.

Contrário ao descrito na literatura (HASHEMI et al., 2017; JUAREZ; MARTÍNEZ CERDEÑO, 2022; LAUBER; FILICE; SCHWALLER, 2016), não observamos alterações no padrão de marcação para PV em nosso modelo, nem pela exposição ao AVP e nem frente aos tratamentos com RISP ou CBD. Em contrapartida, no que se refere a proteína CaM, uma proteína atrelada à ativação de diferentes moléculas efetoras quando ligada ao Ca^{2+} , observamos que tanto o AVP, quanto os tratamentos avaliados, promoveram alterações em seu padrão de marcação encefálico. Demonstramos que, a exposição embrionária ao AVP aumenta a imunomarcação para CaM no encéfalo das larvas de zebrafish, enquanto o tratamento com RISP e CBD, na presença ou ausência de exposição ao AVP, reduz a intensidade dessa marcação. Vale destacar que o CBD foi capaz de diminuir CaM de forma mais pronunciada que a RISP, quando utilizado em animais previamente expostos ao AVP, apresentando ainda, quantificação menor que a encontrada em nosso controle.

Conforme descrito anteriormente, a CaM quando ligada ao Ca^{2+} interage com diferentes quinases, como por exemplo, as CaMKII, uma das mais importantes enzimas efetoras envolvidas na sinalização celular de Ca^{2+} . Quando ativada, a CaMKII fosforila alvos moleculares que participam da mobilização de vesículas sinápticas, da regulação da expressão gênica, entre muitas outras funções (ZALCMAN; FEDERMAN; ROMANO, 2018). Nesse sentido, estudo conduzido por Rinaldi e colaboradores (2007) demonstrou que, a exposição pré-natal ao AVP foi capaz de elevar a expressão de subunidades que compõem o receptor NMDA e também da enzima CaMKII, indicando que a administração de AVP durante o neurodesenvolvimento pode aumentar transmissões excitatórias mediadas pelo receptor NMDA (RINALDI et al., 2007). Além disso, já foi demonstrado que, a CaMKII participa da regulação positiva de *Tbr1* (fator transcricional expresso principalmente em neurônios glutamatérgicos de projeção do córtex cerebral), que por sua vez, induz a expressão de *Nmdar2b* (subunidade do receptor NMDA), sendo sugerido que, mutações nesses genes possam estar envolvidas na fisiopatologia do TEA (HUANG; HSUEH, 2015). Atrelado a isso, estudos conduzidos em modelos de epilepsia, demonstraram uma estreita e ativa relação entre a elevação nos níveis de CaM e a hiperexcitabilidade neuronal, uma vez que, após episódios convulsivos observa-se uma significativa elevação de CaM, a qual também está envolvida na indução da ativação de *c-Fos*, uma proteína classificada como proto-oncogene que pode funcionar como um marcador indireto de atividade neuronal, tendo em vista que é usualmente expressa quando os neurônios disparam potenciais de ação. Logo, uma regulação positiva para

esta proteína indica atividade recente. De fato, a utilização de um antagonista de CaM gera uma redução na marcação de células *c-Fos* positivas nesses modelos, refletindo uma melhora no quadro convulsivo (SOLÀ et al., 2001). Associando esses achados aos nossos resultados, podemos inferir que, o aumento na biodisponibilidade de CaM nesse sistema de sinalização por Ca^{2+} pode culminar com o aumento da ativação de neurônios de projeção glutamatérgicos.

Ademais, a ausência de alterações compensatórias em PV aqui demonstrada, pode resultar em um desequilíbrio entre as sinapses excitatórias/inibitórias em nosso modelo, considerando que interneurônios GABAérgicos PV-positivos modulam a atividade excitatória cortical de neurônios piramidais. Em conjunto, nossos dados vão ao encontro da literatura que descreve o desbalanço excitatório/inibitório como um mecanismo potencialmente envolvido na sintomatologia do TEA, sendo válido ressaltar ainda que, em um âmbito comportamental, já foi demonstrado que a hiperexcitabilidade neuronal possui correlação positiva com respostas de hiperatividade motora e agressão (TAKARAE; SWEENEY, 2017), assim como também foi observado em nosso trabalho.

Curiosamente, nosso dado relativo à proliferação celular também pode ser explicado, em parte, por essa excitabilidade neuronal, tendo em vista que, o aumento da atividade cortical favorece a divisão celular (MICHAUD et al., 2021).

Ainda com relação a marcação por CaM, também observamos que o tratamento com CBD, assim como com a RISP, em animais previamente expostos ao AVP foi capaz de reduzir esse parâmetro. Todavia, o tratamento com CBD retornou valores ainda menores do que aqueles observados para o grupo controle. Por certo, os efeitos modulatórios do CBD sobre a excitabilidade neuronal, principalmente em modelos de epilepsia, encontra-se bem descrita na literatura, sendo relatados diferentes alvos moleculares pelos quais esse fitocanabinoide poderia estar executando seus efeitos, destacando-se sua ação via TRPV1, GPR55 e transportador equilibrativo de nucleosídeos 1 (ENT-1) (GRAY; WHALLEY, 2020). Apesar de ainda não existirem relatos de uma possível ação do CBD sobre a biodisponibilidade de CaM, este mecanismo torna-se um valioso alvo em potencial que deve ser melhor investigado em nosso modelo, principalmente no que diz respeito ao seu efeito sobre a excitabilidade neuronal. Nesse contexto, nossos achados vão novamente ao encontro do disposto na literatura, sendo importante ressaltar que, a reversão do aumento da marcação por CaM induzido pela exposição ao AVP identificada após o tratamento com CBD (que pode refletir uma possível redução na excitabilidade neuronal cortical), também foi acompanhada de uma melhora no quadro comportamental observado em nosso modelo TEA-AVP (redução da hiperatividade motora e do comportamento tipo-agressivo).

Resumidamente, nosso trabalho demonstrou que a exposição embrionária ao AVP em um modelo de zebrafish produziu modificações significativas, culminando em alterações comportamentais que modelam aquelas observadas em pacientes diagnosticados com TEA (hiperlocomoção, aumento de agressividade e alteração no domínio de interação social, aqui refletido pelo comportamento de impulsividade). Além disso, nossos resultados sugerem, de uma forma geral que, o tratamento com CBD, reduz os efeitos comportamentais de maneira mais eficaz e segura quando comparado ao controle positivo (RISP).

Com relação aos dados obtidos por ensaios bioquímicos e imunomarcção, é válido ressaltar que os mesmos precisam ser interpretados com muita cautela devido as limitações inseridas pelas metodologias aqui aplicadas. Nossos resultados demonstrando alterações em componentes do sistema antioxidante (redução da peroxidação lipídica) e na quantificação de CaM, marcador de astrócitos (GFAP) e na proliferação celular (pHH3 e PCNA) precisam ser repetidos e melhor padronizados quanto à amostra (utilização de estruturas do SNC mais isoladas, e não a larva total) e também quanto aos procedimentos de aquisição de imagens mais representativas para os ensaios de imunofluorescência, melhorando parâmetros de resolução (*zoom* mais adequado, por exemplo) e estratificação (para obtenção de imagens com ou sem *z-stack* que viabilizem a melhor identificação das marcações específicas).

Apesar das limitações presentes em nosso estudo e, de mais estudos fazerem-se necessários, podemos sugerir que nossos resultados contribuem com o atual cenário de investigação do CBD como composto em potencial no tratamento do TEA, uma vez que nosso modelo zebrafish TEA-AVP reproduz comportamentos compatíveis com a condição e que, o tratamento com CBD retorna melhorias nessas alterações comportamentais, assim como observado na clínica. Nesse contexto, nosso trabalho parece ser, até então, pioneiro na obtenção de um modelo pré-clínico TEA com avaliação do perfil farmacoterapêutico do CBD, podendo ser utilizado como plataforma para elucidação de mecanismos atribuídos a esse fitocanabinoide as quais ainda permanecem especulativas.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O presente estudo pode configurar-se como contribuição no campo de investigação do potencial terapêutico do CBD no TEA, uma vez que:

- nosso modelo zebrafish TEA-AVP fornece requisitos para sua aplicação como modelo de estudo do TEA, tendo em vista sua capacidade de mimetizar alterações compatíveis com o amplo espectro fenotípico dessa condição;
- representa o primeiro modelo pré-clínico TEA descrevendo o potencial terapêutico do CBD em um modelo zebrafish, demonstrando efeitos benéficos desse fitocanabinoide sobre as alterações induzidas pela exposição embrionária ao AVP, mostrando-se, em alguns casos, superior à RISP, um dos tratamentos de primeira escolha aplicado em pacientes diagnosticados no espectro atualmente;
- pode representar uma ferramenta de *screening* e de investigação dos mecanismos potencialmente envolvidos na ação do CBD sobre as alterações inerentes ao TEA, contribuindo com uma melhor interpretação da farmacodinâmica envolvida nos efeitos positivos atribuídos a esse fitocanabinoide na clínica TEA.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDULAMIR, H. A.; ABDUL-RASHEED, O. F.; ABDULGHANI, E. A. Serotonin and serotonin transporter levels in autistic children. **Saudi Medical Journal**, v. 39, n. 5, p. 487–494, maio 2018.
- ABEL, E. L. **Marihuana: The First Twelve Thousand Years**. [s.l: s.n.].
- ADAMS, R.; HUNT, M.; CLARK, J. H. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, n. 1, p. 196–200, 1 jan. 1940.
- AGUADO, T. et al. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 12, p. 1704–1706, out. 2005.
- AGUADO, T. et al. The Endocannabinoid System Promotes Astroglial Differentiation by Acting on Neural Progenitor Cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 5, p. 1551–1561, 2006.
- AHMED, K. T. et al. Motor neuron development in zebrafish is altered by brief (5-hr) exposures to THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol) or CBD (cannabidiol) during gastrulation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10518, 12 dez. 2018.
- AKYOL, A. et al. Delayed Respiratory Depression After Risperidone Overdose. **Anesthesia & Analgesia**, v. 101, n. 5, p. 1490–1491, nov. 2005.
- AL-AMIN, M. M. et al. Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism. **Behavioural Brain Research**, v. 286, p. 112–121, jun. 2015.
- AL-AYADHI, L. Y.; ELAMIN, N. E. Camel Milk as a Potential Therapy as an Antioxidant in Autism Spectrum Disorder (ASD). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- ALOÍSIO TORRES, M. et al. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 9, p. 923–932, set. 2002.
- ALPÁR, A. et al. Endocannabinoids modulate cortical development by configuring Slit2/Robo1 signalling. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4421, 2014.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-III)**. 3^a ed. [s.l.] American Psychiatric Association Publishing, 1980.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of**

Mental Disorders (DSM-III-R). [s.l.] American Psychiatric Association Publishing, 1987.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)**. 4^a ed. [s.l.] American Psychiatric Association Publishing, 1994.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V)**. [s.l.] American Psychiatric Association, 2013.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Text Revision (DSM-5-TR)**. 5^a ed. Washington: American Psychiatric Association Publishing, 2022.

