



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

CÁSSIA REGINA SUZUKI CAIRES

**EFEITO DO EXTRATO DE *HYPERICUM*
PERFORATUM EM MODELO ANIMAL DE
AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-
NATAL AO ÁCIDO VALPROICO**

São José do Rio Preto
2023

Cássia Regina Suzuki Caires

EFEITO DO EXTRATO DE *HYPERICUM*
PERFORATUM EM MODELO ANIMAL DE
AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-
NATAL AO ÁCIDO VALPROICO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São
José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutora
no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

São José do Rio Preto

2023

Caires, Cássia Regina Suzuki

Efeito do extrato de *Hypericum Perforatum* em modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico / Cássia Regina Suzuki Caires
São José do Rio Preto, 2023.

132 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva/ Co-orientadora: Pra. Dra. Orfa Yineth Galvis Alonso

1. Autismo; 2. *Hypericum perforatum*; 3. Ácido valproico; 4. Modelo animal.

CÁSSIA REGINA SUZUKI CAIRES

Efeito do extrato de *Hypericum Perforatum* em
modelo animal de autismo induzido por exposição
pré-natal ao ácido valproico

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

Co-orientadora e Presidente: Profa. Dra. Orfa Yineth Galvis-Alonso

2º Examinador: Prof. Dr. Victório Bambini-Júnior

3ª Examinador: Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy Pereira

4ª Examinadora: Profa. Dra. Iohanna Deckmann

5º Examinadora: Profa. Dra. Mellanie Fontes-Dutra

Suplentes:

Profa. Dra. Bruna Andrade Karam

Profa. Dra. Glória Elisa Florido Mendes

São José do Rio Preto, 31/08/2023

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	viii
AGRADECIMENTOS	ix
EPÍGRAFE	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xxi
RESUMO.....	xxiv
ABSTRACT	xxvi
1 INTRODUÇÃO	28
1.1 Modelos animais de TEA	31
1.1.1 Modelos associados a fatores genéticos	31
1.1.2 Modelos associados a fatores ambientais: a exposição ao ácido valproico.....	32
1.2 Testes comportamentais.....	35
1.3 Opções terapêuticas.....	37
1.3.1 <i>Hypericum perforatum</i>	38
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos.....	40
3 METODOLOGIA.....	41
3.1 Aspectos Éticos e Animais.....	41
3.2 Aleatorização e estudo cego	42
3.3 Delineamento Experimental	43

3.4 Testes comportamentais	45
3.4.1 Campo Aberto	46
3.4.2 Reconhecimento do Objeto Novo.....	47
3.4.3 Interação Social	49
3.4.4 Teste Labirinto em Cruz Elevado	50
3.5 Análise histológica	51
3.5.1 Perfusão e preparação do tecido	51
3.5.2 Coloração.....	51
3.5.3 Contagem neuronal.....	51
3.6 Análise Estatística	52
4 RESULTADOS	54
4.1 Testes Comportamentais	56
4.1.1 Campo Aberto	56
4.1.2 Reconhecimento do Objeto Novo.....	60
4.1.3 Interação Social	62
4.1.4 Labirinto em Cruz Elevado	64
4.2 Contagem neuronal	68
5 DISCUSSÃO	70
5.1 Testes Comportamentais	72
5.1.1 Campo Aberto	72
5.1.2 Reconhecimento do Objeto Novo.....	72
5.1.3 Interação Social	73

5.1.4 Labirinto em Cruz Elevado	74
5.2 Contagem neuronal	75
5.3 Considerações Finais	75
6 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICE	100
Apêndice A. Artigo publicado	100
Apêndice B. Artigo a ser submetido a revista “Biological Psychiatry” (Fator de impacto: 10.6).....	109
ANEXO	132
Anexo A. Licença de aprovação do CEUA.....	132

Dedico todos estes anos de muito trabalho aos meus pais e meu esposo, sem os quais não seria possível o início e o término deste ciclo que muito me acrescentou. E à minha filha, Clara, que um dia entenderá que o ensino e o conhecimento, além da salvação, são os bens mais preciosos que acharemos nessa terra.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo o que Ele é, sem a misericórdia de Cristo eu não estaria aqui. Sem a sua infinita graça, eu não seria capaz de concluir mais esta etapa. Te adoro meu Senhor, não pelo o que fazes, mas sim, porque tudo o que há em mim te adora! Obrigada meu Senhor e Salvador! Cristo vive em mim e, por isso consigo concluir este ciclo.

Iniciei o meu processo de doutoramento no ano de 2017, durante estes anos, além de conhecimento o que mais adquiri foi o crescimento pessoal. Tornei-me professora de uma instituição de ensino superior tornei-me esposa e, por fim e o mais desafiador, mãe. Durante esta etapa a carga de responsabilidades triplicou, ao mesmo passo do que a maturidade, por isso sou agraciada pelo processo que vivi e por ter pessoas tão excepcionais ao meu lado.

Como tudo na minha vida este doutorado não foi sonhado sozinho, para isso tive o apoio, sempre eterno, da minha mãe Miriam e do meu pai Edimilson. Vocês sempre serão a minha base e, por vocês existirem eu pude realizar mais este sonho. Obrigada por todo apoio, ajuda, incentivo, cuidado, paciência, amor, enfim, obrigada pela minha vida, vocês são o meu bem mais precioso. Creio que Deus não falha em Seus planos e, nos fazer pais e filha, foi um dos planos mais lindo que Ele sonhou pra mim!

Agradeço às minhas irmãs Débora e Giovana, por todo acolhimento em todos os momentos, por me entenderem como ninguém e, por serem as melhores tias que a Clarinha poderia ter. Vocês são minhas melhores amigas e, eu as amo de paixão! Por

vocês posso doar um rim, mas nunca buscar um copo de água. Ah obrigada por todos os almoços, gordices, cafés e tardes no salão, com vocês estes momentos foram muito mais especiais.

Agradeço ao meu esposo Thales, pela companhia e por ser o meu maior incentivador. Você é o sacerdote do meu lar e eu, extremamente feliz por seguir o seu sacerdócio, sigo tranquilamente suas ordenanças, pois sei que elas sempre serão as melhores escolhas para a nossa casa. Sua sabedoria, o amor por Cristo e pelo próximo me constroem, obrigada por sempre me fazer querer ser melhor (e deixar a janta pronta para quando você chegar) e, por ser a pessoa quem mais acreditou em mim nestes anos, te amo. Sem você eu não conseguiria terminar este doutorado. Obrigada por ter me dado o amor da minha vida, a nossa filha Clara. Sou eternamente grata a Deus pelo esposo honroso, carinhoso, sábio, divertido, educado e amável que Ele me permitiu ter. Você é quem eu mais preciso nos momentos difíceis e, sei que posso contar com sua presença e amor em todos eles. Te amo e te amarei para sempre!

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de ser mãe, este foi o papel mais desafiador e doloroso que tive nestes anos de doutorado. Minha filha chegou em meio ao caos do término deste ciclo e, descobri que ela era o que faltava em minha vida. Quero que ela entenda que a graduação e a pós-graduação não farão dela uma profissional bem sucedida, mas sim o amor pelo próximo e as pessoas que caminharão com ela nos processos que virão. Não sei o que ela escolherá cursar (ou se escolherá cursar), mas de algo tenho absoluta certeza, a apoiarei em todas as escolhas e mostrarei que o conhecimento é libertador! Te amo minha princesa e, prometo recompensar todo esse tempo de ausência.

Agradeço aos meus sogros, Alcides e Márcia, por ter me auxiliado em vários momentos durante este processo, por terem sido abrigo e colo nas horas difíceis e, por serem a nossa base. Obrigada, vocês são tudo o que um dia eu pedi a Deus. Obrigada dn Marcia, pelos vários cafés e bolos que a senhora fez pra mim quando eu saia da faculdade pra ir pra Unilago (podia repetir aquele bolo de chocolate né?? Kkk). Eu os amo. Também agradeço ao meu cunhado Samuel, por ?????????????????? (kkkkkkkkkk, brincadeiras), agradeço a ele por sempre me fazer rir quando eu queria chorar e, por ter ido para os EUA na reta final do doutorado e ter deixado a mãe dele só pra nós (kkkkk).

Agradeço vocês, intensamente, por fazerem parte dos meus dias, desempenhando uma tarefa magnífica ao meu lado, a do amor em tempo integral, eu os amo!

Agradeço a minha amiga e orientadora, profa. Dra. Orfa Yineth Galvis-Alonso, quem me ensinou a amar e a vivenciar esse processo e a entender que todos estamos em um, alguns mais à frente e outros em etapas anteriores. Portanto, curtir e aproveitar cada segundo do processo, é a melhor forma de se viver. Agradeço a ela, por me ensinar uma profissão e por ser a orientadora mais exigente e excepcional que eu poderia ter (prof, a senhora tirou meu couro kkk), ela me fez crescer e ultrapassar meus limites e paradigmas. Obrigada professora, por ter insistido, investido e me ouvido durante todos estes anos. Sei que às vezes fui uma aluna “levada”, mas estava vivendo o meu processo de aluna e curtindo ser a única orientanda do lab. Obrigada por ter me acolhido no momento em que mais precisei, a senhora foi a minha base e ponto de refúgio em vários momentos da minha vida pessoal. Obrigada por no dia 23/07/2021 ser a primeira pessoa a me ouvir, me abraçar e ficar feliz com a notícia da minha filha. A senhora tem um espaço enorme em meu

coração, a levarei como amiga, para sempre! Obrigada Prof.^a, por me acolher, me ensinar e acreditar em meu processo!

Durante estes anos de doutorado tive a oportunidade de ter e conhecer vários alunos estagiários. Eles mal sabem que quando saiam eu sentia muuuuito e sempre queria que eles ficassem mais, mesmo que fosse o último ano de graduação (né Victor kkk). Na época em que os animais do projeto estavam no biotério, os estagiários eram os responsáveis pelo tratamento no período noturno e, pelo cuidado com os ratinhos aos fins de semana, por conta deles, eu pude ter alguns fins de semana livres. Obrigada queridos, sei que são e serão grandes profissionais e, lembrem-se: nada de me cobrar consultas, pois posso mandar uma carta para o reitor, falando que tudo foi uma farsa (kkkkkk). O meu processo foi mais leve e divertido por conta destes alunos, obrigada pela bagagem excepcional de histórias, conselhos, alegrias e festinhas. Sei o nome de todos, pois cada um que passou deixou um pouco de si, são estes a minha equipe de milhões: César, Bárbara, Igor, Hélder, Aninha, Luciana, Larissa, Milena, Karen, Gabriele, Bruna, Carla, João Guilherme, Ayvin, Rafael, Clélia, Victor, Luana, Samir e Arthur, obrigada equipe, conseguimos, vocês são fora de sério e, pra sempre: Qualquer coisa me grita!!!

Deus sempre manda alguns anjos para a nossa caminhada ficar mais leve e a gente dar conta do processo. Durante o doutorado, tive a oportunidade de conhecer a Fernanda, minha amiga, conselheira, a pessoa responsável pelos meus 10kg a mais, minha ouvinte, meu consolo, enfim, minha fiel escudeira. Obrigada amiga, te conhecer foi um presente de Deus. Você chegou no momento mais crítico e, fez de tudo (e mais um pouco) para dar conta da parte experimental que, eu não poderia fazer por conta da gravidez. Obrigada por ter vindo e ter feito tudo com maestria. Sem você, eu não sei o que seria. Obrigada pela

amizade, você mora no meu coração amiga! Além da Fer, também pude contar com a ajuda do Sandro, na parte experimental e, da Camila, para a correção das várias versões da tese. Agradeço imensamente! Obrigada Ca, por dividir o seu processo de adaptação conosco e por nos viciar em cappuccino (kkk). Também pude contar com a ajuda e o auxílio da profa. Dra. Ana Luiza Bossolani Martins, uma amiga que me abriu as portas para essa pesquisa e, sem nem me conhecer me agraciou com esse projeto. Obrigada Ana, a leve comigo, escrevemos uma linda história juntas e brindamos com a publicação do nosso artigo. Obrigada por tanto me ensinar! Ao prof. Dr. Jorge Mejia Cabeza, agradeço por todo auxílio com os programas de análise. Ele desenvolveu todos os programas de uma forma brilhante e (apesar da cara de bravo) me ensinou pacientemente a trabalhar com cada um deles (em todas as vezes que eu me esquecia...rsrsrs). Obrigada Jorge, um dia espero ser uma profissional tão brilhante quanto você!

Mais uma vez, a equipe do LMM fez-se presente em minha vida. Obrigada a minha primeira casa, UNESP, foi um prazer enorme poder retornar e tirar as fotos das imagens histológicas, o LMM mora no meu coração. Agradecimentos especiais ao meu amigo cheio dos rolos Luiz Henrique Guerra, ao Luiz Falleiros (o Louis, que nos dias que estive ai, comprou a rosca de chocolate), aos meus (pra sempre) orientadores Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga e Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Villamior, por mais uma vez me permitir usufruir dos equipamentos e do laboratório.

Agradeço à Profa. Dra. Eloiza Tajara pela confiança a nós concedida e a mediação para obtenção da bolsa de doutorado. Ao programa de pós-graduação em Ciências da saúde e à CAPES pela bolsa concedida durante estes anos.

Agradeço aos Profs^a Drs^a Carlos Girardi, Heloísa Cristina Caldas e Rodrigo Neves Romcy Pereira, que compuseram a banca da minha qualificação, suas correções e ideias acrescentaram muito para a elaboração da versão final da tese.

Agradeço à banca examinadora, Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy Pereira, Profa. Dra. Iohanna Deckmann, Profa. Dra. Mellanie Fontes-Dutra e, Prof. Dr. Victório Bambini-Júnior, por terem aceitado o convite para a avaliação e discussão deste estudo e, assim, somar suas experiências e conhecimentos a estes aqui apresentados.

A estes o meu profundo agradecimento e a admiração mais terna que existe em mim!

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos” (Pv 16:3)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Número de artigos indexados, por ano, na plataforma PUBMED que contém os descritores “ <i>animal model</i> ”, “ <i>autism</i> ” e “ <i>valproic acid</i> ”. Busca realizada em 01/08/2023.	30
Figura 2.	Espermatozoides no esfregaço vaginal das fêmeas, corados por Violeta Cristal e fotografados na objetiva de 40x.	43
Figura 3.	Aplicação de gavagem nos ratos, translacionalmente refere-se a via oral dos seres humanos, já que o conteúdo contido na cânula é empurrado diretamente no esôfago dos animais, de modo que a droga perfaça todo o caminho da administração oral.	44
Figura 4.	Linha temporal do estudo que avaliou o efeito do HP em ratos expostos, no período pré-natal, ao AVP. As abreviações indicam: SPMTZ: espermatozoides; E: dia embrionário; DPN: dia pós-natal; CA: Campo Aberto; RON: Reconhecimento do Novo Objeto; IS: Interação Social; LCE: Labirinto em Cruz Elevado; AVP: ácido valproico; SF: soro fisiológico; HP: <i>Hypericum perforatum</i> ; n: número amostral.	45
Figura 5.	Representação da vista superior do aparato utilizado para realizar os testes de campo aberto (CA), reconhecimento de objetos novos (RON) e interação social (IS). Na figura, elaborada utilizando ferramentas gráficas do Biorender, mostra um rato experimental durante o teste de CA.	47
Figura 6.	Teste de reconhecimento de objetos novos (RON) durante (A): fase de treinamento e (B): fase de teste. Figura elaborada utilizando ferramentas gráficas do Biorender.	48
Figura 7.	Ratos durante o teste de interação social (IS). O esquema representa o	49

aparato contendo a caixa utilizada para abrigar o rato de interação durante o teste. Figura elaborada utilizando ferramentas gráficas do Biorender.

- Figura 8.** Rato no braço aberto, durante o teste de LCE para a avaliação da ansiedade dos animais experimentais. Figura elaborada utilizando ferramentas gráficas do Biorender. 50
- Figura 9.** Imagem da camada de células piramidais do campo 1 do Corno de Ammon (CA1) do hipocampo (HC) de um dos ratos experimentais. A imagem mostra áreas de 50 μm^2 que foram usadas para quantificar os neurônios (setas). Cinco áreas em CA1, 2, 4 e nas lâminas superior e inferior do giro denteado (GD) e, três áreas em CA3. 52
- Figura 10.** Quantidade de animais nascidos por ninhada (A). Número de filhotes machos e fêmeas nascidos por rata (B). SF: soro fisiológico; AVP: ácido valproico. Valores expressos como média $\pm$ DPM. 53
- Figura 11.** Avaliação morfológica de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal com *Hypericum perforatum* (HP) ou soro fisiológico (SF). Parâmetros avaliados: abertura dos olhos (A); peso corpóreo (B); dobra caudal (C); presença da cromodaciorreia (D) e alteração das patas dianteiras (E). DPN: dia pós-natal. 55
- Figura 12.** Comportamento no teste do CA, realizado no DPN 31 de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. As figuras indicam a avaliação da: **A e A.1**, atividade exploratória, **B**, locomoção, **C** tempo de movimentos repetitivos e, **D e D.1** ansiedade. 56
- Figura 13.** Perfil comportamental no teste de CA de ninhadas de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal 57

com HP ou SF. As figuras indicam a avaliação da: **A e A.1**, atividade exploratória, **B**, locomoção, **C** tempo de movimentos repetitivos e, **D e D.1** ansiedade.

Figura 14. Atividade exploratória de um novo ambiente no teste do CA, de ratos (**A e A.1**) e ninhadas (**B e B.1**) expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. 58

Figura 15. Comportamento no campo aberto dos animais expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados no período pós-natal com SF com e sem alteração da cauda. Os parâmetros comportamentais avaliados foram: a atividade exploratória (**A e A.1**) e a locomoção (**B**), o tempo de movimentos repetitivos (**C**), a ansiedade (**D e D.1**) e a capacidade de explorar um novo ambiente (**E e E.1**). 59

Figura 16. Tempo de contato com o objeto novo ou o objeto de treino, durante o teste de reconhecimento do novo objeto, de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Também é mostrado o índice de discriminação dos objetos. (*) $p=0,01$. 60

Figura 17. Comportamento no teste de RON de ninhadas de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. À esquerda, gráfico do tempo de contato com o objeto novo, no centro, tempo de contato com o objeto de treino; e o índice de discriminação dos objetos, à direita. (*) $p=0,01$. (***) $p<0,0001$. 61

Figura 18. Comportamento no teste de RON, de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou SF e tratados com SF no período pós-natal, considerando a morfologia da cauda. Somente foi detectada alteração da cauda em animais expostos ao AVP. (*) $p=0,0110$. 61

- Figura 19.** Avaliação da sociabilidade de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Comparação do tempo de permanência na zona de interação, fora da zona de interação e o índice de interação social. **62**
- Figura 20.** Avaliação da sociabilidade de ninhadas de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Comparação do tempo de permanência na zona de interação, fora da zona de interação e o índice de interação social. (*) $p=0,01$. **63**
- Figura 21.** Avaliação da interação social dos animais com e sem alteração da cauda, expostos no período pré-natal ao AVP e tratados no período pós-natal com SF, comparados ao grupo SF-SF. **63**
- Figura 22.** Comportamento no teste do labirinto em cruz elevado de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Avaliação do comportamento do tipo ansioso (**A e A.1**), do nível de exploração (**B, B.1 e B.2**), do comportamento repetitivo (**C**) e de caminhada (**D**). (***) $p= <0,0001$. **65**
- Figura 23.** Comportamento no teste no LCE de ninhadas de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Avaliação do comportamento do tipo ansioso (**A e A.1**), do nível de exploração (**B, B.1 e B.2**), do comportamento repetitivo (**C**) e de caminhada (**D**). **66**
- Figura 24.** Avaliação comportamental no LCE dos animais, com e sem alteração da cauda, expostos no período pré-natal ao AVP ou SF e tratados no período pós-natal com SF. Avaliação do comportamento do tipo ansioso (**A e A.1**), do nível de exploração (**B, B.1 e B.2**), do comportamento repetitivo **67**

(C) e de caminhada (D).

Figura 25. Imagem representativa do hipocampo dorsal de um dos ratos do **69** experimento (A) e densidade neuronal em CA1 (B), CA2 (B.1), CA3 (B.2), CA4 (B.3), giro denteado – lâmina superior (C) e giro denteado – lâmina inferior (C.1).

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABA	Análise do comportamento aplicada
AP	Antero-posterior
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In vivo Experiments</i>
AVP	Ácido valproico
BA	Braço aberto
BF	Braço fechado
CA1	Região 1 do corno de Ammon
CA2	Região 2 do corno de Ammon
CA3	Região 3 do corno de Ammon
CA4	Região 4 do corno de Ammon
CA	Campo aberto
cm	Centímetros
cm²	Centímetros quadrados
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DI	Deficiência intelectual
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPM	Desvio Padrão da Média
DPN	Dia pós-natal
DSM-5	Quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, da Associação Americana de Psiquiatria
E	Dia embrionário
ERO	Espécie reativa de oxigênio

FAMERP Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FXS	Síndrome do Cromossomo X Frágil
g	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	glutamato descarboxilase
GD	Giro denteado
GD-i	Giro denteado – lâmina inferior
GD-s	Giro denteado – lâmina superior
h	Horas
HC	Hipocampo
HE	Hematoxilina e eosina
HP	<i>Hypericum perforatum</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IS	Interação social
IP	Intraperitoneal
iPSC	Células-tronco pluripotentes induzidas
Kg	Kilogramas
KO	<i>Knockout</i>
LCE	Labirinto em cruz elevado
lux	Iluminância
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
n	Número amostral

QI	Quociente de inteligência
RNA	Ácido ribonucleico
RON	Reconhecimento do objeto novo
SF	Soro fisiológico
SNC	Sistema nervoso central
SPMTZ	Espermatozoides
TDAH	Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade
TEA	Transtorno do espectro autista
TOC	Transtorno obsessivo-compulsivo
TRPC6	Canal de cátion de potencial transitório do receptor da subfamília C membro 6
USP	Universidade de São Paulo
°C	Graus Celsius
μm	Micrometro
μm²	Micrometro quadrado
%	Porcentagem

RESUMO

Introdução: Os transtornos do espectro autista (TEA) são caracterizados pela apresentação de interesse restrito, movimentos repetitivos e déficits na comunicação e na interação social. Afetam mais o sexo masculino e apresentam alta prevalência na população mundial. A exposição ao ácido valproico (AVP), durante o período embrionário, aumenta a incidência do transtorno e este fato tem sido utilizado para a geração de um modelo animal de autismo. Pacientes e camundongos que replicam características do TEA apresentam déficits comportamentais e movimentos repetitivos, assim como uma redução na expressão do canal de cátion de potencial transitório do receptor da subfamília C membro 6 (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6* - TRPC6) e nos níveis do ácido gama-aminobutírico (*Gamma-AminoButyric Acid* – GABA). O *Hypericum perforatum* (HP) pode agir nestas vias por meio do resgate das alterações comportamentais e dos níveis de TRPC6 e bloqueio da captação do GABA. **Objetivo:** Avaliar o efeito do HP nos ratos jovens expostos, no período pré-natal, ao AVP, por meio dos testes comportamentais (campo aberto, reconhecimento do novo objeto, interação social e labirinto em cruz elevado) e da quantificação neuronal do hipocampo. **Material e Métodos:** Ratas grávidas foram tratadas no dia embrionário 12,5 com uma injeção intraperitoneal de 600 mg/kg de AVP ou 1 ml/100g de soro fisiológico (SF). Do dia pós-natal 24 ao 30, os filhotes machos foram tratados, a cada 12 horas, com 1 ml/100g de SF ou com 1g/Kg de HP, por gavagem (total de 14 doses). Nos dias seguintes, o comportamento dos animais foi avaliado, na sequência dos testes comportamentais de campo aberto, reconhecimento do objeto novo, interação social e labirinto em cruz elevado (um teste por dia). Finalmente, os cérebros dos animais foram processados em parafina, corados com hematoxilina e eosina, e analisada a densidade neuronal no hipocampo dorsal bilateral. **Resultados:** Os ratos dos grupos SF-SF e SF-HP (expostos ao SF no período pré-natal) apresentaram morfologia corporal normal enquanto 78% dos grupos expostos ao AVP pré-natal (AVP-SF e AVP-HP) apresentou deformidade na cauda (mais curta e com um calo). A abertura ocular ocorreu entre o DPN14 e 16 em todos os grupos e não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos de filhotes, na curva de peso nem no comportamento expresso nos testes do campo aberto, reconhecimento de objeto novo, interação social e labirinto em cruz elevado. **Conclusões:** Ratos machos jovens expostos no período pré-natal ao AVP apresentam alterações morfológicas sem características comportamentais

similares às dos transtornos do espectro do autismo. Tal condição pode ser justificada por uma provável ausência de suscetibilidade genética dos animais expostos ao AVP. Devido à ausência de reprodução das características similares às do TEA, não foi possível avaliar o efeito do *Hypericum perforatum*, que foi desprovido de efeitos adversos e aparentemente, foi benéfico para a aquisição de memória.

Palavras - Chave: 1. Autismo; 2. *Hypericum Perforatum*; 3. Ácido valproico; 4. Modelo Animal.

ABSTRACT

Introduction: Autism Spectrum Disorders (ASD) are characterized by the presence of restricted interest, repetitive movements and social and communication deficits. Males are more affected for this condition and present high prevalence. Exposure to valproic acid (VPA) during the embryonic period increases the incidence of the disorder, a fact that has been used to obtain an animal model of autism. Patients and mice that replicate characteristics of ASD showed behavioral deficits and repetitive movements, as well as a reduction in the expression of the Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6 (TRPC6) cation channel and in the Gamma-Amino Butyric Acid (GABA) levels. *Hypericum perforatum* (HP) can act on these pathways by rescuing behavioral changes and TRPC6 levels and blocking GABA uptake. **Objective:** To evaluate the effect of HP in juvenile rats prenatally exposed to VPA, through behavioral tests (open field, new object recognition, social interaction and elevated plus maze) and neuronal quantification of the hippocampus. **Material and Methods:** Pregnant rats were treated on embryonic day 12.5 with an intraperitoneal injection of 600 mg/kg of VPA or 1 ml/100g of saline solution (SS). From the 24th to the 30th postnatal day, the male pups were treated, every 12 hours, with 1 ml/100g of SS or with 1g/Kg of HP, by gavage (total of 14 doses). In the following days, the animals' behavior was evaluated in the open field, recognition of the new object, social interaction and elevated plus maze tests (one test per day). Finally, the animals' brains were processed in paraffin, stained with hematoxylin and eosin and analyzed for neuronal density in the bilateral dorsal hippocampus. **Results:** Rats from the SS-SS and SS-HP groups (exposed to SS during the prenatal period) showed normal body morphology while 78% of the groups exposed to prenatal VPA (VPA-SS and VPA-HP) presented deformity in the tail (shorter and with a callus). Eye opening occurred between DPN14 and 16 in all groups, and no statistically significant differences were identified, between the four groups of pups, in the weight curve or in the behavior expressed in the open field tests, new object recognition, social interaction and the elevated plus maze. **Conclusions:** Young male rats exposed prenatally to VPA showed morphological alterations without ASD-like behavioral features. Such a condition can be justified by an absence of genetic susceptibility of animals exposed to VPA. Due to the lack of reproduction of ASD-like features, it was not possible to evaluate the effect of *Hypericum perforatum*, which was devoid of adverse effects and seems to be beneficial for memory acquisition.

Key Words: 1. Autism; 2. *Hypericum Perforatum*; 3. Valproic acid; 4. Animal Model.

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição heterogênea de manifestações comportamentais de desenvolvimento amplamente variável. É caracterizado por déficits na comunicação e na interação social e, aumento do interesse restrito e dos comportamentos repetitivos ^(1, 2, 3). Atualmente, o TEA possui uma prevalência mundial de um em cada 100 indivíduos e uma probabilidade de 4,2 meninos para uma menina ⁽⁴⁾, com um notório aumento nos últimos 10 anos ^(5, 6). Entretanto, consideramos que este aumento represente também uma manifestação de outros fatores, como conscientização, ampliação dos critérios diagnósticos e detecção precoce ^(2, 7).

Para ser diagnosticado com TEA, uma pessoa deve mostrar evidências de dificuldades em cada um dos três subdomínios de comunicação social (déficits na reciprocidade socioemocional, nos comportamentos comunicativos não-verbais e no desenvolvimento, manutenção e compreensão de relacionamentos). Deve ter ou ter tido dificuldade em dois dos quatro diferentes comportamentos sensório-motores repetitivos e restritos (movimentos motores estereotipados ou repetitivos com o uso de objetos ou fala, insistência na mesmice, adesão inflexível às rotinas ou padrões ritualizados de comportamento verbal e não-verbal, interesses fixados e altamente restritos que são anormais em intensidade ou foco e, hiperreatividade ou hiporreatividade a informações sensoriais ou interesses incomuns em aspectos sensoriais do ambiente) ⁽⁸⁾.

Segundo a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-5) de 2013, o termo “espectro” representa a variabilidade na gravidade dos sintomas. Compreendendo indivíduos levemente comprometidos e de alto funcionamento, com quociente de inteligência (QI) normal ou elevado, que levam uma vida independente ⁽⁹⁾, a casos gravemente prejudicados

que requerem suporte especializado de longo prazo ^(7, 8), abrangendo indivíduos com deficiência intelectual (DI) grave e de baixo desempenho em habilidades comportamentais adaptativas ⁽⁹⁾.

Os sintomas podem variar de início precoce, no primeiro ano de vida e, de surgimento tardio, no segundo ano de vida, com possível regressão de habilidades previamente adquiridas ⁽²⁾. A tríade comportamental do TEA, que compreende déficit na interação social e aumento da movimentação repetitiva, apresenta-se acompanhada de outras comorbidades, como transtornos psiquiátricos múltiplos, ansiedade ⁽⁸⁾ depressão ⁽¹⁰⁾, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) ⁽¹¹⁾, epilepsia ⁽¹²⁾, problemas gastrointestinais, distúrbios do sono ⁽¹³⁾, alterações sensoriais ⁽¹⁴⁾, transtorno alimentar, dificuldade de aprendizado, DI e transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) ⁽⁷⁾.

O TEA não possui uma única etiologia, e sim, uma série de distúrbios cerebrais distintos, causados por uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais ⁽¹⁵⁾. O fator etiológico é desconhecido em 85% dos casos ⁽¹⁶⁾ e pode ser identificado em apenas 15% dos pacientes ⁽¹⁷⁾.

Os fatores genéticos foram apontados de forma mais explícita, levando a uma grande proporção de evidências genéticas na etiologia do TEA ^(18, 19). Irmãos de crianças com TEA têm um risco de oito a 20% de desenvolver o transtorno ^(20,18). Este dado aumenta consideravelmente ao se tratar de gêmeos idênticos, com 36 a 95% de chance de desenvolver o TEA e, em gêmeos não idênticos a probabilidade do distúrbio diminui para 0-30% ^(21, 22).

Além disso, foi demonstrado que genes únicos podem aumentar o risco do TEA, como mutações em FMR1 (síndrome do X frágil), MECP2 (síndrome de Rett), TSC1/TSC2 (complexo de esclerose tuberosa), CNTNAP2 (displasia cortical-focal epilética), ADNP (dismorfismo facial específico) e CACNA1C (síndrome de Timothy),

abrangendo também anormalidades cromossômicas, como duplicações 15q11–13 herdadas da mãe (síndrome dup15q) ⁽¹⁹⁾.

Alguns fatores ambientais associados ao TEA foram identificados, incluindo exposição materna a poluentes ambientais ^(23, 24), uso de ácido valproico (AVP), misoprostol e talidomida durante a gravidez ⁽²⁵⁾, hipertensão, diabetes e obesidade materna ⁽²⁶⁾, curto intervalo entre as gestações ⁽²⁷⁾, baixo peso ao nascer e prematuridade ⁽²⁸⁾. Estudos mostram que há um risco de 10,93% de crianças apresentar alguma malformação congênita (de qualquer tipo) ⁽²⁹⁾ e um risco de 2,4 a 4,42% de desenvolverem o TEA, quando expostas ao AVP, no período intraútero ⁽³⁰⁾.

Exame *post-mortem* de encéfalos de pacientes com TEA revelou mudanças globais, incluindo a desorganização das substâncias cinzenta e branca, aumento do número de neurônios, diminuição do volume do soma neuronal e aumento do neurópilo, refletindo mudanças na densidade das espinhas dendríticas, vascular e glial. Com achados consistentes relatados no córtex pré-frontal, giro fusiforme, córtex cingulado, hipocampo, amígdala, cerebelo e tronco cerebral ⁽³¹⁾.

Anormalidades no hipocampo (HC) estão relacionadas aos principais sintomas do TEA, como as disfunções cognitivas e o comportamento social. Assim, o HC é uma estrutura importante em termos de etiologia do transtorno ⁽³²⁾. Vários estudos relataram reduções no tamanho neuronal com um aumento da densidade de empacotamento celular, bem como, a presença de arborização dendrítica menos complexa no HC de indivíduos com TEA. A região do corno de Ammon 1 (CA1) possui um aumento de neurônios piramidais, enquanto há uma migração anormal e distorção das camadas celulares no giro denteado (GD), indivíduos com TEA apresentam terminais axônicos inchados (denominados esferoides) em todas regiões do Corno de Ammon (CA1, CA2, CA3 e CA4) do HC ⁽³¹⁾.

Devido à escassez de trabalhos envolvendo seres humanos e a neuropatologia do TEA, os estudos utilizando os modelos animais apresentam um papel importante no conhecimento da fisiopatologia do transtorno. Além de replicar algumas características neuropatológicas observadas em estudos *post mortem* de indivíduos com TEA, um achado comum em vários modelos animais de autismo é o aumento de neurônios nas regiões do Corno de Ammon, a diminuição do peso cerebelar e a presença da diminuição da densidade pós-sináptica no HC ⁽³¹⁾.

1.1 Modelos animais de TEA

Os mecanismos responsáveis pelo TEA não são totalmente compreendidos, portanto, modelos animais que repliquem algumas das alterações comportamentais, neuroanatômicas, bioquímicas e as deficiências cognitivas podem auxiliar para a melhor compreensão da fisiopatologia do TEA ^(25, 33). Estes modelos animais devem apresentar manifestações clínicas típicas do TEA como os déficits sociais e os comportamentos repetitivos/estereotipados ⁽³⁴⁾. Como qualquer outro modelo animal de transtornos neurobiológicos, os modelos animais de TEA foram desenvolvidos a fim de obter informações de forma translacional.