ANDALOUSSI, Z. I. L. et al. Acute cannabidiol treatment attenuates ethanol-induced place preference and reduces aggressivity in group-housed male rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 211, p. 173290, dez. 2021.

ARAN, A. et al. Brief Report: Cannabidiol-Rich Cannabis in Children with Autism Spectrum Disorder and Severe Behavioral Problems—A Retrospective Feasibility Study. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 49, n. 3, p. 1284–1288, 31 mar. 2019a.

ARAN, A. et al. Lower circulating endocannabinoid levels in children with autism spectrum disorder. **Molecular Autism**, v. 10, n. 1, p. 2, 30 dez. 2019b.

ARAN, A. et al. Cannabinoid treatment for autism: a proof-of-concept randomized trial. **Molecular Autism**, v. 12, n. 1, p. 6, 3 dez. 2021.

ARAQUE, A. et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 5, p. 208–215, maio 1999.

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, 23 abr. 2005.

ASTELL, K. R.; SIEGER, D. Investigating microglia-brain tumor cell interactions in vivo in the larval zebrafish brain. In: **The Zebrafish Disease Models and Chemical Screens**. [s.l.: s.n.], p. 593–626.

ATALAY, S.; JAROCKA-KARPOWICZ, I.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 21, 25 dez. 2019.

BAI, D. et al. Association of Genetic and Environmental Factors With Autism in a 5-Country Cohort. **JAMA Psychiatry**, v. 76, n. 10, p. 1035, 1 out. 2019.

BAI, O.; ZHANG, H.; LI, X.-M. Antipsychotic drugs clozapine and olanzapine upregulate bcl-2 mRNA and protein in rat frontal cortex and hippocampus. **Brain Research**, v. 1010, n. 1–2, p. 81–86, jun. 2004.

BAILEY, J. M. et al. Persistent behavioral effects following early life exposure to retinoic acid or valproic acid in zebrafish. **NeuroToxicology**, v. 52, p. 23–33, jan. 2016.

BAIMBRIDGE, K. G.; CELIO, M. R.; ROGERS, J. H. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, v. 15, n. 8, p. 303–308, ago. 1992.

BANJI, D. et al. Amelioration of behavioral aberrations and oxidative markers by green tea extract in valproate induced autism in animals. **Brain Research**, v. 1410, p. 141–151, set. 2011.

BARCHEL, D. et al. Oral Cannabidiol Use in Children With Autism Spectrum Disorder to Treat Related Symptoms and Co-morbidities. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 9 jan. 2019.

BARONIO, D. et al. Embryonic exposure to valproic acid affects the histaminergic system and the social behaviour of adult zebrafish (*Danio rerio*). **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 5, p. 797–809, mar. 2018.

BARTON, K. M.; LEVINE, E. M. Expression patterns and cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1, and phosphorylated histone H3 in the developing mouse retina. **Developmental Dynamics**, v. 237, n. 3, p. 672–682, mar. 2008.

BARTOS, M.; VIDA, I.; JONAS, P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 45–56, jan. 2007.

BENT, S. et al. Identification of urinary metabolites that correlate with clinical improvements in children with autism treated with sulforaphane from broccoli. **Molecular Autism**, v. 9, n. 1, p. 35, 30 dez. 2018.

BERGHUIS, P. et al. Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 52, p. 19115–19120, 27 dez. 2005.

BERNARDINELLI, Y. et al. Activity-Dependent Structural Plasticity of Perisynaptic Astrocytic Domains Promotes Excitatory Synapse Stability. **Current Biology**, v. 24, n. 15, p. 1679–1688, ago. 2014.

BETANCUR, C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. **Brain Research**, v. 1380, p. 42–77, mar. 2011.

BHANDARI, R.; PALIWAL, J. K.; KUHAD, A. Neuropsychopathology of Autism Spectrum Disorder: Complex Interplay of Genetic, Epigenetic, and Environmental Factors. **Advances in neurobiology**, v. 24, p. 97–141, 2020.

BIELECKA, A. M.; OBUCHOWICZ, E. Antiapoptotic action of lithium and valproate. **Pharmacological reports : PR**, v. 60, n. 6, p. 771–82, 2008.

BILGE, S.; EKICI, B. CBD-enriched cannabis for autism spectrum disorder: an experience of a single center in Turkey and reviews of the literature. **Journal of Cannabis Research**, v. 3, n. 1, p. 53, 16 dez. 2021.

BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.: s.n.]. p. 299–305.

BISOGNO, T. et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 4, p. 845–852, out. 2001.

BISOGNO, T. et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. **Journal of Cell Biology**, v. 163, n. 3, p. 463–468, 10 nov. 2003.

BJØRKLUND, G. et al. Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2314–2332, 5 maio 2020.

BLANCO-SUÁREZ, E.; CALDWELL, A. L. M.; ALLEN, N. J. Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 6, p. 1903–1916, 15 mar. 2017.

BORRAS, L. et al. Pulmonary Thromboembolism Associated with Olanzapine and Risperidone. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 35, n. 2, p. 159–161, ago. 2008.

BOSSU, J.-L.; ROUX, S. Les modèles animaux d'étude de l'autisme. **médecine/sciences**, v. 35, n. 3, p. 236–243, 1 mar. 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

BRASIL. **Bolsonaro anuncia inclusão de autistas no Censo 2020**. Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/politica/noticia/2019-07/bolsonaro-anuncia-inclusao-de-autistas-no-censo-2020>>. Acesso em: 13 ago. 2021.

BREMER, E.; LLOYD, M. School-Based Fundamental-Motor-Skill Intervention for Children With Autism-Like Characteristics: An Exploratory Study. **Adapted Physical Activity Quarterly**, v. 33, n. 1, p. 66–88, jan. 2016.

BUSKE, C.; GERLAI, R. Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish. **Developmental Psychobiology**, v. 54, n. 1, p. 28–35, jan. 2012.

BYRD, C. A. et al. Ontogeny of odorant receptor gene expression in zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Neurobiology**, v. 29, n. 4, p. 445–458, abr. 1996.

CADOGAN, A.-K. et al. Influence of Cannabinoids on Electrically Evoked Dopamine Release and Cyclic AMP Generation in the Rat Striatum. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 3, p. 1131–1137, 18 nov. 1997.

CAMPOS, A. C. et al. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1607, p. 3364–3378, 5 dez. 2012.

CAMPOS, A. C. et al. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 6, p. 1407–1419, 1 jul. 2013.

CAMPOS, A. C. et al. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 119–127, out. 2016.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 2, p. 223–230, 1 ago. 2008.

CAMPOS, A. C.; GUIMARÃES, F. S. Evidence for a potential role for TRPV1 receptors in the dorsolateral periaqueductal gray in the attenuation of the anxiolytic effects of cannabinoids. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 8, p. 1517–1521, nov. 2009.

CARLI, M. et al. Atypical Antipsychotics and Metabolic Syndrome: From Molecular Mechanisms to Clinical Differences. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 238, 8 mar. 2021.

CARLINI, E. A. et al. Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 25, n. 8, p. 664–665, 12 abr. 1973.

CARRIER, E. J.; AUCHAMPACH, J. A.; HILLARD, C. J. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: A mechanism of cannabinoid immunosuppression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 20, p. 7895–7900, 16 maio 2006.

CARTY, D. R. et al. Developmental Effects of Cannabidiol and Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 162, n. 1, p. 137–145, 1 mar. 2018.

CASAROTTO, P. C. et al. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. **Behavioural Pharmacology**, v. 21, n. 4, p. 353–358, jul. 2010.

CDC. **Data & Statistics on Autism Spectrum Disorder**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

CELADA, P.; PUIG, M. V.; ARTIGAS, F. Serotonin modulation of cortical neurons and networks. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 7, 2013.

CHAHARDEHI, A. M.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1345, 12 out. 2020.

CHAWARSKA, K. Early Generalized Overgrowth in Boys With Autism. **Archives of General Psychiatry**, v. 68, n. 10, p. 1021, 1 out. 2011.

CHEN, J. et al. Developmental and behavioral alterations in zebrafish embryonically exposed to valproic acid (VPA): An aquatic model for autism. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 66, p. 8–16, mar. 2018.

CHEN, J. et al. Live-imaging of astrocyte morphogenesis and function in zebrafish neural circuits. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 10, p. 1297–1306, 7 out. 2020a.

CHEN, O. et al. The early overgrowth theory of autism spectrum disorder: Insight into convergent mechanisms from valproic acid exposure and translational models. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 173, p. 275–300, 2020b.

CHEN, Y.-H. et al. Affect of Seizures During Gestation on Pregnancy Outcomes in Women With Epilepsy. **Archives of Neurology**, v. 66, n. 8, 1 ago. 2009.

CHESS, S. Autism in children with congenital rubella. **Journal of Autism and Childhood Schizophrenia**, v. 1, n. 1, p. 33–47, 1971.

CHEVALLIER, C. et al. The social motivation theory of autism. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, n. 4, p. 231–239, abr. 2012.

CHOW, M. L. et al. Age-Dependent Brain Gene Expression and Copy Number Anomalies in Autism Suggest Distinct Pathological Processes at Young Versus Mature Ages. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 3, p. e1002592, 22 mar. 2012.

CHRISTENSEN, J. et al. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. **JAMA**, v. 309, n. 16, p. 1696, 24 abr. 2013.

CLAIRBORNE, A. Catalase activity. In: GREENWALD, R. A. (Ed.). . **CRC handbook of methods in oxygen radical research**. Boca Raton ed. [s.l.: s.n.]. p. 283–284.

CLAPHAM, D. E. Calcium signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 259–268, jan. 1995.

COSTA, K. C. M. et al. Zebrafish as a Translational Model: An Experimental Alternative to Study the Mechanisms Involved in Anosmia and Possible Neurodegenerative Aspects of COVID-19? **eneuro**, v. 8, n. 3, p. ENEURO.0027-21.2021, maio 2021.

COURCHESNE, E. et al. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic

disorder: An MRI study. **Neurology**, v. 57, n. 2, p. 245–254, 24 jul. 2001.

COURCHESNE, E. et al. Mapping Early Brain Development in Autism. **Neuron**, v. 56, n. 2, p. 399–413, out. 2007.

COURCHESNE, E. et al. The ASD Living Biology: from cell proliferation to clinical phenotype. **Molecular Psychiatry**, v. 24, n. 1, p. 88–107, 22 jan. 2019.

COURCHESNE, E.; CARPER, R.; AKSHOOMOFF, N. Evidence of brain overgrowth in the first year of life in autism. **JAMA**, v. 290, n. 3, p. 337–44, 16 jul. 2003.

CRAVATT, B. F. et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 83–87, nov. 1996.

CRIPPA, A. et al. A multimethod approach to assessing motor skills in boys and girls with autism spectrum disorder. **Autism**, v. 25, n. 5, p. 1481–1491, 2 jul. 2021.

CUOGHI, B.; MOLA, L. Macroglial cells of the teleost central nervous system: a survey of the main types. **Cell and Tissue Research**, v. 338, n. 3, p. 319–332, 29 dez. 2009.

DARNELL, D.; GILBERT, S. F. Neuroembryology. **WIREs Developmental Biology**, v. 6, n. 1, jan. 2017.

DE OLIVEIRA, A.; BRIGANTE, T.; OLIVEIRA, D. Tail Coiling Assay in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos: Stage of Development, Promising Positive Control Candidates, and Selection of an Appropriate Organic Solvent for Screening of Developmental Neurotoxicity (DNT). **Water**, v. 13, n. 2, p. 119, 7 jan. 2021.

DE OLIVEIRA, R. W. et al. Cannabinoid signalling in embryonic and adult neurogenesis: possible implications for psychiatric and neurological disorders. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 31, n. 1, p. 1–16, 16 fev. 2019.

DE PETROCELLIS, L. et al. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1479–1494, ago. 2011.

DECKMANN, I. et al. Neuroimmune Alterations in Autism: A Translational Analysis Focusing on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. **Neuroimmunomodulation**, v. 25, n. 5–6, p. 285–299, 2018.

DENG, L. et al. Quantitative Analyses of Synergistic Responses between Cannabidiol and DNA-Damaging Agents on the Proliferation and Viability of Glioblastoma and Neural Progenitor Cells in Culture. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 215–224, jan. 2017.

DENG, W. et al. The Relationship Among Genetic Heritability, Environmental Effects, and

Autism Spectrum Disorders. **Journal of Child Neurology**, v. 30, n. 13, p. 1794–1799, 14 nov. 2015.

DESJARDINS, J. K.; FERNALD, R. D. What do fish make of mirror images? **Biology Letters**, v. 6, n. 6, p. 744–747, 23 dez. 2010.

DEVANE, W. A. et al. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605–13, nov. 1988.

DEVANE, W. A. et al. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946–1949, 18 dez. 1992.

DÍAZ-ALONSO, J. et al. CB 1 Cannabinoid Receptor-Dependent Activation of mTORC1/Pax6 Signaling Drives Tbr2 Expression and Basal Progenitor Expansion in the Developing Mouse Cortex. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 9, p. 2395–2408, set. 2015.

DICARLO, G. E. et al. Autism-linked dopamine transporter mutation alters striatal dopamine neurotransmission and dopamine-dependent behaviors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 8, p. 3407–3419, 22 jul. 2019.

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, 6 dez. 2012.

DIETERT, R. R.; DIETERT, J. M.; DEWITT, J. C. Environmental risk factors for autism. **Emerging Health Threats Journal**, v. 4, n. 1, p. 7111, 25 jan. 2011.

DILIBERTI, J. H. et al. The fetal valproate syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 19, n. 3, p. 473–481, nov. 1984.

DINIZ, M. S. et al. Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*). **Science of The Total Environment**, v. 505, p. 282–289, fev. 2015.

DRYSDALE, A. J. et al. Cannabidiol-induced intracellular Ca²⁺ elevations in hippocampal cells. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 621–631, abr. 2006.

DWIVEDI, S. et al. Larval zebrafish model for studying the effects of valproic acid on neurodevelopment: An approach towards modeling autism. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 95, p. 56–65, jan. 2019.

EDMONSON, C.; ZIATS, M. N.; RENNERT, O. M. Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. **Molecular Autism**, v. 5, n. 1, p. 3, 2014.

EMBERTI GIALLORETI, L.; CURATOLO, P. Autism Spectrum Disorder: Why Do We

Know So Little? **Frontiers in Neurology**, v. 9, 17 ago. 2018.

ERNST, M. et al. Low medial prefrontal dopaminergic activity in autistic children. **The Lancet**, v. 350, n. 9078, p. 638, ago. 1997.

ESPOSITO, G. et al. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in β -amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF- κ B involvement. **Neuroscience Letters**, v. 399, n. 1–2, p. 91–95, maio 2006.

ESPOSITO, G. et al. Cannabidiol Reduces A β -Induced Neuroinflammation and Promotes Hippocampal Neurogenesis through PPAR γ Involvement. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e28668, 5 dez. 2011.

FATEMI, S. H. et al. Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. **Synapse**, v. 62, n. 7, p. 501–507, jul. 2008.

FATEMI, S. H. et al. Consensus Paper: Pathological Role of the Cerebellum in Autism. **The Cerebellum**, v. 11, n. 3, p. 777–807, 28 set. 2012.

FEIN, D. et al. Optimal outcome in individuals with a history of autism. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 54, n. 2, p. 195–205, fev. 2013.

FINNEY, J. L. et al. Structure and autonomic innervation of the swim bladder in the zebrafish (*Danio rerio*). **The Journal of Comparative Neurology**, v. 495, n. 5, p. 587–606, 10 abr. 2006.

FITZPATRICK, S. E. et al. Aggression in autism spectrum disorder: presentation and treatment options. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 12, p. 1525–38, jun. 2016.

FÖLDY, C.; MALENKA, R. C.; SÜDHOF, T. C. Autism-Associated Neuroligin-3 Mutations Commonly Disrupt Tonic Endocannabinoid Signaling. **Neuron**, v. 78, n. 3, p. 498–509, maio 2013.

FOMBONNE, E. Epidemiology of Pervasive Developmental Disorders. **Pediatric Research**, v. 65, n. 6, p. 591–598, jun. 2009.

FRASCO, M. F.; GUILHERMINO, L. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 149–156, 2002.

GALVE-ROPERH, I. et al. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 633–650, out. 2013.

GAO, J. et al. Neuroprotective effects of docosahexaenoic acid on hippocampal cell death and learning and memory impairments in a valproic acid-induced rat autism model. **International**

Journal of Developmental Neuroscience, v. 49, n. 1, p. 67–78, 27 abr. 2016.

GARCÍA-ARENCIBIA, M. et al. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. **Brain Research**, v. 1134, p. 162–170, fev. 2007.

GARDNER, D. M. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 13, p. 1703–1711, 21 jun. 2005.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 419–425, jan. 2017.

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 1002–1012, dez. 2003.

GERLAI, R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. **Behavior genetics**, v. 33, n. 5, p. 461–8, set. 2003.

GESCHWIND, D. H. Advances in autism. **Annual Review of Medicine**, v. 60, p. 367–80, 2009.

GIFFORD, A. N.; ASHBY, C. R. Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 277, n. 3, p. 1431–6, jun. 1996.

GILBERT, S. F.; BARRESI, M. J. F. **Developmental Biology**. 11^a ed. [s.l.] Sinauer Associates, 2016.

GO, H. S. et al. Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF- κ B signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL. **Journal of Biomedical Science**, v. 18, n. 1, p. 48, 4 dez. 2011.

GO, H. S. et al. Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat brain via a mechanism involving the GSK-3 β / β -catenin pathway. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 6, p. 1028–1041, nov. 2012.

GOEL, R. et al. An update on pharmacotherapy of autism spectrum disorder in children and adolescents. **International Review of Psychiatry**, v. 30, n. 1, p. 78–95, 2 jan. 2018.

GONCALVES, M. B. et al. A diacylglycerol lipase-CB2 cannabinoid pathway regulates adult subventricular zone neurogenesis in an age-dependent manner. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 38, n. 4, p. 526–536, 2008.