1.1.1 Modelos associados a fatores genéticos

Os exemplos de modelos roedores de TEA induzidos geneticamente mais comuns são os BTBR T + tf/J, que exibem déficits comportamentais observados em indivíduos com TEA ⁽³⁵⁾; o FMR1 KO (*knockout*) que são modelos de camundongos com síndrome do Cromossomo X Frágil (FXS) e que representa 24% de concomitância com o TEA ^(36, 37); os camundongos mutantes para Neuroliginas 3 e 4 (Nlgn-3 e Nlgn-4), que apresentam mutações nos genes *NLGN-3* e *NLGN-4* e estão fortemente implicados no

desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos, como o TEA ⁽³⁸⁾; os camundongos mutantes para a família de genes *Shank* (Shank-1 KO, Shank-2 KO e Shank-3 KO), os quais são associados aos transtornos idiopáticos do espectro autista e os camundongos TSC1 e TSC2 KO, que correspondem ao modelo animal de esclerose tuberosa, cuja desregulação nos genes *TSC1* e *TSC2* prejudica o crescimento e a proliferação celular de proteínas responsáveis pela plasticidade sináptica, o que pode levar ao fenótipo de TEA ⁽³⁹⁾.

1.1.2 Modelos associados a fatores ambientais: a exposição ao ácido valproico

Alguns modelos animais induzidos por fatores ambientais incluem os ratos ou os camundongos expostos no período pré-natal à resposta imunológica materna, causada por infecção respiratória com o vírus influenza ⁽⁴⁰⁾, lipopolissacarídeo ⁽⁴¹⁾, polinosina:citosina, uma proteína sintética de cadeia dupla de ácido ribonucleico (RNA) que induz uma reação imune do tipo antiviral ⁽⁴²⁾ ou por inflamação materna desencadeada pela injeção de imunógenos como interleucina-1 (IL-1) e IL-6 durante a gravidez ⁽⁴³⁾. Características similares às do TEA também foram encontradas nos roedores expostos no período pré-natal a alguns fármacos, tais como, AVP, talidomida, misoprazol ⁽⁴⁴⁾ e ácido propanoico ⁽²⁵⁾.

Dos modelos induzidos por fatores ambientais, acima citados, os ratos e os camundongos expostos no período pré-natal ao AVP são os mais amplamente estudados ^(45, 46, 47, 48, 49). Conforme demonstrado na Figura 1, na última década, o número de pesquisas utilizando estes modelos aumentou consideravelmente, devido a sua forte relevância etiológica e facilidade de obtenção ⁽⁵⁰⁾.

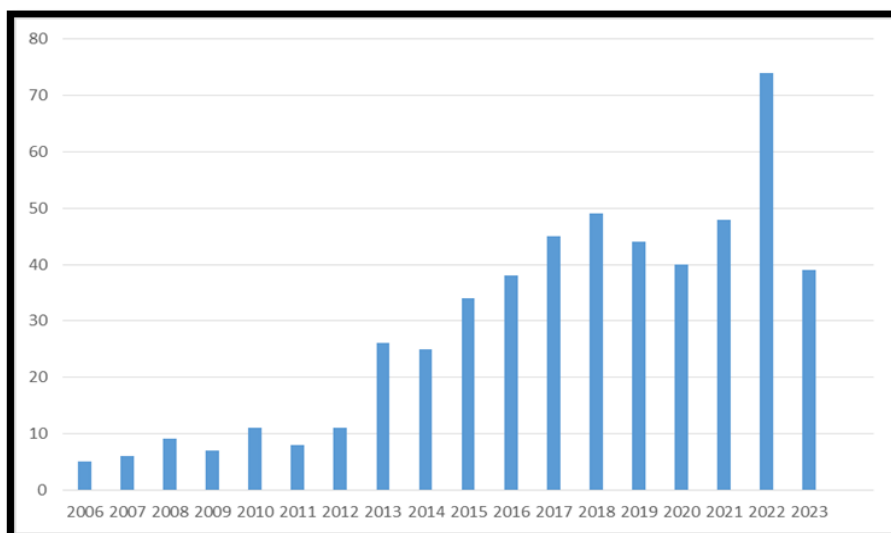


Figura 1. Número de artigos indexados, por ano, na plataforma PUBMED que contém os descritores “*animal model*”, “*autism*” e “*valproic acid*”. Busca realizada em 01/08/2023.

O AVP é um medicamento anticonvulsivante e estabilizador de humor, prescrito principalmente para tratar a epilepsia, o transtorno bipolar ⁽⁵¹⁾ e as crises de enxaquecas ⁽⁵²⁾. Este medicamento atravessa a placenta e pode passar pelo leite materno ⁽⁴⁴⁾, portanto, durante anos tem sido associado a diversos efeitos teratogênicos ⁽⁵³⁾, como a ocorrência de malformações congênitas, que incluem defeitos nas características faciais, como saliência frontal, ponte nasal plana, testa larga, hipoplasia do terço médio da face, estreitamento bitemporal, orelhas rotacionadas posteriormente, lábios finos e longos, além de malformações da tecido cardíaco, dos membros e dos dedos ⁽⁵⁴⁾.

Experimentos com roedores indicaram que a exposição materna ao AVP, durante o período gestacional, tem efeito adverso permanente sobre o desenvolvimento neurológico e comportamental dos filhotes, mimetizando déficits neuroanatômicos e comportamentais associados ao TEA ⁽²⁵⁾. Há relatos dos efeitos teratogênicos nos animais expostos ao AVP, tais como a redução dos fetos vivos, do peso e do comprimento corpóreo, a ocorrência de fetos com atraso na abertura dos olhos ⁽⁵⁵⁾, com exencefalia, com fenda craniofacial

completa, com dilatação e consequente aumento dos ventrículos cerebrais e, com malformações nas vértebras, especialmente na região cervical ⁽⁵⁶⁾.

O modelo animal do AVP foi proposto por Rodier e colaboradores (1996), que utilizaram o medicamento no período pré-natal para posterior avaliação morfológica do sistema nervoso central (SNC) ⁽⁵⁷⁾. Desde então, vários protocolos têm sido adotados com diferenças pontuais nos dias de aplicação e posologia da droga, conforme demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1. Características dos protocolos de indução de comportamentos similares aos do TEA, por aplicação por via intraperitoneal de uma dose de AVP, durante o período pré-natal, em ratos ou camundongos, realizados em diferentes estudos.

Estudo (Referência)	Dia embrionário de aplicação	Espécie/Cepa	Dose (mg/Kg)
64	12,5	Rato / Wistar	350
58, 61	12,5	Rato / Sprague Dawley ou Wistar	400
60	12,5	Rato / Wistar	500
65	11,5	Rato/Wistar	500
63	11	Camundongo / Swiss mice	500
48, 59, 62,66	12,5	Rato / Wistar	600

Os animais expostos ao AVP atendem aos critérios de validade para o modelo animal de TEA. Este apresenta validade de construção, que se refere à replicação do agente causador e dos mecanismos da desordem no humano e no animal; de face, que se refere à replicação das características do transtorno no humano e no animal e; validade preditiva, que se refere à capacidade do modelo de permitir identificar drogas que possam ser benéficas para os seres humanos e de demonstrar a resposta que o humano apresentará quando exposto a estes medicamentos ^(19, 50).

A administração de AVP aumenta as espécies reativas de oxigênio (EROs), que danificam a estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla ⁽⁶⁷⁾. Durante estágios iniciais de desenvolvimento, o sistema antioxidante embrionário é imaturo, portanto, o embrião é mais propenso a danos por estresse oxidativo, resultando em anomalias na estrutura e no desenvolvimento do tubo neural do feto ⁽⁶⁸⁾.

Também, o AVP atua como um inibidor não seletivo das histonas desacetilases de classe I ⁽⁶⁹⁾, no momento do fechamento do tubo neural. Em particular, a modulação da estrutura da cromatina controlada pelas histonas desacetilases é importante para a regulação da transcrição e diferenciação das células-tronco neurais. Portanto, após a exposição ao AVP, as funções que envolvem essas células podem estar comprometidas ⁽⁷⁰⁾, as quais já foram associadas a prejuízos comportamentais em pacientes com TEA ^(71, 72).

Além disso, foi observado níveis diminuídos de glutamato descarboxilase (GAD) 65 e 67, que são isoformas da GAD, uma enzima responsável pela síntese do ácido γ -aminobutírico (GABA), no cerebelo de ratos expostos ao AVP no período pré-natal, resultando na diminuição deste neurotransmissor. Por sua vez, o GABA possui um papel crítico na maturação de redes neurais no encéfalo em desenvolvimento. Então, qualquer alteração nos níveis deste neurotransmissor pode interromper o circuito neuronal em desenvolvimento e resultar em fenótipos comportamentais do tipo autista ⁽⁷³⁾.

1.2 Testes comportamentais

O TEA é um distúrbio específico em humanos e alguns aspectos fenotípicos podem ser reproduzidos por modelos animais ⁽⁵⁰⁾. Para qualquer modelo animal ser rotulado como um modelo de TEA, o animal deve espelhar ao menos dois aspectos da sintomatologia do TEA ⁽⁷⁴⁾. Levando-se em consideração as observações clínicas em humanos, é possível

detectar sintomas semelhantes ao TEA nos modelos animais por meio de abordagens comportamentais ⁽⁷⁵⁾.

A exploração é um dos comportamentos mais ativos nos ratos, porém, nos animais que replicam a sintomatologia do TEA há uma notória diminuição deste aspecto. Também é possível identificar o aumento dos comportamentos repetitivos em ratos expostos ao AVP no período intraútero ^(75, 76), uma maneira de avaliar este comportamento de forma translacional se dá por meio da utilização do teste de campo aberto ⁽⁷⁷⁾, o qual consiste em observar como o animal reage a um novo ambiente, avaliando comportamentos exploratórios, locomotores e repetitivos.

Déficits de memória e aprendizagem já foram encontrados em pacientes com TEA ⁽⁷⁸⁾. Para a avaliação da retenção de memória no modelo animal de AVP ⁽⁷⁹⁾, usa-se o teste de reconhecimento de novos objetos, que é baseado na diferença do tempo, entre animais controle e AVP, em explorar o objeto novo ao invés do familiar ⁽⁸⁰⁾. Visto que os roedores possuem uma preferência inata por novidades, este teste consiste na substituição de um objeto familiar por um novo objeto.

Os roedores são espécies altamente sociais e, por isso são testados para interação e preferência social. Para a análise deste comportamento, usa-se o teste de interação social ⁽⁷⁵⁾, que consiste em observar a interação social entre um rato experimental e um rato desconhecido, de mesmo sexo e de menor idade ⁽⁸¹⁾. Déficits na sociabilidade já foram demonstrados no modelo animal de autismo induzido por AVP ⁽⁴⁵⁾.

O labirinto em cruz elevado é um teste comportamental cujo objetivo é observar como animais reagem em situações de risco e de ansiedade. O teste é baseado nas tendências naturais dos roedores de evitar lugares abertos ou elevados, contrabalançados com sua curiosidade inata para explorar áreas desconhecidas. Portanto, um rato menos

ansioso visitará com mais frequência os braços abertos, enquanto um rato com ansiedade elevada tenderá a passar mais tempo nos braços fechados do aparato ⁽³³⁾.

1.3 Opções terapêuticas

As opções atuais de tratamento para o TEA incluem medicamentos e intervenções não farmacológicas ^(82, 83). Dentre as opções não farmacológicas, podemos citar, o uso da musicoterapia ⁽⁸⁴⁾, massagem corporal ⁽⁸⁵⁾, terapias comportamentais cognitivas, sociais e psicológicas ^(82, 86), suplementação nutricional ⁽⁸⁷⁾; dieta com restrição de triptofano ⁽⁸⁸⁾ e uso de terapias da análise do comportamento aplicada (ABA) ⁽⁸⁹⁾.

As opções medicamentosas para crianças com TEA são muito limitadas, devido à heterogeneidade do transtorno e provocam muitos efeitos adversos ⁽⁹⁰⁾. Risperidona e Aripiprazol são os medicamentos mais utilizados, aprovados pela *Federal Drug Administration (FDA)* para o tratamento dos sintomas associados ao TEA, ambas as drogas são usadas para tratar a irritabilidade e a agressividade ⁽⁹¹⁾. No entanto, 22% dos pacientes que utilizam estes medicamentos têm o risco de desenvolvimento de efeitos adversos, incluindo aumento do apetite, ganho de peso, congestão nasal, fadiga, tontura, constipação e diarreia ^(91, 92), sendo que este risco, em pacientes com TEA, pode chegar até 50% ^(86, 93, 94). Além disso, medicamentos antipsicóticos são responsáveis por danos multissistêmicos ⁽³⁵⁾.

Drogas como metilfenidato, atomoxetina ⁽⁹⁵⁾, agmatina ⁽⁹⁶⁾, anandamida ⁽⁹⁷⁾ e canabivarina ⁽⁹⁸⁾ apresentaram efeitos benéficos nos modelos animais de TEA. Porém as terapias farmacológicas disponíveis têm níveis variáveis de eficácia e são capazes de diminuir os efeitos dos comportamentos disruptivos associados à condição, como o TDAH e a ansiedade ^(94, 99), ao invés de atuar nos sintomas centrais do TEA ⁽¹⁰⁰⁾. Portanto, novos

medicamentos necessitam serem testados e aprovados para o uso em pacientes com TEA e consequente tratamento do transtorno.

1.3.1 *Hypericum perforatum*

A erva de São João, *Hypericum perforatum* (HP), é uma planta medicinal popularmente conhecida. Apresenta efeitos ansiolítico, sedativo, antipsicótico, antidepressivo, anticonvulsivante, antidiabético e analgésico. Também mostrou ser benéfica em modelos experimentais, no tratamento da dependência do álcool, da nicotina e da cafeína ⁽¹⁰¹⁾ e melhorar alguns aspectos cognitivos, como a aquisição e a consolidação da memória ⁽¹⁰²⁾. Portanto, o HP possui efeitos no SNC, evidenciados terapeuticamente.

A erva de São João contém grande variedade de compostos biologicamente ativos, sendo a hipericina e a hiperforina as principais responsáveis por seu efeito terapêutico ⁽¹⁰³⁾. A hipericina inibe *in vitro* as monoaminas oxidases do tipo A e B, nas mitocôndrias do encéfalo de ratos ^(101, 104). Possui propriedades antivirais e antibacterianas fotoinduzidas e efeitos antiproliferativos e citotóxicos em diversas linhas tumorais ⁽¹⁰⁵⁾.

A hiperforina atua, *in vivo* e *in vitro*, na inibição da recaptação de serotonina, de norepinefrina e de dopamina, as quais estão envolvidas na regulação do humor. Além disso, atua como antagonista serotoninérgica do receptor 5-HT₃ e 5-HT₄ e, inibidor do crescimento de células tumorais por indução da apoptose ⁽¹⁰⁴⁾.

Um estudo, no qual três pacientes do sexo masculino, diagnosticados com TEA apresentaram melhora na irritabilidade, nos comportamentos repetitivos e na fala após a administração da erva de São João durante quatro semanas, com dosagem de 20 mg/dia ⁽¹⁰⁶⁾.

Camundongos com deficiência na expressão do gene que codifica o canal de cátion de potencial transitório do receptor da subfamília C membro 6 (*Transient Receptor*

Potential Cation Channel Subfamily C Member 6 - TRPC6) apresentam comportamento ansioso e depressivo e redução da excitabilidade dos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo e das células granulares do GD ⁽¹⁰⁷⁾. Pacientes com TEA apresentam mutações com redução da função desse gene. Esta redução pode ser resgatada pela complementação de TRPC6, por meio do tratamento com a hiperforina, que é uma das substâncias responsáveis pelo efeito terapêutico do HP, sugerindo então que os pacientes com TEA podem se beneficiar com o uso da erva de São João ⁽¹⁰⁸⁾.

Estudos demonstram diminuição GABAérgica em modelo animal de TEA induzido por AVP ⁽⁷³⁾ e em pacientes com o transtorno ⁽¹⁰⁹⁾. Portanto, reparar os déficits de GABA seria uma ferramenta importante para o alívio dos sintomas associados ao TEA. E um dos efeitos do HP é o bloqueio da captação do GABA, o que resulta no aumento deste neurotransmissor no SNC ⁽¹¹⁰⁾.

Neste contexto, nosso estudo avaliou os efeitos da administração da erva de São João em um modelo experimental de autismo induzido por exposição intraútero ao AVP. Espera-se que as alterações dos principais parâmetros comportamentais replicados por modelos animais de TEA e que o distúrbio neuronal do HC sejam revertidos pelo uso do *Hypericum perforatum*; por ser um bloqueador da captação de GABA, o que aumentaria este neurotransmissor no SNC e, por conter alta concentração de hiperforina, um agonista de TRPC6, o que aumentaria a expressão do gene codificante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar o efeito do extrato de *Hypericum perforatum* (erva de São João), nas manifestações comportamentais e na quantidade neuronal, no modelo animal de Transtorno do Espectro do Autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar o efeito da administração do extrato de *Hypericum perforatum* no modelo animal de TEA, induzido por exposição pré-natal ao AVP, por meio da avaliação dos seguintes parâmetros:

- 2.2.1 Comportamentos estereotipados e exploratórios, com o teste de campo aberto;
- 2.2.2 Avaliação da memória, pelo teste de reconhecimento do novo objeto;
- 2.2.3 Comportamento social por meio do teste de interação social;
- 2.2.4 Ansiedade, com o teste de labirinto em cruz elevado;
- 2.2.5 Densidade neuronal hipocampal.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos Éticos e Animais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Brasil e seguindo as orientações do *Animal Research: Reporting of In vivo Experiments (ARRIVE)*. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) sob o protocolo de número 03/2017 (Anexo A).

Para compor os casais genitores foram utilizados 59 ratos Wistar fêmeas (de 58 a 136 dias de idade) e 22 ratos Wistar machos (de 60 a 191 dias de idade), provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP). Estes animais passaram no mínimo 14 dias no Centro de Bioterismo da FAMERP (período de quarentena). Após este período foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Fisiologia Experimental da FAMERP, em condições controladas de luminosidade (luz das 7h00 às 19h00) e temperatura (23 ± 2 °C), alojados em caixa de polietileno autoclavável, com tampa de arame de aço inox, com dimensões de 47 x 34 x 16 cm, forradas com maravalha e limpas três vezes por semana, com acesso livre a ração Nuvilab CR-1 e água mineral, trocadas diariamente.

Para a função de ratos de interação (Teste de Interação Social) foram utilizados filhotes submetidos às mesmas condições de cuidado dos ratos experimentais, porém mantidos em um local separado, sem contato social ou ultrassonoros com os demais animais.

O extrato seco da erva de São João 0,3% utilizado foi fabricado pela empresa Levviale, com data de fabricação 07/06/2020 e validade 06/06/2023. Lote interno número

20K20-B0155-070340. Para a composição do extrato seco, foram utilizados a erva com as flores. Foi armazenado em alíquotas de 0,15 g do extrato que, no dia da aplicação foi diluído em 1,2 mL de soro fisiológico (SF).

O ácido valproico, droga utilizada para a indução dos comportamentos do tipo autista em ratos, foi obtido do laboratório Santa Cruz Biotechnology (SC-202378; lote L1420). O AVP foi armazenado em alíquotas de 0,18 g, em temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$. No dia de aplicação da droga, a alíquota foi diluída em SF para um volume final da solução de 0,3 mL.

3.2 Aleatorização e estudo cego

Para o cálculo amostral foi utilizado o software G*Power, com um tamanho do efeito de 0,80, uma probabilidade de erro de 0,05 e um poder de 0,95 ⁽⁵⁹⁾.

A escolha do tratamento das mães foi realizada por meio da randomização simples ⁽¹¹¹⁾. Para a definição do tratamento dos filhotes e da ordem em que ocorreria este tratamento (para evitar que um mesmo rato fosse sempre o primeiro a ser tratado e, dessa forma levar ao aumento do estresse nos demais) em cada dia e horário, foi realizada uma aleatorização utilizando o aplicativo *<omnicalculator.com>*. O tratamento dos filhotes foi realizado por membros da equipe, de forma que a pesquisadora responsável pelo estudo não tinha conhecimento dos animais tratados com HP ou SF (estudo cego).

Ademais, para evitar qualquer viés, todos os animais foram nomeados com letras e números, de forma que no momento da análise comportamental e morfológica a pesquisadora não tinha conhecimento dos grupos experimentais dos ratos.

3.3 Delineamento Experimental

As fêmeas foram colocadas juntamente com os machos durante 12h, das 20h00 às 8h00. Na manhã seguinte, era realizada a análise citológica e, caso observada a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal (Figura 2), considerava-se dia embrionário 0 (E0) e as fêmeas eram colocadas em caixas individuais. No E12,5 às 14h30, estas fêmeas foram tratadas por via intraperitoneal (IP) com: 1) SF: 1 mL/100g de solução salina a 0,9% (grupo SF) ou 2) AVP: 600 mg/kg de AVP dissolvido em solução salina a 0,9% (grupo AVP).

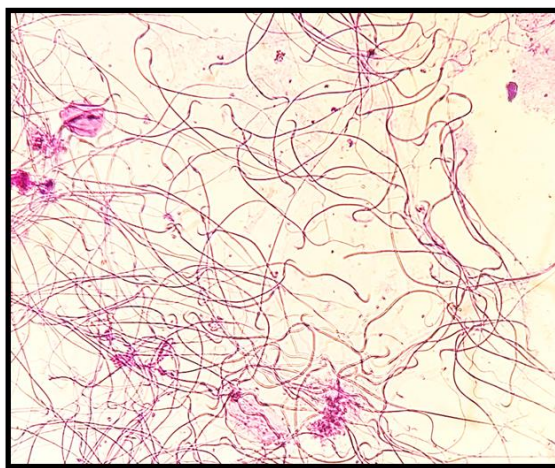


Figura 2. Espermatozoides no esfregaço vaginal das fêmeas, corados por Violeta Cristal e fotografados na objetiva de 40x.

As ninhadas foram padronizadas em até 10 filhotes e a prole permaneceu junto à mãe por 21 dias, quando ocorreu o desmame da ninhada. Neste dia os machos foram alocados em caixas com três a quatro irmãos. Do dia pós-natal (DPN) 10 ao 16 foi verificada a abertura dos olhos, os animais foram pesados no DPN 14, 28 e 36 e, sua saúde foi avaliada diariamente por observação dos ratos e sem a interação direta com os animais.

Ao completarem 24 dias de vida, os animais foram tratados por via oral (gavagem – Figura 3) com: 1) SF: solução salina a 0,9% na dose de 10 mL/Kg ou 2) HP: erva de São João (*Hypericum perforatum*), diluída em solução salina 0,9% na dose de 1g/Kg ⁽¹¹²⁾. A

administração ocorreu a cada 12 horas durante sete dias consecutivos (DPN 24 ao DPN 30).

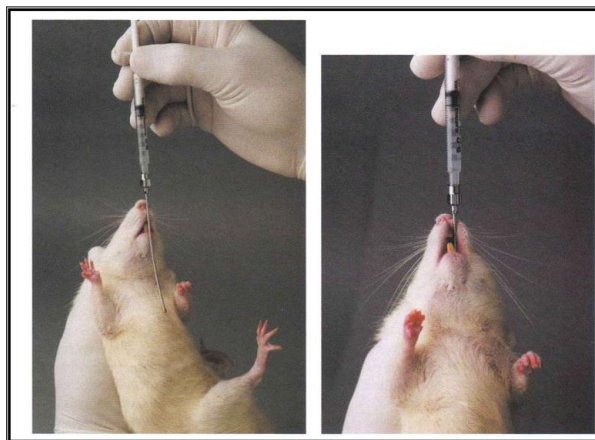


Figura 3. Aplicação de gavagem nos ratos, translacionalmente refere-se a via oral dos seres humanos, já que o conteúdo contido na cânula é empurrado diretamente no esôfago dos animais, de modo que a droga percorra todo o caminho da administração oral.

No dia seguinte à aplicação da última dose do tratamento, iniciaram-se os testes comportamentais. Os animais foram submetidos individualmente a cada teste, os quais ocorreram na seguinte sequência: Campo Aberto (CA – DPN 31), Reconhecimento do Objeto Novo (RON – DPN 32), Interação Social (IS – DPN 33) e Labirinto em Cruz Elevado (LCE – DPN 34). Na Figura 4 é apresentada a linha experimental.

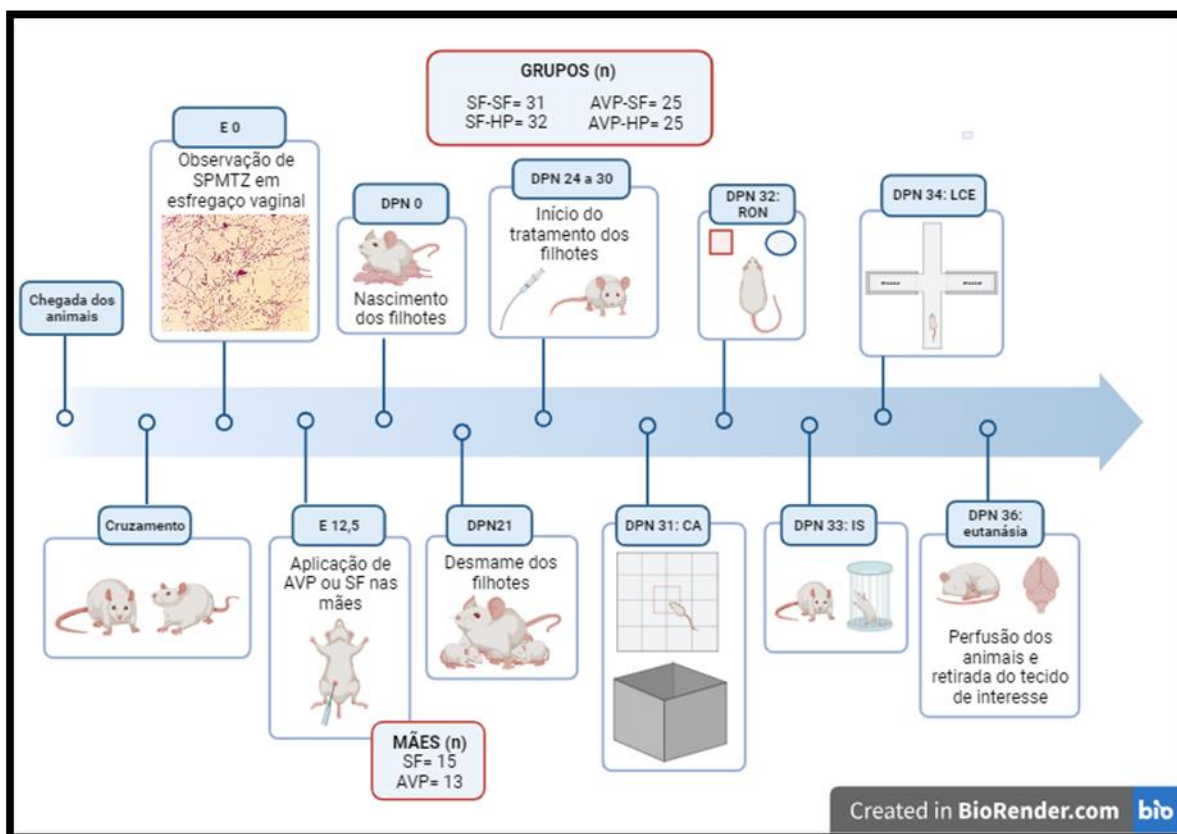


Figura 4. Linha temporal do estudo que avaliou o efeito do HP em ratos expostos, no período pré-natal ao AVP. As abreviações indicam: SPMTZ: espermatozoides; E: dia embrionário; DPN: dia pós-natal; CA: campo aberto; RON: reconhecimento do objeto novo; IS: interação social; LCE: labirinto em cruz elevado; AVP: ácido valproico; SF: soro fisiológico; HP: *Hypericum perforatum*; n: número amostral.

3.4 Testes comportamentais

Os testes comportamentais ocorreram do DPN 31 ao 34, entre as 7h00 e as 13h00. Foram realizados em uma sala isolada com baixa intensidade de luminosidade, para evitar o estresse dos animais, e temperatura mantida em 23 ± 2 °C. Os testes foram gravados por uma mini-câmera sq – 12, da marca Quelim, para posterior análise.

Os animais foram levados individualmente até a sala teste em caixas pequenas convencionais (20 x 30 x 13 cm). Ao término da gravação cada animal foi levado para a sua caixa moradia e o aparato e os objetos utilizados foram limpos com álcool 70%. Para a realização dos testes de CA, RON e IS foi utilizado um mesmo aparato com dimensões de

60 cm x 40 cm x 50 cm (comprimento x largura x altura), com iluminação de 17 lux no centro, 11 lux no canto superior esquerdo, 17 lux no canto superior direito, 7 lux no canto inferior esquerdo e 11 lux no canto inferior direito do aparato medidos pelo aplicativo <Lux Ligth Meter>.

3.4.1 Campo Aberto

O teste de campo aberto (CA) foi utilizado para avaliar a atividade exploratória e locomotora, o tempo de movimentos repetitivos e a ansiedade dos animais experimentais. Para a quantificação da atividade exploratória, realizamos a contagem do tempo em que o animal passou explorando o aparato (farejando) e o tempo em que o animal realizou a elevação (animal sobre as patas posteriores). A avaliação do tempo de autolimpeza foi utilizada para averiguarmos o comportamento repetitivo dos animais. E a preferência nas localidades do aparato (tempo em que o animal esteve no centro ou na periferia), foi utilizada para quantificarmos o nível de ansiedade dos animais de cada grupo experimental. Autores sugerem que a diminuição do tempo na área central (área quadrada de 625 cm²) do aparato de campo aberto, reflete a um aumento da ansiedade ⁽¹¹³⁾.

Antes do início de cada teste o animal foi levado para a sala de gravação em uma caixa convencional pequena e mantido na bancada por 15 minutos (período de habituação). Finalizado este tempo, o animal foi colocado no centro do aparato (Figura 5) e iniciado o teste, com duração de 20 minutos. Após o teste os animais retornaram às suas caixas moradias no biotério.

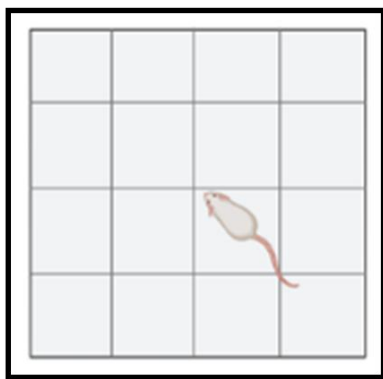


Figura 5. Representação da vista superior do aparato utilizado para realizar os testes de campo aberto (CA), reconhecimento de objetos novos (RON) e interação social (IS). A figura, elaborada utilizando ferramentas gráficas do Biorender, mostra um rato experimental durante o teste de CA.

3.4.2 Reconhecimento do Objeto Novo

No DPN 32, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos novos (RON). Neste teste foi analisado o tempo em que o rato explorou o objeto familiar ou o novo objeto. Como os roedores têm uma preferência inata por novidades, um roedor que se lembra do objeto familiar passará mais tempo explorando o novo objeto ⁽¹¹⁴⁾. Em nosso estudo avaliamos a memória de curto prazo dos animais, pois a sessão teste iniciou-se logo após 10 minutos da sessão treino.

O teste foi dividido em duas fases: fase 1 de treinamento e fase 2 de teste (Figura 6). Na fase de treinamento os animais foram apresentados a dois objetos iguais (A+B – latas de refrigerante com dimensões de 13,9 cm de altura e 5,7 cm de largura), ficando livres para explorá-los durante 10 minutos. Após este tempo, os animais retornaram para as suas caixas moradias.

Passados no mínimo 60 minutos, o mesmo animal retornou à sala de gravação e iniciou-se a fase de teste, na qual os ratos foram expostos novamente a um dos objetos utilizados na fase 1 e um novo objeto (C – caixa de madeira medindo 10,5 cm de altura x 7 cm de largura), ficando livre para explorá-los durante 10 minutos. Todos os objetos

estavam a aproximadamente 6 cm de distância das paredes do aparato e o rato era colocado em frente ao novo objeto ⁽⁴⁸⁾. Após o teste os animais retornaram para as suas caixas moradias no biotério.

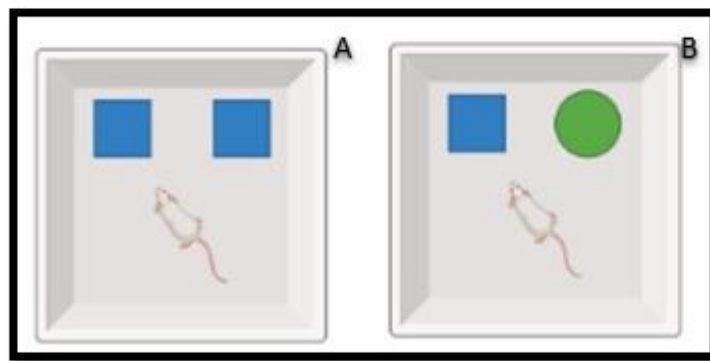


Figura 6. Teste de reconhecimento de objetos novos (RON) durante (A): fase de treinamento e (B): fase de teste. Figura elaborada utilizando ferramentas gráficas do Biorender.

Durante a análise foi quantificado o tempo em que o animal fez contato direto com o objeto novo ou com o objeto de treino. Foi considerada atividade exploratória o ato de cheirar ou tocar o objeto com o focinho, não foi considerada exploração a permanência ou deslocar-se no entorno do objeto. Calculamos também o índice de discriminação dos objetos nos animais experimentais o qual consiste na razão entre a diferença do tempo de exploração e o tempo total de exploração dos objetos ⁽⁴⁸⁾. Nesse parâmetro valores próximos a 1 representam os animais que são capazes de discriminar o objeto novo do familiar, enquanto valores próximos a 0 ou -1 representam os animais que não discriminaram os objetos apresentados.

$$\text{Índice de discriminação} = \frac{t \text{ novo} - t \text{ familiar}}{t \text{ novo} + t \text{ familiar}}$$

3.4.3 Interação Social

No DPN 33 foi realizado o teste de interação social (IS). Primeiramente, os ratos de interação eram levados à sala de gravação, onde permaneceram durante todo o teste. Cada animal experimental foi habituado à sala por cinco minutos, em seguida levado ao aparato, no qual havia uma caixa transparente, no meio de uma das paredes, vazia e limpa com altura de 13 cm e largura de 25 cm, por mais cinco minutos. O animal experimental foi retirado do aparato e o rato de interação colocado na caixa. Em seguida foi recolocado o rato experimental na extremidade oposta a caixa e o teste iniciado, com duração de 10 minutos (Figura 7).