GOTLIB, D. et al. Valproic Acid in Women and Girls of Childbearing Age. **Current**

Psychiatry Reports, v. 19, n. 9, p. 58, 20 set. 2017.

GOTTLICHER, M. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 24, p. 6969–6978, 17 dez. 2001.

GOWEN, E.; HAMILTON, A. Motor Abilities in Autism: A Review Using a Computational Context. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 43, n. 2, p. 323–344, 22 fev. 2013.

GRAY, R. A.; WHALLEY, B. J. The proposed mechanisms of action of CBD in epilepsy. **Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape**, v. 22, n. S1, p. 10–15, 1 jan. 2020.

GRUPP, L.; WOLBURG, H.; MACK, A. F. Astroglial structures in the zebrafish brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 21, p. 4277–4287, 1 nov. 2010.

GUILHERMINO, L. et al. Acetylcholinesterase Activity in Juveniles of *Daphnia magna* Straus. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, n. 6, p. 979–985, 1 dez. 1996.

GUIMARÃES, F. S. et al. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 100, n. 4, p. 558–559, abr. 1990.

GUIMARÃES, F. S. et al. Anxiolytic effect of cannabidiol derivatives in the elevated plus-maze. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 25, n. 1, p. 161–164, jan. 1994.

GUNAYDIN, L. A. et al. Natural Neural Projection Dynamics Underlying Social Behavior. **Cell**, v. 157, n. 7, p. 1535–1551, jun. 2014.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–9, 25 nov. 1974.

HAMED, N. O. et al. Understanding the roles of glutamine synthetase, glutaminase, and glutamate decarboxylase autoantibodies in imbalanced excitatory/inhibitory neurotransmission as etiological mechanisms of autism. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 72, n. 5, p. 362–373, maio 2018.

HAMPSON, A. J. et al. Cannabidiol and (–)Δ⁹-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 14, p. 8268–8273, 7 jul. 1998.

HAMZAWY, M. A. et al. Leptin and camel milk abate oxidative stress status, genotoxicity induced in valproic acid rat model of autism. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 32, p. 205873841878551, 1 jan. 2018.

HANUŠ, L. O. et al. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 12, p. 1357–1392, 2016.

HARATIZADEH, S. et al. An overview of modeling and behavioral assessment of autism in the rodent. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 81, n. 3, p. 221–228, 18 maio 2021.

HARDEN, C. L. et al. Management issues for women with epilepsy-Focus on pregnancy (an evidence-based review): I. Obstetrical complications and change in seizure frequency. **Epilepsia**, v. 50, n. 5, p. 1229–1236, maio 2009a.

HARDEN, C. L. et al. Management issues for women with epilepsy-Focus on pregnancy (an evidence-based review): III. Vitamin K, folic acid, blood levels, and breast-feeding. **Epilepsia**, v. 50, n. 5, p. 1247–1255, maio 2009b.

HARDEN, C. L. et al. Management issues for women with epilepsy-Focus on pregnancy (an evidence-based review): II. Teratogenesis and perinatal outcomes. **Epilepsia**, v. 50, n. 5, p. 1237–1246, maio 2009c.

HARKANY, T. et al. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 83–92, 2007.

HARKANY, T. et al. Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 286, n. 1–2, p. S84–S90, 2008.

HARTMANN, A. et al. Cannabidiol attenuates aggressive behavior induced by social isolation in mice: Involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 94, p. 109637, ago. 2019.

HASHEMI, E. et al. The Number of Parvalbumin-Expressing Interneurons Is Decreased in the Prefrontal Cortex in Autism. **Cerebral Cortex**, v. 27, n. 3, p. 1931–1943, 2017.

HAZLETT, H. C. et al. 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. 467–76, maio 2011.

HERTZ-PICCIOTTO, I. et al. The CHARGE Study: An Epidemiologic Investigation of Genetic and Environmental Factors Contributing to Autism. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 7, p. 1119–1125, jul. 2006.

HEUSSLER, H. et al. A phase 1/2, open-label assessment of the safety, tolerability, and efficacy of transdermal cannabidiol (ZYN002) for the treatment of pediatric fragile X syndrome. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 11, n. 1, p. 16, 2 dez. 2019.

HOANG, N.; CYTRYNBAUM, C.; SCHERER, S. W. Communicating complex genomic information: A counselling approach derived from research experience with Autism Spectrum

Disorder. **Patient Education and Counseling**, v. 101, n. 2, p. 352–361, fev. 2018.

HOF, P. R. et al. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 16, n. 2, p. 77–116, fev. 1999.

HÖFER, J.; HOFFMANN, F.; BACHMANN, C. Use of complementary and alternative medicine in children and adolescents with autism spectrum disorder: A systematic review. **Autism**, v. 21, n. 4, p. 387–402, 25 maio 2017.

HORZMANN, K.; FREEMAN, J. Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity. **Toxics**, v. 4, n. 3, p. 19, 27 ago. 2016.

HOWLIN, P. et al. Adult outcome for children with autism. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 45, n. 2, p. 212–229, fev. 2004.

HU, H.; GAN, J.; JONAS, P. Fast-spiking, parvalbumin + GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. **Science**, v. 345, n. 6196, ago. 2014.

HUANG, T.-N.; HSUEH, Y.-P. Brain-specific transcriptional regulator T-brain-1 controls brain wiring and neuronal activity in autism spectrum disorders. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, 3 nov. 2015.

IANNOTTI, F. A. et al. Nonpsychotropic Plant Cannabinoids, Cannabidiol (CBD) and Cannabidiol (CBD), Activate and Desensitize Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) Channels in Vitro: Potential for the Treatment of Neuronal Hyperexcitability. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1131–1141, 19 nov. 2014.

IDALENCIO, R. et al. Waterborne Risperidone Decreases Stress Response in Zebrafish. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0140800, 16 out. 2015.

IM, D. S. Treatment of Aggression in Adults with Autism Spectrum Disorder: A Review. **Harvard review of psychiatry**, v. 29, n. 1, p. 35–80, jan. 2021.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. **ISO 7346**, 1996.

JENKINS, T. et al. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 56, 20 jan. 2016.

JIA, W. et al. Properties of Calmodulin Binding to NaV1.2 IQ Motif and Its Autism-Associated Mutation R1902C. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 3, p. 523–534, 4 mar. 2021.

JIN, Y. et al. Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral

alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 48, p. 9–17, mar. 2015.

JONES, L. J.; NORTON, W. H. J. Using zebrafish to uncover the genetic and neural basis of aggression, a frequent comorbid symptom of psychiatric disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 276, p. 171–80, 1 jan. 2015.

JOSEPH, T. P. et al. Duloxetine ameliorates valproic acid-induced hyperactivity, anxiety-like behavior, and social interaction deficits in zebrafish. **Autism Research**, v. 15, n. 1, p. 27–41, 3 jan. 2022.

JUAREZ, P.; MARTÍNEZ CERDEÑO, V. Parvalbumin and parvalbumin chandelier interneurons in autism and other psychiatric disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 13, 12 out. 2022.

JURGA, A. M. et al. Beyond the GFAP-Astrocyte Protein Markers in the Brain. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 1361, 14 set. 2021.

JURISCH-YAKSI, N.; YAKSI, E.; KIZIL, C. Radial glia in the zebrafish brain: Functional, structural, and physiological comparison with the mammalian glia. **Glia**, v. 68, n. 12, p. 2451–2470, 31 dez. 2020.

KALICHAK, F. et al. Waterborne psychoactive drugs impair the initial development of Zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 41, p. 89–94, jan. 2016.

KALICHAK, F. et al. Psychotropic in the environment: risperidone residues affect the behavior of fish larvae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14121, 26 dez. 2017.

KALICHAK, F. et al. Persistent and transgenerational effects of risperidone in zebrafish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 25, p. 26293–26303, 8 set. 2019.

KALUEFF, A. V. et al. Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, mar. 2013.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, fev. 2014.

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

KANYO, R. et al. Medium-throughput zebrafish optogenetic platform identifies deficits in subsequent neural activity following brief early exposure to cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 11515, 1 dez. 2021.

KAPLAN, J. S. et al. Cannabidiol attenuates seizures and social deficits in a mouse model of

Dravet syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 42, p. 11229–11234, 17 out. 2017.

KARNIOL, I. G. et al. Cannabidiol interferes with the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in man. **European Journal of Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 172–177, set. 1974.

KASHEM, M. A. et al. Effects of typical (haloperidol) and atypical (risperidone) antipsychotic agents on protein expression in rat neural stem cells. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 7, p. 558–565, dez. 2009.

KATONA, I. et al. Molecular Composition of the Endocannabinoid System at Glutamatergic Synapses. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 21, p. 5628–5637, 2006.

KEILHOFF, G.; FUSAR-POLI, P.; BECKER, A. Effects of Antipsychotics on Dentate Gyrus Stem Cell Proliferation and Survival in Animal Models: A Critical Update. **Neural Plasticity**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

KEIMPEMA, E. et al. Diacylglycerol lipase α manipulation reveals developmental roles for intercellular endocannabinoid signaling. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 2093, 2013a.

KEIMPEMA, E. et al. Nerve growth factor scales endocannabinoid signaling by regulating monoacylglycerol lipase turnover in developing cholinergic neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 5, p. 1935–1940, 2013b.

KERR, D. M. et al. Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism. **Behavioural Brain Research**, v. 249, p. 124–132, jul. 2013.

KERR, D. M.; GILMARTIN, A.; ROCHE, M. Pharmacological inhibition of fatty acid amide hydrolase attenuates social behavioural deficits in male rats prenatally exposed to valproic acid. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 228–235, nov. 2016.

KHALAJ, R.; HAJIZADEH MOGHADDAM, A.; ZARE, M. Hesperetin and its nanocrystals ameliorate social behavior deficits and oxido-inflammatory stress in rat model of autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 80–87, 30 out. 2018.

KIM, Y. S.; LEVENTHAL, B. L. Genetic Epidemiology and Insights into Interactive Genetic and Environmental Effects in Autism Spectrum Disorders. **Biological Psychiatry**, v. 77, n. 1, p. 66–74, jan. 2015.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, jul. 1995.

KINTNER, C. Neurogenesis in Embryos and in Adult Neural Stem Cells. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 639–643, 1 fev. 2002.

KIRINO, E. Efficacy and Tolerability of Pharmacotherapy Options for the Treatment of

Irritability in Autistic Children. **Clinical Medicine Insights: Pediatrics**, v. 8, p. CMPed.S8304, 25 jan. 2014.

KUESTER, G. et al. Oral cannabis extracts as a promising treatment for the core symptoms of autism spectrum disorder: Preliminary experience in Chilean patients. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 381, p. 932–933, out. 2017.

LACIVITA, E. et al. Targets for Drug Therapy for Autism Spectrum Disorder: Challenges and Future Directions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 22, p. 9114–9141, 2017.

LAGARDE, F. et al. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. **Environmental Health**, v. 14, p. 13, 11 fev. 2015.

LANDRIGAN, P. J. What causes autism? Exploring the environmental contribution. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 22, n. 2, p. 219–225, abr. 2010.

LAPRAIRIE, R. B. et al. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB 1 receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 20, p. 4790–4805, out. 2015.

LARSON, E. T.; O'MALLEY, D. M.; MELLONI, R. H. Aggression and vasotocin are associated with dominant–subordinate relationships in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 167, n. 1, p. 94–102, fev. 2006.

LAUBER, E.; FILICE, F.; SCHWALLER, B. Prenatal Valproate Exposure Differentially Affects Parvalbumin-Expressing Neurons and Related Circuits in the Cortex and Striatum of Mice. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, 21 dez. 2016.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, n. 1–4, p. 1–20, set. 2007.

LEMMON, M. E.; GREGAS, M.; JESTE, S. S. Risperidone Use in Autism Spectrum Disorders: A Retrospective Review of a Clinic-Referred Patient Population. **Journal of Child Neurology**, v. 26, n. 4, p. 428–432, 6 abr. 2011.

LEWIS, M. et al. Animal models of restricted repetitive behavior in autism. **Behavioural Brain Research**, v. 176, n. 1, p. 66–74, 10 jan. 2007.

LINDSEY, B. W.; SMITH, F. M.; CROLL, R. P. From Inflation to Flotation: Contribution of the Swimbladder to Whole-Body Density and Swimming Depth During Development of the Zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 7, n. 1, p. 85–96, mar. 2010.

LIU, G. I. et al. Mediation of Cannabidiol Anti-inflammation in the Retina by Equilibrative Nucleoside Transporter and A 2A Adenosine Receptor. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 49, n. 12, p. 5526, 1 dez. 2008.

LIU, H. et al. Valproic Acid Induces Autism-Like Synaptic and Behavioral Deficits by

Disrupting Histone Acetylation of Prefrontal Cortex ALDH1A1 in Rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 28 abr. 2021.

LOSS, C. M. et al. Is Cannabidiol During Neurodevelopment a Promising Therapy for Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders? **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 4 fev. 2021.

LUISELLI, J. K. Aggression and Noncompliance. In: MATSON, J. L. (Ed.). . **Applied Behavior Analysis for Children with Autism Spectrum Disorders**. New York, NY: Springer New York, 2009. p. 175–187.

MACCARRONE, M. et al. Programming of neural cells by (endo)cannabinoids: from physiological rules to emerging therapies. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 20 dez. 2014.

MAENNER, M. J. et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2016. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 69, n. 4, p. 1–12, 27 mar. 2020.

MAENNER, M. J. et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. **MMWR. Surveillance Summaries**, v. 70, n. 11, p. 1–16, 3 dez. 2021.

MAISON, P. et al. BDNF regulates neuronal sensitivity to endocannabinoids. **Neuroscience Letters**, v. 467, n. 2, p. 90–94, dez. 2009.

MANIVASAGAM, T. et al. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Autism. In: **Personalized Food Intervention and Therapy for Autism Spectrum Disorder Management**. [s.l.] Springer, 2020. p. 193–206.

MANNUCCI, C. et al. Neurological Aspects of Medical Use of Cannabidiol. **CNS & Neurological Disorders Drug Targets**, v. 16, n. 5, p. 541–553, 2017.

MANO-SOUSA, B. J. et al. Effects of Risperidone in Autistic Children and Young Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Current Neuropharmacology**, v. 19, n. 4, p. 538–552, abr. 2021.

MARSICANO, G. et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. **Science**, v. 302, n. 5642, p. 84–8, 3 out. 2003.

MARTÍN-MORENO, A. M. et al. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 6, p. 964–73, jun. 2011.

MASI, A. et al. An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 2, p. 183–193, 17 abr. 2017.

- MATO, S.; OLMO, E. DEL; PAZOS, A. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 9, p. 1747–1754, 2003.
- MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 9 ago. 1990.
- MATSUNAMI, N. et al. Identification of rare recurrent copy number variants in high-risk autism families and their prevalence in a large ASD population. **PloS One**, v. 8, n. 1, p. e52239, 2013.
- 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, p. 107975, maio 2020.
- MCCRACKEN, J. T. et al. Risperidone in Children with Autism and Serious Behavioral Problems. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 5, p. 314–321, ago. 2002.
- MCFADDEN, K.; MINSHEW, N. J. Evidence for dysregulation of axonal growth and guidance in the etiology of ASD. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 7, 2013.
- MCPARTLAND, J.; VOLKMAR, F. R. Autism and related disorders. In: AMINOFF, M. J.; BOLLER, F.; SWAAB, D. F. (Eds.). **Neurobiology of Psychiatric Disorders**. Handbook of Clinical Neurology. [s.l.] Elsevier, 2012. v. 106p. 407–418.
- MEADOR, K. J. Effects of in Utero Antiepileptic Drug Exposure. **Epilepsy Currents**, v. 8, n. 6, p. 143–147, 6 nov. 2008.
- MEADOR, K. J. et al. Cognitive Function at 3 Years of Age after Fetal Exposure to Antiepileptic Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 16, p. 1597–1605, 16 abr. 2009.
- MEADOR, K. J. et al. Foetal antiepileptic drug exposure and verbal versus non-verbal abilities at three years of age. **Brain**, v. 134, n. 2, p. 396–404, fev. 2011.
- MECHOULAM, R. et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83–90, jun. 1995.
- MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish. I. The structure of cannabidiol. **Tetrahedron**, v. 19, n. 12, p. 2073–2078, jan. 1963.
- MESHALKINA, D. A. et al. Zebrafish models of autism spectrum disorder. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 207–216, jan. 2018.
- MEUNIER, H. et al. Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. **Therapie**, v. 18,

p. 435–8, 1963.

MICHAUD, A. et al. Cortical excitability and cell division. **Current Biology**, v. 31, n. 10, p. R553–R559, maio 2021.

MOLDIN, S.; RUBENSTEIN, J. (EDS.). **Understanding Autism**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

MOLINA-HOLGADO, F. et al. CB2 cannabinoid receptors promote mouse neural stem cell proliferation. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 629–634, 2007.

MONEY, K. M.; STANWOOD, G. D. Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, 2013.

MORAKOTSRIWAN, N. et al. Autistic-Like Behaviors, Oxidative Stress Status, and Histopathological Changes in Cerebellum of Valproic Acid Rat Model of Autism Are Improved by the Combined Extract of Purple Rice and Silkworm Pupae. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

MOREIRA, F. A.; GUIMARÃES, F. S. Cannabidiol inhibits the hyperlocomotion induced by psychotomimetic drugs in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, n. 2–3, p. 199–205, abr. 2005.

MORETZ, J. A.; MARTINS, E. P.; ROBISON, B. D. Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. **Behavioral Ecology**, v. 18, n. 3, p. 556–562, maio 2007.

MOROZOV, Y. M.; TORII, M.; RAKIC, P. Origin, Early Commitment, Migratory Routes, and Destination of Cannabinoid Type 1 Receptor-Containing Interneurons. **Cerebral Cortex**, v. 19, n. suppl_1, p. i78–i89, 2009.

MOSCONI, M. W.; SWEENEY, J. A. Sensorimotor dysfunctions as primary features of autism spectrum disorders. **Science China Life Sciences**, v. 58, n. 10, p. 1016–1023, 2 out. 2015.

MOSTAFAVI, M.; GAITANIS, J. Autism Spectrum Disorder and Medical Cannabis: Review and Clinical Experience. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 35, p. 100833, out. 2020.

MOUSAVINEJAD, E. et al. Coenzyme Q10 supplementation reduces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activity in children with autism spectrum disorders. **Psychiatry Research**, v. 265, p. 62–69, jul. 2018.

MU, Y. et al. Glia Accumulate Evidence that Actions Are Futile and Suppress Unsuccessful Behavior. **Cell**, v. 178, n. 1, p. 27–43.e19, jun. 2019.

MULDER, J. et al. Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-

range axon patterning. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 25, p. 8760–5, 24 jun. 2008.

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, maio 2016.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, set. 1993.

NADEBAUM, C. et al. Language skills of school-aged children prenatally exposed to antiepileptic drugs. **Neurology**, v. 76, n. 8, p. 719–726, 22 fev. 2011.

NAGAI, J. et al. Behaviorally consequential astrocytic regulation of neural circuits. **Neuron**, v. 109, n. 4, p. 576–596, fev. 2021.

NAM, T.-G. Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. **Toxicological Research**, v. 27, n. 1, p. 1–6, 1 mar. 2011.