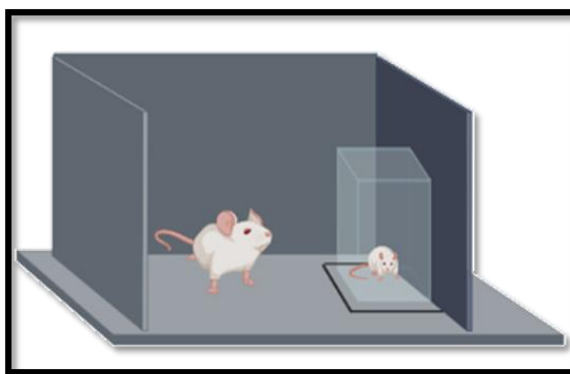


Figura 7. Ratos durante o teste de interação social (IS). O esquema representa o aparato contendo a caixa utilizada para abrigar o rato de interação durante o teste. Figura elaborada utilizando ferramentas gráficas do Biorender.

Para a análise comportamental foi avaliado o tempo em que o rato teste permaneceu na zona ou fora da zona de interação, a qual consistiu em uma área com 6 cm de largura em cada lado em torno da caixa de interação. Também avaliamos o índice de IS, que consiste na razão da diferença do tempo de permanência na zona ou fora da zona de IS pelo tempo de permanência nas duas zonas ⁽⁴⁸⁾. Valores próximos a 1 representam animais que tiveram preferência por interagir com o animal de interação, enquanto valores próximos a -1 representam os animais que não apresentaram preferência social.

$$\text{Índice de interação social} = \frac{t \text{ na zona de interação social} - t \text{ fora da zona de interação social}}{t \text{ na zona de interação social} + t \text{ fora da zona de interação social}}$$

3.4.4 Teste Labirinto em Cruz Elevado

O aparato consiste em dois braços abertos de 50 × 10 cm e dois braços fechados de 50 × 10 × 40 cm com um telhado aberto, de modo que os dois braços fiquem opostos, elevado a uma altura de 50 cm do chão ⁽¹¹⁶⁾ (Figura 8). A luminosidade no aparato de LCE foi de 16 e 21 lux nas extremidades dos braços fechados (BF), de 51 e 60 lux nas extremidades dos braços abertos (BA) e, 51 lux no centro. Após o período de habituação de 15 minutos, o rato foi colocado no centro do aparato, de frente para um braço aberto, podendo explorar o labirinto livremente durante os cinco minutos do teste.

O teste foi utilizado para observar o comportamento do tipo ansioso, por meio da avaliação do tempo e da quantidade de vezes em que o animal permaneceu e entrou nos BA ou BF do aparato, animais menos ansiosos tendem permanecer mais tempo e a entrar mais vezes nos BA do LCE. Além deste comportamento, também foram quantificados o tempo de *head-dipping* e de exploração no fim do BA, bem como o tempo de exploração, de elevação, de autolimpeza e de caminhada de cada rato experimental no teste de LCE.

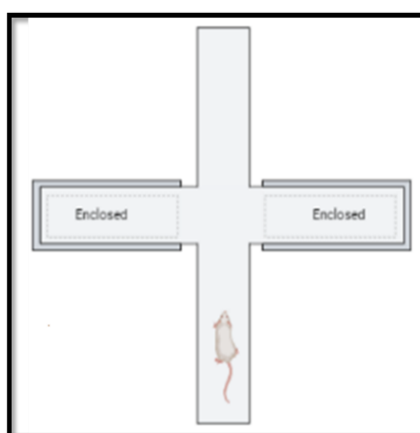


Figura 8. Rato no braço aberto, durante o teste de LCE para a avaliação da ansiedade dos animais experimentais. Figura elaborada utilizando ferramentas gráficas do Biorender.

3.5 Análise histológica

3.5.1 Perfusão e preparação do tecido

No DPN 36 ou 37, os ratos experimentais foram anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg) por via intraperitoneal e, perfundidos por via intra-cardíaca, com 50 ml de solução salina 0,9%, seguidos de 200 ml de paraformaldeído 4%. Os cérebros foram removidos e mergulhados em solução de paraformaldeído 4%. Após, no mínimo, sete dias foi realizado o processamento histológico do tecido (desidratados em concentração crescente de etanol – 70 a 100% - e clarificados em xilol) e consequente inclusão em parafina, para a obtenção dos blocos que, utilizando micrótomo, foram cortados em secções de 6 µm de espessura e os cortes colocados em lâminas previamente gelatinizadas.

3.5.2 Coloração

As lâminas histológicas foram submetidas à coloração por Hematoxilina e Eosina (HE), seguindo o seguinte protocolo: desparafinização em xilol, hidratação dos cortes em álcool com concentração decrescente, coloração do núcleo com hematoxilina por um minuto, diferenciação, coloração do citoplasma com eosina durante 10 segundos, hidratação dos cortes, clarificação e montagem.

3.5.3 Contagem neuronal

Imagens do hipocampo dorsal esquerdo foram capturadas em ampliação de $\times 40$ usando o sistema de escâner de lâminas (Olympus VS120 - S5). A contagem de neurônios foi realizada em quatro regiões do HC (CA1, CA2, CA3 e CA4) e nas lâminas superior (GD-s) e inferior (GD-i) do GD, nas secções coronais dos cérebros correspondentes às coordenadas anteroposterior (AP) de -4.16 a -4.52 mm, com relação ao bregma ⁽¹¹⁷⁾.

Para a quantificação dos neurônios foram feitas imagens da secção estudada usando o software *OlyVIA* 2.9 com dimensões de 20 μm da área escaneada. Estas imagens foram abertas no *ImageJ* 1.8 e, em cada imagem foram delimitadas cinco áreas de 50 μm^2 para a contagem de neurônios em CA1, 2, 4 e GD e, três áreas de 50 μm^2 para a contagem de neurônios em CA3 (Figura 9). Para esta quantificação foram usados sete animais do grupo SF-SF, cinco SF-HP, cinco AVP-SF e, seis AVP-HP.

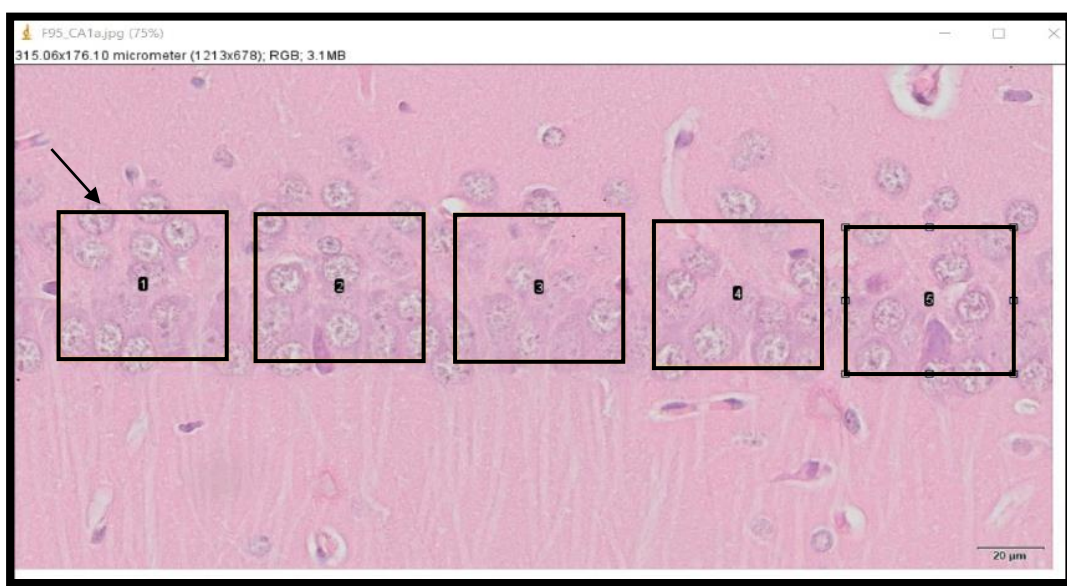


Figura 9. Imagem da camada de células piramidais do campo 1 do Corno de Ammon (CA1) do hipocampo (HC) de um dos ratos experimentais. A imagem mostra áreas de 50 μm^2 que foram usadas para quantificar os neurônios (setas). Cinco áreas em CA1, 2, 4 e nas lâminas superior e inferior do giro denteado (GD) e, três áreas em CA3.

3.6 Análise Estatística

Para verificar as diferenças entre os períodos do desenvolvimento foram utilizadas as análises de variância (ANOVA) de medidas repetidas como “*post hoc*”, o teste Bonferroni. Nas demais análises, o teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar normalidade entre os grupos experimentais. Para os dados não paramétricos foi conduzida a análise com o teste Kruskal-Wallis como “*post hoc*”, o de Dunn’s. Para os dados paramétricos foi utilizado o Anova e, Tukey como “*pos-hoc*”. As análises estatísticas

foram feitas em planilhas e gráficos do *GraphPad Instat* 8.0. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Os dados foram apresentados em gráficos *dot-plot* e, os resultados das análises comportamentais e morfológicas expressos em média e desvio padrão ($\pm$).

4 RESULTADOS

Foram utilizados 59 ratos Wistar fêmeas (de 58 a 136 dias) e 22 ratos Wistar machos (de 60 a 191 dias). Estes ratos foram colocados para acasalar num total de 155 vezes, porém em 62 acasalamentos foram encontrados espermatozoides na citologia vaginal (E0), então obtivemos 40% de sucesso nos acasalamentos dos ratos. No dia E12,5, 26 fêmeas foram tratadas com SF e 36 fêmeas foram tratadas com AVP, após este tratamento 42,3% das ratas SF e 47,2% das ratas AVP sofreram abortos. Além disso, no grupo AVP houve uma porcentagem de 31,57% de canibalismo, fato que não ocorreu no grupo SF. O número total de ninhadas experimentais foram 15 SF e 13 AVP, com a obtenção de 113 filhotes machos experimentais (31 filhotes SF-SF; 32 filhotes SF-HP; 25 AVP-SF e 25 AVP-HP). Não houve diferenças estatisticamente significativas na quantidade total de animais ao nascer e, nem no número de filhotes machos ou fêmeas, nascidos de mães SF ou AVP (Figura 10).

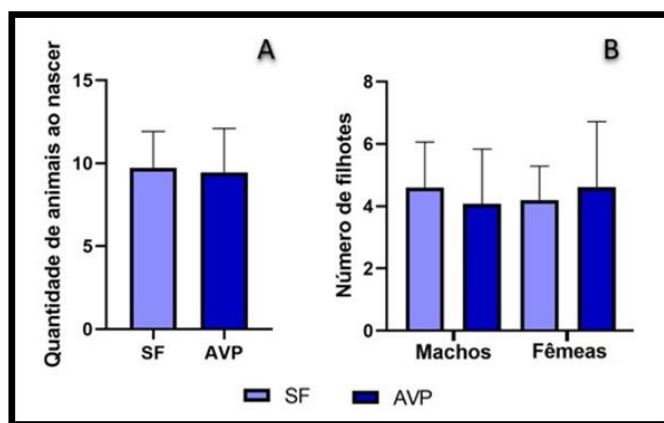


Figura 10. Quantidade de animais nascidos por ninhada (A). Número de filhotes machos e fêmeas nascidos por rata (B). SF: soro fisiológico; AVP: ácido valproico. Valores expressos como média $\pm$ DPM.

Em nosso estudo não observamos diferenças estatísticas significantes entre os grupos experimentais quanto à data de abertura dos olhos, que variou entre os DPNs 14 e

fisiológico (SF). Parâmetros avaliados: abertura dos olhos (**A**); peso corpóreo (**B**); dobra caudal (**C**); presença da cromodacriorreia (**D**) e alteração das patas dianteiras (**E**). DPN: dia pós-natal.

4.1 Testes Comportamentais

4.1.1 Campo Aberto

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros comportamentais avaliados e nem nas preferências das localidades do aparato (Figura 12).

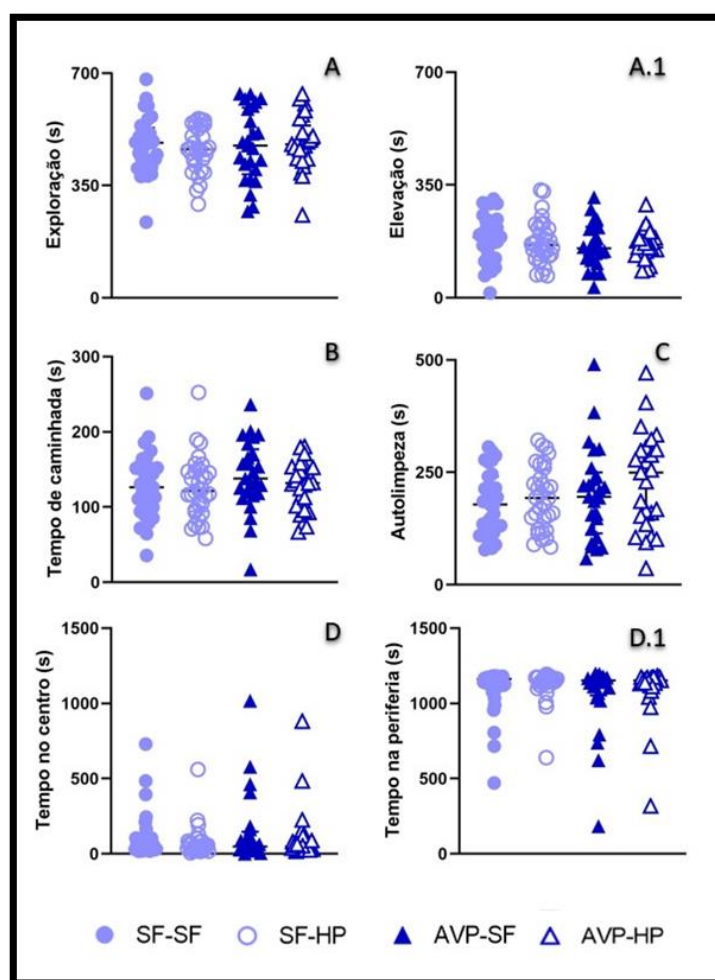


Figura 12. Comportamento no teste do CA, realizado no DPN 31 de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. As figuras indicam a avaliação da: **A** e **A.1**, atividade exploratória, **B**, locomoção, **C** tempo de movimentos repetitivos e, **D** e **D.1** ansiedade.

O perfil comportamental também foi analisado considerando-se como “n” amostral a ninhada, que indica resultado similar ao observado na análise que considerou indivíduos como unidade amostral (Figura 13).

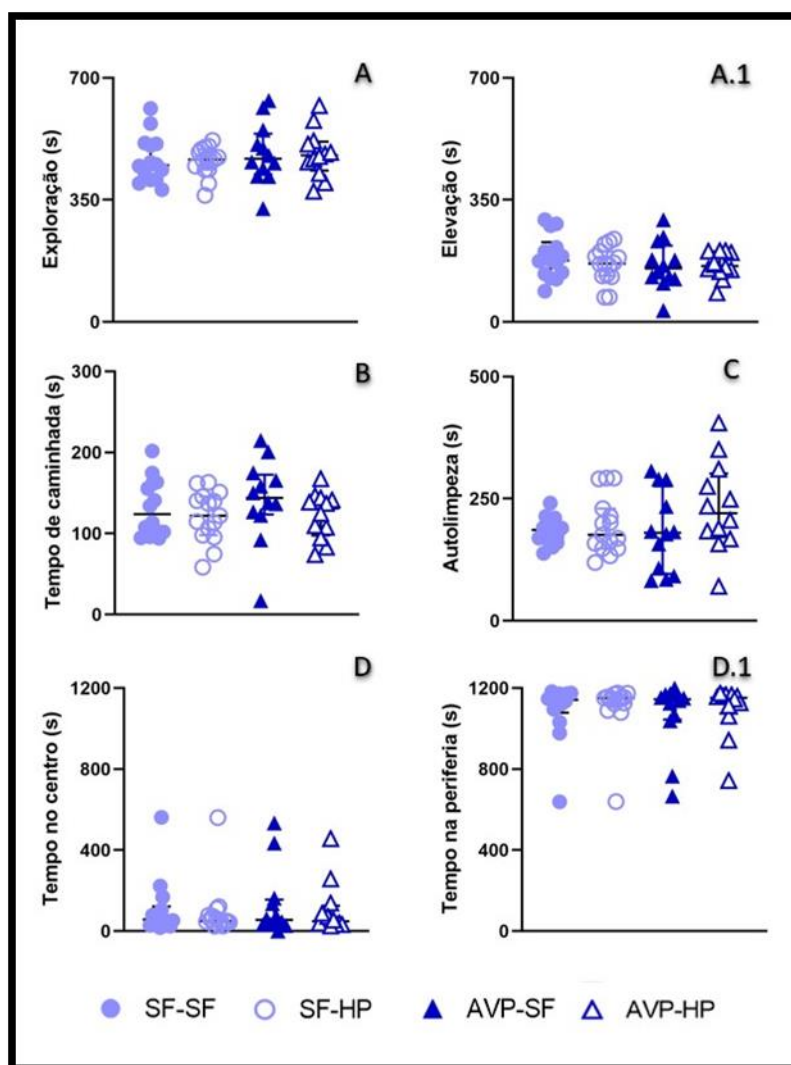


Figura 13. Perfil comportamental no teste de CA de ninhadas de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. As figuras indicam a avaliação da: **A** e **A.1**, atividade exploratória, **B**, locomoção, **C** tempo de movimentos repetitivos e, **D** e **D.1** ansiedade.

Quantificamos também, o número de farejamentos e de elevações (animal sobre as patas posteriores) realizados durante os cinco primeiros minutos de teste, para avaliar a capacidade dos animais em explorar um novo ambiente. Não obtivemos diferenças

estatisticamente significativas, entre os grupos experimentais, em nenhuma das análises (análise individual de cada animal e análise do emparelhamento da ninhada – Figura 14).

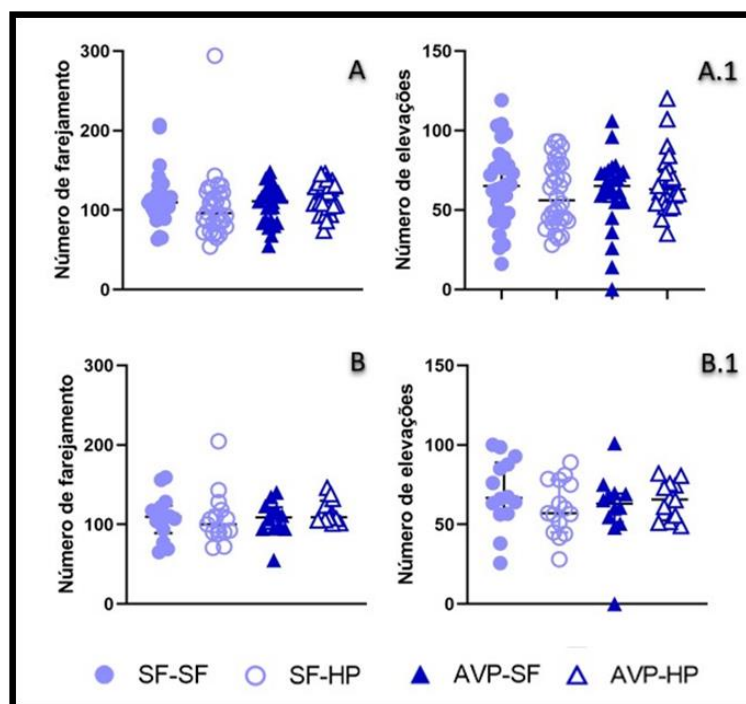


Figura 14. Atividade exploratória de um novo ambiente no teste do CA, de ratos (**A** e **A.1**) e ninhadas (**B** e **B.1**) expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF.

Foi realizada nos animais SF-SF, AVP-SF sem alteração da cauda e AVP-SF com cauda alterada, a comparação da presença de alteração fenotípica da cauda em conjunto com os parâmetros comportamentais no teste de CA (Figura 15). No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os animais AVP com ou sem alteração da cauda.

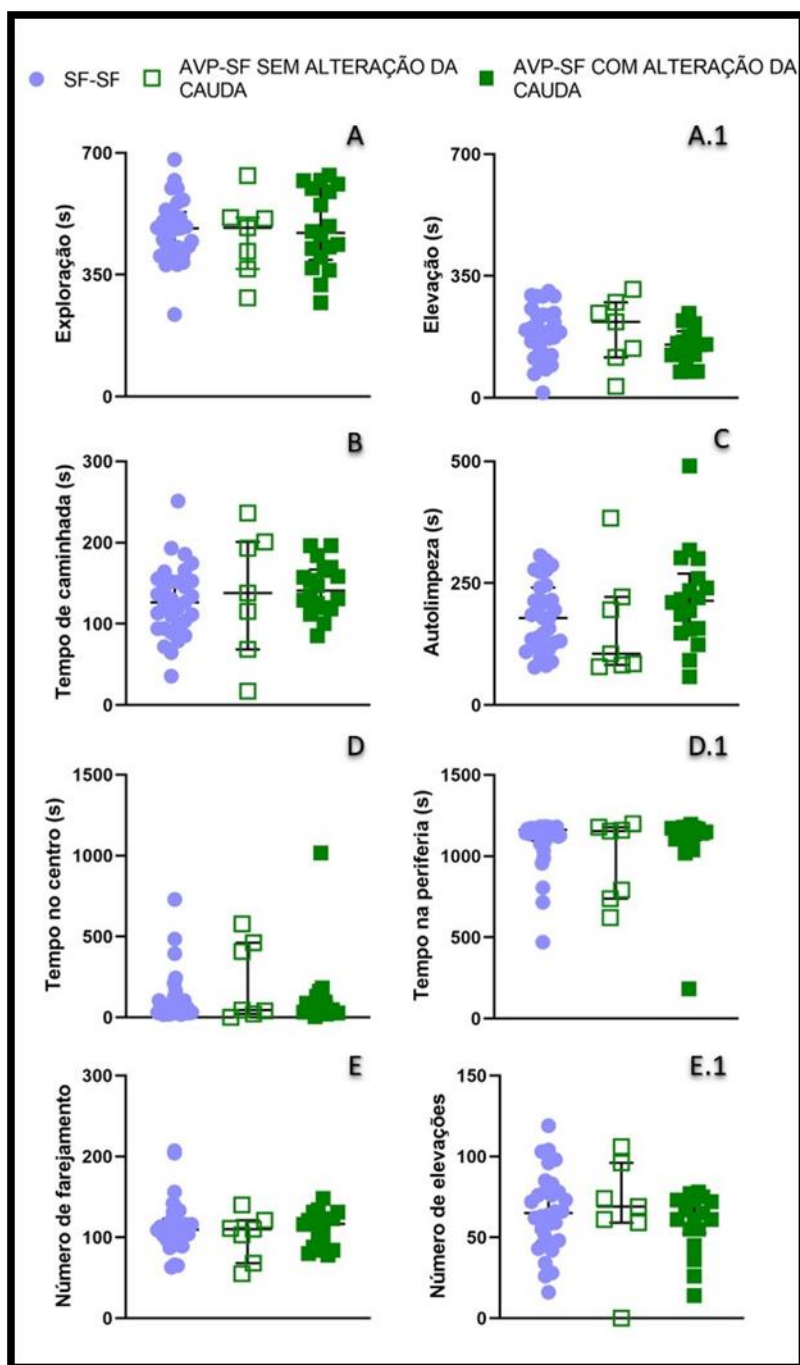


Figura 15. Comportamento no campo aberto dos animais expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados no período pós-natal com SF com e sem alteração da cauda. Os parâmetros comportamentais avaliados foram: a atividade exploratória (A e A.1) e a locomoção (B), o tempo de movimentos repetitivos (C), a ansiedade (D e D.1) e a capacidade de explorar um novo ambiente (E e E.1).

4.1.2 Reconhecimento do Objeto Novo

O grupo AVP-SF realizou um maior tempo de contato com o objeto novo, em relação aos animais SF-HP ($p < 0,05$ – Figura 16). Na análise do índice de discriminação, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos.

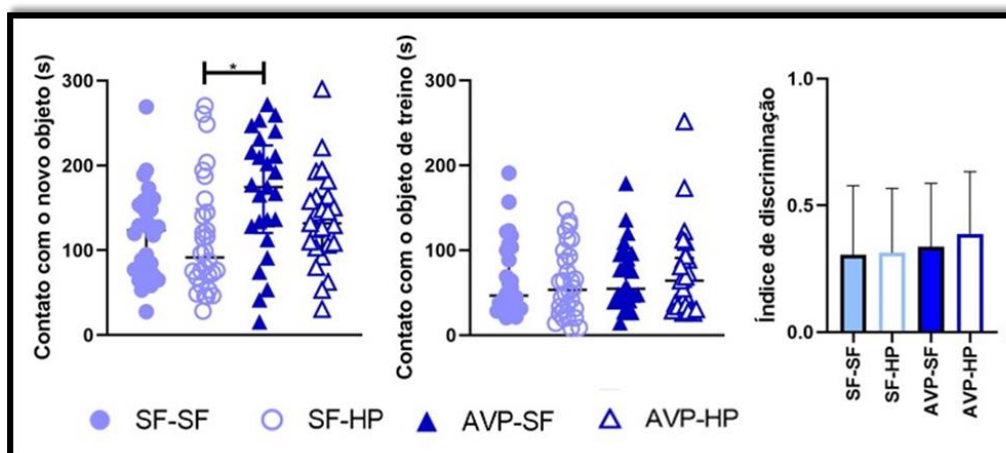


Figura 16. Tempo de contato com o objeto novo ou o objeto de treino, durante o teste de reconhecimento do novo objeto, de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Também é mostrado o índice de discriminação dos objetos. (*) $p=0,01$.

Ao avaliarmos o emparelhamento por ninhada dos animais não observamos diferenças estatisticamente significativas no tempo em que exploram o objeto novo ou o familiar. No entanto, o grupo SF-HP apresentou um maior índice de discriminação em relação aos demais grupos experimentais (SF-SF: $p<0,0001$; AVP-SF: $p=0,0104$; AVP-HP: $p<0,0001$ - Figura 17).

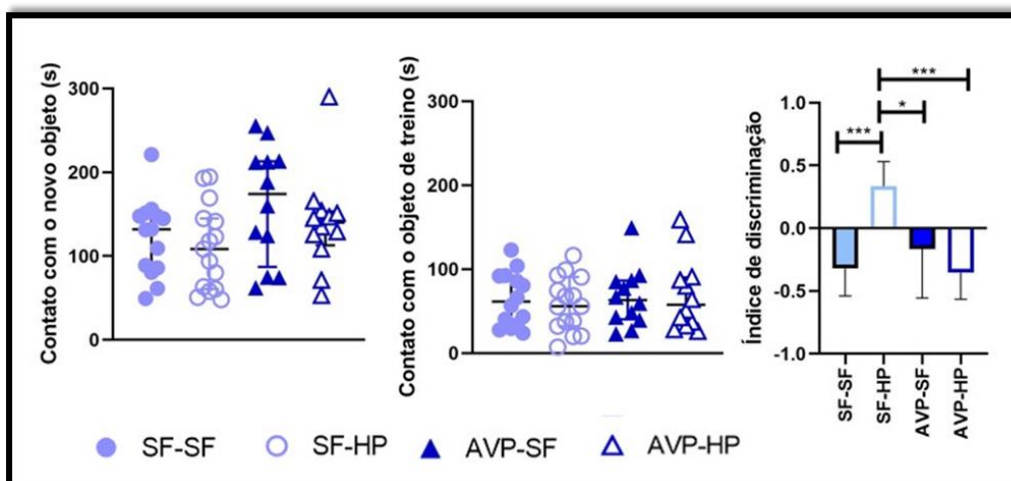


Figura 17. Comportamento no teste de RON de ninhadas de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. À esquerda, gráfico do tempo de contato com o objeto novo, no centro, tempo de contato com o objeto de treino; e índice de discriminação dos objetos, à direita. (*) $p=0,01$. (***) $p<0,0001$.

Os animais AVP-SF com alteração da cauda tiveram um maior tempo de contato com o novo objeto do que os animais SF-SF e, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes no índice de discriminação destes animais (Figura 18).

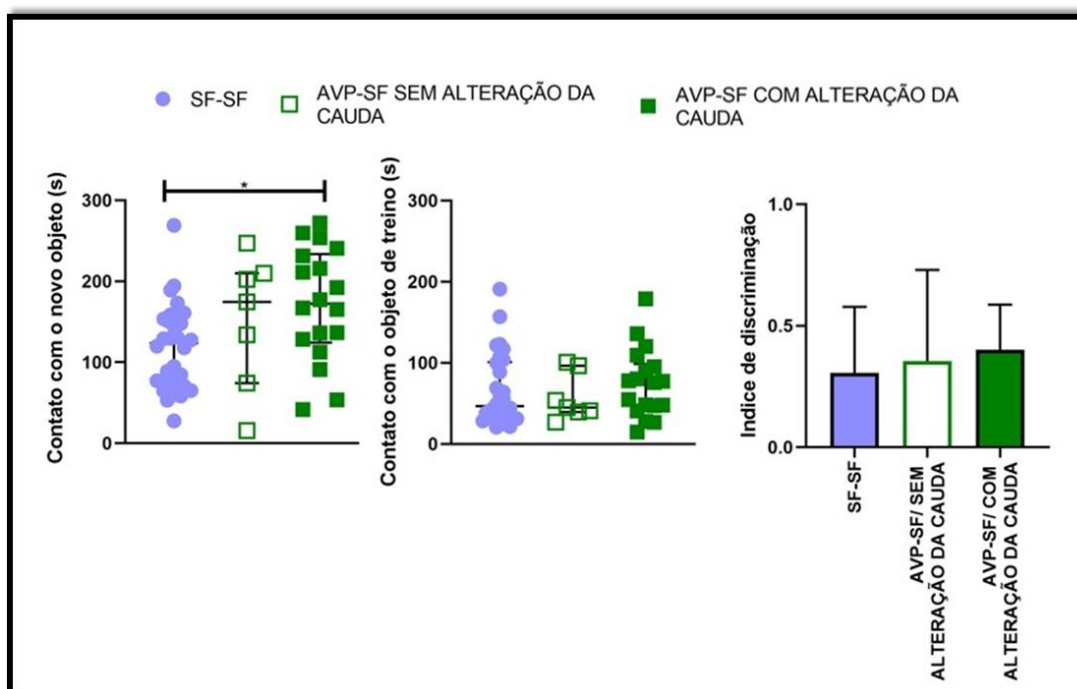


Figura 18. Comportamento no teste de RON, de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou SF e, tratados com SF no período pós-natal, considerando a morfologia da cauda. Somente foi detectada alteração da cauda em animais expostos ao AVP. (*) $p = 0,0110$.

4.1.3 Interação Social

No teste de interação social os parâmetros avaliados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Figura 19).

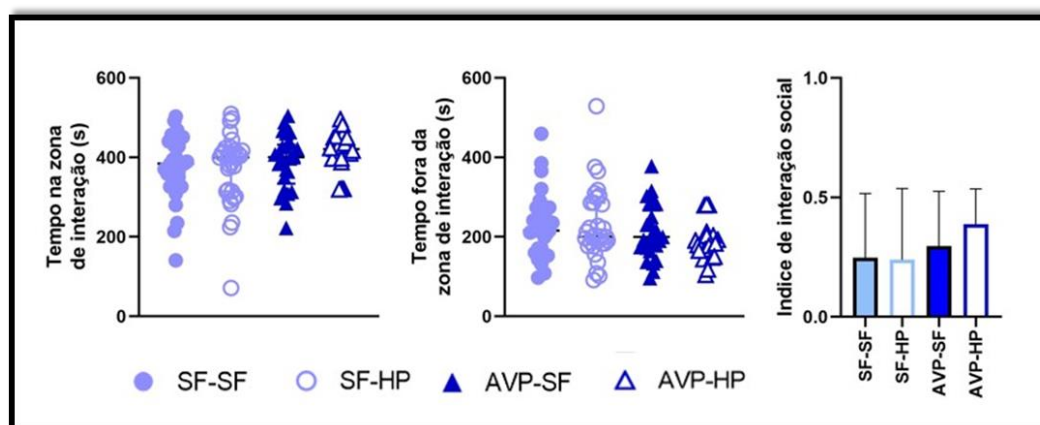


Figura 19. Avaliação da sociabilidade de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Comparação do tempo de permanência na zona de interação, fora da zona de interação e o índice de interação social.

Para a exclusão de fatores intrínsecos e extrínsecos individuais avaliamos a ninhada. Quanto à sociabilidade verificamos que as ninhadas com animais AVP-HP passam menos tempo fora da zona de interação do que ninhadas com animais SF-HP (Figura 20).

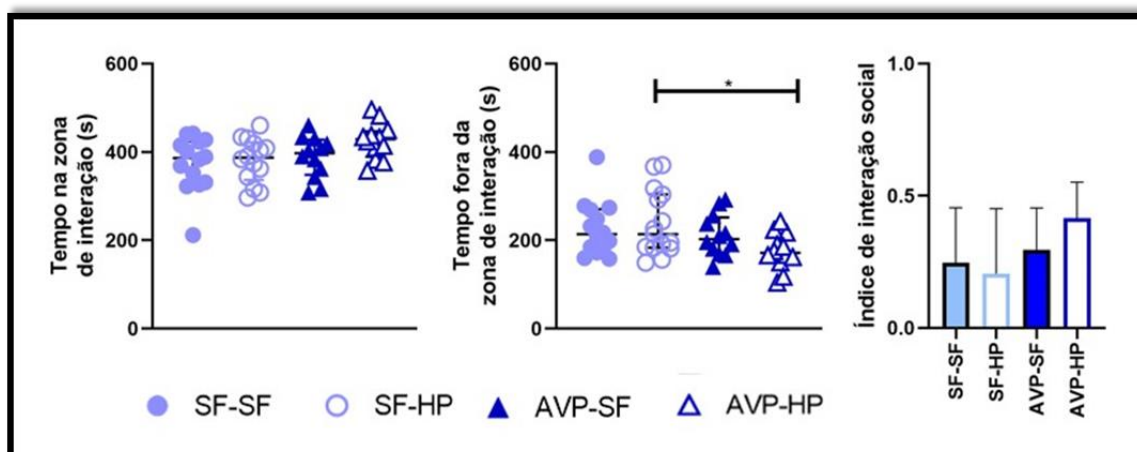


Figura 20. Avaliação da sociabilidade de ninhadas de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Comparação do tempo de permanência na zona de interação, fora da zona de interação e o índice de interação social. (*) $p=0,01$.

Na análise da alteração da cauda não foi possível observar diferenças estatísticas nos parâmetros avaliados (Figura 21).