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, jun. 1992.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E. Animal models of neuropsychiatric disorders. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 10, p. 1161–1169, 27 out. 2010.

NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 217–227, jan. 2018.

NIKOO, M. et al. N-Acetylcysteine as an Adjunctive Therapy to Risperidone for Treatment of Irritability in Autism. **Clinical Neuropharmacology**, v. 38, n. 1, p. 11–17, jan. 2015.

NORTON, W. H. J. Toward developmental models of psychiatric disorders in zebrafish. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, 2013.

NOSÈ, M. et al. Antipsychotic drug exposure and risk of pneumonia: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 24, n. 8, p. 812–820, ago. 2015.

OGAWA, T. et al. Valproate-induced developmental neurotoxicity is affected by maternal conditions including shipping stress and environmental change during early pregnancy. **Toxicology Letters**, v. 174, n. 1–3, p. 18–24, 1 nov. 2007.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

OLIVEIRA, R. F.; SILVA, J. F.; SIMÕES, J. M. Fighting Zebrafish: Characterization of

Aggressive Behavior and Winner–Loser Effects. **Zebrafish**, v. 8, n. 2, p. 73–81, jun. 2011.

OLTRABELLA, F. et al. Role of the endocannabinoid system in vertebrates: Emphasis on the zebrafish model. **Development, Growth & Differentiation**, v. 59, n. 4, p. 194–210, maio 2017.

OPAS/OMS. **Transtorno do Espectro Autista**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/transtorno-do-espectro-autista>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

ORNOY, A. Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 1–10, jul. 2009.

ORNOY, A.; WEINSTEIN-FUDIM, L.; ERGAZ, Z. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 155–169, ago. 2015.

OSBORNE, A. L. et al. Improved Social Interaction, Recognition and Working Memory with Cannabidiol Treatment in a Prenatal Infection (poly I:C) Rat Model. **Neuropsychopharmacology**, v. 42, n. 7, p. 1447–1457, 23 jun. 2017.

LOUDIN, M. J.; HOBBS, C.; DOHERTY, P. DAGL-dependent endocannabinoid signalling: roles in axonal pathfinding, synaptic plasticity and adult neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 10, p. 1634–1646, 2011.

PALAZUELOS, J. et al. CB2 Cannabinoid Receptors Promote Neural Progenitor Cell Proliferation via mTORC1 Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 2, p. 1198–1209, 2012.

PANDELIDES, Z. et al. Developmental exposure to cannabidiol (CBD) alters longevity and health span of zebrafish (*Danio rerio*). **GeroScience**, v. 42, n. 2, p. 785–800, 27 abr. 2020.

PANDELIDES, Z. et al. Transcriptomic Changes and the Roles of Cannabinoid Receptors and PPAR γ in Developmental Toxicities Following Exposure to Δ 9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol. **Toxicological Sciences**, v. 182, n. 1, p. 44–59, 16 jul. 2021.

PAVĀL, D. A Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. **Developmental Neuroscience**, v. 39, n. 5, p. 355–360, 2017.

PEDRAZZI, J. F. C. et al. Cannabidiol for the treatment of autism spectrum disorder: hope or hype? **Psychopharmacology**, 29 jul. 2022.

PELLATI, F. et al. Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–15, 4 dez. 2018.

PEREA, G.; NAVARRETE, M.; ARAQUE, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 421–431, ago. 2009.

PEREZ-ALVAREZ, A. et al. Structural and Functional Plasticity of Astrocyte Processes and Dendritic Spine Interactions. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 38, p. 12738–12744, 17 set. 2014.

PERISIC, T. et al. Valproate and Amitriptyline Exert Common and Divergent Influences on Global and Gene Promoter-Specific Chromatin Modifications in Rat Primary Astrocytes. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 792–805, 18 fev. 2010.

PERSICO, A. M. et al. The pediatric psychopharmacology of autism spectrum disorder: A systematic review - Part I: The past and the present. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 110, p. 110326, ago. 2021.

PHAM, M. et al. Assessing Social Behavior Phenotypes in Adult Zebrafish: Shoaling, Social Preference, and Mirror Biting Tests. In: KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M. (Eds.). . **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. Totowa: Humana Press, 2012. p. 231–246.

PINZON-OLEJUA, A. et al. Cre-inducible site-specific recombination in zebrafish oligodendrocytes. **Developmental Dynamics**, v. 246, n. 1, p. 41–49, jan. 2017.

PIROZZI, F.; NELSON, B.; MIRZAA, G. From microcephaly to megalencephaly: determinants of brain size. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 267–282, 31 dez. 2018.

PISANTI, S. et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 175, p. 133–150, jul. 2017.

POLEG, S. et al. Cannabidiol as a suggested candidate for treatment of autism spectrum disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 89, p. 90–96, mar. 2019.

PRESTI, M. F.; MIKES, H. M.; LEWIS, M. H. Selective blockade of spontaneous motor stereotypy via intrastriatal pharmacological manipulation. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 74, n. 4, p. 833–839, mar. 2003.

PRIETO, M. J. et al. Effect of Risperidone and Fluoxetine on the Movement and Neurochemical Changes of Zebrafish. **Open Journal of Medicinal Chemistry**, v. 02, n. 04, p. 129–138, 2012.

PRIGENT, C.; DIMITROV, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 18, p. 3677–3685, 15 set. 2003.

PRYCE, G. et al. Neuroprotection in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Progressive Multiple Sclerosis by Cannabis-Based Cannabinoids. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 10, n. 2, p. 281–292, 24 jun. 2015.

QIU, J. et al. Valproic acid therapy decreases serum 25-hydroxyvitamin D level in female

infants and toddlers with epilepsy— a pilot longitudinal study. **The Journal of Biomedical Research**, v. 35, n. 1, p. 61, 2021.

QUAAK, I.; BROUNS, M.; VAN DE BOR, M. The Dynamics of Autism Spectrum Disorders: How Neurotoxic Compounds and Neurotransmitters Interact. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 8, p. 3384–3408, 6 ago. 2013.

RAJESH, M. et al. Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 1, p. H610–H619, jul. 2007.

RANGER, P.; ELLENBROEK, B. A. Perinatal Influences of Valproate on Brain and Behaviour: An Animal Model for Autism. In: [s.l: s.n.]. p. 363–386.

RANGER, P.; ELLENBROEK, B. A. Perinatal Influences of Valproate on Brain and Behaviour: An Animal Model for Autism. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 29, p. 363–386, 2016.

RINALDI, T. et al. Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13501–13506, 14 ago. 2007.

ROBERTSON, G. N. et al. Development of the swimbladder and its innervation in the zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Morphology**, v. 268, n. 11, p. 967–985, nov. 2007.

ROLAND, A. B. et al. Cannabinoid-induced actomyosin contractility shapes neuronal morphology and growth. **eLife**, v. 3, 2014.

ROMOLI, M. et al. Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 10, p. 926–946, 13 set. 2019.

ROSE'MEYER, R. A review of the serotonin transporter and prenatal cortisol in the development of autism spectrum disorders. **Molecular Autism**, v. 4, n. 1, p. 37, 2013.

ROSE, S. et al. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 7, p. e134–e134, 10 jul. 2012.

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, mar. 2013.

RUDY, B. et al. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. **Developmental Neurobiology**, v. 71, n. 1, p. 45–61, 1 jan. 2011.

RUSSO, E. B. et al. Agonistic Properties of Cannabidiol at 5-HT_{1a} Receptors. **Neurochemical Research**, v. 30, n. 8, p. 1037–1043, ago. 2005.

RUSSO, F. B. et al. Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 7, p. 569–578, abr. 2018.

RYBERG, E. et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 7, p. 1092–1101, dez. 2007.

SAAD, A. K. et al. Role of Brain Modulators in Neurodevelopment: Focus on Autism Spectrum Disorder and Associated Comorbidities. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, p. 612, 16 maio 2022.

SACCO, R.; GABRIELE, S.; PERSICO, A. M. Head circumference and brain size in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. **Psychiatry Research**, v. 234, n. 2, p. 239–51, 30 nov. 2015.

SACREY, L.-A. R. et al. The reach-to-grasp movement in infants later diagnosed with autism spectrum disorder: a high-risk sibling cohort study. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 10, n. 1, p. 41, 27 dez. 2018.

SADEK, A. et al. Antioxidants and Autism: Teachers' Perceptions of Behavioral Changes. **Advances in mind-body medicine**, v. 32, n. 3, p. 12–17, 2018.

SAMUELS, B. A.; HEN, R. Neurogenesis and affective disorders. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 6, p. 1152–1159, mar. 2011.

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, 10 maio 2012.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–809, 2003.

SARASAMMA, S. et al. Behavioral Impairments and Oxidative Stress in the Brain, Muscle, and Gill Caused by Chronic Exposure of C70 Nanoparticles on Adult Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5795, 18 nov. 2019.

SCARANTE, F. F. et al. Glial Cells and Their Contribution to the Mechanisms of Action of Cannabidiol in Neuropsychiatric Disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 4 fev. 2021.

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, jan. 2005.

- SCHOLZ, S. et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 15, n. 5, p. 394–404, jul. 2008.
- SERVADIO, M. et al. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. **Translational Psychiatry**, v. 6, n. 9, p. e902–e902, 27 set. 2016.
- SHALLCROSS, R. et al. Child development following in utero exposure: Levetiracetam vs sodium valproate. **Neurology**, v. 76, n. 4, p. 383–389, 25 jan. 2011.
- SHEN, C.; ZUO, Z. Zebrafish as a Model to Study Autism Spectrum Disorder Caused by Environmental Chemicals Exposure. **Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism**, v. 06, n. 06, 2016.
- SHOWALTER, V. M. et al. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 278, n. 3, p. 989–99, set. 1996.
- SIEMANN, J. K. et al. An autism-associated serotonin transporter variant disrupts multisensory processing. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 3, p. e1067–e1067, 21 mar. 2017.
- SILVA JUNIOR, E. A. DA et al. Evaluation of the efficacy and safety of cannabidiol-rich cannabis extract in children with autism spectrum disorder: randomized, double-blind and controlled placebo clinical trial. **Trends in Psychiatry and Psychotherapy**, 2022.
- SILVERMAN, J. L. et al. Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 490–502, jul. 2010.
- SILVESTRO, S. et al. Molecular Targets of Cannabidiol in Experimental Models of Neurological Disease. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5186, 7 nov. 2020.
- SINISCALCO, D. Endocannabinoid System as Novel Therapeutic Target for Autism Treatment. **Autism-Open Access**, v. 04, n. 02, 2014.
- SMITH, F. M.; CROLL, R. P. Autonomic control of the swimbladder. **Autonomic Neuroscience**, v. 165, n. 1, p. 140–148, nov. 2011.
- SOLÀ, C. et al. The Ca²⁺/calmodulin system in neuronal hyperexcitability. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 5, p. 439–455, maio 2001.
- SOLÀ, C.; TUSELL, J. .; SERRATOSA, J. Comparative study of the pattern of expression of calmodulin messenger RNAs in the mouse brain. **Neuroscience**, v. 75, n. 1, p. 245–256, set. 1996.

SORIA-ORTIZ, M. B. et al. A Functional Signature in the Developing Cerebellum: Evidence From a Preclinical Model of Autism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 3 set. 2021.

SPARKS, B. F. et al. Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder. **Neurology**, v. 59, n. 2, p. 184–92, 23 jul. 2002.

SPENCE, R.; SMITH, C. Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. **Behavioral Ecology**, v. 17, n. 5, p. 779–783, 1 set. 2006.

STEPHENSON, J. R. et al. A Novel Human CAMK2A Mutation Disrupts Dendritic Morphology and Synaptic Transmission, and Causes ASD-Related Behaviors. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 8, p. 2216–2233, 22 fev. 2017.

STEWART, A. M. et al. Developing zebrafish models of autism spectrum disorder (ASD). **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 50, p. 27–36, 3 abr. 2014.

STEWART, A. M. et al. Molecular psychiatry of zebrafish. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 2–17, 28 fev. 2015.

STRÖMLAND, K. et al. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 36, n. 4, p. 351–6, abr. 1994.

SULLIVAN, P. F.; DALY, M. J.; O'DONOVAN, M. Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 8, p. 537–551, 10 ago. 2012.

SUN, S. et al. Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons. **Redox Biology**, v. 11, p. 577–585, abr. 2017.

TAKARAE, Y.; SWEENEY, J. Neural Hyperexcitability in Autism Spectrum Disorders. **Brain Sciences**, v. 7, n. 12, p. 129, 13 out. 2017.

TALAMANTES, M. et al. Passive exposure to cannabidiol oil does not cause microbiome dysbiosis in larval zebrafish. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100045, dez. 2021.

TALEB, A. et al. Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in autism and its implications for pharmacological treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111322, maio 2021.

TARTAGLIA, N.; BONN-MILLER, M.; HAGERMAN, R. Treatment of Fragile X Syndrome with Cannabidiol: A Case Series Study and Brief Review of the Literature. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 4, n. 1, p. 3–9, mar. 2019.

TARTAGLIONE, A. M. et al. Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. **Neuropharmacology**, v. 159, p. 107477, nov. 2019.

TAYANLOO-BEIK, A. et al. Zebrafish Modeling of Autism Spectrum Disorders, Current Status and Future Prospective. **Frontiers in Psychiatry**, v. 13, 14 jul. 2022.

THAM, M. et al. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1455–1469, maio 2019.

THOMAS, A. et al. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB 1 and CB 2 receptor agonists in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 5, p. 613–623, mar. 2007.

THOMPSON, T. Autism Research and Services for Young Children: History, Progress and Challenges. **Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities**, v. 26, n. 2, p. 81–107, mar. 2013.

TIDEY, J. W.; MICZEK, K. A. Social defeat stress selectively alters mesocorticolimbic dopamine release: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v. 721, n. 1–2, p. 140–149, maio 1996.

TIERBACH, A. et al. Glutathione S-Transferase Protein Expression in Different Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicological Sciences**, v. 162, n. 2, p. 702–712, 1 abr. 2018.

TIMME-LARAGY, A. R. et al. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 89–101, dez. 2013.

TOMSON, T.; BROMLEY, R. Association of Fetal Exposure to Newer Antiseizure Medications With Neurodevelopment. **JAMA Neurology**, 7 jun. 2021.

TORDJMAN, S. et al. Gene X environment Interactions in Autism Spectrum Disorders: Role of Epigenetic Mechanisms. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, 4 ago. 2014.

TOTH, A. B.; SHUM, A. K.; PRAKRIYA, M. Regulation of neurogenesis by calcium signaling. **Cell Calcium**, v. 59, n. 2–3, p. 124–134, mar. 2016.

TROPEPE, V.; SIVE, H. L. Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism? **Genes, Brain and Behavior**, v. 2, n. 5, p. 268–281, 16 out. 2003.

TURNER, M. The role of drugs in the treatment of autism. **Australian Prescriber**, v. 43, n. 6, p. 185–190, 1 dez. 2020.

VALIM BRIGANTE, T. A. et al. Cannabidiol did not induce teratogenicity or neurotoxicity in exposed zebrafish embryos. **Chemico-Biological Interactions**, v. 291, p. 81–86, ago. 2018.

VILLENEUVE, D. et al. Investigating Alternatives to the fish early-life stage test: A strategy for discovering and annotating adverse outcome pathways for early fish development. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 158–169, 19 jan. 2014.

VOLKMAR, F. et al. DSM-III and DSM-III-R diagnoses of autism. **American Journal of Psychiatry**, v. 145, n. 11, p. 1404–1408, nov. 1988.

WAKADE, C. G. et al. Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 69, n. 1, p. 72–79, 1 jul. 2002.

WANG, J.-H. et al. Interactive effects of morphine and dopaminergic compounds on spatial working memory in rhesus monkeys. **Neuroscience Bulletin**, v. 29, n. 1, p. 37–46, fev. 2013.

WANG, M.-T. et al. Association Between Antipsychotic Agents and Risk of Acute Respiratory Failure in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **JAMA Psychiatry**, v. 74, n. 3, p. 252, 1 mar. 2017a.

WANG, R. et al. Aberrant Development and Synaptic Transmission of Cerebellar Cortex in a VPA Induced Mouse Autism Model. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, 21 dez. 2018.

WANG, R. et al. Evaluation of the Developmental Toxicity Induced by E804 in Zebrafish Embryos. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 14 fev. 2020.

WANG, Y. et al. Cannabidiol attenuates alcohol-induced liver steatosis, metabolic dysregulation, inflammation and neutrophil-mediated injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12064, 21 dez. 2017b.

WEIS, J. S. et al. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences: Killifish from a contaminated site are slow to capture prey and escape predators; altered neurotransmitters and thyroid may be responsible for this behavior, which ma. **BioScience**, v. 51, n. 3, p. 209–217, 1 mar. 2001.

WEITLAUF, A. S. ET AL. Therapies for Children With Autism Spectrum Disorder: Behavioral Interventions Update. **Comparative Effectiveness Review**, 2014.

WILHELM FILHO, D. et al. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). **Aquaculture**, v. 203, n. 1–2, p. 149–158, nov. 2001.

WINATA, C. L. et al. Development of zebrafish swimbladder: The requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers. **Developmental Biology**, v. 331, n. 2, p. 222–236, jul. 2009.

WING, L. Asperger's syndrome: a clinical account. **Psychological Medicine**, v. 11, n. 1, p. 115–129, 9 fev. 1981.

WOOD, A. G. et al. Prospective assessment of autism traits in children exposed to antiepileptic drugs during pregnancy. **Epilepsia**, v. 56, n. 7, p. 1047–1055, jul. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO releases new International Classification of Diseases (ICD 11)**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/detail/18-06-2018-who-releases-new-international-classification-of-diseases-\(icd-11\)](https://www.who.int/news-room/detail/18-06-2018-who-releases-new-international-classification-of-diseases-(icd-11))>. Acesso em: 14 fev. 2023.

WULLIMANN, M. F.; PUELLES, L. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains. **Anatomy and Embryology**, v. 199, n. 4, p. 329–348, 25 fev. 1999.

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, maio 2014.

YUAN, J.; YANKNER, B. A. Apoptosis in the nervous system. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 802–809, out. 2000.

ZALCMAN, G.; FEDERMAN, N.; ROMANO, A. CaMKII Isoforms in Learning and Memory: Localization and Function. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, 4 dez. 2018.

ZAMBERLETTI, E. et al. Cannabidiol 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, 9 ago. 2019.

ZEIDAN, J. et al. Global prevalence of autism: A systematic review update. **Autism Research**, v. 15, n. 5, p. 778–790, 3 maio 2022.

ZHANG, Y. et al. Sulindac attenuates valproic acid-induced oxidative stress levels in primary cultured cortical neurons and ameliorates repetitive/stereotypic-like movement disorders in Wistar rats prenatally exposed to valproic acid. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, n. 1, p. 263–270, jan. 2015.

ZHANG, Y. et al. N-acetylcysteine ameliorates repetitive/stereotypic behavior due to its antioxidant properties without activation of the canonical Wnt pathway in a valproic acid-induced rat model of autism. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 2, p. 2233–2240, fev. 2017.

ZHENG, W. et al. Comparative Transcriptome Analyses Indicate Molecular Homology of Zebrafish Swimbladder and Mammalian Lung. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e24019, 26 ago. 2011.

ZIMMER, A. et al. Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1

receptor knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 10, p. 5780–5785, 1999.