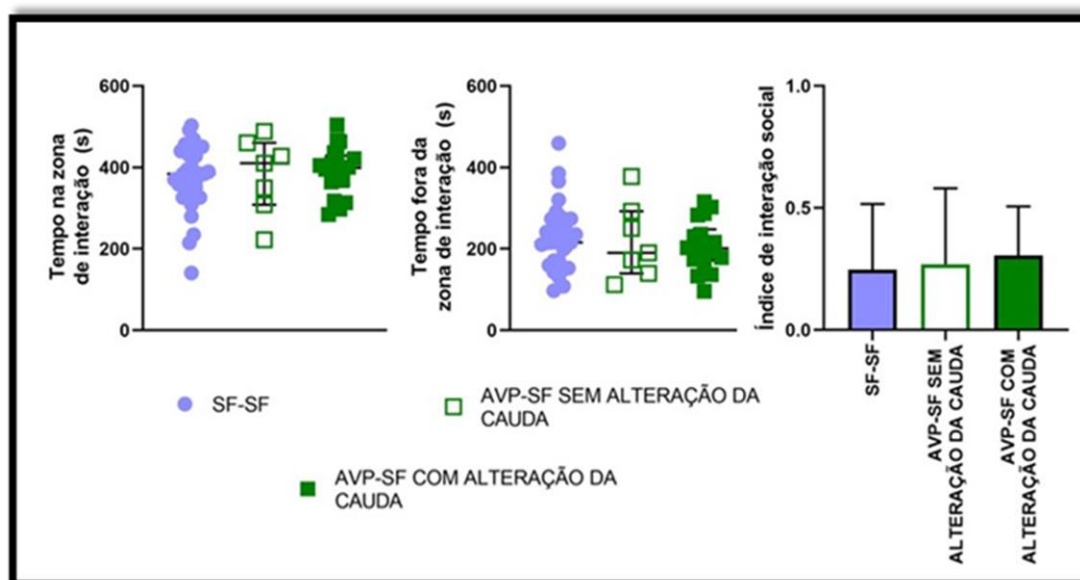


Figura 21. Avaliação da interação social dos animais com e sem alteração da cauda, expostos no período pré-natal ao AVP e tratados no período pós-natal com SF e, comparados ao grupo SF-SF.

4.1.4 Labirinto em Cruz Elevado

No teste de LCE não observamos diferenças entre os grupos experimentais quanto ao comportamento ansioso e estereotipa dos animais, também não observamos diferenças no tempo de exploração, de elevação e de *head-dipping*. Por fim, avaliamos o tempo em que cada animal passou caminhando durante o teste e observamos uma diminuição deste parâmetro nos animais AVP-HP em relação aos demais grupos experimentais (Figura 23).

Nenhuma diferença estatística foi observada no emparelhamento das ninhadas dos grupos experimentais (Figura 24) e na análise da alteração morfológica da cauda (Figura 25). Durante a execução do teste de LCE quatro ratos experimentais, todos tratados com AVP, caíram do aparato.

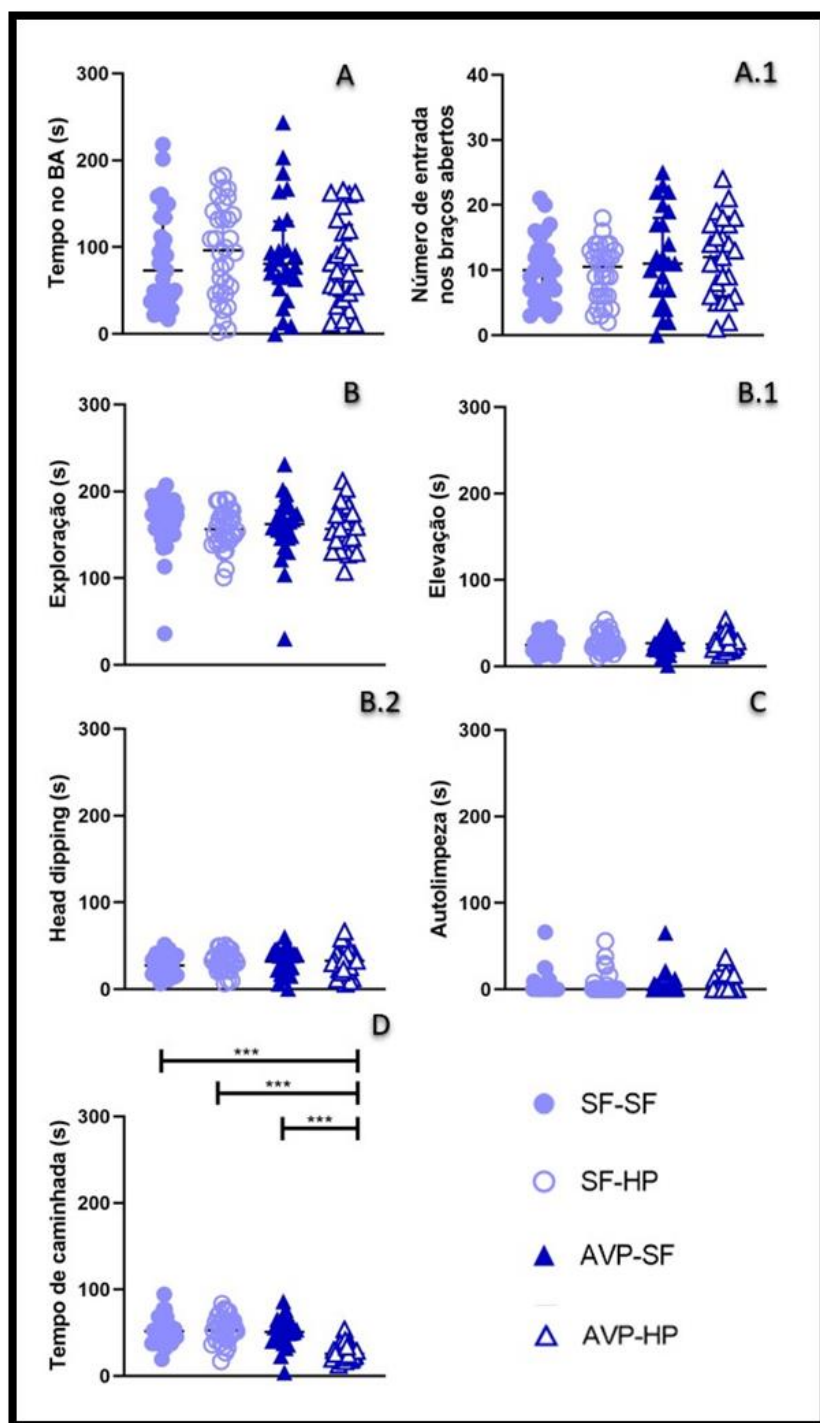


Figura 22. Comportamento no teste do labirinto em cruz elevado de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Avaliação do comportamento do tipo ansioso (**A** e **A.1**), do nível de exploração (**B**, **B.1** e **B.2**), do comportamento repetitivo (**C**) e de caminhada (**D**). (***) $p < 0,0001$.

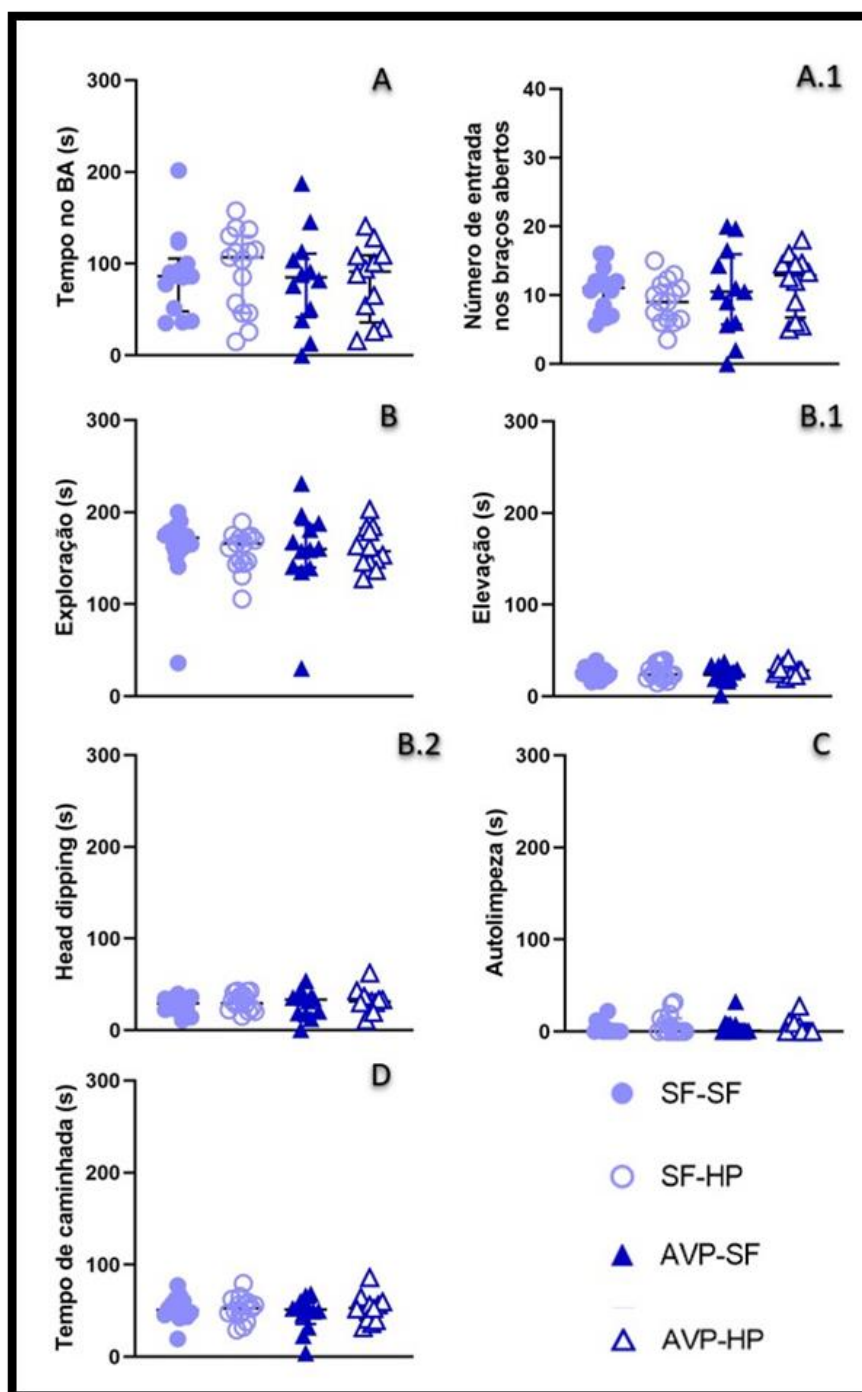


Figura 23. Comportamento no teste no LCE de ninhadas de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SF e, tratados durante a fase pós-natal com HP ou SF. Avaliação do comportamento do tipo ansioso (A e A.1), do nível de exploração (B, B.1 e B.2), do comportamento repetitivo (C) e de caminhada (D).

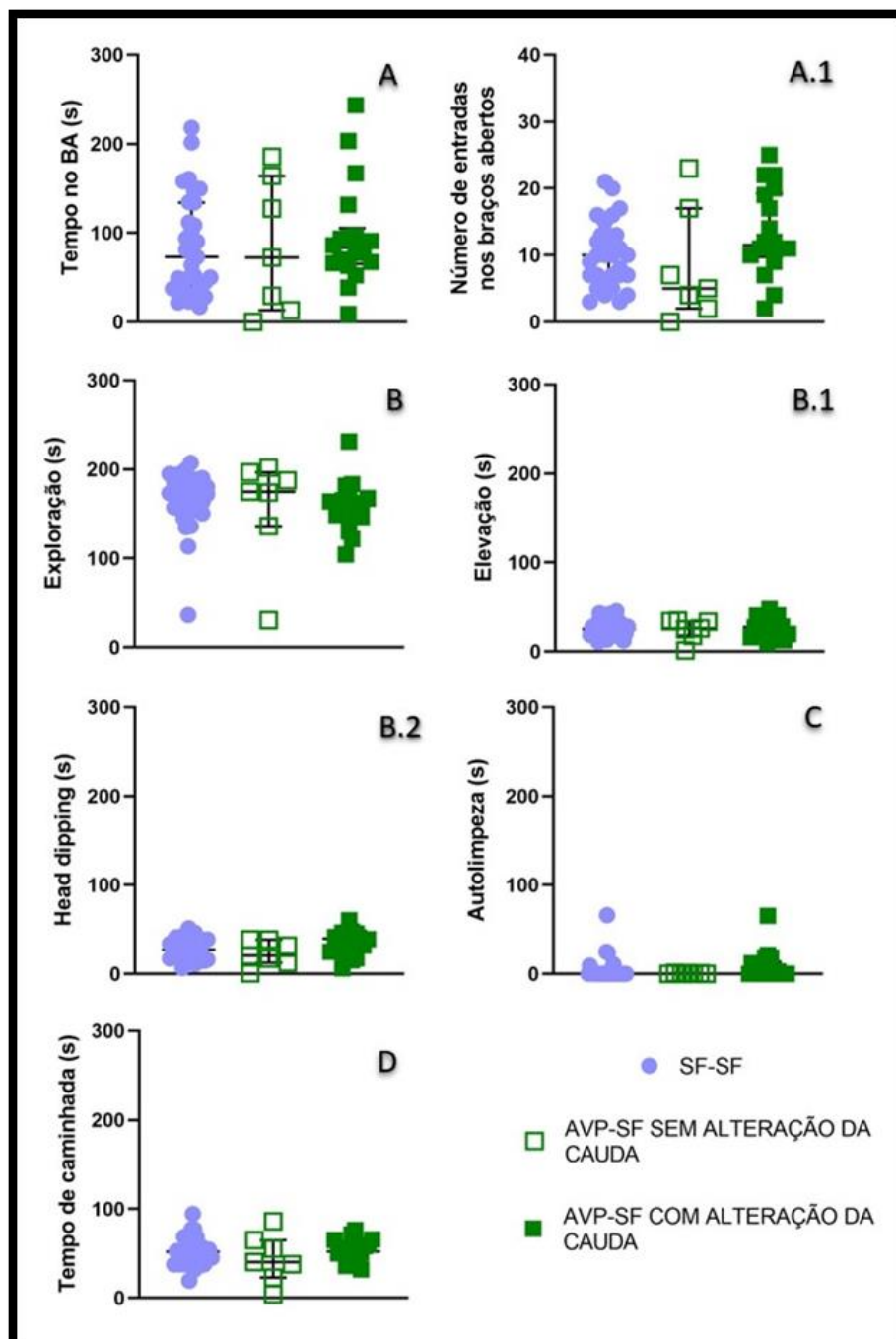


Figura 24. Avaliação comportamental no LCE dos animais, com e sem alteração da cauda, expostos no período pré-natal ao AVP ou SF e, tratados no período pós-natal com SF. Avaliação do comportamento do tipo ansioso (**A** e **A.1**), do nível de exploração (**B**, **B.1** e **B.2**), do comportamento repetitivo (**C**) e de caminhada (**D**).

4.2 Contagem neuronal

Não observamos diferenças significativas ao quantificarmos o número de neurônios do hipocampo, nas secções coronais AP de -4.16 a -4.52 mm, com relação ao bregma ⁽¹¹⁷⁾, nas sub-regiões do HC em CA1, CA2, CA3, CA4, GD-s e GD-i (Figura 25).

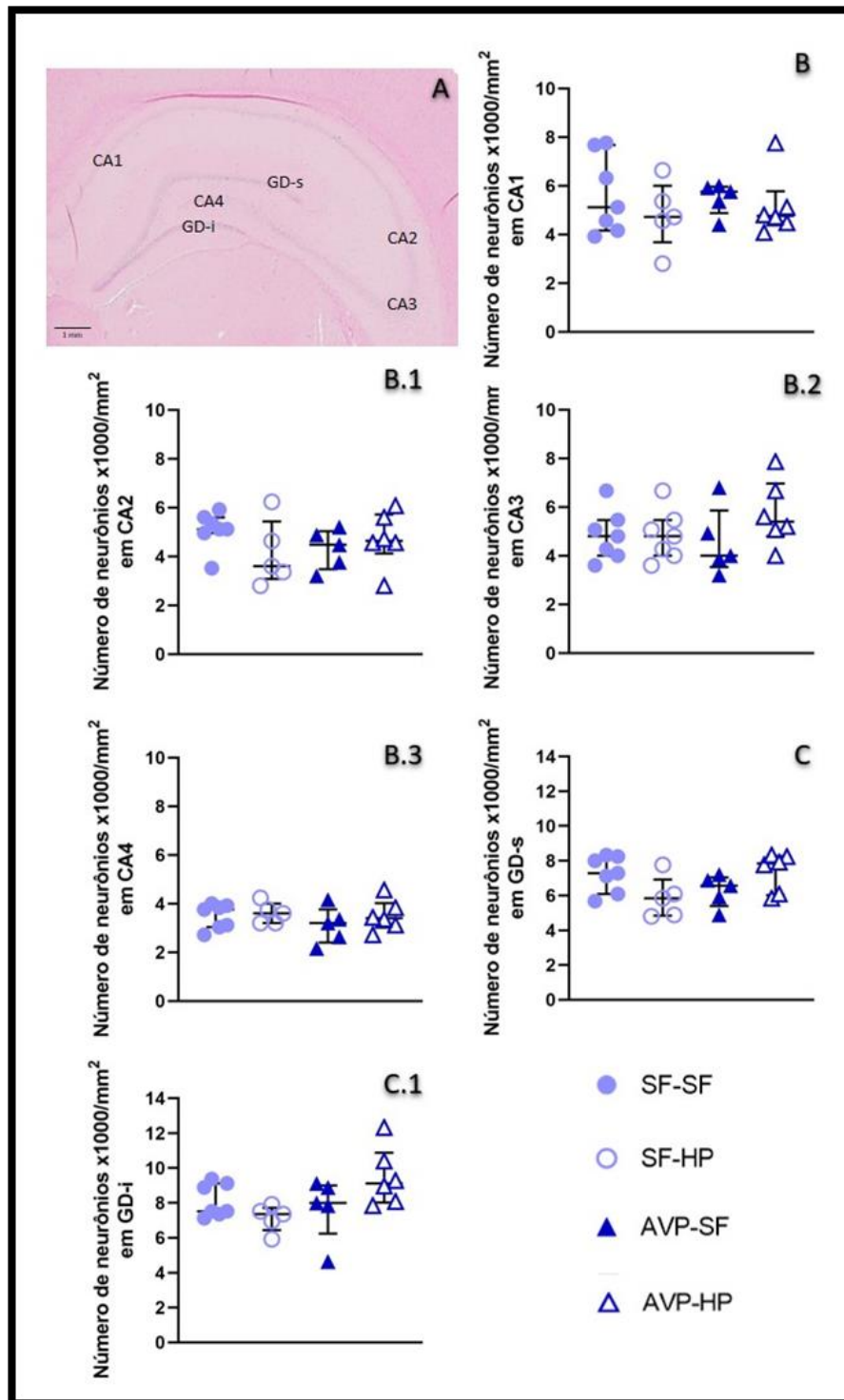


Figura 25. Imagem representativa do hipocampo dorsal de um dos ratos do experimento (A) e densidade neuronal em CA1 (B), CA2 (B.1), CA3 (B.2), CA4 (B.3), giro dentado – lâmina superior (C) e giro dentado – lâmina inferior (C.1).

5 DISCUSSÃO

Considerando os resultados obtidos propusemos que alguns fatores do ambiente poderiam influenciar nos parâmetros comportamentais do tipo autista de modelos animais, o que resultou em um artigo já publicado (Apêndice A). Também, a discussão dos resultados divergentes quanto a replicabilidade do modelo animal exposto ao AVP será o escopo de um artigo a ser publicado (Apêndice B).

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é representado por um grupo heterogêneo de manifestações comportamentais de desenvolvimento amplamente variável, com etiologia multifatorial ⁽¹⁵⁾. Os desafios terapêuticos são muitos, visto que as opções atuais de tratamento medicamentoso são limitadas, focam nas comorbidades e provocam muitos efeitos adversos. Nesse contexto, o presente estudo avaliou os efeitos do *Hypericum perforatum* (HP) em um modelo experimental de TEA, que apresenta os critérios de validade, de face e de construto ⁽⁵⁰⁾. Pesquisas envolvendo aspectos comportamentais de modelos roedores aumentaram nos últimos anos, assim como, a preocupação relacionada à replicabilidade de seus estudos ⁽¹¹⁸⁾.

No processo de geração das ninhadas do modelo, o número de acasalamentos entre os ratos e a taxa de prenhes são escassos na literatura. Em um estudo, a taxa de aborto em fêmeas tratadas com 600 mg/kg de AVP foi de 54,1% ⁽¹¹⁹⁾, contrapondo a uma porcentagem menor obtida no presente estudo, tanto nos animais controle quanto nos tratados. É sabido que o estresse pré-natal aumenta o risco de aborto, tanto por alterações ambientais quanto por exposição a medicamentos. O estresse pré-natal ambiental (aumento da luz, calor e contenção da rata grávida) é associado a 35,70% de canibalismo ⁽¹²⁰⁾, similar à proporção do nosso estudo com exposição medicamentosa. Não observamos

diferenças na quantidade total de animais ao nascer, e nem na quantidade de machos ou fêmeas nascidas em cada ninhada, corroborando com a literatura ⁽¹¹⁹⁾.

Para verificar o processo de maturação dos filhotes monitoramos a data de abertura dos olhos e não observamos diferenças significativas, porém a literatura traz que há uma tendência de abertura ocular atrasada nos animais AVP ⁽⁵⁵⁾. Estudos demonstram que os animais expostos no período pré-natal ao AVP são mais leves em relação aos do grupo controle ^(55, 119). Em nosso estudo, como em outro, não foi possível observar diferenças significativas em relação ao peso corpóreo dos animais do grupo AVP ⁽¹²¹⁾.

É possível verificar se houve a biodisponibilidade do AVP aos filhotes no período intraútero por meio da presença de alguma teratogenia. Estudos demonstraram que ratos expostos no E11 ao E12,5, a doses de 350 a 800 mg/kg de AVP, replicam a maioria das anormalidades anatômicas e comportamentais do tipo autista ^(45, 48, 57, 73). Qualquer alteração durante o referido período é suficiente para induzir características morfológicas, neurodesenvolvimentais e comportamentais que se assemelham ao autismo em humanos, pois este período coincide com o momento do fechamento do tubo neural de ratos ⁽¹¹⁹⁾.

Pesquisadores observaram que alguns animais expostos ao AVP no período intraútero exibiam malformação física; 9% exibiam dobras nas caudas e 4% dos animais, a ocorrência de cromodacriorreia ⁽¹¹⁹⁾. Em nosso estudo 78% dos animais apresentaram alteração da cauda e 12% a cromodacriorreia. Estes eventos são congruentes com a ocorrência de malformações físicas em alguns pacientes expostos ao AVP durante o período embrionário e, evidenciam a biodisponibilidade do composto aos fetos no momento do fechamento do tubo neural, indicando seus efeitos tóxicos e teratogênicos ^(54, 70).

5.1 Testes Comportamentais

Todos os testes comportamentais realizados, apesar de certas diferenças na execução, são amplamente utilizados para verificar parâmetros comportamentais replicados pelo modelo animal, análogo ao comportamento do TEA em seres humanos ⁽⁷⁵⁾.

5.1.1 Campo Aberto

O teste de CA possui pequenas diferenças entre os protocolos, como o material do aparato e o tempo de execução ^(122, 123, 124). Estudos demonstram que os animais AVP apresentam menor permanência na área central do aparato, diminuição da atividade exploratória, aumento da locomoção e do tempo de autolimpeza ^(45, 121 125). No entanto, nossos animais não apresentaram um aumento da ansiedade e dos comportamentos repetitivos, avaliados por meio do teste de CA. Como uma forma de excluir a variabilidade individual do rato realizamos os testes estatísticos com as médias das ninhadas de cada grupo. Também, não obtivemos valores significantes.

A fim de avaliarmos se a alteração da cauda representa um marcador fenotípico de animais que replicam as características do TEA, avaliamos as diferenças comportamentais de cada parâmetro entre os animais com e sem alteração da cauda. Porém, não encontramos diferenças relevantes em nenhum dos parâmetros avaliados, assim, a alteração fenotípica da cauda parece não ser um marcador de animais que replicam o TEA.

5.1.2 Reconhecimento do Objeto Novo

Estudos mostram que os animais expostos ao AVP apresentam uma preferência pelo contato com objeto familiar. Alguns autores realizam a fase de treinamento, por cinco ou dez minutos, em dois dias anteriores a fase de teste. No dia seguinte ocorre a gravação com um período de 60 minutos entre o treino e o teste ^(112, 113). Em nosso trabalho não

observamos diferenças na preferência do animal pelo objeto novo ou familiar, talvez no nosso protocolo os animais não conheçam de fato os objetos apresentados, já que os ratos eram liberados a explorar livremente os objetos por 10 minutos no dia do teste. O índice de discriminação avaliado no teste de RON não apresentou diferenças estatísticas, corroborando com os valores apresentados por cada animal.

Na avaliação da ninhada e consequente exclusão de fatores individuais, não observamos diferenças estatísticas entre o tempo de exploração dos objetos. Os animais SF-HP apresentaram um maior índice de discriminação em relação aos demais grupos experimentais, evidenciando o efeito benéfico do HP nos aspectos cognitivos dos animais ⁽¹⁰²⁾ e, mostrando também que, a média da ninhada é uma análise importante para verificarmos a totalidade dos comportamentos realizados pelos animais.

Ao avaliarmos o RON com a alteração fenotípica da cauda, observamos que os animais controle tiveram um menor tempo de contato com o objeto novo, em comparação com os animais de cauda alterada, evidenciando que a alteração da cauda não é um fator determinante para a replicação dos comportamentos do tipo autista em ratos.

5.1.3 Interação Social

Déficits na sociabilidade de animais expostos ao AVP já foram demonstrados ⁽¹¹²⁾, no entanto não observamos esta diferença com o tratamento realizado, corroborando com o achado no índice de interação social.

Ao avaliarmos a média de cada ninhada observamos que os animais SF-HP passaram mais tempo fora da zona de interação em relação aos animais AVP-HP, o que não corrobora com outros estudos. Na literatura o teste foi realizado em dois dias consecutivos, sendo que no primeiro, o animal era adaptado ao aparato, por cinco minutos e, no segundo dia era colocado o cilindro vazio com posterior gravação do teste ⁽¹¹²⁾.

Como em nosso protocolo, o teste de IS ocorreu no mesmo aparato utilizado nos dois dias anteriores. Optamos por não realizar o dia de habituação e sim, uma fase de habituação ao aparato com duração de cinco minutos. Talvez este dia de habituação, seja crucial para evidenciar o comportamento social do animal durante o teste. Na análise da alteração fenotípica da cauda, não observamos alterações significativas.

5.1.4 Labirinto em Cruz Elevado

Dentre os testes comportamentais realizados, o de LCE é o mais padronizado entre os laboratórios de pesquisa experimental ^(119, 126). Animais expostos ao AVP evitam áreas abertas do aparato, devido ao aumento do nível da ansiedade e diminuem todos os parâmetros exploratórios (exploração, elevação, exploração no final do BA e *head dipping*) ^(122, 127). Desse modo, apresentam um maior tempo e número de entradas nos BF do labirinto, o que não foi observado no presente estudo.

Para a verificação da atividade locomotora dos ratos durante o teste de LCE avaliamos o tempo de caminhada e, observamos que há uma diminuição deste parâmetro no grupo AVP-HP. Por não haver outros parâmetros locomotores alterados nos demais testes, não podemos inferir que seja o medo extremo, mas talvez uma reação restrita a um novo ambiente. Na avaliação da ninhada e da alteração fenotípica da cauda, também não observamos alterações significativas.

Um fator ambiental a ser considerado é a luminosidade durante o teste, pois tem sido relatado que baixos níveis de iluminação levam a uma maior exploração dos BAs do aparato e que em ambientes iluminados (3 a 300 lux – medidos no centro do aparato) os animais evitam esta localidade, com menor porcentagem de entradas e de tempo gasto no BA ⁽¹²⁸⁾. Em nosso protocolo, a luminosidade do centro foi de 51 lux, então,

aparentemente nossos animais evitaram os BAs do aparato por conta da alta luminosidade durante o teste.

5.2 Contagem neuronal

A exposição pré-natal ao AVP induz alterações estruturais no HC dos animais, levando a uma descontinuidade da camada de células granulares e diminuição do número de neurônios no GD⁽¹²⁹⁾ e em CA1⁽¹³⁰⁾. Não encontramos as referidas alterações em nosso estudo. Já nas demais sub-regiões (CA1, CA2 e CA3), um estudo não encontrou diferenças na quantidade neuronal⁽¹²⁹⁾, o que condiz com o nosso achado.

5.3 Considerações Finais

A etiologia do TEA não é totalmente compreendida; assim modelos animais que repliquem as manifestações clínicas presentes no espectro são de suma importância para avanços na compreensão da fisiopatologia e do tratamento do transtorno. Tais modelos podem ser de induzidos geneticamente⁽³⁵⁾ ou por fatores ambientais⁽⁴⁴⁾. Contudo, é importante avaliarmos e questionarmos a reprodutibilidade dos modelos.

Neste estudo o modelo animal de autismo induzido por fatores ambientais, AVP, parece não ter sido reproduzido. Visto que os animais não apresentaram, no teste de CA, um aumento da ansiedade, avaliado por meio do tempo de permanência na área central^(113, 121) e aumento dos comportamentos repetitivos, avaliados por meio do tempo de autolimpeza^(45, 125). Também não apresentaram uma maior preferência pelo contato com os objetos familiares⁽¹³¹⁾ e nem déficits na sociabilidade^(45, 115), avaliados no teste de RON e de IS, respectivamente. Além disso, não apresentaram aumento no número de entradas e no tempo gasto nos BAs do LCE, para avaliação do comportamento do tipo ansioso⁽³³⁾.

Entretanto, nossos animais entraram em contato com o AVP. Tal condição pode ser comprovada pela existência da alta taxa de efeitos teratogênicos como as alterações da cauda (78%) e a cromodacriorreia (12%); similar ao observado na literatura ^(55, 119). Na literatura há estudos com o modelo experimental de TEA exposto ao AVP e replicação das características do transtorno ^(122, 127, 130). Os estudos são realizados em diferentes condições experimentais, bem como, em diferentes origens genéticas das espécies, talvez estes pontos sejam a explicação para os nossos achados.

Não há um consenso sobre as formas corretas de analisar e estimar a replicabilidade dos estudos ^(132, 133). Porém problemas e diferenças são observados nos trabalhos, reforçando ainda mais a necessidade de protocolos mais padronizados em que a composição das soluções/suspensões dos fármacos e o *background* genético dos animais sejam descritos da forma mais precisa possível para aumentar a comparabilidade e a reprodutibilidade dos estudos ⁽¹³⁴⁾.

Uma variedade de fatores genéticos e ambientais tem sido associada ao TEA, mas nenhum é absolutamente específico para o desenvolvimento do espectro ⁽¹³⁵⁾. Fatores ambientais foram associados ao risco de 14% a 22% de desenvolver o TEA, porém aos fatores genéticos o risco atribuído é de cerca de 80% ^(135, 136). Assim, ressalta-se a importante contribuição dos fatores genéticos. Inclusive, a Academia Americana de Pediatria e o Colégio Americano de Genética Médica e Genômica recomendam testes genéticos para indivíduos diagnosticados com TEA, visando o correto Aconselhamento Genético para as famílias ^(137, 138, 139).

Neste contexto, a aparente não reprodução do modelo animal de autismo induzido por fatores ambientais, pode ser justificada pela não suscetibilidade genética dos animais expostos ao AVP. Assim, será que estudos que reproduziram o modelo utilizaram animais com certa suscetibilidade ao composto? Uma proposta seria comparar geneticamente os

nossos animais com animais expostos ao AVP e que replicaram a características comportamentais do tipo autista.

Apesar de não ser possível avaliarmos os efeitos do HP nos comportamentos do tipo autista replicados no modelo animal por exposição ao AVP, é interessante ressaltarmos que o composto não possuiu efeitos adversos, já que o grupo SF-HP foi similar ao grupo controle (SF-SF), em todos os parâmetros analisados. Inclusive, o HP aumentou o índice de discriminação nos ratos controle, evidenciando um efeito benéfico do composto.

6 CONCLUSÃO

É notório que os animais entraram em contato com o ácido valproico, comprovado pela existência dos efeitos teratogênicos, como a alteração morfológica da cauda e a ocorrência de cromodacriorreia. No entanto, nossos animais não replicaram os comportamentos do tipo autista, pois não foram observados aumento das estereotipias, preferência pelo objeto familiar, déficits na sociabilidade e aumento da ansiedade. Assim, provavelmente, os animais do estudo não possuíam susceptibilidade genética ao composto. Logo, não foi possível avaliar o efeito do *Hypericum perforatum* nestes animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) *American Psychiatric Association*. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 15th ed. Arlington, VA: Am Psychiatr Publishing; 2013.

- (2) Carbone PS. Moving from research to practice in the primary care of children with autism spectrum disorders. *Acad Pediatr*. 2013 Sep-Oct;13(5):390-9. doi: 10.1016/j.acap.2013.04.003. PMID: 24011743.

- (3) Hyman SL, Levy SE, Myers SM; Council on children with disabilities, section on developmental and behavioral pediatrics. Executive Summary: Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics*. 2020 Jan;145(1):e20193448. doi: 10.1542/peds.2019-3448. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31843858.

- (4) Zeidan J, Fombonne E, Scora J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, Yusuf A, Shih A, Elsabbagh M. Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res*. 2022 May;15(5):778-790. doi: 10.1002/aur.2696. Epub 2022 Mar 3. PMID: 35238171; PMCID: PMC9310578.

- (5) Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcín C, Montiel-Nava C, Patel V, Paula CS, Wang C, Yasamy MT, Fombonne E. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res*. 2012 Jun;5(3):160-79. doi: 10.1002/aur.239. Epub 2012 Apr 11. PMID: 22495912; PMCID: PMC3763210.

- (6) Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, Kurzius-Spencer M, Zahorodny W, Robinson Rosenberg C, White T, Durkin MS, Imm P, Nikolaou L, Yeargin-Allsopp M, Lee LC, Harrington R, Lopez M, Fitzgerald RT, Hewitt A, Pettygrove S, Constantino JN, Vehorn A, Shenouda J, Hall-Lande J, Van Naarden Braun K, Dowling NF. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ*. 2018 Apr 27;67(6):1-23. doi: 10.15585/mmwr.ss6706a1. Erratum in: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018 May

18;67(19):564. Erratum in: MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018 Nov 16;67(45):1280. Corrected and republished in: MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018 Nov 16;67(45):1279. PMID: 29701730; PMCID: PMC5919599.

(7) Al-Dewik N, Al-Jurf R, Styles M, Tahtamouni S, Alsharshani D, Alsharshani M, Ahmad AI, Khattab A, Al Rifai H, Walid Qoronfleh M. Overview and Introduction to Autism Spectrum Disorder (ASD). *Adv Neurobiol.* 2020;24:3-42. doi: 10.1007/978-3-030-30402-7_1. PMID: 32006355.

(8) Lord C, Charman T, Havdahl A, Carbone P, Anagnostou E, Boyd B, Carr T, de Vries PJ, Dissanayake C, Divan G, Freitag CM, Gotelli MM, Kasari C, Knapp M, Mundy P, Plank A, Scahill L, Servili C, Shattuck P, Simonoff E, Singer AT, Slonims V, Wang PP, Ysraelit MC, Jellett R, Pickles A, Cusack J, Howlin P, Szatmari P, Holbrook A, Toolan C, McCauley JB. The Lancet Commission on the future of care and clinical research in autism. *Lancet.* 2022 Jan 15;399(10321):271-334. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01541-5. Epub 2021 Dec 6. Erratum in: *Lancet.* 2022 Dec 3;400(10367):1926. PMID: 34883054.
Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet.* 2018 Aug 11;392(10146):508-520. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31129-2. Epub 2018 Aug 2. PMID: 30078460; PMCID: PMC7398158.

(9) Griesi-Oliveira, K., & Sertié, A. L. (2017). Transtornos do espectro autista: um guia atualizado para aconselhamento genético. *Einstein (São Paulo)*, 15, 233-238.

(10) Amr, M., Raddad, D., El-Mehesh, F., Bakr, A., Sallam, K., & Amin, T. (2012). Comorbid psychiatric disorders in Arab children with autism spectrum disorders. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 6(1), 240-248.

(11) Sheldrick RC, Marakovitz S, Garfinkel D, Perrin EC, Carter AS. Prevalence and Co-Occurrence of Developmental and Emotional-Behavioral Problems in Young Children. *Acad Pediatr.* 2023 Apr;23(3):623-630. doi: 10.1016/j.acap.2022.11.008. Epub 2022 Nov 20. PMID: 36417968; PMCID: PMC10149553.

(12) Amiet C, Gourfinkel-An I, Bouzamondo A, Tordjman S, Baulac M, Lechat P, Mottron L, Cohen D. Epilepsy in autism is associated with intellectual disability and

gender: evidence from a meta-analysis. *Biol Psychiatry*. 2008 Oct 1;64(7):577-82. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.030. Epub 2008 Jun 20. PMID: 18565495.

(13) Souders MC, Zavodny S, Eriksen W, Sinko R, Connell J, Kerns C, Schaaf R, Pinto-Martin J. Sleep in Children with Autism Spectrum Disorder. *Curr Psychiatry Rep*. 2017 Jun;19(6):34. doi: 10.1007/s11920-017-0782-x. PMID: 28502070; PMCID: PMC5846201.

(14) Chandler S, Howlin P, Simonoff E, O'Sullivan T, Tseng E, Kennedy J, Charman T, Baird G. Emotional and behavioural problems in young children with autism spectrum disorder. *Dev Med Child Neurol*. 2016 Feb;58(2):202-8. doi: 10.1111/dmcn.12830. Epub 2015 Jun 16. PMID: 26077499.

(15) Bauman MD, Schumann CM. Advances in nonhuman primate models of autism: Integrating neuroscience and behavior. *Exp Neurol*. 2018 Jan;299(Pt A):252-265. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.07.021. Epub 2017 Aug 1. PMID: 28774750; PMCID: PMC5810939.

(16) Carter MT, Scherer SW. Autism spectrum disorder in the genetics clinic: a review. *Clin Genet*. 2013 May;83(5):399-407. doi: 10.1111/cge.12101. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23425232.

(17) Apte M, Kumar A. Correlation of mutated gene and signalling pathways in ASD. *IBRO Neurosci Rep*. 2023 Mar 27;14:384-392. doi: 10.1016/j.ibneur.2023.03.011. PMID: 37101819; PMCID: PMC10123338.

(18) Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, Bryson S, Carver LJ, Constantino JN, Dobkins K, Hutman T, Iverson JM, Landa R, Rogers SJ, Sigman M, Stone WL. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*. 2011 Sep;128(3):e488-95. doi: 10.1542/peds.2010-2825. Epub 2011 Aug 15. PMID: 21844053; PMCID: PMC3164092.

- (19) Chen JA, Peñagarikano O, Belgard TG, Swarup V, Geschwind DH. The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:111-44. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040405. PMID: 25621659.
- (20) Bolton P, Macdonald H, Pickles A, Rios P, Goode S, Crowson M, Bailey A, Rutter M. A case-control family history study of autism. *J Child Psychol Psychiatry*. 1994 Jul;35(5):877-900. doi: 10.1111/j.1469-7610.1994.tb02300.x. PMID: 7962246.
- (21) Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K, Lotspeich L, Croen LA, Ozonoff S, Lajonchere C, Grether JK, Risch N. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry*. 2011 Nov;68(11):1095-102. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.76. Epub 2011 Jul 4. PMID: 21727249; PMCID: PMC4440679..
- (22) Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G, McGready J, Kaufmann WE, Law PA. Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2009 Oct;163(10):907-14. doi: 10.1001/archpediatrics.2009.98. PMID: 19805709.
- (23) Volk HE, Lurmann F, Penfold B, Hertz-Picciotto I, McConnell R. Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry*. 2013 Jan;70(1):71-7. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.266. PMID: 23404082; PMCID: PMC4019010.
- (24) Windham GC, Sumner A, Li SX, Anderson M, Katz E, Croen LA, Grether JK. Use of birth certificates to examine maternal occupational exposures and autism spectrum disorders in offspring. *Autism Res*. 2013 Feb;6(1):57-63. doi: 10.1002/aur.1275. Epub 2013 Jan 29. PMID: 23361991.
- (25) Tania M, Khan MA, Xia K. Recent advances in animal model experimentation in autism research. *Acta Neuropsychiatr*. 2014 Oct;26(5):264-71. doi: 10.1017/neu.2013.58. PMID: 25371923.

(26) Krakowiak P, Walker CK, Bremer AA, Baker AS, Ozonoff S, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics*. 2012 May;129(5):e1121-8. doi: 10.1542/peds.2011-2583. Epub 2012 Apr 9. PMID: 22492772; PMCID: PMC3340592.

(27) Cheslack-Postava K, Liu K, Bearman PS. Closely spaced pregnancies are associated with increased odds of autism in California sibling births. *Pediatrics*. 2011 Feb;127(2):246-53. doi: 10.1542/peds.2010-2371. Epub 2011 Jan 10. PMID: 21220394; PMCID: PMC3387860.

(28) Lampi KM, Lehtonen L, Tran PL, Suominen A, Lehti V, Banerjee PN, Gissler M, Brown AS, Sourander A. Risk of autism spectrum disorders in low birth weight and small for gestational age infants. *J Pediatr*. 2012 Nov;161(5):830-6. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.04.058. Epub 2012 Jun 5. PMID: 22677565; PMCID: PMC3449022.

(29) Weston J, Bromley R, Jackson CF, Adab N, Clayton-Smith J, Greenhalgh J, Hounscome J, McKay AJ, Tudur Smith C, Marson AG. Monotherapy treatment of epilepsy in pregnancy: congenital malformation outcomes in the child. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Nov 7;11(11):CD010224. doi: 10.1002/14651858.CD010224.pub2. PMID: 27819746; PMCID: PMC6465055.

(30) Christensen J, Grønberg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, Vestergaard M. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*. 2013 Apr 24;309(16):1696-703. doi: 10.1001/jama.2013.2270. PMID: 23613074; PMCID: PMC4511955.

(31) Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein DL, Harony-Nicolas H, De Rubeis S, Drapeau E, Buxbaum JD, Hof PR. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol*. 2017 Oct;134(4):537-566. doi: 10.1007/s00401-017-1736-4. Epub 2017 Jun 5. PMID: 28584888; PMCID: PMC5693718

(32) Doğan M, Albayrak Y, Erbaş O. Torasemide Improves the Propionic Acid-Induced Autism in Rats: A Histopathological and Imaging Study. *Alpha Psychiatry*. 2023 Jan

1;24(1):22-31. doi: 10.5152/alphapsychiatry.2023.22975. PMID: 36879996; PMCID: PMC9984905.

(33) Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:69-74. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_4. PMID: 30535682.

(34) Iwata K. Characterization of an Animal Model of Autism and Social Interaction. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:149-155. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_14. PMID: 30535692.

(35) Zhao M, Chang Q, Yang H, Wang M, Liu Y, Lv N, Lei Q, Wei H. Epothilone D Modulates Autism-like Behaviors in the BTBR Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience.* 2022 May 10;490:171-181. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.02.025. Epub 2022 Feb 25. PMID: 35227832.

(36) Harris SW, Hessel D, Goodlin-Jones B, Ferranti J, Bacalman S, Barbato I, Tassone F, Hagerman PJ, Herman H, Hagerman RJ. Autism profiles of males with fragile X syndrome. *Am J Ment Retard.* 2008 Nov;113(6):427-38. doi: 10.1352/2008.113:427-438. PMID: 19127654; PMCID: PMC2629645.

(37) Kazdoba TM, Leach PT, Silverman JL, Crawley JN. Modeling fragile X syndrome in the *Fmr1* knockout mouse. *Intractable Rare Dis Res.* 2014 Nov;3(4):118-33. doi: 10.5582/iridr.2014.01024. PMID: 25606362; PMCID: PMC4298642.

(38) Tabuchi K, Blundell J, Etherton MR, Hammer RE, Liu X, Powell CM, Südhof TC. A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science.* 2007 Oct 5;318(5847):71-6. doi: 10.1126/science.1146221. Epub 2007 Sep 6. PMID: 17823315; PMCID: PMC3235367.

(39) Wesseling H, Elgersma Y, Bahn S. A brain proteomic investigation of rapamycin effects in the *Tsc1*^{+/-} mouse model. *Mol Autism.* 2017 Aug 1;8:41. doi: 10.1186/s13229-017-0151-y. PMID: 28775826; PMCID: PMC5540199.

- (40) Brown AS, Meyer U. Maternal Immune Activation and Neuropsychiatric Illness: A Translational Research Perspective. *Am J Psychiatry*. 2018 Nov 1;175(11):1073-1083. doi: 10.1176/appi.ajp.2018.17121311. Epub 2018 Sep 17. PMID: 30220221; PMCID: PMC6408273.
- (41) Vitor-Vieira F, Vilela FC, Giusti-Paiva A. Hyperactivation of the amygdala correlates with impaired social play behavior of prepubertal male rats in a maternal immune activation model. *Behav Brain Res*. 2021 Sep 24;414:113503. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113503. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34331970.
- (42) Hsiao EY, Patterson PH. Activation of the maternal immune system induces endocrine changes in the placenta via IL-6. *Brain Behav Immun*. 2011 May;25(4):604-15. doi: 10.1016/j.bbi.2010.12.017. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21195166; PMCID: PMC3081363.
- (43) Ergaz Z, Weinstein-Fudim L, Ornoy A. Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reprod Toxicol*. 2016 Sep;64:116-40. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.04.024. Epub 2016 Apr 30. PMID: 27142188.
- (44) Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM. The teratology of autism. *Int J Dev Neurosci*. 2005 Apr-May;23(2-3):189-99. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2004.11.001. PMID: 15749245.
- (45) Schneider T, Przewłocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Jan;30(1):80-9. doi: 10.1038/sj.npp.1300518. PMID: 15238991.
- (46) Bromley RL, Mawer GE, Briggs M, Cheyne C, Clayton-Smith J, García-Fiñana M, Kneen R, Lucas SB, Shallcross R, Baker GA; Liverpool and Manchester Neurodevelopment Group. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013 Jun;84(6):637-43. doi: 10.1136/jnnp-2012-304270. Epub 2013 Jan 31. PMID: 23370617; PMCID: PMC4115188.

- (47) Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Vafae F, Moghadas M. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain Res.* 2013 Aug 14;1526:15-25. doi: 10.1016/j.brainres.2013.06.024. Epub 2013 Jun 24. PMID: 23806776.
- (48) Bambini-Junior V, Zanatta G, Della Flora Nunes G, Mueller de Melo G, Michels M, Fontes-Dutra M, Nogueira Freire V, Riesgo R, Gottfried C. Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci Lett.* 2014 Nov 7;583:176-81. doi: 10.1016/j.neulet.2014.09.039. Epub 2014 Sep 28. PMID: 25263788.
- (49) Liu F, Horton-Sparks K, Hull V, Li RW, Martínez-Cerdeño V. The valproic acid rat model of autism presents with gut bacterial dysbiosis similar to that in human autism. *Mol Autism.* 2018 Dec 10;9:61. doi: 10.1186/s13229-018-0251-3. PMID: 30555669; PMCID: PMC6288876.
- (50) Mabunga DF, Gonzales EL, Kim JW, Kim KC, Shin CY. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp Neurobiol.* 2015 Dec;24(4):285-300. doi: 10.5607/en.2015.24.4.285. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26713077; PMCID: PMC4688329.
- (51) Johannessen CU, Johannessen SI. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev.* 2003 Summer;9(2):199-216. doi: 10.1111/j.1527-3458.2003.tb00249.x. PMID: 12847559; PMCID: PMC6741662.
- (52) Zafar MS, Stewart AM, Toupin DN, Cook AM, Baumann RJ. Continuous Intravenous Valproate as Abortive Therapy for Pediatric Status Migrainosus. *Neurologist.* 2018 Mar;23(2):43-46. doi: 10.1097/NRL.000000000000161. PMID: 29494433.
- (53) Saeed M, Saleem U, Anwar F, Ahmad B, Anwar A. Inhibition of Valproic Acid-Induced Prenatal Developmental Abnormalities with Antioxidants in Rats. *ACS Omega.* 2020 Mar 2;5(10):4953-4961. doi: 10.1021/acsomega.9b03792. PMID: 32201781; PMCID: PMC7081441.

(54) Doğan A, Baykan A, 7 C. Fetal valproate syndrome with coronary arteriovenous fistula: a case report. *Cardiol Young*. 2021 May;31(5):853-855. doi: 10.1017/S1047951120004904. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33455599.

(55) Ruhela RK, Soni S, Sarma P, Prakash A, Medhi B. Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Ann Neurosci*. 2019 Jan;26(1):25-31. doi: 10.5214/ans.0972.7531.260106. Epub 2019 Jan 1. PMID: 31975769; PMCID: PMC6894633.

(56) Lin YL, Bialer M, Cabrera RM, Finnell RH, Wlodarczyk BJ. Teratogenicity of valproic acid and its constitutional isomer, amide derivative valnoctamide in mice. *Birth Defects Res*. 2019 Aug 15;111(14):1013-1023. doi: 10.1002/bdr2.1406. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30325584.

(57) Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Comp Neurol*. 1996 Jun 24;370(2):247-61. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2. PMID: 8808733.

(58) Liu F, Horton-Sparks K, Hull V, Li RW, Martínez-Cerdeño V. The valproic acid rat model of autism presents with gut bacterial dysbiosis similar to that in human autism. *Mol Autism*. 2018 Dec 10;9:61. doi: 10.1186/s13229-018-0251-3. PMID: 30555669; PMCID: PMC6288876.

(59) Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Moreira JC, Riesgo R, Gottfried C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res*. 2011 Aug 23;1408:8-16. doi: 10.1016/j.brainres.2011.06.015. Epub 2011 Jun 12. PMID: 21767826.

(60) Bronzuoli MR, Facchinetti R, Ingrassia D, Sarvadio M, Schiavi S, Steardo L, Verkhratsky A, Trezza V, Scuderi C. Neuroglia in the autistic brain: evidence from a

preclinical model. *Mol Autism*. 2018 Dec 27;9:66. doi: 10.1186/s13229-018-0254-0. PMID: 30603062; PMCID: PMC6307226.

(61) Cezar LC, Kirsten TB, da Fonseca CCN, de Lima APN, Bernardi MM, Felicio LF. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018 Jun 8;84(Pt A):173-180. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.02.008. Epub 2018 Feb 23. PMID: 29481896.

(62) Dubiel A, Kulesza RJ. Prenatal valproic acid exposure disrupts tonotopic c-Fos expression in the rat brainstem. *Neuroscience*. 2015 Dec 17;311:349-61. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.10.043. Epub 2015 Oct 28. Erratum in: *Neuroscience*. 2016 Jun 2;324:510. Corrected and republished in: *Neuroscience*. 2016 Jun 2;324:511-23. PMID: 26518464.

(63) Baronio D, Castro K, Gonchoroski T, de Melo GM, Nunes GD, Bambini-Junior V, Gottfried C, Riesgo R. Effects of an H3R antagonist on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *PLoS One*. 2015 Jan 5;10(1):e0116363. doi: 10.1371/journal.pone.0116363. PMID: 25560049; PMCID: PMC4283962.

(64) Emam B, Shahsavani A, Khodaghali F, Zarandi SM, Hopke PK, Hadei M, Behbahani H, Yarahmadi M. Effects of PM_{2.5} and gases exposure during prenatal and early-life on autism-like phenotypes in male rat offspring. *Part Fibre Toxicol*. 2020 Jan 29;17(1):8. doi: 10.1186/s12989-020-0336-y. PMID: 31996222; PMCID: PMC6990481.

(65) Favre MR, La Mendola D, Meystre J, Christodoulou D, Cochrane MJ, Markram H, Markram K. Predictable enriched environment prevents development of hyper-emotionality in the VPA rat model of autism. *Front Neurosci*. 2015 Jun 2;9:127. doi: 10.3389/fnins.2015.00127. PMID: 26089770; PMCID: PMC4452729.

(66) Fontes-Dutra M, Santos-Terra J, Deckmann I, Brum Schwingel G, Della-Flora Nunes G, Hirsch MM, Bauer-Negrini G, Riesgo RS, Bambini-Júnior V, Hedin-Pereira C, Gottfried C. Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the

Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. *Front Synaptic Neurosci.* 2018 May 22;10:9. doi: 10.3389/fnsyn.2018.00009. PMID: 29872390; PMCID: PMC5972198.

50

(67) Defoort EN, Kim PM, Winn LM. Valproic acid increases conservative homologous recombination frequency and reactive oxygen species formation: a potential mechanism for valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol.* 2006 Apr;69(4):1304-10. doi: 10.1124/mol.105.017855. Epub 2005 Dec 23. PMID: 16377765.

(68) Tung EW, Winn LM. Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol.* 2011 Dec;80(6):979-87. doi: 10.1124/mol.111.072314. Epub 2011 Aug 25. PMID: 21868484.

(69) Biondo-Simões R, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO, Robes RR, Dall'Antonia MO. The effects of valproic acid on skin healing: experimental study in rats. *Acta Cir Bras.* 2022 Jul 15;37(4):e370403. doi: 10.1590/acb370403. PMID: 35857935; PMCID: PMC9290763.

(70) Servadio M, Vanderschuren LJ, Trezza V. Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do 'autistic' rodents exist? *Behav Pharmacol.* 2015 Sep;26(6):522-40. doi: 10.1097/FBP.000000000000163. PMID: 26226143.

(71) Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013 Feb;16(1):91-103. doi: 10.1017/S1461145711001714. Epub 2011 Nov 18. PMID: 22093185.

(72) Moldrich RX, Leanage G, She D, Dolan-Evans E, Nelson M, Reza N, Reutens DC. Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behav Brain Res.* 2013 Nov 15;257:253-64. doi: 10.1016/j.bbr.2013.09.049. Epub 2013 Oct 5. PMID: 24103642.

- (73) Ma SY, Kwan KM. Size anomaly and alteration of GABAergic enzymes expressions in cerebellum of a valproic acid mouse model of autism. *Behav Brain Res*. 2022 Jun 25;428:113896. doi: 10.1016/j.bbr.2022.113896. Epub 2022 Apr 15. PMID: 35436531.
- (74) Belzung C, Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord*. 2011 Nov 7;1(1):9. doi: 10.1186/2045-5380-1-9. PMID: 22738250; PMCID: PMC3384226.
- (75) Pasciuto E, Borrie SC, Kanellopoulos AK, Santos AR, Cappuyns E, D'Andrea L, Pacini L, Bagni C. Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiol Learn Mem*. 2015 Oct;124:71-87. doi: 10.1016/j.nlm.2015.07.013. Epub 2015 Jul 26. PMID: 26220900.
- (76) Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TP, Siegel SJ. Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry*. 2010 Dec 15;68(12):1100-6. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.09.031. PMID: 21130222; PMCID: PMC5070466.
- (77) Bahi A. Hippocampal BDNF overexpression or microR124a silencing reduces anxiety- and autism-like behaviors in rats. *Behav Brain Res*. 2017 May 30;326:281-290. doi: 10.1016/j.bbr.2017.03.010. Epub 2017 Mar 8. PMID: 28284951.
- (78) Ben Shalom D. Memory in autism: review and synthesis. *Cortex*. 2003 Sep-Dec;39(4-5):1129-38. doi: 10.1016/s0010-9452(08)70881-5. PMID: 14584570.
- (79) Jaramillo TC, Speed HE, Xuan Z, Reimers JM, Liu S, Powell CM. Altered Striatal Synaptic Function and Abnormal Behaviour in Shank3 Exon4-9 Deletion Mouse Model of Autism. *Autism Res*. 2016 Mar;9(3):350-75. doi: 10.1002/aur.1529. Epub 2015 Nov 11. PMID: 26559786; PMCID: PMC4857590.
- (80) Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988 Nov 1;31(1):47-59. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x. PMID: 3228475.

- (81) Umeda T, Takashima N, Nakagawa R, Maekawa M, Ikegami S, Yoshikawa T, Kobayashi K, Okanoya K, Inokuchi K, Osumi N. Evaluation of Pax6 mutant rat as a model for autism. *PLoS One*. 2010 Dec 21;5(12):e15500. doi: 10.1371/journal.pone.0015500. PMID: 21203536; PMCID: PMC3006426.
- (82) Sharma SR, Gonda X, Tarazi FI. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacol Ther*. 2018 Oct;190:91-104. doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.007. Epub 2018 May 12. PMID: 29763648.
- (83) Elsabbagh M, Johnson MH. Autism and the Social Brain: The First-Year Puzzle. *Biol Psychiatry*. 2016 Jul 15;80(2):94-99. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.02.019. Epub 2016 Feb 23. PMID: 27113503.
- (84) Sharda M, Silani G, Specht K, Tillmann J, Nater U, Gold C. Music therapy for children with autism: investigating social behaviour through music. *Lancet Child Adolesc Health*. 2019 Nov;3(11):759-761. doi: 10.1016/S2352-4642(19)30265-2. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31494080.
- (85) Lu WP, Tsai WH, Lin LY, Hong RB, Hwang YS. The Beneficial Effects of Massage on Motor Development and Sensory Processing in Young Children with Developmental Delay: A Randomized Control Trial Study. *Dev Neurorehabil*. 2019 Oct;22(7):487-495. doi: 10.1080/17518423.2018.1537317. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30376388.
- (86) Alfageh BH, Wang Z, Mongkhon P, Besag FMC, Alhawassi TM, Brauer R, Wong ICK. Safety and Tolerability of Antipsychotic Medication in Individuals with Autism Spectrum Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Paediatr Drugs*. 2019 Jun;21(3):153-167. doi: 10.1007/s40272-019-00333-x. PMID: 31134563.
- (87) Asfour MH, Abd El-Alim SH, Kassem AA, Salama A, Gouda AS, Nazim WS, Nashaat NH, Hemimi M, Abdel Meguid N. Vitamin D₃-Loaded Nanoemulsions as a Potential Drug Delivery System for Autistic Children: Formulation Development, Safety, and Pharmacokinetic Studies. *AAPS PharmSciTech*. 2023 Feb 9;24(2):58. doi: 10.1208/s12249-023-02501-2. PMID: 36759398.

- (88) Tanaka M, Sato A, Kasai S, Hagino Y, Kotajima-Murakami H, Kashii H, Takamatsu Y, Nishito Y, Inagaki M, Mizuguchi M, Hall FS, Uhl GR, Murphy D, Sora I, Ikeda K. Brain hyperserotonemia causes autism-relevant social deficits in mice. *Mol Autism*. 2018 Nov 26;9:60. doi: 10.1186/s13229-018-0243-3. PMID: 30498565; PMCID: PMC6258166.
- (89) Portnova GV, Ivanova O, Proskurnina EV. Effects of EEG examination and ABA-therapy on resting-state EEG in children with low-functioning autism. *AIMS Neurosci*. 2020 Jun 5;7(2):153-167. doi: 10.3934/Neuroscience.2020011. PMID: 32607418; PMCID: PMC7321768.
- (90) Lotufo Denucci B, Silva de Lima L, Ferreira Lima Mota I, Rocha Madureira Azevedo J, Germino Veras L, Montenegro Luzardo Bicca JV, de Miranda Santana B, Beserra Pinheiro G, Gonçalves Coelho G, Mortari MR. Current knowledge, challenges, new perspectives of the study, and treatments of Autism Spectrum Disorder. *Reprod Toxicol*. 2021 Dec;106:82-93. doi: 10.1016/j.reprotox.2021.10.010. Epub 2021 Oct 22. PMID: 34695561.
- (91) Mankoski R, Stockton G, Manos G, Marler S, McQuade R, Forbes RA, Marcus R. Aripiprazole treatment of irritability associated with autistic disorder and the relationship between prior antipsychotic exposure, adverse events, and weight change. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2013 Oct;23(8):572-6. doi: 10.1089/cap.2012.0075. PMID: 24138011; PMCID: PMC3804231.
- (92) Boon-Yasidhi V, Jearnarongrit P, Tulayapichitchock P, Tarugsa J. Adverse effects of risperidone in children with autism spectrum disorders in a naturalistic clinical setting at siriraj hospital, Thailand. *Psychiatry J*. 2014;2014:136158. doi: 10.1155/2014/136158. Epub 2014 Feb 3. PMID: 24790986; PMCID: PMC3979146.
- (93) Aabbassi B, Benali A, Asri F. Risperidone-induced priapism in an autistic child: a case report. *J Med Case Rep*. 2016 Jun 6;10:164. doi: 10.1186/s13256-016-0956-x. PMID: 27266696; PMCID: PMC4893879.

- (94) Rast JE, Anderson KA, Roux AM, Shattuck PT. Medication Use in Youth With Autism and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Acad Pediatr*. 2021 Mar;21(2):272-279. doi: 10.1016/j.acap.2020.05.015. Epub 2020 May 31. PMID: 32492579.
- (95) Hara Y, Takuma K, Takano E, Katashiba K, Taruta A, Higashino K, Hashimoto H, Ago Y, Matsuda T. Reduced prefrontal dopaminergic activity in valproic acid-treated mouse autism model. *Behav Brain Res*. 2015 Aug 1;289:39-47. doi: 10.1016/j.bbr.2015.04.022. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25907743.
- (96) Uzunova G, Pallanti S, Hollander E. Excitatory/inhibitory imbalance in autism spectrum disorders: Implications for interventions and therapeutics. *World J Biol Psychiatry*. 2016 Apr;17(3):174-86. doi: 10.3109/15622975.2015.1085597. Epub 2015 Oct 15. PMID: 26469219.
- (97) Servadio M, Melancia F, Manduca A, di Masi A, Schiavi S, Cartocci V, Pallottini V, Campolongo P, Ascenzi P, Trezza V. Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. *Transl Psychiatry*. 2016 Sep 27;6(9):e902. doi: 10.1038/tp.2016.182. PMID: 27676443; PMCID: PMC5048215.
- (98) Zamberletti E, Gabaglio M, Woolley-Roberts M, Bingham S, Rubino T, Parolaro D. Cannabidivarin Treatment Ameliorates Autism-Like Behaviors and Restores Hippocampal Endocannabinoid System and Glia Alterations Induced by Prenatal Valproic Acid Exposure in Rats. *Front Cell Neurosci*. 2019 Aug 9;13:367. doi: 10.3389/fncel.2019.00367. PMID: 31447649; PMCID: PMC6696797.
- (99) Baribeau DA, Anagnostou E. An update on medication management of behavioral disorders in autism. *Curr Psychiatry Rep*. 2014 Mar;16(3):437. doi: 10.1007/s11920-014-0437-0. PMID: 24488702.
- (100) Reichow B, Hume K, Barton EE, Boyd BA. Early intensive behavioral intervention (EIBI) for young children with autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 May 9;5(5):CD009260. doi: 10.1002/14651858.CD009260.pub3. PMID: 29742275; PMCID: PMC6494600.

- (101) Russo E, Scicchitano F, Whalley BJ, Mazzitello C, Ciriaco M, Esposito S, Patanè M, Upton R, Pugliese M, Chimirri S, Mammì M, Palleria C, De Sarro G. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug-drug interactions. *Phytother Res*. 2014 May;28(5):643-55. doi: 10.1002/ptr.5050. Epub 2013 Jul 30. PMID: 23897801.
- (102) Klusa V, Germane S, Nöldner M, Chatterjee SS. *Hypericum* extract and hyperforin: memory-enhancing properties in rodents. *Pharmacopsychiatry*. 2001 Jul;34 Suppl 1:S61-9. doi: 10.1055/s-2001-15451. PMID: 11518079.
- (103) Bukhari IA, Dar A. Behavioral profile of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) extract. A comparison with standard antidepressants in animal models of depression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013 Apr;17(8):1082-9. PMID: 23661522.
- (104) Dugoua JJ, Mills E, Perri D, Koren G. Safety and efficacy of St. John's wort (*hypericum*) during pregnancy and lactation. *Can J Clin Pharmacol*. 2006 Fall;13(3):e268-76. Epub 2006 Nov 3. PMID: 17085775.
- (105) Joniova J, Rebič M, Strejčková A, Huntosova V, Staničová J, Jancura D, Miskovsky P, Bánó G. Formation of Large Hypericin Aggregates in Giant Unilamellar Vesicles-Experiments and Modeling. *Biophys J*. 2017 Mar 14;112(5):966-975. doi: 10.1016/j.bpj.2017.01.019. PMID: 28297655; PMCID: PMC5355495.
- (106) Niederhofer H. St John's Wort treating patients with autistic disorder. *Phytother Res*. 2009 Nov;23(11):1521-3. doi: 10.1002/ptr.2580. PMID: 19274686.
- (107) El Hamdaoui Y, Zheng F, Fritz N, Ye L, Tran MA, Schwickert K, Schirmeister T, Braeuning A, Lichtenstein D, Hellmich UA, Weikert D, Heinrich M, Treccani G, Schäfer MKE, Nowak G, Nürnberg B, Alzheimer C, Müller CP, Friedland K. Analysis of hyperforin (St. John's wort) action at TRPC6 channel leads to the development of a new class of antidepressant drugs. *Mol Psychiatry*. 2022 Dec;27(12):5070-5085. doi: 10.1038/s41380-022-01804-3. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36224261; PMCID: PMC9763113.

- (108) Griesi-Oliveira K, Acab A, Gupta AR, Sunaga DY, Chailangkarn T, Nicol X, Nunez Y, Walker MF, Murdoch JD, Sanders SJ, Fernandez TV, Ji W, Lifton RP, Vadasz E, Dietrich A, Pradhan D, Song H, Ming GL, Gu X, Haddad G, Marchetto MC, Spitzer N, Passos-Bueno MR, State MW, Muotri AR. Modeling non-syndromic autism and the impact of TRPC6 disruption in human neurons. *Mol Psychiatry*. 2015 Nov;20(11):1350-65. doi: 10.1038/mp.2014.141. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25385366; PMCID: PMC4427554.
- (109) Banerjee A, García-Oscos F, Roychowdhury S, Galindo LC, Hall S, Kilgard MP, Atzori M. Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Jul;16(6):1309-18. doi: 10.1017/S1461145712001216. Epub 2012 Dec 11. PMID: 23228615; PMCID: PMC3674140.
- (110) Ben-Eliezer D, Yechiam E. Hypericum perforatum as a cognitive enhancer in rodents: A meta-analysis. *Sci Rep*. 2016 Oct 20;6:35700. doi: 10.1038/srep35700. PMID: 27762349; PMCID: PMC5071825.
- (111) Ferreira, Juliana Carvalho, and Cecilia Maria Patino. "Randomização: mais do que o lançamento de uma moeda." *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 42 (2016): 310-310.
- (112) Cao Z, Wang F, Xiu C, Zhang J, Li Y. Hypericum perforatum extract attenuates behavioral, biochemical, and neurochemical abnormalities in Aluminum chloride-induced Alzheimer's disease rats. *Biomed Pharmacother*. 2017 Jul;91:931-937. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.022. Epub 2017 May 13. PMID: 28514831.
- (113) Kang SS, Kurti A, Fair DA, Fryer JD. Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. *J Neuroinflammation*. 2014 Sep 12;11:156. doi: 10.1186/s12974-014-0156-9. PMID: 25212412; PMCID: PMC4172780.

(114) Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*. 2017 Aug 30;(126):55718. doi: 10.3791/55718. PMID: 28892027; PMCID: PMC5614391.

(115) Banerjee A, Engineer CT, Sauls BL, Morales AA, Kilgard MP, Ploski JE. Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero. *Front Behav Neurosci*. 2014 Nov 12;8:387. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00387. PMID: 25429264; PMCID: PMC4228846.

(116) Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986 Mar;24(3):525-9. doi: 10.1016/0091-3057(86)90552-6. PMID: 2871560.

(117) Paxinos, G., Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.

(118) Kafkafi N, Agassi J, Chesler EJ, Crabbe JC, Crusio WE, Eilam D, Gerlai R, Golani I, Gomez-Marin A, Heller R, Iraqi F, Jaljuli I, Karp NA, Morgan H, Nicholson G, Pfaff DW, Richter SH, Stark PB, Stiedl O, Stodden V, Tarantino LM, Tucci V, Valdar W, Williams RW, Würbel H, Benjamini Y. Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018 Apr;87:218-232. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.01.003. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29357292; PMCID: PMC6071910.

(119) Favre MR, Barkat TR, Lamendola D, Khazen G, Markram H, Markram K. General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Front Behav Neurosci*. 2013 Jul 24;7:88. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00088. PMID: 23898245; PMCID: PMC3721005.

(120) Pérez-Laso C, Segovia S, Martín JL, Ortega E, Gómez F, Del Cerro MC. Environmental prenatal stress alters sexual dimorphism of maternal behavior in rats. *Behav Brain Res*. 2008 Mar 5;187(2):284-8. doi: 10.1016/j.bbr.2007.09.029. Epub 2007 Sep 29. PMID: 17980921.

(121) Olexová L, Štefánik P, Kršková L. Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amygdala and cerebellum of VPA rats - An animal model of autism. *Neurosci Lett*. 2016 Aug 26;629:9-14. doi: 10.1016/j.neulet.2016.06.035. Epub 2016 Jun 25. PMID: 27353514.

(122) Hirsch MM, Deckmann I, Santos-Terra J, Staevie GZ, Fontes-Dutra M, Carello-Collar G, Körbes-Rockenbach M, Brum Schwingel G, Bauer-Negrini G, Rabelo B, Gonçalves MCB, Corrêa-Velloso J, Naaldijk Y, Castillo ARG, Schneider T, Bambini-Junior V, Ulrich H, Gottfried C. Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acid-induced animal model of autism. *Neuropharmacology*. 2020 May 1;167:107930. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107930. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31904357.

(123) Shafaghi A, Vakili Shahrabaki SS, Aminzadeh A, Heidari MR, Shamsi Meymandi M, Bashiri H. The effect of early handling on anxiety-like behaviors of rats exposed to valproic acid pre-and post-natally. *Neurotoxicol Teratol*. 2022 Jan-Feb;89:107050. doi: 10.1016/j.ntt.2021.107050. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34801733.

(124) Shahrabaki SSV, Moslemizadeh A, Amiresmaili S, Tezerji SS, Juybari KB, Sepehri G, Shamsi Meymandi M, Bashiri H. Ameliorating age-dependent effects of resveratrol on VPA-induced social impairments and anxiety-like behaviors in a rat model of neurodevelopmental disorder. *Neurotoxicology*. 2023 May;96:154-165. doi: 10.1016/j.neuro.2023.03.003. Epub 2023 Mar 16. PMID: 36933665.

(125) Zhang Y, Sun Y, Wang F, Wang Z, Peng Y, Li R. Downregulating the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway attenuates the susceptibility to autism-like phenotypes by decreasing oxidative stress. *Neurochem Res*. 2012 Jul;37(7):1409-19. doi: 10.1007/s11064-012-0724-2. Epub 2012 Feb 29. PMID: 22374471.

(126) Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K, Przewłocki R. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*. 2008 Jul;33(6):728-40. doi: 10.1016/j.psyneuen.2008.02.011. Epub 2008 Apr 8. PMID: 18396377.

- (127) Schneider T, Turczak J, Przewłocki R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Jan;31(1):36-46. doi: 10.1038/sj.npp.1300767. PMID: 15920505.
- (128) Garcia AM, Cardenas FP, Morato S. Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav*. 2005 Jun 30;85(3):265-70. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.04.007. PMID: 15927214.
- (129) Santos-Terra J, Deckmann I, Schwingel GB, Paz AVC, Gama CS, Bambini-Junior V, Fontes-Dutra M, Gottfried C. Resveratrol prevents long-term structural hippocampal alterations and modulates interneuron organization in an animal model of ASD. *Brain Res*. 2021 Oct 1;1768:147593. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147593. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34331907.
- (130) Habib MZ, Elnahas EM, Aboul-Ela YM, Ebeid MA, Tarek M, Sadek DR, Negm EA, Abdelhakam DA, Aboul-Fotouh S. Risperidone impedes glutamate excitotoxicity in a valproic acid rat model of autism: Role of ADAR2 in AMPA GluA2 RNA editing. *Eur J Pharmacol*. 2023 Jul 15;955:175916. doi: 10.1016/j.ejphar.2023.175916. Epub ahead of print. PMID: 37460052.
- (131) Alò R, Olivito I, Fazzari G, Zizza M, Di Vito A, Avolio E, Mandalà M, Bruno R, Barni T, Canonaco M, Facciolo RM. Correlation of distinct behaviors to the modified expression of cerebral Shank1,3 and BDNF in two autistic animal models. *Behav Brain Res*. 2021 Apr 23;404:113165. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113165. Epub 2021 Feb 9. PMID: 33577886.
- (132) Open Science Collaboration. PSYCHOLOGY. Estimating the reproducibility of psychological science. *Science*. 2015 Aug 28;349(6251):aac4716. doi: 10.1126/science.aac4716. PMID: 26315443.
- (133) Gilbert DT, King G, Pettigrew S, Wilson TD. Comment on "Estimating the reproducibility of psychological science". *Science*. 2016 Mar 4;351(6277):1037. doi: 10.1126/science.aad7243. PMID: 26941311.

- (134) Niederberger E, Wilken-Schmitz A, Manderscheid C, Schreiber Y, Gurke R, Tegeder I. Non-Reproducibility of Oral Rotenone as a Model for Parkinson's Disease in Mice. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 21;23(20):12658. doi: 10.3390/ijms232012658. PMID: 36293513; PMCID: PMC9604506.
- (135) Hirota T, King BH. Autism Spectrum Disorder: A Review. *JAMA*. 2023 Jan 10;329(2):157-168. doi: 10.1001/jama.2022.23661. PMID: 36625807.
- (136) Wu Y, Cao H, Baranova A, et al. Multi-trait analysis for genome-wide association study of five psychiatric disorders. *Transl Psychiatry*. 2020;10(1): 1-11. doi:10.1038/s41398-020-00902-6
- (137) Volkmar F, Siegel M, Woodbury-Smith M, King B, McCracken J, State M; American Academy of Child and Adolescent Psychiatry (AACAP) Committee on Quality Issues (CQI). Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with autism spectrum disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014; 53(2):237-257. doi:10.1016/j.jaac.2013.10.013
- (138) Schaefer GB, Mendelsohn NJ; Professional Practice and Guidelines Committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med*. 2013 May;15(5):399-407. doi: 10.1038/gim.2013.32. Epub 2013 Mar 21. Erratum in: *Genet Med*. 2013 Aug;15(8):669. PMID: 23519317.
- (139) Hyman SL, Levy SE, Myers SM; Council on children with disabilities, section on developmental and behavioral pediatrics. Identification, evaluation, and management of children with autism spectrum disorder. *Pediatrics*. 2020;145(1):e20193447. doi:10.1542/peds.2019-3447

APÊNDICE

Apêndice A. Artigo publicado

Caires CRS, Bossolani-Martins AL. Which form of environmental enrichment is most effective in rodent models of autism? Behav Processes. 2023 Jul 13;211:104915. doi: 10.1016/j.beproc.2023.104915. Epub ahead of print. PMID: 37451559.



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Processes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/behavproc



Which form of environmental enrichment is most effective in rodent models of autism?

Cássia Regina Suzuki Caires^a, Ana Luiza Bossolani-Martins^{b,*}

^a Laboratory of Experimental Physiology, Faculty of Medicine of São Jose do Rio Preto - FAMERP, Av. Brg. Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP, Brazil

^b Federal University of Mato Grosso do Sul - UFMS, Av. Pedro Pedrossian, 725 - Universitário, Paranaíba, MS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Autism spectrum disorder
Social behavior
Neuronal Plasticity

ABSTRACT

Environmental enrichment (EE) is known to produce experience-dependent changes in the brains and behaviors of rodents, and it has therefore been widely used to study neurodevelopmental disorders, including autism. Current studies show significant protocol variation, such as the presence of running wheels, number of cage-mates, duration of enrichment, and the age of the animals at the beginning and end of the enrichment interventions. EE has been shown to have prominent positive effects in animal models of idiopathic and syndromic autism, but little is known about the ideal type of EE and the most efficient protocols for reversing autism spectrum disorder (ASD) behaviors modeled in rodents. This review presents evidence that social enrichment is the most effective way to rescue typical behaviors, and that variables such as onset, duration, and type of induction in the ASD model are important for EE success. Understanding which EE protocols are most beneficial for reversing ASD behaviors modeled in rodents opens up possibilities for the potential treatment of neuropsychiatric disorders characterized by behavioral deficits, such as autism.

1. Introduction

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition characterized by deficits in communication and social interaction in addition to increased restricted interest and repetitive behaviors (Kodak and Bergmann, 2020). According to Zeidan et al. (2022), the worldwide incidence of ASD is 1 in every 100 individuals, with 4.2 affected boys for every girl.

The brain mechanisms responsible for autism are not fully understood, making animal models that replicate ASD behavioral and cognitive phenotypes invaluable tools to better understand ASD's pathophysiology (Tania et al., 2014). An ideal animal model of autism exhibits face, construct, and predictive validity, thereby recapitulating ASD-associated features in humans, including behavior, etiology, and the predictive power of interventions, respectively (Nestler and Hyman, 2010).

The most common examples of genetically induced rodent models of autism are *BTBR T_{tf/J}* (BTBR), which exhibit behavioral deficits with face validity to the main symptoms observed in individuals with ASD (Zhao et al., 2022); *Fmr1* KO (knockout) mouse model of Fragile X

Chromosome syndrome (FXS), which presents with of autism and intellectual disability (Kazdoba et al., 2014); mice mutant for neuro-ligin3/4 (*Nlgn3* and *Nlgn4*), which in humans are strongly implicated in development of neuropsychiatric disorders such as autism (Tabuchi et al., 2007); mutant mice for the *Shank* gene family and *Tcs1/Tsc2* genes that show deregulation of proteins linked to synaptic plasticity, which can result in autistic-like traits (Jiang and Ehlers, 2013; Wesseling et al., 2017). The most widely used rodent models induced by environmental factors are rats and mice prenatally exposed to valproic acid (VPA) or maternal immune infection. The VPA animal model was described in 1996 for the study of ASD (Rodier et al., 1996, 1997). These animals recapitulate deficits in sociability and increased repetitive behavior, which are present in children with ASD (Schlickmann and Fortunato, 2013). Studies in maternal immune activation models have demonstrated that both infections and inflammation in pregnancy can result in injury to neurons and neural progenitor cells directly, or indirectly through oxidative stress-associated microglia and astrocyte activation, as observed in ASD (Al-Haddad et al., 2019; Bjorklund et al., 2020).

These animal models must show the typical clinical manifestations of

Abbreviations: EE, Environmental enrichment; STE, Stereotypy; SB, Sociability; NS, Nervous system; ASD, Autism spectrum disorder; VPA, Valproic acid.

* Corresponding author. E-mail addresses: cassia.caires@edu.famerp.br (C.R.S. Caires), ana.bossolani@ufms.br (A.L. Bossolani-Martins).

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2023.104915> Received 15 February 2023; Received in revised form 10 July 2023; Accepted 11 July 2023 Available online 13 July

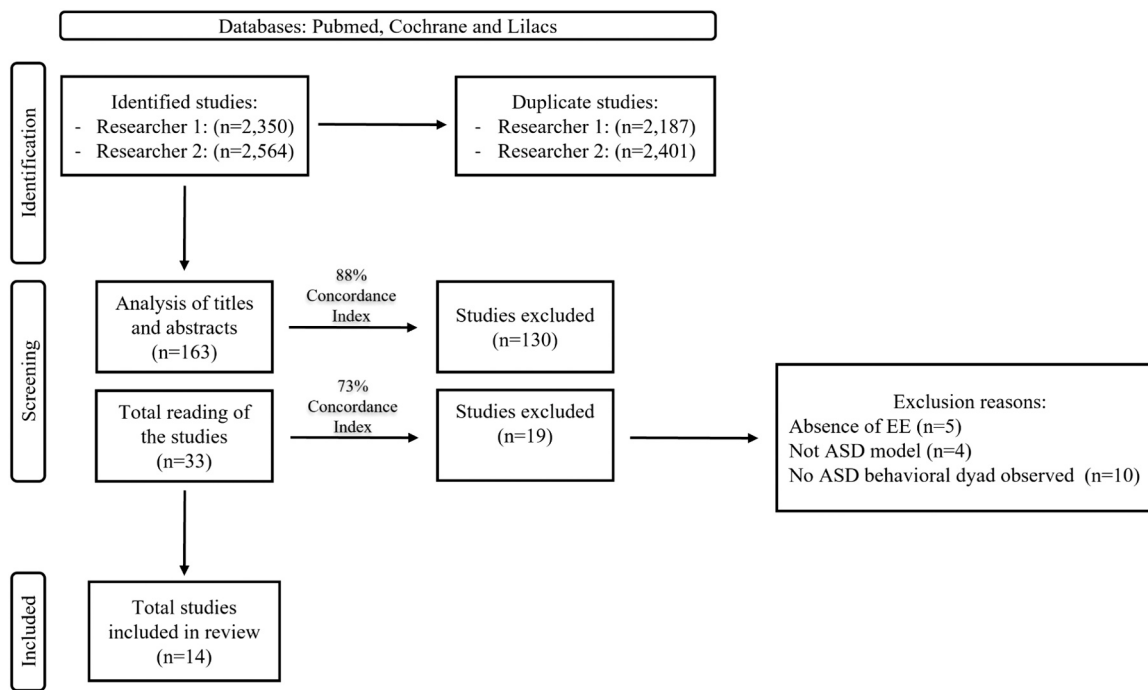


Fig. 1. PRISMA flowchart study selection stages.

ASD, such as social deficits and repetitive/stereotyped behaviors (Iwata, 2019). Decreased behaviors of approaching, caring, chasing, lying under or over, smelling, peeking, following, anogenital exploring, threatening, attacking, and biting one another are seen as deficits in social interaction. On the other hand, an increase in behaviors such as self-cleaning and pacing in circles are examples of repetitive/stereotyped behaviors (Tordjman et al., 2007; Iwata et al., 2010).

In addition to understanding the pathophysiology of ASD, animal models can provide clues to novel therapeutic approaches, either pharmacological or behavior-oriented. These encompass what is termed environmental enrichment (EE), an experimental paradigm introduced over 75 years ago to decipher how gene-environment interactions change the structure and function of the brain throughout an animal's life. Enriched environments are generally characterized by the presence of physical objects and opportunities for social interaction, resulting in physical and social enrichment, respectively (Elliott and Grunberg, 2005). Therefore, EE can be considered a rich external source of stimuli and a mechanism for changing brain plasticity patterns based on individual behavior, since each animal in an enriched environment will have a slightly different set of experiences (Kempermann, 2019).

Physical enrichment strategies for rodent models involve structural modifications such as increased space and resources that allow for exercise, play, and exploration (Stewart and Bayne, 2004). These include bedding enriched with natural materials (parchments and fiber-based paper), plastic tunnels, wooden objects, ropes, racing wheels, balls, ramps, ladders, and other appropriately sized toys. Social enrichment allows animals to be housed in groups, whenever possible. Although social enrichment is easier to implement, there are situations in which animals must be individually housed, and in such cases, physical enrichment is particularly useful (Johansson and Ohlsson, 1996).

Other contexts can also be considered EE, such as sensory stimulation and nutritional supplementation. The first is related to the application of innocuous stimuli in a controlled environment (Schaffler et al., 2019). The second refers to dietary intervention, used in animal models and in humans to attenuate ASD-associated behavioral deficits (Nolan et al., 2022).

The effects of EE have been shown to improve phenotypes associated with neurodegenerative diseases, brain injury, and other psychiatric

disorders in animal models (van Praag et al., 2000; Will et al., 2004; Nithianantharajah and Hannan, 2006; Laviola et al., 2008; Solinas et al., 2010). Hence, EE allow researchers to study the neurobiology of ASD through modification of the environment. However, among a variety of EE protocols, there is no answer as to which strategy is most effective in reversing typical ASD behaviors. Therefore, this review aims to answer the following question: "Which type of EE is most effective for reversing typical ASD behaviors in a rodent model of autism?"

2. Material and methods

This study presents a literature review carried out in duplicate and independently, following the PRISMA protocol, used for systematic reviews (Page et al., 2021). PubMed, Cochrane, and Lilacs databases in Portuguese and English from October 2019 to January 2021 were utilized for this review. The descriptors selected for the search were: "Animal model," "Rat," "Rodent," "Mouse," "Mice," "ASD," "Autism," "Autism spectrum disorder," "Autistic behavior," "Autistic disorder," "Pervasive developmental disorder," "Enrichment," "Environmental intervention," "Nutritional enrichment," "Social enrichment," "Physical enrichment" and "Sensorial enrichment" with combinations between them using "AND" with no lower date limit. Zotero and Mendeley reference managers were used to organize collected data and exclude duplicate articles.

The inclusion and exclusion criteria were applied during the study selection stages. The inclusion criteria were empirical articles that included experiments with rodent animal models of syndromic and non-syndromic autism obtained by genetic or environmental induction, which presented the ASD behavioral dyad (social deficits and repetitive behaviors). Exclusion criteria were samples that did not involve the replication of autism in rodent animal models; articles with only genetic analysis results, microbiota, and drug tests; and studies on animals that did not exhibit the autism dyad.

After retrieving articles from the databases, steps were applied to select the studies. The first step involved reading the titles and abstracts, and the second involved reading the articles in full and discussing them. For each of these steps, the agreement index between researchers was calculated, based on the following formula: number of agreements/

Table 1
Information regarding the ASD animal model of the evaluated studies.

Author (year) model and sex	Species, ASD	Syndromic or non-syndromic/ genetic or environmental induction	Score
Schneider et al. (2006)	- Wistar Rats - VPA - Males	- Non-syndromic - Environmental	15
Yang et al. (2011)	- BTBR and C57BL/6J (B6) mice - BTBR - Males and Females	- Non-syndromic - Genetic	16
Reynolds et al. (2013)	- C57BL/6J and BTBR mice - BTBR - Males	- Non-syndromic - Genetic	15
Pietropaolo et al. (2014)	- C57BL/6J - Fmr1-KO - Males	- Syndromic - Genetic	16
Favre et al. (2015)	- Wistar Rats - VPA - Males	- Non-syndromic - Environmental	15
Raza et al. (2015)	- Long-Evans rats - VPA - Males and Females	- Non-syndromic - Environmental	14
Oddi et al. (2015)	- Fmr1-KO mice - Fmr1-KO - Males	- Syndromic - Genetic	15
Garbugino et al. (2016)	- Oprm1 mice - Oprm1 μ -KO - Males and Females	- Non-syndromic - Genetic	15
Kentner et al. (2016)	- Sprague- Dawley rats - LPS - Males	- Non-syndromic - Environmental	
Yamaguchi et al. (2017)	- CD1 mice - VPA - Males	- Non-syndromic - Environmental	14
Acosta et al. (2018)	- Cubs CF1 - VPA - Males and Females	- Non-syndromic - Environmental	14
Campolongo - CF1 mice et al. (2018)	- VPA - Males	- Non-syndromic - Environmental	15
Hulbert et al. (2018)	- Shank3 mice 4e4-22 - Shank3 4e4-22 - Males and Females	- Non-syndromic - Genetic	15
Queen et al. (2020)	- BTBR mouse - BTBR - Males and Females	- Non-syndromic - Genetic	16

VPA: valproic acid. LPS: gram negative endotoxin lipopolysaccharide. CF1: CrIFcen:CF1 outbred strain. Oprm1 μ -KO: μ -opioid receptor knockout mice.

BTBR: BTBR T + tf/J. CD1: ICR, Fmr1-KO: FMRP translational regulator 1 knockout mice, Oprm1: μ -opioid receptor mice.

(number of agreements/number of disagreements) 100. A third researcher participated in each step to decide on discordant studies.

The studies were analyzed regarding the model species and sex used, ASD model (syndromic or non-syndromic; genetic or environmental induction), sample number (n), and validity score of the animal model (Denayer et al., 2014). Regarding methodology, the experimental groups, type of EE, period in postnatal day (PND), and enrichment protocol and its effects, morphofunctional findings in the nervous system (NS) and reversal of the ASD behavioral dyad were evaluated.

A scoring system ranging from 1 to 4 was used to compose the model validity score under five criteria: (1) Species: the closer a species comes to humans, the more likely it is that the pathophysiology of the disease is

similar to that of humans; (2) Complexity: the more complex the test system, the more likely that the relevant mechanisms are included; (3) Disease simulation: methods to induce the disease of interest, according to its etiology; (4) Predictivity: similarity with human characteristics, when exposed to a type of treatment; and (5) Face validity: similarity of one or a set of disease symptoms (Denayer et al., 2014).

3. Results

The articles were collected from the Lilacs and PubMed databases, as the Cochrane database had no articles listed with the study descriptors. PRISMA flowchart in Fig. 1 summarizes the number of articles identified, screened, and included in the final review.

Most of the 14 studies analyzed made use of male rodent models of non-syndromic ASD. Seven studies used models generated via environmental induction, and seven studies used models generated via genetic induction. Among the environmental models, the most used was mice with intrauterine exposure to VPA, while the most used genetic models were BTBR and *Fmr1*-KO mice for investigating non-syndromic and syndromic ASD, respectively. The most adopted method for studying the reversal of the ASD behavioral dyad was social enrichment, which mostly involved placing animal models with standard animals in equal proportion for at least 40 days after the beginning of the post-weaning period.

When considering the ASD behavioral dyad, SB was the most reversed after EE, however, STE was less evaluated in the selected studies. The most common morphofunctional findings in the NS

following EE were increased expression of dopamine and its receptors, BDNF and its TRKb receptor, EAAT2, GluN2B, CaMKII, and nuclear c-Fos, increased dendritic column density, decrease of morphological abnormalities in the brain, in addition to normalization of neuro-inflammatory factors such as CD11b, CD45 and IL-1B.

Data extraction from the articles is summarized in Tables 1 and 2.

Table 1 describes aspects related to the ASD experimental model, such as the species, sex sample number, whether syndromic or not, the method of induction (genetic or environmental), and the model validity score.

Table 2 shows the data referring to the experimental protocol of each study, including the experimental groups, type of EE, duration, enrichment protocol, outcome (with or without reversal of the ASD behavioral dyad), and morphofunctional findings in the NS.

4. Discussion

Social enrichment was the most used EE in non-syndromic models and in studies on reversing the ASD behavioral dyad. Most studies (Schneider et al., 2006; Yang et al., 2011; Pietropaolo et al., 2014; Favre et al., 2015; Yamaguchi et al., 2017; Acosta et al., 2018; Campolongo et al., 2018; Hulbert et al., 2018) started the enrichment at PND 21–22, the post-weaning period, and this protocol remained for at least 40 days. An autism animal model must mirror the symptomatology of the disorder (Mabunga et al., 2015), so observation of the social deficit/- stereotypy behavioral dyad is extremely important. Among the evaluated studies, only six performed such observation (Schneider et al., 2006; Yang et al., 2011; Pietropaolo et al., 2014; Favre et al., 2015; Campolongo et al., 2018; Queen et al., 2020), out of which only three showed reversal of the behavioral dyad after different types and protocols of enrichment (Schneider et al., 2006; Pietropaolo et al., 2014; Campolongo et al., 2018). No relationship was found between the type of enrichment and of induction.

Two studies (Yang et al., 2011; Favre et al., 2015) showed improvement in social deficits but not in stereotypy. Considering that both studies started enrichment soon after weaning (PND 21 and 23, respectively), social deficits may be more susceptible to reversal than stereotypies, since these behaviors are regulated by different genetic factors and therefore may respond variably to treatments (Happé and Ronald, 2008).

Table 2

Design of the EE protocol with the main findings of the behavioral and morphofunctional analyses.

Author (year)	Experimental Groups/n ¹	Enrichment type and period (PND) ¹	Enrichment protocol ¹ ASD behavioral dyad	Reversal of the	Morphological/functional findings in the NS after enrichment ^{1, 2}
Schneider et al. (2006)	4 groups: SAL-STD SAL-ENR VPA-STD VPA-ENR n = 5–8/groups	1) Sensory - 14 days (PND 7–21) 2) Social and physical - 13 days (PND 22–35)	1) The male pups were submitted to the multisensory stimulation protocol, which included individual placement of the pup on surfaces with different temperatures and textures (wood, glass, paper towels), righting reflex training, negative geotaxis and swimming in an aquarium. The full procedure lasted 25 min per day. 2) The standard pups were kept 5 to each small cage (60 × 38 × 20 cm) and the enrichment pups were kept 12 to each larger cage (60 × 60 × 40 cm) filled with toys (wheels, ladders, plastic tunnels, wooden shelters, labyrinths, blocks of construction and swings) which were changed every 2 days when cage cleaning was performed.	SB: yes STE: yes	Not evaluated
Yang et al. (2011)	3 groups: B6 + B6 BTBR + BTBR BTBR + B6 n = 96–128/ groups	Social - Cohort 1 for 40 days (PND 21–61) - Cohort 2 for 20 days (PND 21–41)	Male and female pups were separated by sex and housed in three different groups. Enrichment consisted of housing 2 BTBR and 2 B6 animals, for the two cohorts.	SB: yes, for both cohorts. STE: no, for both cohorts.	Not evaluated
Reynolds et al. (2013)	4 groups: C57BL/6j-STD C57BL/6j-ENR BTBR-STD BTBR-ENR n = 7–8/groups	Social and physical- 30 days (PND 49–79)	The pups were kept in groups of 3–4 in a standard cage, or in groups of 8 in an enriched cage. The enriched cage consisted of two extra floors and various toys, including wheels and tunnels that were changed every 5 days to add an element of novelty.	SB: Not evaluated STE: yes	Not evaluated
Pietropaolo et al. (2014)	4 groups: FMR1-WT -CONT FMR1-WT-N-3PUFAs FMR1-KO -CONT FMR1-KO-N-3PUFAs n = 23–24/ groups 6 groups: SAL-ST SAL-UE SAL-PE VPA-ST VPA-UE VPA-PE n = 18/groups	Nutritional - 69 days (PND 21–90)	At weaning, pups were exposed to one of two dietary conditions.	SB: yes STE: yes	In KO animals: - Decrease of CD11b and CD45 in CA1, which was rescued with the N-3PUFAs diet - Increase of IL-1B in CA3, which was reduced after the enriched diet In KO and WT animals: - Decrease of IL-1B in the PFC, which was rescued with the N-3PUFAs diet
Favre et al. (2015)	4 groups: FMR1-WT-STD FMR1-WT-ENR FMR1-KO-STD FMR1-KO-ENR n = 6–13/ groups 4 groups: CONT-NST CONT-ST VPA-NST VPA-ST n = 32–46/ groups 4 groups: Oprm1-WT-L Oprm1-WT-L + L Oprm1-KO-L Oprm1-KO-	Physicist and social - 100 days (PND 23–123)	The ST environment contained 3 animals per cage, with a bed and cardboard tube in a common room, treated by several caregivers. The enriched environment was divided into an unpredictable enriched environment (UE) defined by exchange of stimuli twice a week, in part, totaling 4 different configurations, and a predictable and enriched environment (PE) that had a constant adjustment with the same set of enriching elements (without changing identity). The two environments took place in an isolated room, manipulated by the same experimenters, where the animals were housed 6 per large cage with ethologically positive multimodal stimuli including wheels, toys, treats and odors. Mothers and their pups were kept isolated (STD) or with the addition of another non-lactating female (ENR).	SB: yes, only for VPA in PE environment STE: no	In VPA-PE animals: - Increased expression of GluN2B in the somatosensory cortex and in the amygdala and of CaMKII in the dorsal-anterior hippocampus.
Oddi et al. (2015)	4 groups: FMR1-WT-STD FMR1-WT-ENR FMR1-KO-STD FMR1-KO-ENR n = 6–13/ groups 4 groups: CONT-NST CONT-ST VPA-NST VPA-ST n = 32–46/ groups 4 groups: Oprm1-WT-L Oprm1-WT-L + L Oprm1-KO-L Oprm1-KO-	Social - 21 days (PND 0–21)	The animals were exposed to tactile stimulation (ST) three times a day (9:00 a.m., 1:00 p.m. and 4:00 p.m.) for 15 min.	SB: yes STE: Not evaluated	In FMR1-KO-ENR animals: - Correction of morphological abnormalities of dendritic spines of hippocampal neurons - Decreased filopod-like dendritic spines
Raza et al. (2015)	4 groups: Oprm1-WT-L Oprm1-WT-L + L Oprm1-KO-L Oprm1-KO-	Sensory - 18 days (PND 3–21)	Upon completing 15 days of pregnancy, the females were housed individually (L) or with another pregnant female (L + L), and kept that way until weaning.	SB: Not evaluated STE: no	In VPA-ST animals: - Increased apical dendritic branching of pyramidal cells in mPFC, which is reduced in VPA-NST animals.
Garbugino et al. (2016)	4 groups: Oprm1-WT-L Oprm1-WT-L + L Oprm1-KO-L Oprm1-KO-	Social - 34 days (E15 to PND 28)	Upon completing 15 days of pregnancy, the females were housed individually (L) or with another pregnant female (L + L), and kept that way until weaning.	SB: yes STE: Not evaluated	Not evaluated

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Author (year)	Experimental Groups/n ¹	Enrichment type and period (PND) ¹	Enrichment protocol ¹ ASD behavioral dyad	Reversal of the	Morphological/functional findings in the NS after enrichment ^{1, 2}
Kentner et al. (2016)	L + L n = 3–5/groups 6 groups: SAL–STD SAL – CN SAL – ENRLPS – STD LPS – CN LPS – ENR n = 7–9/groups	Social and physical – 42 days (PND 50–92)	Rats were randomized to 3 different conditions: – STD: standard cage with tube, chew bone and Nestlets, housing 2 animals per cage. – CN: larger cage with tube, chew bone and nestlets, housing 4 per cage. – ENR: multi-level cage with new toys, tubes, chew bone, Nestlets, ramps, housing 4 animals per cage. The arrangement of toys and tubes were changed twice a week along with cagemates.	SB: no STE: Not evaluated	In LPS-CN and ENR animals: – Increased BDNF in the hippocampus In LPS-ENR animals: – Increase of TrkB and EAAT2 in the PFC
Yamaguchi et al. (2017)	4 groups: CD1–STD CD1–ENR VPA–STD VPA–ENR n = 32/groups	Physicist – 28 days (PND 21–49)	The pups were housed in groups of 5–6 animals per cage in a standard or enriched environment. This consisted of large plastic boxes (65 cm × 35 cm × 30 cm), containing two racing wheels (15.2 cm in diameter), two types of nesting materials and a variety of objects, including toys, tunnels and hiding places, which were reorganized twice a week, with the aim of creating a new environment.	SB: yes STE: Not evaluated	In VPA-ENR animals: – Increased dendritic column density in the CA1 and BDNF region of the hippocampus
Acosta et al. (2018)	4 groups: SAL–SAL SAL–VPA VPA–SAL VPA–VPA n = 5–7/groups	Social – 39 days (PND 21–60)	At weaning, SAL or VPA pups were kept with mates on the same or other prenatal treatment	SB: no STE: Not evaluated	VPA–VPA animals, compared to the control, presented: – Elevated levels of DA in the striatal region – Differences in DA turnover in the dorsal striatum – Increased volume of the caudate nucleus – Increased expression of DRD3
Campolongo et al. (2018)	4 groups: – SAL–SAL – SAL–VPA – VPA–SAL – VPA–VPA n = 15–22/ groups	Social – 39 days (PND 21–60)	Male pups from one treatment (saline or VPA) were kept with other pups from the same treatment (4–5 animals) or the opposite (ratio of 2:3 animals).	SB: Yes, for all groups except VPA–VPA. STE: yes, except VPA–VPA group.	In VPA–VPA animals: – Increased number of c-Fos and DA positive nuclei in Piriform cortex layer 2 compared to SAL–SAL mice.
Hulbert et al. (2018)	6 groups: Shank3 4e4-22: +/+ STD +/- STD -/- STD +/+ ENR +/- ENR -/- ENR n = 4–15/ groups	Physical and Social: 10 days (PND 10–20) – Social: 39 days (PND 21–60)	One (STD) or two (ENR), lactating and litters per cage were placed. The ENR environment contained various objects and toys, which were rotated daily and changed weekly to maintain freshness. After weaning, the rats were housed with same-sex cagemates, with seven animals per cage (ENR) and five animals per cage (STD).	SB: Not evaluated STE: Yes to the animals -/-	Not evaluated
Queen et al. (2020)	2 groups: BTBR–STD BTBR–ENR n = 8–10/ groups	Physicist – 119 days (PND ~ 28–147)	Three or five animals were maintained in a standard or enriched environment, respectively. In the latter the cages were larger, supplemented with racing wheels, igloos, toys, tunnels, maze and nesting material.	SB: no STE: no	In BTBR–ENR animals: – Females did not show changes in the expression of neurotrophic factors – Males showed increased BDNF in the hypothalamus – Increase of TrkB in the hypothalamus, hippocampus and amygdala.

(1) SAL: saline; STD: standard; ENR: enriched; LPS: gram negative endotoxin lipopolysaccharide; KO: knockout; WT: wild type; PND: postnatal day.

(2) BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; CA1: first region in the hippocampal circuit; CA3: third region in the hippocampal circuit; CaMKII: Calcium-calmodulin (CaM)-dependent protein kinase I; CD11b: Conventional dendritic cell 2; CD45: cluster of differentiation 45; DA: dopamine; DRD3: Dopamine D3 Receptor; EAAT2: Excitatory amino acid transporter 2; GluN2B: NMDA receptors containing the GluN2B subunit; IL-1B: Interleukin-1B; mPFC: medial prefrontal cortex; N-3PUFAs: omega-3 polyunsaturated fatty acids; PFC: prefrontal cortex; TrkB: tyrosine receptor kinase B.

Exposure to EE in early postnatal life was crucial for the improvement of sociability in animals. The reversal of this type of deficit occurred in most studies (Schneider et al., 2006; Yang et al., 2011; Pietropaolo et al., 2014; Favre et al., 2015; Oddi et al., 2015; Garbugino et al., 2016; Yamaguchi et al., 2017; Campolongo et al., 2018), excepting Kentner et al. (2016) and Queen et al. (2020), who did not show improvement in sociability (treatment started at PND 50 and PND 28, respectively).

Eight studies (Reynolds et al., 2013; Oddi et al., 2015; Raza et al., 2015; Garbugino et al., 2016; Kentner et al., 2016; Acosta et al., 2018;

Yamaguchi et al., 2017; Hulbert et al., 2018) assessed at least one of the typical behavioral parameters of ASD. In studies by Reynolds et al. (2013), Oddi et al. (2015), Garbugino et al. (2016), Yamaguchi et al. (2017), and Hulbert et al. (2018), the animals showed a significant improvement in the evaluated parameters; this was not observed in the study by Acosta et al. (2018), which used the VPA model under a social enrichment protocol performed for 39 days (PND 21–60). When comparing this finding with those of Oddi et al. (2015) and Garbugino et al. (2016), we observed that genetic animal models were more susceptible to the reversal of ASD behaviors. This may have occurred

because in genetically induced models, ASD behaviors derive from a single mutation, while in environmental induction they are influenced by a number of complex variables. These include genotype of the mother/pups and its interaction with the environmental stressor, and the amount of stressors absorbed by each pup according to intrauterine position. Thus, phenotype reversal could be more effective in monogenic models due to their lower inherent complexity.

In addition to behavioral parameters, morphofunctional variables are widely evaluated after EE protocols. These outcomes were analyzed in most studies with the exception of Schneider et al. (2006), Yang et al. (2011), Reynolds et al. (2013), Garbugino et al. (2016), and Hulbert et al. (2018). The most common morphofunctional findings were changes in several parameters relevant for the neurobiology of ASD. These included increased expression of dopamine, BDNF/TrkB, EAAT2, GluN2B, CaMKII, and nuclear c-Fos, increased dendritic column density, decreased brain abnormalities and normalization of CD11b, CD45 and IL1-B.

The rise in dopamine and its receptors is related to the rescue of social behavior (Pavál and Micluția, 2021; Campolongo et al., 2018). Interestingly, despite using a similar EE strategy, Acosta et al. (2018), observed an increase in dopamine without reversal of sociability. This indicates that more robust relationships between these variables must be found before appointing dopamine as a marker of sociability in these models.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a neurotrophin that is critical for brain development and function and acts through transmembrane receptors, such as the specific high-affinity tyrosine kinase B (TrkB) receptor (Correia et al., 2010). Blood, serum, and brain samples from individuals with ASD showed increased levels of BDNF compared to controls, indicating the involvement of the BDNF/TrkB pathway in autism (Nelson et al., 2001; Perry et al., 2001; Connolly et al., 2006). In studies by Kentner et al. (2016) and Queen et al. (2020), an increase in BDNF/TrkB and non-reversal of social deficits and stereotypes were also found, which may be related to the late implementation of enrichment. EAAT2 is a glutamate transporter, and any pathological dysfunction or loss causes high, neurotoxic levels of extracellular glutamate (Rothstein et al., 1993). This increase has been implicated in range of neurological disorders, including amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia, epilepsy, and autism (Petr et al., 2013; Silvestrin et al., 2013; Garcia-Esparcia et al., 2018; Mironova et al., 2018). These observations are in accordance with Kentner et al. (2016), who found increased levels of EAAT2 in the pre-frontal cortex and non-reversal of SB after EE.

Decreased expression of GluN2B, a subunit of NMDA receptors, has been associated with shortening of neuronal dendrites (Bahry et al., 2021) and reduced synaptic connection, which impairs the development of normal and functional circuits. In the study by Favre et al. (2015), after applying the EE protocol, an increase in GluN2B expression and reversal of the social deficit were found, evidencing the benefit of EE and associating this marker with the pathogenesis of ASD (Roulet et al., 2010; Etherton et al., 2011; Bostrom et al., 2015; De Filippis et al., 2015).

c-Fos plays an important role in neurogenesis, therefore, it has been used as a marker for neuronal activity. c-fos $-/-$ mice show behavioral changes such as learning difficulties, hyperactivity, and abnormal sexual behavior (Velazquez et al., 2015). Therefore, an increase in this marker suggests the normalization of neuronal activity and rescue of behavioral changes, as observed by Campolongo et al. (2018) after applying the EE protocol.

The enrichment can also be considered an environmental stimulus that influences the increase in dendritic spines and, consequently, the dendritic column. Rescue of the dendritic architecture is important because dendritic abnormalities are often associated with ASD (Gao and Penzes, 2015; Lin et al., 2016; Varghese et al., 2017). Notably, studies that evaluated dendritic spines/columns (Oddi et al., 2015; Yamaguchi et al., 2017) observed the recovery of social behavior in animal models

of both syndromic or non-syndromic ASD.

Increased levels of the neuroinflammatory factors CD8b, CD11b and CD45 have already been associated with children and the BTBR animal model of ASD (Wang et al., 2019; Ahmad et al., 2020; Uddin et al., 2020). Pietropaolo et al. (2014) observed the rescue of social deficits and stereotypes associated with a decrease in neuroinflammatory factors after EE, suggesting that it plays an important role in the remission of the neuroinflammatory and behavioral mechanisms of ASD.

In summary, for the success of EE, some variables must be taken into account, such as early start (around PND 21), duration (protocols lasting 30–40 days), and the genetic induction of the rodent model of ASD. Social enrichment proved to be more effective in reversing the ASD behavioral dyad than the other studied enrichment types. Finally, compared to stereotyped behaviors, social deficits are more likely to be reversed after applying EE protocols.

Funding sources

This work was supported by the Foundation for Supporting the Development of Education, Science, and Technology of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT)/ Process Number: [59/300.156/2016].

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank Prof. Dr. Orfa Yineth Galvis Alonso for her contribution in discussing the data and her assistance in designing the scope of this article.

References

- Acosta, J., Campolongo, M.A., Höcht, C., Depino, A.M., Golombek, D.A., Agostino, P.V., 2018. Deficits in temporal processing in mice prenatally exposed to valproic acid. *Eur. J. Neurosci.* 47, 619–630. <https://doi.org/10.1111/ejn.13621>.
- Ahmad, S.F., Ansari, M.A., Nadeem, A., Bakheet, S.A., Al-Ayadhi, L.Y., Alasmari, A.F., Alanazi, M.M., Al-Mazroua, H.A., Attia, S.M., 2020. Involvement of CD45 cells in the development of autism spectrum disorder through dysregulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, key inflammatory cytokines, and transcription factors. *Int. Immunopharmacol.* 83, 106466 <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106466>.
- Al-Haddad, B.J.S., Oler, E., Armistead, B., Elsayed, N.A., Weinberger, D.R., Bernier, R., Burd, I., Kapur, R., Jacobsson, B., Wang, C., Mysorekar, I., Rajagopal, L., Adams Waldorf, K.M., 2019. The fetal origins of mental illness. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 6,549–562. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.06.013> (Epub 2019 Jun 15. PMID: 31207234; PMCID: PMC6889013).
- Bahry, J.A., Fedder-Semmes, K.N., Sceniak, M.P., Sabo, S.L., 2021. An autism-associated de novo mutation in GluN2B destabilizes growing dendrites by promoting retraction and pruning. *Front. Cell. Neurosci.* 15, 692232 <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.692232>.
- Bjørklund, G., Meguid, N.A., El-Bana, M.A., Tinkov, A.A., Saad, K., Dadar, M., Hemimi, M., Skalny, A.V., Hosnedlová, B., Kizek, R., Osredkar, J., Urbina, M.A., Fabjan, T., El-Houfey, A.A., Kaluzna-Czaplińska, J., Gatarek, P., Chirumbolo, S., 2020. Oxidative stress in autism spectrum disorder. *Mol. Neurobiol.* (Epub 2020 Feb 5. PMID: 32026227).
- Bostrom, C.A., Majaess, N.M., Morch, K., White, E., Eadie, B.D., Christie, B.R., 2015. Rescue of NMDAR-dependent synaptic plasticity in Fmr1 knock-out mice. *Cereb. Cortex* 25, 271–279. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht237>.
- Campolongo, M., Kazlauskas, N., Falasco, G., Urrutia, L., Salgueiro, N., Höcht, C., Depino, A.M., 2018. Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Mol. Autism* 9, 36. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0221-9>.
- Connolly, A.M., Chez, M., Streif, E.M., Keeling, R.M., Golombek, P.T., Kwon, J.M., Riviello, J.J., Robinson, R.G., Neuman, R.J., Deuel, R.M., 2006. Brain-derived neurotrophic factor and autoantibodies to neural antigens in sera of children with autistic spectrum disorders, Landau-Kleffner syndrome, and epilepsy. *Biol. Psychiatry* 59, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.07.004>.
- Correia, C.T., Coutinho, A.M., Sequeira, A.F., Sousa, I.G., Lourenço Vanda, L., Almeida, J.P., Abreu, R.L., Lobo, C., Miguel, T.S., Conroy, J., Cochrane, L., Gallagher, L., Gill, M., Ennis, S., Oliveira, G.G., Vicente, A.M., 2010. Increased BDNF levels and NTRK2 gene association suggest a disruption of BDNF/TrkB signaling in autism. *Genes Brain Behav.* 9, 841–848. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00627.x>.

- De Filippis, B., Valenti, D., Chiodi, V., Ferrante, A., de Bari, L., Fiorentini, C., Domenici, M.R., Ricceri, L., Vacca, R.A., Fabbri, A., Laviola, G., 2015. Modulation of Rho GTPases rescues brain mitochondrial dysfunction, cognitive deficits and aberrant synaptic plasticity in female mice modeling Rett syndrome. *Eur. Neuropsychopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.03.012>.
- Denayer, T., Stöhr, T., Van Roy, M., 2014. Animal models in translational medicine: validation and prediction. *N. Horiz. Transl. Med.* 2 (1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2014.08.001>.
- Elliott, B.M., Grunberg, N.E., 2005. Effects of social and physical enrichment on openfield activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behav. Brain Res.* 165 (2), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.025>.
- Etherton, M., Földy, C., Sharma, M., Tabuchi, K., Liu, X., Shamloo, M., Malenka, R.C., Südhof, T.C., 2011. Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 13764–13769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111093108>.
- Favre, M.R., La Mendola, D., Meystre, J., Christodoulou, D., Cochrane, M.J., Markram, H., Markram, K., 2015. Predictable enriched environment prevents development of hyper-emotionality in the VPA rat model of autism. *Front. Neurosci.* 9, 127. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00127>.
- Gao, R., Penzes, P., 2015. Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Curr. Mol. Med.* 15, 146–167. <https://doi.org/10.2174/1566524015666150303003028>.
- Garbugino, L., Centofante, E., D'Amato, F.R., 2016. Early social enrichment improves social motivation and skills in a monogenic mouse model of autism, the Oprm1 (-/-) mouse. *Neural Plast.* 2016, 1. <https://doi.org/10.1155/2016/5346161>.
- Garcia-Esparcia, P., Diaz-Lucena, D., Ainciburu, M., Torrejón-Escribano, B., Carmona, M., Llorens, F., Ferrer, I., 2018. Glutamate transporter GLT1 expression in Alzheimer disease and dementia with Lewy bodies. *Front. Aging Neurosci.* 10, 122. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00122>.
- Happé, F., Ronald, A., 2008. The 'fractionable autism triad': a review of evidence from behavioural, genetic, cognitive and neural research. *Neuropsychol. Rev.* 18, 287–304. <https://doi.org/10.1007/s11065-008-9076-8>.
- Hulbert, S.W., Bey, A.L., Jiang, Y.H., 2018. Environmental enrichment has minimeffects on behavior in the Shank3 complete knockout model of autism spectrum disorder. *Brain Behav.* 8, 1. <https://doi.org/10.1002/brb3.1107>.
- Iwata, K., 2019. Characterization of an animal model of autism and social interaction. *Methods Mol. Biol.* 1916, 149–155. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_14.
- Iwata, K., Matsuzaki, H., Takei, N., Manabe, T., Mori, N., 2010. Animal models of autism: an epigenetic and environmental viewpoint. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* 10, 37–44. <https://doi.org/10.4137/CJNSD.S6188>.
- Jiang, Y.H., Ehlers, M.D., 2013. Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron* 78 (1), 8–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.016>.
- Johansson, B.B., Ohlsson, A.L., 1996. Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. *Exp. Neurol.* 139, 322–327. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0106>.
- Kazdoba, T.M., Leach, P.T., Silverman, J.L., Crawley, J.N., 2014. Modeling fragile X syndrome in the Fmr1 knockout mouse. *Intractable Rare Dis. Res.* 3 (4), 118–133. <https://doi.org/10.5582/iridr.2014.01024>.
- Kempermann, G., 2019. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 235–245. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0120-x>.
- Kentner, A.C., Khoury, A., Lima Queiroz, E., MacRae, M., 2016. Environmental enrichment rescues the effects of early life inflammation on markers of synaptic transmission and plasticity. *Brain Behav. Immun.* 57, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.013> Get rights and content.
- Kodak, T., Bergmann, S., 2020. Autism spectrum disorder: characteristics, associated behaviors, and early intervention. *Pediatr. Clin. N. Am.* 67 (3), 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2020.02.007>.
- Laviola, G., Hannan, A.J., Macri, S., Solinas, M., Jaber, M., 2008. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol. Dis.* 31, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.05.001>.
- Lin, Y.C., Frei, J.A., Kilander, M.B., Shen, W., Blatt, G.J., 2016. A subset of autism-associated genes regulate the structural stability of neurons. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 263. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00263>.
- Mabunga, D.F., Gonzales, E.L., Kim, J.W., Kim, K.C., Shin, C.Y., 2015. Exploring the validity of valproic acid animal model of autism. *Exp. Neurobiol.* 24 (4), 285–300. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>.
- Mironova, Y.S., Zhukova, I., Zhukova, N., Alifrova, V., Izhboldina, O., Latypova, A., 2018. Parkinson's disease and glutamate excitotoxicity. *Zh. Nevrol. i psikiatrii Im.SS Korsakova* 118, 50–54. <https://doi.org/10.17116/jnevro201811806250>.
- Nelson, K.B., Grether, J.K., Croen, L.A., Dambrosia, J.M., Dickens, B.F., Jelliffe, L.L., Hansen, R.L., Phillips, T.M., 2001. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Ann. Neurol.* 49, 597–606.
- Nestler, E., Hyman, S., 2010. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 13, 1161–1169. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>.
- Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 697–709. <https://doi.org/10.1038/nrn1970>.
- Nolan, S.O., Hodges, S.L., Binder, M.S., Smith, G.D., Okoh, J.T., Jefferson, T.S., Escobar, B., Lugo, J.N., 2022. Dietary rescue of adult behavioral deficits in the Fmr1 knockout mouse. *PLoS One* 17, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262916>.
- Oddi, D., Subashi, E., Middei, S., Bellocchio, L., Lemaire-Mayo, V., Guzmán, M., Crusio, W.E., D'Amato, F.R., Pietropaolo, S., 2015. Early social enrichment rescues adult behavioral and brain abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Neuropsychopharmacology* 40, 1113–1122. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.291>.
- Page, M.J., McKenzie, J.E., Bossuyt, P.M., Boutron, I., Hoffmann, T.C., Mulrow, C.D., Shamseer, L., Tetzlaff, J.M., Akl, E.A., Brennan, S.E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J.M., Hróbjartsson, A., Lalu, M.M., Li, T., Loder, E.W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., McGuinness, L.A., Stewart, L.A., Thomas, J., Tricco, A.C., Welch, V.A., Whiting, P., Moher, D., 2021. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 372, n71. <https://doi.org/10.1136/bmj>.
- Pavà, D., Micuțu, I.V., 2021. The dopamine hypothesis of autism spectrum disorder revisited: current status and future prospects. *Dev. Neurosci.* 43 (2), 73–83. <https://doi.org/10.1159/000515751>.
- Perry, E.K., Lee, M.L., Martin-Ruiz, C.M., Court, J.A., Volsen, S.G., Merritt, J., Folly, E., Iversen, P.E., Bauman, M.L., Perry, R.H., Wenk, G.L., 2001. Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain. *Am. J. Psychiatry* 158, 1058–1066. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.7.1058>.
- Petr, G.T., Bakradze, E., Frederick, N.M., Wang, J., Armsen, W., Aizenman, E., Rosenberg, P.A., 2013. Glutamate transporter expression and function in a striatal neuronal model of Huntington's disease. *Neurochem. Int.* 62, 973–981. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.026>.
- Pietropaolo, S., Goubran, M.G., Joffe, C., Aubert, A., Lemaire-Mayo, V., Crusio, W.E., Layé, S., 2014. Dietary supplementation of omega-3 fatty acids rescues fragile X phenotypes in Fmr1-Ko mice. *Psychoneuroendocrinology* 49, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.07.002>.
- Queen, N.J., Boardman, A.A., Patel, R.S., Siu, J.J., Mo, X., Cao, L., 2020. Environmental enrichment improves metabolic and behavioral health in the BTBR mouse model of autism. *Psychoneuroendocrinology* 111, 104476. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104476>.
- Raza, S., Harker, A., Richards, S., Kolb, B., Gibb, R., 2015. Tactile stimulation improves neuroanatomical pathology but not behavior in rats prenatally exposed to valproic acid. *Behav. Brain Res.* 282, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.055>.
- Reynolds, S., Urruela, M., Devine, D.P., 2013. Effects of environmental enrichment on repetitive behaviors in the BTBR T^{tf}/J mouse model of autism. *Autism Res.* 6, 337–343. <https://doi.org/10.1002/aur.1298>.
- Rodier, P.M., Ingram, J.L., Tisdale, B., Nelson, S., Romano, J., 1996. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J. Comp. Neurol.* 370, 247–261. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960624\)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2).
- Rodier, P.M., Ingram, J.L., Tisdale, B., Croog, V.J., 1997. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod. Toxicol.* 11, 417–422. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(97\)80001-u](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(97)80001-u).
- Rothstein, J.D., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Kuncel, R.W., 1993. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6591–6595. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6591>.
- Roulet, F.I., Wollaston, L., Decatanaro, D., Foster, J.A., 2010. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience* 170, 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.069>.
- Schaffner, M.D., Middleton, L.J., Abdus-Saboor, I., 2019. Mechanisms of tactile sensory phenotypes in autism: current understanding and future directions for research. *Curr. Psychiatry Rep.* 21 (12), 134. <https://doi.org/10.1007/s11920-019-1122-0>.
- Schlickmann, E., Fortunato, J.J., 2013. O uso de ácido valproico para a indução de modelos animais de autismo: uma revisão. *J. Bras. Psiquiatr.* 62 (2), 151–159. <https://doi.org/10.1590/S0047-20852013000200009>.
- Schneider, T., Turczak, J., Przewłocki, R., 2006. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology* 31, 36–46. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300767>.
- Silvestrin, R.B., Bambini-Junior, V., Galland, F., Bobermim, D.L., Quincozes-Santos, A., Torres, R.A., Zanotto, C., Batassini, C., Brolese, G., Gonçalves, C.A., Riesgo, R., Gottfried, C., 2013. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res.* 1495, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012>.
- Solinas, M., Thiriet, N., Chauvet, C., Jaber, M., 2010. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Prog. Neurobiol.* 92, 572–592. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.08.002>.
- Stewart, K., Bayne, K., 2004. Environmental enrichment for laboratory animals. In: Reuter, J.D. (Ed.), *Laboratory Animal Medicine and Management*. International Veterinary Information Service, New York.
- Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M.R., Hammer, R.E., Liu, X., Powell, C.M., Südhof, T.C., 2007. A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science* 318 (5847), 71–76. <https://doi.org/10.1126/science.1146221>.
- Tania, M., Khan, M.A., Xia, K., 2014. Recent advances in animal model experimentation in autism research. *Acta Neuropsychiatr.* 26 (5), 264–271. <https://doi.org/10.1017/neu.2013.58> (PMID: 25371923).
- Tordjman, S., Drapier, D., Bonnot, O., Gaignic, R., Fortes, S., Cohen, D., Millet, B., Laurent, C., Roubertoux, P.L., 2007. Animal models relevant to schizophrenia and autism: validity and limitations. *Behav. Genet.* 37, 61–78. <https://doi.org/10.1007/s10519-006-9120-5>.
- Uddin, M.N., Yao, Y., Manley, K., Lawrence, D.A., 2020. Development, phenotypes of immune cells in BTBR T^{tf}/J mice. *Cell. Immunol.* 358, 104223. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104223>.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191–198. <https://doi.org/10.1038/35044558>.

Varghese, M., Keshav, N., Jacot-Descombes, S., Warda, T., Wicinski, B., Dickstein, D.L., Harony-Nicolas, H., De Rubeis, S., Drapeau, E., Buxbaum, J.D., Hof, P.R., 2017. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol.* 134, 537–566. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1736-4>.

Velazquez, F.N., Pucca, C.G., Etienne, O., D'Astolfo, D.S., Silvestre, D.C., Boussin, F.D., Caputto, B.L., 2015. Brain development is impaired in c-fos $-/-$ mice. *Oncotarget* 6, 16883–16901. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4527>.

Wang, H., Yin, Y.X., Gong, D.M., Hong, L.J., Wu, G., Jiang, Q., Wang, C.K., Blinder, P., Long, S., Han, F., Lu, Y.M., 2019. Cathepsin B inhibition ameliorates leukocyte-endothelial adhesion in the BTBR mouse model of autism. *CNS Neurosci. Ther.* 25 (4), 476–485. <https://doi.org/10.1111/cns.13074>.

Wesseling, H., Elgersma, Y., Bahn, S., 2017. A brain proteomic investigation of rapamycin effects in the Tsc1 $-/-$ mouse model. *Mol. Autism* 8, 41. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0151-y>.

Will, B., Galani, R., Kelche, C., Rosenzweig, M.R., 2004. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990–2002). *Prog. Neurobiol.* 72, 167–182. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.03.001>.

Yamaguchi, H., Hara, Y., Ago, Y., Takano, E., Hasebe, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T., Takuma, K., 2017. Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. *Behav. Brain Res.* 333, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.035>.

Yang, M., Perry, K., Weber, M.D., Katz, A.M., Crawley, J.N., 2011. Social peers rescue autism-relevant sociability deficits in adolescent mice. *Autism Res.* 4, 17–27. <https://doi.org/10.1002/aur.163>.

Zeidan, J., Fombonne, E., Scora, J., Ibrahim, A., Durkin, M.S., Saxena, S., Yusuf, A., Shih, A., Elsabbagh, M., 2022. Global prevalence of autism: a systematic review update. *Autism Res.* 15, 778–790. <https://doi.org/10.1002/aur.2696>.

Zhao, M., Chang, Q., Yang, H., Wang, M., Liu, Y., Lv, N., Lei, Q., Wei, H., 2022. Epithelone D modulates autism-like behaviors in the BTBR mouse model of autism spectrum disorder. *Neuroscience* 490, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.02.025>.

Apêndice B. Artigo a ser submetido a revista “Biological Psychiatry” (Fator de impacto: 10.6).

Animais expostos ao ácido valproico durante o período intraútero podem não replicar as características comportamentais do autismo

Cassia Regina Suzuki Caires^a, Fernanda Aparecida David^a, Camila Ive Ferreira Oliveira Brancati^a, Karen Romano Tamehiro^a, Victor Jun Ohya Imai^a, Gabriele Celis Silva^b, Samir Andrei Lucio Dias^a, Luana Beline Faria^a, Jorge Mejia Cabeza^c, Ana Luiza Bossolani Martins^d, Orfa Yineth Galvis Alonso^a

^a Laboratório de Fisiologia Experimental, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP, Av. Brg. Faria Lima, 5416 - Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP, Brasil

^b Centro de Química Medicinal (CQMED), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Av. Dr. André Tosello, 550 - Cidade Universitária, Campinas, SP, Brasil

^c Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brasil.

^d Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - UFMS, Av. Pedro Pedrossian, 725 - Universitário, Paranaíba, MS, Brasil

Corresponding author: cassia.caires@edu.famerp.br

Replicabilidade do TEA: exposição ao ácido valproico

Palavras Chave:

TEA; Autismo; Ácido Valproico; Rato, Modelo Animal; Teste comportamental.

Resumo

Introdução: Os transtornos do espectro autista são caracterizados pela presença de interesse restrito, movimentos repetitivos e déficits sociais. Afetam mais o sexo masculino e, apresentam alta prevalência na população mundial. A exposição ao ácido valproico (AVP), durante o período embrionário, aumenta a incidência do transtorno. Com isso, avaliamos a replicabilidade do modelo animal de autismo induzido por AVP, por meio das análises comportamentais utilizadas para avaliar as características do tipo autista nos animais. **Métodos:** Ratas grávidas, no dia embrionário 12,5, receberam uma injeção intraperitoneal de 600 mg/kg de AVP ou 1 ml/100g de solução salina a 0,9% (SS). E, do dia pós-natal (DPN) 31 ao 34 o comportamento dos animais foi avaliado. **Resultados:** não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, entre os grupos, na curva de peso, a idade de abertura dos olhos, nem no comportamento expresso nos testes do campo aberto, de interação social e do labirinto em cruz elevado. **Conclusões:** Os animais entraram em contato com o AVP, comprovado pela existência dos efeitos teratogênicos, porém não replicaram os comportamentos do tipo autista. Não há um consenso sobre as formas corretas de analisar e estimar a replicabilidade dos estudos, entretanto, esse estudo ressalta a necessidade de protocolos mais padronizados em que a composição das soluções/suspensões dos fármacos e o background genético dos animais sejam descritos da forma mais precisa possível para aumentar a comparabilidade e a reprodutibilidade dos estudos.

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição heterogênea de manifestações comportamentais de desenvolvimento amplamente variável. É caracterizado por déficits na comunicação e na interação social e, aumento do interesse restrito e dos comportamentos repetitivos ^(1, 2, 3). Atualmente, o TEA possui uma incidência mundial de um em cada 100 indivíduos e uma probabilidade de 4,2 meninos para uma menina ⁽⁴⁾, com um notório aumento nos últimos 10 anos ^(5, 6). Não possui uma única etiologia, e sim, uma série de distúrbios cerebrais distintos, causados por uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais ⁽⁷⁾. O fator etiológico é desconhecido em 85% dos casos ⁽⁸⁾ e pode ser identificado em apenas 15% dos pacientes ⁽⁹⁾.

Os fatores genéticos foram apontados de forma mais explícita, levando a uma grande proporção de evidências genéticas na etiologia do TEA ^(10, 11). Alguns fatores ambientais associados ao TEA foram identificados, incluindo exposição materna a poluentes ambientais ^(12, 13), uso de ácido valproico (AVP), misoprostol e talidomida durante a gravidez ⁽¹⁴⁾, hipertensão, diabetes e obesidade materna ⁽¹⁵⁾, curto intervalo entre as gestações ⁽¹⁶⁾, baixo peso ao nascer e prematuridade ⁽¹⁷⁾.

Os mecanismos cerebrais responsáveis pelo autismo não são totalmente compreendidos, portanto, modelos animais que repliquem algumas das alterações, comportamentais do TEA como os déficits sociais e os comportamentos repetitivos/estereotipados ⁽¹⁸⁾, neuroanatômicas, bioquímicas e as deficiências cognitivas podem auxiliar para a melhor compreensão da fisiopatologia do TEA ^(14, 19).

Dos modelos animais induzidos por fatores ambientais, os ratos e os camundongos expostos no período pré-natal ao AVP são os mais amplamente estudados ^(20, 21, 22, 23, 24). O AVP é um medicamento anticonvulsivante e estabilizador de humor, prescrito principalmente para tratar a epilepsia, o transtorno bipolar ⁽²⁵⁾ e as crises de enxaquecas ⁽²⁶⁾. Este medicamento atravessa a placenta e pode passar pelo leite materno ⁽²⁷⁾, portanto, durante anos tem sido associado a diversos efeitos teratogênicos ⁽²⁸⁾, como a ocorrência de malformações congênitas, que incluem defeitos nas características faciais, além de malformações do tecido cardíaco, dos membros e dos dedos de pacientes com TEA ⁽²⁹⁾. Estudos mostram que há um risco de 10,93% de crianças apresentarem alguma malformação congênita (de qualquer tipo) ⁽³⁰⁾ e um risco de 2,4 a 4,42% de desenvolverem o autismo, quando expostas ao AVP, no período intraútero ⁽³¹⁾.

Como qualquer outro modelo animal de transtornos neurobiológicos, os modelos animais de TEA foram desenvolvidos para obter informações e fazer previsões do

transtorno em humanos. O autismo é um distúrbio específico em humanos e a maioria dos sintomas pode ser reproduzido por modelos animais ⁽³²⁾. Para qualquer modelo animal ser rotulado como um modelo de autismo, o animal deve espelhar ao menos dois aspectos da sintomatologia do TEA ⁽³³⁾. Levando-se em consideração as observações clínicas em humanos, é possível detectar sintomas semelhantes ao TEA nos modelos animais, por meio de abordagens comportamentais ⁽³⁴⁾.

Pesquisas envolvendo aspectos comportamentais de modelos roedores aumentaram nos últimos anos. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar a replicabilidade do modelo animal de autismo induzido por AVP, por meio dos parâmetros comportamentais que analisam as características do tipo autista nos animais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Ratos Wistar machos e fêmeas não irmãos obtidos do biotério central da Universidade de São Paulo, USP, Brasil foram mantidos no biotério de experimentação do laboratório de Fisiologia Experimental, da Faculdade de Medicina de Rio Preto, FAMERP, Brasil. Todos os animais foram alojados em caixas de polietileno com dimensões de 47 cm x 34 cm x 16cm com tampa de aço inox. As caixas foram higienizadas três vezes por semana e forradas com maravalha autoclavável. Os animais foram mantidos em condições controladas de luz (fase luz 07 am às 07 pm) e temperatura (23 ± 2 °C), com disponibilidade para consumo à vontade de ração e água filtrada. Os protocolos foram realizados de acordo com as normas éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) do Brasil e seguindo as orientações do Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE). Este estudo foi aprovado pelo Comitê local de ética no uso de animais (CEUA – FAMERP, nº 03/2017).

2.2. Protocolo experimental

Após completarem 60 dias de vida, os animais foram colocados para acasalar das 08 pm às 08 am e, após foi verificada a gravidez, por meio da avaliação da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. Este dia foi considerado o dia embrionário 0 (E0) e estas fêmeas foram mantidas isoladas em caixas individuais. No dia E12,5 as ratas prenhes foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: AVP (n=13), que recebeu 600 mg/kg de ácido valproico (Santa Cruz Biotechnology - SC-202378) diluídos em

solução salina e, grupo salina (SS; n=15), tratado com 1 ml/kg de solução salina a 0,9%, por via intraperitoneal.

No dia pós natal (DPN) 01, todas as ninhadas foram padronizadas com um máximo de 10 filhotes cada. Os filhotes foram desmamados no DPN 21 e separados em caixas contendo irmãos do mesmo sexo (2 - 4 irmãos/caixa). Entre DPN 31 e 34, todos os filhotes machos foram incluídos no estudo e expostos a um teste comportamental por dia, na seguinte sequência: campo aberto (CA), interação social (IS) e labirinto em cruz elevado (LCE). O delineamento experimental está exemplificado na Figura 1.

2.3 Parâmetros de desenvolvimento

A data de abertura dos olhos foi verificada diariamente do DPN 06 ao 16. Nos DPNs 14, 28 e 36 os animais foram pesados para análise do peso corpóreo. No DPN 21 os ratos foram desmamados e avaliados quanto à presença de alguma teratogenia.

2.4 Testes comportamentais

Os testes comportamentais ocorreram das 7 am à 01 pm em uma sala isolada acusticamente, com temperatura controlada de 21 ± 2 °C. A sala continha uma iluminação tênue, com duas lâmpadas brancas localizadas em cima do aparato a 1,65 m do chão. Os animais foram transportados do biotério à sala de teste em caixas brancas. Antes do início das gravações os ratos foram aclimatados individualmente por 15 minutos na sala de teste e, ao final de cada teste o aparato foi completamente limpo com etanol 70% para remoção dos odores. Adicionalmente, o comportamento de todos os animais foi registrado em vídeo, para análise posterior. Nos testes de CA e IS foi utilizado o mesmo aparato.

2.4.1 Campo aberto

O aparato consistia em uma caixa preta, vazia e limpa (50 cm x 50 cm x 50 cm). O animal foi colocado no centro do aparato e durante 20 minutos foi registrada a duração dos seguintes comportamentos: autolimpeza e a permanência do animal no centro (área quadrada de 625 cm²) do aparato. Quantificamos também o número de farejamentos e de elevações (animal sobre as patas posteriores) realizados durante os cinco primeiros minutos de teste, para avaliar a capacidade dos animais em explorar um novo ambiente.

2.4.2. Interação social

Foi utilizada uma versão modificada do protocolo proposto por BANERJEE e colaboradores (2014) ⁽³⁵⁾. No meio de uma das paredes do aparato foi colocada uma caixa de acrílico transparente (base quadrada com 15 cm de lado, 27 cm de altura e paredes com furos). O rato experimental foi colocado na parede oposta e de frente à caixa vazia durante cinco minutos. Após o término deste tempo ele foi retirado e colocado o rato de interação dentro da caixa. Em seguida foi recolocado o rato experimental e iniciado o teste, com duração de 10 minutos. A região em torno do cilindro (6 cm) foi denominada zona de interação e, avaliamos o tempo em que o animal esteve dentro ou fora deste local.

2.4.3. Labirinto em cruz elevado

O aparato consiste em dois braços abertos de 50 cm×10 cm e dois braços fechados de 50 cm×10 cm com paredes de 40 cm de altura, elevado a 50 cm do chão ⁽³⁶⁾. Os ratos foram colocados no centro do labirinto, de frente para um braço aberto, podendo explorar o aparato por cinco minutos. Foi registrada a duração dos comportamentos de *head dipping* (mergulhar a cabeça para baixo na borda do braço aberto), o tempo total no BA e de entradas nessa mesma localidade. Bem como o tempo de autolimpeza, exploração e elevação.

2.5. Análise histológica

No DPN 36 ou 37, os ratos foram anestesiados com 100 mg/kg de tiopental sódico por via intraperitoneal e perfundidos por via intra-cardíaca com 50 ml de solução salina 0,9%, seguidos de 200 ml de paraformaldeído (PFA) 4%. Os cérebros foram removidos e deixados no PFA 4% por no mínimo sete dias, após este tempo foi realizado o processamento histológico e inclusão na parafina. Os blocos foram cortados com micrótomo em secções de 6 µm de espessura e, os cortes colocados em lâminas previamente gelatinizadas. As quais foram submetidas à coloração por Hematoxilina e Eosina (HE), seguindo o seguinte protocolo: desparafinização em xilol, hidratação dos cortes em álcool com concentração decrescente, coloração com hematoxilina por um minuto, diferenciação, coloração com eosina durante 10 segundos, hidratação dos cortes, clarificação e montagem.

Imagens do hipocampo dorsal foram capturadas em ampliação de $\times 40$ usando o sistema de escâner de lâminas (Olympus VS120 - S5). A contagem de neurônios foi realizada em CA1, CA2, CA3 e CA4 e nas lâminas superior (GD-s) e inferior (GD-i) do giro denteado (GD), nas secções correspondentes às coordenadas antero-posterior (AP) de -4.16 a -4.52 mm, com relação ao bregma⁽³⁷⁾. Para a quantificação dos neurônios foram feitas imagens usando o software *OlyVIA* 2.9 com dimensões de 20 μm da área escaneada. Estas imagens foram abertas no *ImageJ* 1.8 e, em cada imagem foram delimitadas cinco áreas de 50 μm^2 para a contagem de neurônios em CA1, 2, 4 e GD e, três áreas de 50 μm^2 para a contagem de neurônios em CA3. Para esta quantificação foram usados sete animais do grupo SS e cinco AVP.

2.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.00. ANOVA de duas vias com medidas repetidas foi utilizado para calcular a diferença estatística dos pesos dos grupos experimentais, seguido do teste post-hoc Bonferroni. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, para verificar se as variáveis registradas apresentaram distribuição normal. Para os dados paramétricos foi utilizado o “T test” e, para os não paramétricos, o teste de “Mann-Whitney”. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$. Os dados foram representados em gráficos dot plot com mediana interquartil range e, na tabela para a apresentação dos pesos, os resultados foram representados em média $\pm$ desvio padrão.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do AVP nos parâmetros de desenvolvimento

Ao todo, 81 animais do biotério central da USP (22 machos e 59 fêmeas) foram acasalados para a obtenção de 56 filhotes machos experimentais (SS=31 e AVP=25). Todos os animais apresentaram boa condição de saúde ao longo do experimento. A aplicação de AVP ocorreu em 36 ratas grávidas e 17 sofreram aborto. 78% dos ratos AVP apresentaram dobras na cauda e não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na data de abertura dos olhos, na quantidade de filhotes por ninhada e nem no peso corpóreo. Com o aumento da idade os animais aumentaram de peso (Tabela 1).

3.2. Efeito do AVP nos parâmetros comportamentais

Não foram detectadas, no teste de campo aberto, diferenças estatisticamente significativas no tempo de autolimpeza, nem na permanência no centro do aparato e na capacidade de exploração de um novo ambiente (Figura 2).

No teste de interação social nenhum dos parâmetros avaliados apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Figura 3).

No teste de LCE não observamos diferenças entre os grupos experimentais quanto ao comportamento ansioso e estereotipa dos animais, também não observamos diferenças no tempo de exploração, de elevação e de *head-dipping* (Figura 4).

Na contagem celular não foram observadas diferenças significativas ao quantificarmos o número de neurônios do hipocampo, em CA1, CA2, CA3, CA4, GD-s e GD-i, todas em AP3 (Figura 5).

4. DISCUSSÃO

A etiologia do TEA não é totalmente compreendida, assim modelos animais que repliquem as manifestações clínicas presentes no espectro são de suma importância para avanços na compreensão da fisiopatologia e do tratamento do transtorno. Tais modelos podem ser de induzidos geneticamente ⁽³⁸⁾ ou por fatores ambientais ⁽²⁷⁾. Neste estudo o modelo animal de autismo induzido por exposição a um fator ambiental (AVP), parece não ter sido reproduzido.

Pois os animais não apresentaram, no teste de CA, um aumento da ansiedade, avaliado por meio do tempo de permanência na área central ^(36, 39) e dos comportamentos repetitivos, avaliados por meio do tempo de autolimpeza ^(20, 34, 40, 41, 42) que é análoga a este comportamento. Além disso, no referido teste, também avaliamos a exploração que é um dos comportamentos mais ativos nos ratos, estudos demonstram que nos animais que replicam a sintomatologia do TEA há uma notória diminuição deste aspecto ^(34, 40). Fato este, que também não foi reproduzido em nosso estudo. Também não apresentaram déficits na sociabilidade ^(20, 43), avaliado no teste de IS. Além disso, não apresentaram aumento no número de entradas e no tempo gasto nos BAs do LCE, para avaliação do comportamento do tipo ansioso ⁽¹⁹⁾.

Entretanto, nossos animais entraram em contato com o AVP. Tal condição pode ser comprovada pela existência da alta taxa de efeitos teratogênicos como as alterações da cauda (78%) e a cromodacriorreia (12%); similar ao observado na literatura ^(44, 45). Na

literatura há estudos com o modelo experimental de TEA exposto ao AVP e replicação das características do transtorno ^(46, 47, 48). Os estudos são realizados em diferentes condições experimentais, bem como, em diferentes origens genéticas das espécies, talvez estes pontos sejam a explicação para os nossos achados.

Não há um consenso sobre as formas corretas de analisar e estimar a replicabilidade dos estudos ^(49, 50). Porém problemas e diferenças são observados nos trabalhos, reforçando ainda mais a necessidade de protocolos mais padronizados em que a composição das soluções/suspensões dos fármacos e o *background* genético dos animais sejam descritos da forma mais precisa possível para aumentar a comparabilidade e a reprodutibilidade dos estudos ⁽⁵¹⁾.

Uma variedade de fatores genéticos e ambientais tem sido associada ao TEA, mas nenhum é absolutamente específico para o desenvolvimento do espectro ⁽⁵²⁾. Fatores ambientais foram associados ao risco de 14% a 22% de desenvolver o TEA, porém aos fatores genéticos o risco atribuído é de cerca de 80% ^(52, 53). Assim, ressalta-se a importante contribuição dos fatores genéticos. Inclusive, a Academia Americana de Pediatria e o Colégio Americano de Genética Médica e Genômica recomendam testes genéticos para indivíduos diagnosticados com TEA, visando o correto Aconselhamento Genético para as famílias ^(51, 52, 53).

Neste contexto, a aparente não reprodução do modelo animal de autismo induzido por fatores ambientais, talvez possa ser justificada pela não suscetibilidade genética dos animais expostos ao AVP. Assim, será que estudos que reproduziram o modelo utilizaram animais com certa suscetibilidade ao composto? Uma proposta seria comparar geneticamente os nossos animais com animais expostos ao AVP e que replicaram a características comportamentais do tipo autista.

Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT - 59/300.156/2016) e da Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (FUNFARME/FAMERP). Agradecimentos a toda a equipe do laboratório de fisiologia experimental: Ayvin Souza, Bruna Toniolo, Carla Colenghi, Hélder Camacho, Igor Gorla, Bárbara Fontes, Cesar Telles, Rafael Mota, Clélia Ribeiro, Arthur Brener, Maria Eduarda, Victória, Sandro Barbosa e, Leonardo Oliveira. Ao Centro de Bioterismo da FAMERP, ao Laboratório de Microscopia e Microanálise da UNESP e, ao Laboratório de Plasticidade Neuroglial da UFRGS.

Conflito de interesse

Os autores não relatam interesses financeiros biomédicos ou potenciais conflitos de interesse

Referências

(1) *American Psychiatric Association*. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 15th ed. Arlington, VA: Am Psychiatr Publishing; 2013.

(2) Carbone PS. (2013): Moving from research to practice in the primary care of children with autism spectrum disorders. *Acad Pediatr*. 13(5):390-9. doi: 10.1016/j.acap.2013.04.003. PMID: 24011743.

(3) Hyman SL, Levy SE, Myers SM; (2020): Council on children with disabilities, section on developmental and behavioral pediatrics. Executive Summary: Identification, Evaluation, and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. *Pediatrics*. doi: 10.1542/peds.2019-3448. PMID: 31843858.

(4) Zeidan J, Fombonne E, Scora J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, et al. (2022): Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res*. 15(5):778-790. doi: 10.1002/aur.2696. PMID: 35238171; PMCID: PMC9310578.

(5) Maenner MJ, Warren Z, Williams AR, Amoakohene E, Bakian AV, Bilder DA, Durkin MS, Fitzgerald RT, Fournier SM, Hughes MM, Ladd-Acosta CM, McArthur D, Pas ET, Salinas A, Vehorn A, Williams S, Esler A, Grzybowski A, Hall-Lande J, Nguyen RHN, Pierce K, Zahorodny W, Hudson A, Hallas L, Mancilla KC, Patrick M, Shenouda J, Sidwell K, DiRienzo M, Gutierrez J, Spivey MH, Lopez M, Pettygrove S, Schwenk YD, Washington A, Shaw KA. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR Surveill Summ*. 2023 Mar 24;72(2):1-14. doi: 10.15585/mmwr.ss7202a1. PMID: 36952288; PMCID: PMC10042614.

(6) Baio J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z et al. (2018): Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ*. 67(6):1-23. doi: 10.15585/mmwr.ss6706a1. Erratum in: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2018 May 18;67(19):564. Erratum in: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*.

2018 Nov 16;67(45):1280. Corrected and republished in: MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018 Nov 16;67(45):1279. PMID: 29701730; PMCID: PMC5919599.

(7) Bauman MD, Schumann CM (2018): Advances in nonhuman primate models of autism: Integrating neuroscience and behavior. *Exp Neurol.* 299(Pt A):252-265. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.07.021. PMID: 28774750; PMCID: PMC5810939.

(8) Carter MT, Scherer SW (2013): Autism spectrum disorder in the genetics clinic: a review. *Clin Genet.* 83(5):399-407. doi: 10.1111/cge.12101. PMID: 23425232.

(9) Apte M, Kumar A. (2023): Correlation of mutated gene and signalling pathways in ASD. *IBRO Neurosci Rep.* 14:384-392. doi: 10.1016/j.ibneur.2023.03.011. PMID: 37101819; PMCID: PMC10123338.

(10) Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, et al. (2011): Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics.* 128(3):e488-95. doi: 10.1542/peds.2010-2825. PMID: 21844053; PMCID: PMC3164092.

(11) Chen JA, Peñagarikano O, Belgard TG, Swarup V, Geschwind DH. (2015): The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. *Annu Rev Pathol.* 10:111-44. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040405. PMID: 25621659.

(12) Volk HE, Lurmann F, Penfold B, Hertz-Picciotto I, McConnell R. (2013): Traffic-related air pollution, particulate matter, and autism. *JAMA Psychiatry.* 70(1):71-7. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.266. PMID: 23404082; PMCID: PMC4019010.

(13) Windham GC, Sumner A, Li SX, Anderson M, Katz E, Croen LA, Grether JK. (2013): Use of birth certificates to examine maternal occupational exposures and autism spectrum disorders in offspring. *Autism Res.*;6(1):57-63. doi: 10.1002/aur.1275. PMID: 23361991.

- (14) Tania M, Khan MA, Xia K. (2014): Recent advances in animal model experimentation in autism research. *Acta Neuropsychiatr.* 26(5):264-71. doi: 10.1017/neu.2013.58. PMID: 25371923.
- (15) Krakowiak P, Walker CK, Bremer AA, Baker AS, Ozonoff S, Hansen RL, et al. (2012): Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics.* 129(5):e1121-8. doi: 10.1542/peds.2011-2583. PMID: 22492772; PMCID: PMC3340592.
- (16) Cheslack-Postava K, Liu K, Bearman PS. (2011): Closely spaced pregnancies are associated with increased odds of autism in California sibling births. *Pediatrics.* 127(2):246-53. doi: 10.1542/peds.2010-2371. PMID: 21220394; PMCID: PMC3387860.
- (17) Lampi KM, Lehtonen L, Tran PL, Suominen A, Lehti V, Banerjee PN, et al. (2012): Risk of autism spectrum disorders in low birth weight and small for gestational age infants. *J Pediatr.* 161(5):830-6. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.04.058. PMID: 22677565; PMCID: PMC3449022.
- (18) Iwata K. (2019): Characterization of an Animal Model of Autism and Social Interaction. *Methods Mol Biol.* 1916:149-155. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_14. PMID: 30535692.
- (19) Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. (2019): The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *Methods Mol Biol.* 1916:69-74. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_4. PMID: 30535682.
- (20) Schneider T, Przewłocki R. (2005): Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology.* 30(1):80-9. doi: 10.1038/sj.npp.1300518. PMID: 15238991.
- (21) Bromley RL, Mawer GE, Briggs M, Cheyne C, Clayton-Smith J, García-Fiñana M, et al. (2013): Liverpool and Manchester Neurodevelopment Group. The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *J*

Neurol Neurosurg Psychiatry. 84(6):637-43. doi: 10.1136/jnnp-2012-304270. PMID: 23370617; PMCID: PMC4115188.

(22) Edalatmanesh MA, Nikfarjam H, Vafae F, Moghadas M. (2013): Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. Brain Res.;1526:15-25. doi: 10.1016/j.brainres.2013.06.024. PMID: 23806776.

(23) Bambini-Junior V, Zanatta G, Della Flora Nunes G, Mueller de Melo G, Michels M, Fontes-Dutra M, Nogueira Freire V, et al. (2014): Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. Neurosci Lett. 583:176-81. doi: 10.1016/j.neulet.2014.09.039. PMID: 25263788.

(24) Liu F, Horton-Sparks K, Hull V, Li RW, Martínez-Cerdeño V. (2018): The valproic acid rat model of autism presents with gut bacterial dysbiosis similar to that in human autism. Mol Autism. 10;9:61. doi: 10.1186/s13229-018-0251-3. PMID: 30555669; PMCID: PMC6288876.

(25) Johannessen CU, Johannessen SI. (2003): Valproate: past, present, and future. CNS Drug Rev. 9(2):199-216. doi: 10.1111/j.1527-3458.2003.tb00249.x. PMID: 12847559; PMCID: PMC6741662.

(26) Zafar MS, Stewart AM, Toupin DN, Cook AM, Baumann RJ. (2018): Continuous Intravenous Valproate as Abortive Therapy for Pediatric Status Migrainosus. Neurologist. 23(2):43-46. doi: 10.1097/NRL.000000000000161. PMID: 29494433.

(27) Arndt TL, Stodgell CJ, Rodier PM. (2005): The teratology of autism. Int J Dev Neurosci. 2005 23(2-3):189-99. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2004.11.001. PMID: 15749245.

(28) Saeed M, Saleem U, Anwar F, Ahmad B, Anwar A. (2020): Inhibition of Valproic Acid-Induced Prenatal Developmental Abnormalities with Antioxidants in Rats. ACS Omega. 5(10):4953-4961. doi: 10.1021/acsomega.9b03792. PMID: 32201781; PMCID: PMC7081441.

- (29) Doğan A, Baykan A, 7 C. (2021): Fetal valproate syndrome with coronary arteriovenous fistula: a case report. *Cardiol Young*. 31(5):853-855. doi: 10.1017/S1047951120004904. PMID: 33455599.
- (30) Weston J, Bromley R, Jackson CF, Adab N, Clayton-Smith J, Greenhalgh J, et al. (2016): Monotherapy treatment of epilepsy in pregnancy: congenital malformation outcomes in the child. *Cochrane Database Syst Rev*. 11(11):CD010224. doi: 10.1002/14651858.CD010224.pub2. PMID: 27819746; PMCID: PMC6465055.
- (31) Christensen J, Grønberg TK, Sørensen MJ, Schendel D, Parner ET, Pedersen LH, et al. (2013): Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*. 309(16):1696-703. doi: 10.1001/jama.2013.2270. PMID: 23613074; PMCID: PMC4511955.
- (32) Mabunga DF, Gonzales EL, Kim JW, Kim KC, Shin CY. (2015): Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp Neurobiol*. 24(4):285-300. doi: 10.5607/en.2015.24.4.285. PMID: 26713077; PMCID: PMC4688329.
- (33) Belzung C, Lemoine M. (2011): Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord*. 1(1):9. doi: 10.1186/2045-5380-1-9. PMID: 22738250; PMCID: PMC3384226.
- (34) Pasciuto E, Borrie SC, Kanellopoulos AK, Santos AR, Cappuyns E, D'Andrea L, et al. (2015): Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiol Learn Mem*. 124:71-87. doi: 10.1016/j.nlm.2015.07.013. PMID: 26220900.
- (35) Banerjee A, Engineer CT, Sauls BL, Morales AA, Kilgard MP, Ploski JE. (2014): Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero. *Front Behav Neurosci*. 8:387. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00387. PMID: 25429264; PMCID: PMC4228846.

- (36) Pellow S, File SE. (1986): Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 24(3):525-9. doi: 10.1016/0091-3057(86)90552-6. PMID: 2871560.
- (37) Paxinos, G., Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.
- (38) Zhao M, Chang Q, Yang H, Wang M, Liu Y, Lv N, et al. (2022): Epothilone D Modulates Autism-like Behaviors in the BTBR Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Neuroscience.* 10;490:171-181. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.02.025. PMID: 35227832.
- (39) Shahrababaki SSV, Moslemizadeh A, Amiresmaili S, Tezerji SS, Juybari KB, Sepehri G, et al. (2023): Ameliorating age-dependent effects of resveratrol on VPA-induced social impairments and anxiety-like behaviors in a rat model of neurodevelopmental disorder. *Neurotoxicology.* 96:154-165. doi: 10.1016/j.neuro.2023.03.003. PMID: 36933665.
- (40) Bahi A. (2017): Hippocampal BDNF overexpression or microR124a silencing reduces anxiety- and autism-like behaviors in rats. 326:281-290. doi: 10.1016/j.bbr.2017.03.010. PMID: 28284951.
- (41) Abhishek M, Rubal S, Rohit K, Rupa J, Phulen S, Gurjeet K, et al. (2022): Neuroprotective effect of the standardised extract of Bacopa monnieri (BacoMind) in valproic acid model of autism spectrum disorder in rats. *J Ethnopharmacol.* 293:115199. doi: 10.1016/j.jep.2022.115199. PMID: 35346813.
- (42) Garcia AM, Cardenas FP, Morato S. (2005): Effect of different illumination levels on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav.* 85(3):265-70. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.04.007. PMID: 15927214.
- (43) Kafkafi N, Agassi J, Chesler EJ, Crabbe JC, Crusio WE, Eilam D, et al. (2018): Reproducibility and replicability of rodent phenotyping in preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 87:218-232. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.01.003. PMID: 29357292; PMCID: PMC6071910.

- (44) Ruhela RK, Soni S, Sarma P, Prakash A, Medhi B. (2019): Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Ann Neurosci*. 26(1):25-31. doi: 10.5214/ans.0972.7531.260106. PMID: 31975769; PMCID: PMC6894633.
- (45) Hirsch MM, Deckmann I, Santos-Terra J, Staevie GZ, Fontes-Dutra M, Carello-Collar G, et al (2020): Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acid-induced animal model of autism. *Neuropharmacology*. 167:107930. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107930. PMID: 31904357.
- (46) Zhang Y, Sun Y, Wang F, Wang Z, Peng Y, Li R. (2012): Downregulating the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway attenuates the susceptibility to autism-like phenotypes by decreasing oxidative stress. *Neurochem Res*. 37(7):1409-19. doi: 10.1007/s11064-012-0724-2. PMID: 22374471.
- (47) Alò R, Olivito I, Fazzari G, Zizza M, Di Vito A, Avolio E, et al. (2021): Correlation of distinct behaviors to the modified expression of cerebral Shank1,3 and BDNF in two autistic animal models. *Behav Brain Res*. 404:113165. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113165. PMID: 33577886.
- (48) Niederberger E, Wilken-Schmitz A, Manderscheid C, Schreiber Y, Gurke R, Tegeder I. (2022): Non-Reproducibility of Oral Rotenone as a Model for Parkinson's Disease in Mice. *Int J Mol Sci*. 23(20):12658. doi: 10.3390/ijms232012658. PMID: 36293513; PMCID: PMC9604506.
- (49) Hirota T, King BH. (2023): Autism Spectrum Disorder: A Review. *JAMA*. 329(2):157-168. doi: 10.1001/jama.2022.23661. PMID: 36625807.
- (50) Wu Y, Cao H, Baranova A, et al. (2020): Multi-trait analysis for genome-wide association study of five psychiatric disorders. *Transl Psychiatry*. 10(1): 1-11. doi:10.1038/s41398-020-00902-6
- (51) Volkmar F, Siegel M, Woodbury-Smith M, King B, McCracken J, State M. (2014): American Academy of Child and Adolescent Psychiatry (AACAP) Committee on Quality

Issues (CQI). Practice parameter for the assessment and treatment of children and adolescents with autism spectrum disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 53(2):237-257. doi:10.1016/j.jaac.2013.10.013

(52) Schaefer GB, Mendelsohn NJ. (2013): Professional Practice and Guidelines Committee. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med*. 15(5):399-407. doi: 10.1038/gim.2013.32. Erratum in: *Genet Med*. 2013 Aug;15(8):669. PMID: 23519317.

(53) Hyman SL, Levy SE, Myers SM. (2020): Council on children with disabilities, section on developmental and behavioral pediatrics. Identification, evaluation, and management of children with autism spectrum disorder. *Pediatrics*. 145(1):e20193447. doi:10.1542/peds.2019-3447

Legendas de tabelas e figuras

Tabela 1. Efeito da exposição ao AVP ou ao SS no período intraútero na quantidade de dias para a abertura dos olhos, no quantidade de animais por ninhada e no peso corpóreo, de ratos Wistars machos. Onde: (n) número experimental, (DPN) dia pós natal, (SS) grupo solução salina e (AVP) grupo ácido valproico.

Figura 1. Linha temporal do estudo que avaliou ratos expostos ao AVP no período pré-natal. As abreviações indicam: SPMTZ: espermatozoides; E: dia embrionário; DPN: dia pós-natal; CA: campo aberto; NOR: reconhecimento do objeto novo; IS: interação social; LCE: labirinto em cruz elevado; AVP: ácido valproico; SS: soro fisiológico; n: número amostral. Created with BioRender.com

Figura 2. Perfil comportamental dos grupos experimentais quanto ao comportamento repetitivo (**A**), a ansiedade de acordo com a localização no aparato (**B**) e, a capacidade de exploração (**C** e **D**) no teste de campo aberto.

Figura 3. Avaliação da sociabilidade de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou a SS. Comparação do tempo de permanência na zona de interação (**A**), fora da zona de interação (**B**) e o índice de interação social (**C**).

Figura 4. Comportamento no teste do labirinto em cruz elevado de ratos expostos no período pré-natal ao AVP ou ao SS. Avaliação do comportamento do tipo ansioso (**A** e **B**), do comportamento repetitivo (**C**) e do nível de exploração (**D**, **E** e **F**).

Figura 5. Densidade neuronal em CA1 (**A**), CA2 (**B**), CA3 (**C**), CA4 (**D**), giro denteado – lâmina inferior (**E**) e giro denteado – lâmina superior (**F**).

Tabelas e figuras

Tabela 1.

Grupo	Abertura dos olhos	n/ninhada	Peso - g (DPN)		
			14	28	36
SS	14,71±0,9	9,73±2,18	27,16±3,17	77,54±8,68	125,38±15,06
AVP	14,68±1,18	9,46±2,63	33,32±49,46	76,84±11,68	125,36±14,51

Figura 1.

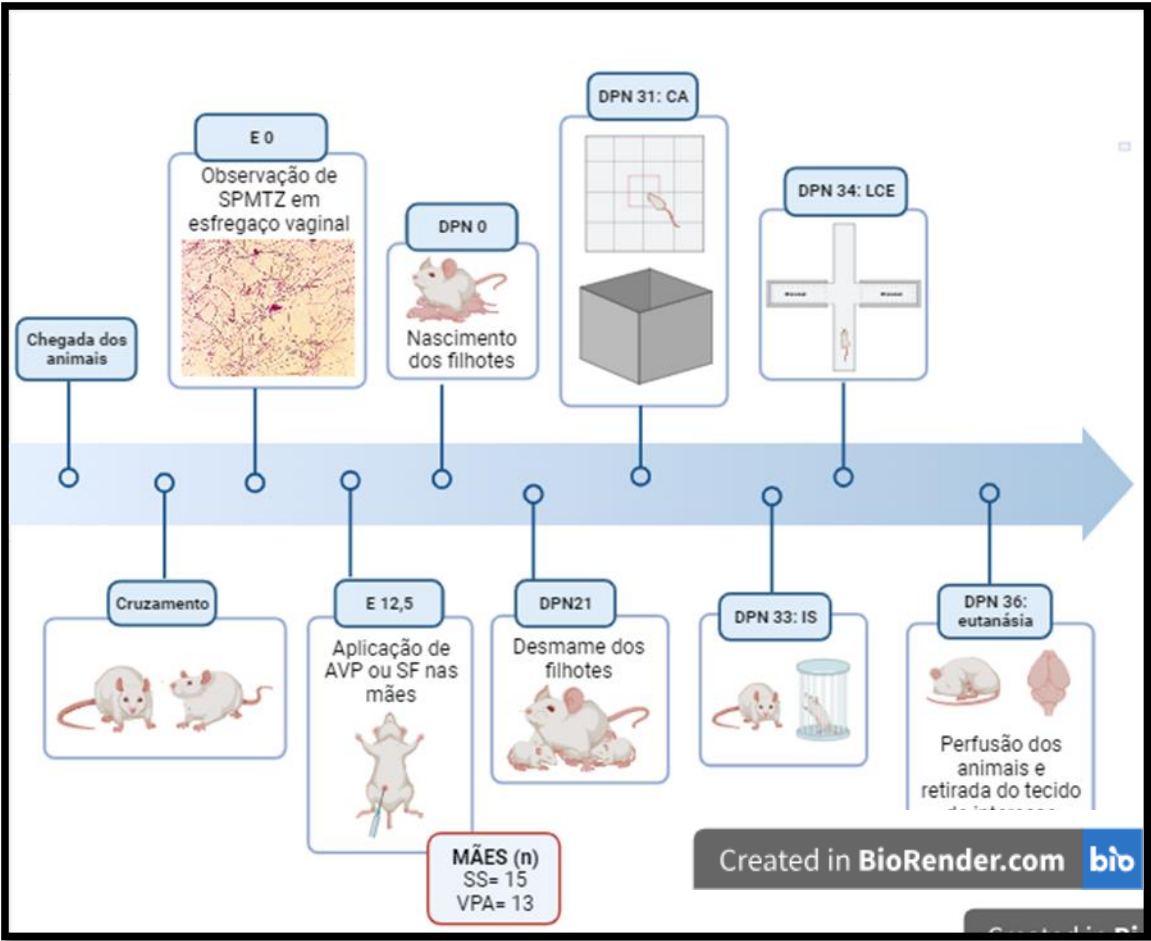


Figura 2.

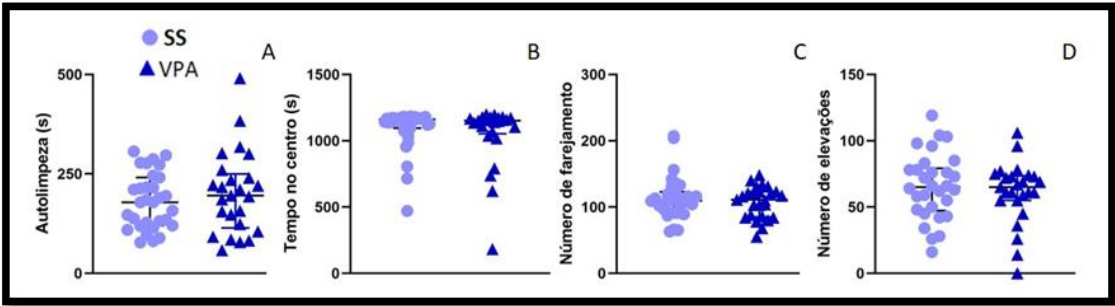


Figura 3.

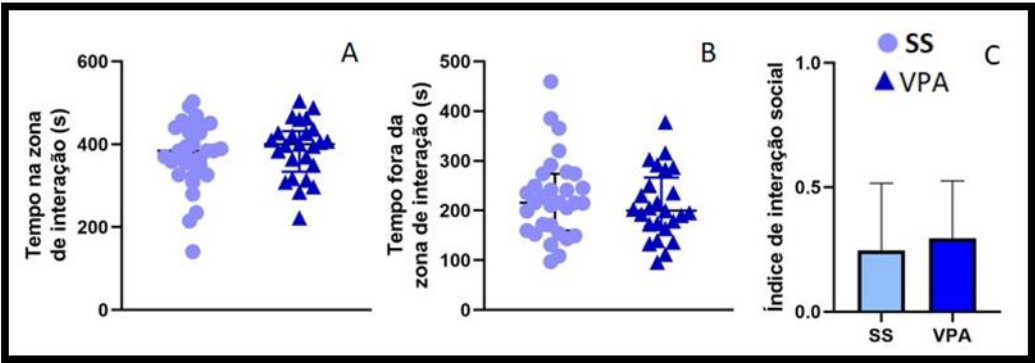


Figura 4.

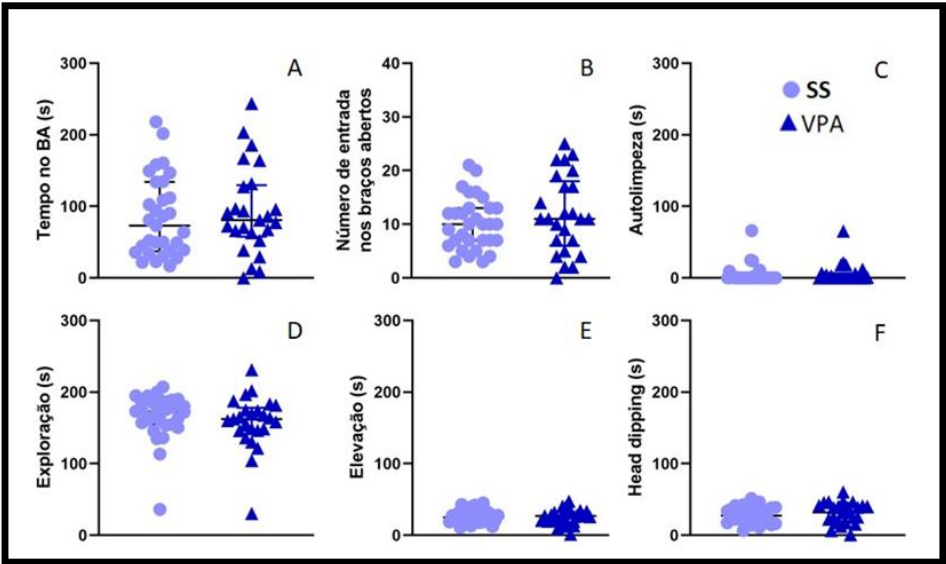
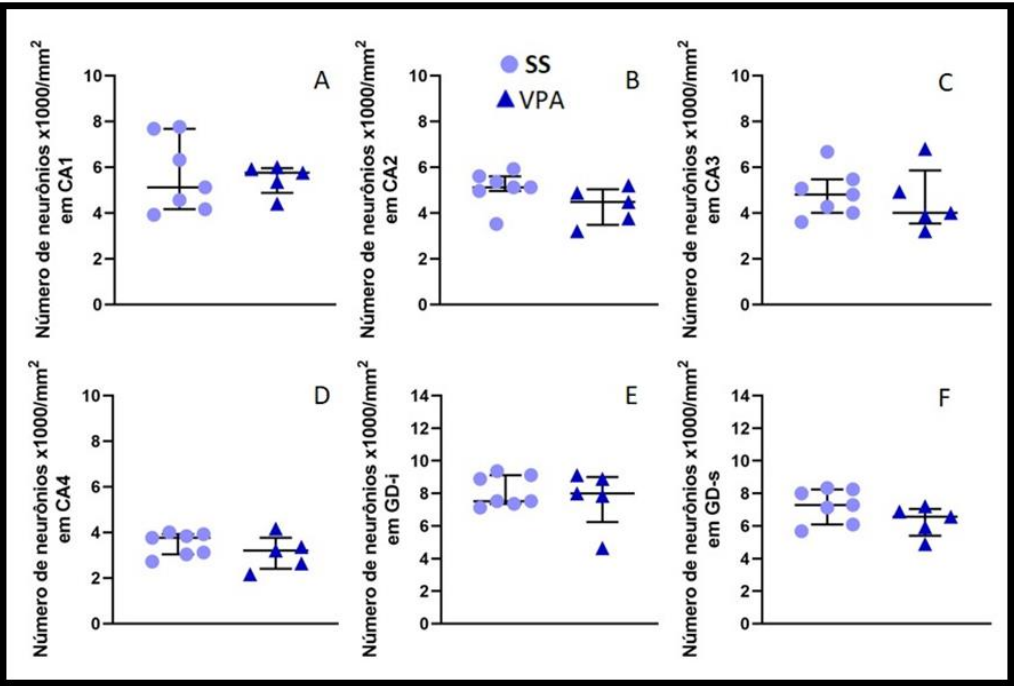
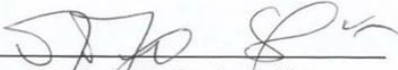
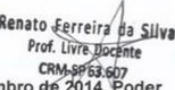


Figura 5.



ANEXO

Anexo A. Licença de aprovação do CEUA

 CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais	Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP Autarquia Estadual – Lei nº 8899 de 27/09/94 (Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179 de 14/06/74)															
LICENÇA CEUA 03/2017																
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS																
AUTORIZAÇÃO DE PROJETO APROVADO (DE ACORDO COM ORIENTAÇÃO TÉCNICA CONCEA Nº 08 DE 18 DE MARÇO DE 2016)																
Certificamos que a proposta intitulada “Efeito do extrato de <i>Hypericum perforatum</i> em modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valpróico”, protocolo FAMERP nº 001-003723/2017, em 11 de Setembro de 2017, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Orfa Yineth Galvis Alonso, que envolve a produção/ manutenção/utilização de animais pertencentes ao filo <i>Chordata</i>, subfilo <i>Vertebrata</i> (exceto humanos), para fins de pesquisa, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FAMERP (CEUA-FAMERP) em reunião de 27 de Setembro de 2017.																
<table border="1"> <tr><td>FINALIDADE</td><td>Pesquisa</td></tr> <tr><td>VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO</td><td>01/10/2017 a 01/11/2020</td></tr> <tr><td>ESPÉCIE</td><td>Ratos Wistar albinos (<i>Rattus norvegicus</i>)</td></tr> <tr><td>NÚMERO DE ANIMAIS</td><td>80</td></tr> <tr><td>PESO/IDADE</td><td>24 Fêmeas adultas (90-120 dias) 12 Machos adultos (90-120 dias) 44 Filhotes (10-20 dias)</td></tr> <tr><td>SEXO</td><td>Machos e Fêmeas</td></tr> <tr><td>ORIGEM</td><td>Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto.</td></tr> </table>	FINALIDADE	Pesquisa	VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO	01/10/2017 a 01/11/2020	ESPÉCIE	Ratos Wistar albinos (<i>Rattus norvegicus</i>)	NÚMERO DE ANIMAIS	80	PESO/IDADE	24 Fêmeas adultas (90-120 dias) 12 Machos adultos (90-120 dias) 44 Filhotes (10-20 dias)	SEXO	Machos e Fêmeas	ORIGEM	Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto.		
FINALIDADE	Pesquisa															
VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO	01/10/2017 a 01/11/2020															
ESPÉCIE	Ratos Wistar albinos (<i>Rattus norvegicus</i>)															
NÚMERO DE ANIMAIS	80															
PESO/IDADE	24 Fêmeas adultas (90-120 dias) 12 Machos adultos (90-120 dias) 44 Filhotes (10-20 dias)															
SEXO	Machos e Fêmeas															
ORIGEM	Biotério Central da Universidade de São Paulo, campus Ribeirão Preto.															
São José do Rio Preto, 04 de Outubro de 2017.																
 Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva Presidente CEUA  Renato Ferreira da Silva Prof. Livre Docente CRM-SP 63.607 (Portaria FAMERP 109, de 28 de outubro de 2014 – DOESP de 05 de novembro de 2014, Poder Executivo – Seção I, 124(209) – 57)																
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416 – Vila São Pedro. CEP: 15090-000 – São José do Rio Preto – SP – Brasil Tel. (17) 3201-5936																