ZIMMERMANN, F. F. et al. Embryological exposure to valproic acid induces social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*): A developmental behavior analysis. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 52, p. 36–41, nov. 2015.

ZLEBNIK, N. E.; CHEER, J. F. Beyond the CB1 Receptor: Is Cannabidiol the Answer for Disorders of Motivation? **Annual Review of Neuroscience**, v. 39, p. 1–17, 2016.

ZOROGLU, S. S. et al. Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 254, n. 3, jun. 2004.

ZUARDI, A. et al. Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. **Journal of Psychopharmacology**, v. 23, n. 8, p. 979–983, 18 nov. 2009.

ZUARDI, A. W. et al. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ^9 -THC in normal subjects. **Psychopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 245–250, mar. 1982.

ZUARDI, A. W. et al. Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. **Journal of Psychopharmacology**, v. 7, n. 1_suppl, p. 82–88, 29 jan. 1993.

ZUARDI, A. W. et al. A Critical Review of the Antipsychotic Effects of Cannabidiol: 30 Years of a Translational Investigation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 32, p. 5131–5140, 12 set. 2012.

ZUARDI, A. W.; ANTUNES RODRIGUES, J.; CUNHA, J. M. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. **Psychopharmacology**, v. 104, n. 2, p. 260–264, jun. 1991.

ZWAIGENBAUM, L. et al. Early Screening of Autism Spectrum Disorder: Recommendations for Practice and Research. **PEDIATRICS**, v. 136, n. Supplement, p. S41–S59, 1 out. 2015.

ANEXO A

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA FCFRP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada “Avaliação dos efeitos do canabidiol sobre a organização cortical e consequências comportamentais induzidas pelo tratamento com o ácido valproico durante o período embrionário do Zebrafish”, registrada sob nº 19.1.243.60.4, sob a responsabilidade de Karla Cristinne Mancini Costa e Alline Cristina de Campos, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto ° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado *ad referendum* em 22/11/2021 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaboradores: Danielle Palma de Oliveira, Tamiris Amabile Valim Brigante, Gabriel Gripp Fernandes.

| | |
|-------------------------|--|
| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
| Vigência da Autorização | 01/05/2019 a 31/08/2022 |
| Espécie/Linhagem/Raça | Peixe <i>Danio rerio</i> |
| Nº de animais | 5520 |
| Peso/Idade | Até 9 dias pós fertilização |
| Sexo | Indiferente |
| Origem | Biotério de Toxicologia ambiental da FCFRP |

Ribeirão Preto, 23 de novembro de 2021.

Prof. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
 Vice- Coordenadora da CEUA-FCFRP

Novel Tools and Methods

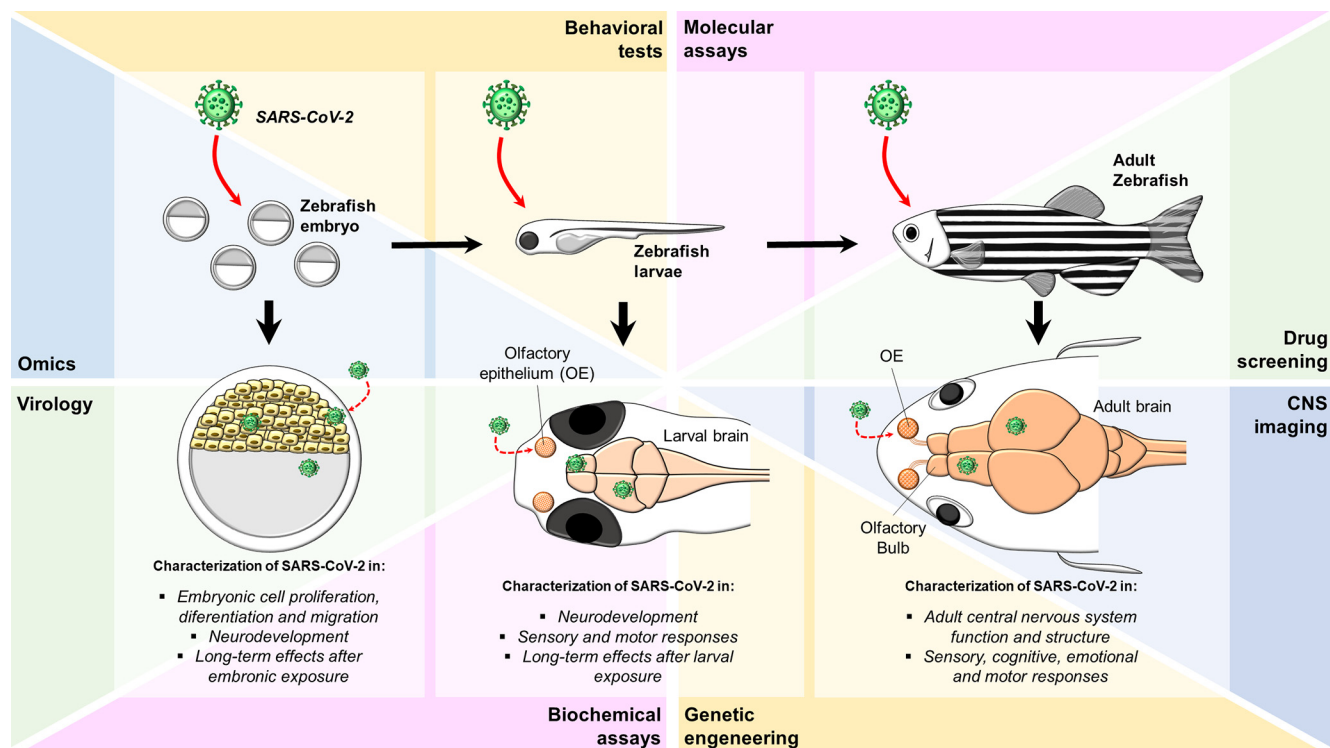
Zebrafish as a Translational Model: An Experimental Alternative to Study the Mechanisms Involved in Anosmia and Possible Neurodegenerative Aspects of COVID-19?

 Karla C. M. Costa,¹ Tamires A. V. Brigante,¹ Gabriel G. Fernandes,¹ Davi S. Scomparin,¹ Franciele F. Scarante,¹ Danielle P. de Oliveira,² and Aline C. Campos¹

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0027-21.2021>

¹Pharmacology of Neuroplasticity Laboratory, Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 14049-900, and ²EcoHumanTox Laboratory, Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analysis, School of Pharmaceutical Science of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil 14049-900

Visual Abstract



The Coronavirus disease-2019 (COVID-19) presents a variability of clinical symptoms, ranging from asymptomatic to severe respiratory and systemic conditions. In a cohort of patients, the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV-2), beyond the classical respiratory manifestations, induces anosmia. Evidence has suggested SARS-CoV-2-induced anosmia can be the result of neurodegeneration of the olfactory pathway. Neurologic symptoms associated with COVID-19 have been reported; however, the precise mechanism and possible long-lasting effects remain poorly investigated. Preclinical models are valuable tools



Cannabidiol for the treatment of autism spectrum disorder: hope or hype?

João F. C. Pedrazzi¹ · Frederico R. Ferreira² · Danyelle Silva-Amaral³ · Daniel A. Lima¹ · Jaime E. C. Hallak¹ · Antônio W. Zuardi¹ · Elaine A. Del-Bel^{1,4} · Francisco S. Guimarães⁵ · Karla C. M. Costa⁵ · Alline C. Campos⁵ · Ana C. S. Crippa⁶ · José A. S. Crippa¹

Received: 15 November 2021 / Accepted: 18 July 2022 / Published online: 29 July 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Rationale Autism spectrum disorder (ASD) is defined as a group of neurodevelopmental disorders whose symptoms include impaired communication and social interaction, restricted and repetitive patterns of behavior, and varying levels of intellectual disability. ASD is observed in early childhood and is one of the most severe chronic childhood disorders in prevalence, morbidity, and impact on society. It is usually accompanied by attention deficit hyperactivity disorder, anxiety, depression, sleep disorders, and epilepsy. The treatment of ASD has low efficacy, possibly because it has a heterogeneous nature, and its neurobiological basis is not clearly understood. Drugs such as risperidone and aripiprazole are the only two drugs available that are recognized by the Food and Drug Administration, primarily for treating the behavioral symptoms of this disorder. These drugs have limited efficacy and a high potential for inducing undesirable effects, compromising treatment adherence. Therefore, there is great interest in exploring the endocannabinoid system, which modulates the activity of other neurotransmitters, has actions in social behavior and seems to be altered in patients with ASD. Thus, cannabidiol (CBD) emerges as a possible strategy for treating ASD symptoms since it has relevant pharmacological actions on the endocannabinoid system and shows promising results in studies related to disorders in the central nervous system.

Objectives Review the preclinical and clinical data supporting CBD's potential as a treatment for the symptoms and comorbidities associated with ASD, as well as discuss and provide information with the purpose of not trivializing the use of this drug.

Keywords Cannabidiol · Autism spectrum disorder · Treatment autism spectrum disorder · Endocannabinoid system · Pharmacological targets · Animal models · Clinical trials · Medical *Cannabis*

Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a set of heterogeneous disorders of early neurodevelopment characterized by impaired social interaction, deficits in communication,

and stereotyped, repetitive, and restrictive behavior patterns (American Psychiatric Association 2013). Although defined by these significant symptoms, the phenotype in ASD patients may vary, ranging from individuals with severe intellectual disability and poor performance in

✉ João F. C. Pedrazzi
joaofranciscopedrazzi@usp.br

¹ Department of Neurosciences and Behavioral Sciences, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

² Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil

³ Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁴ Department of Morphology, Physiology, and Basic Pathology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁵ Department of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁶ Graduate Program in Child and Adolescent Health, Neuropediatric Center of the Hospital of Clinics (CENEP), Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil