

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SIMONE LESPINASSE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA GLINFÁTICO E PARÂMETROS
OXIDATIVOS EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2025
SIMONE LESPINASSE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA GLINFÁTICO E PARÂMETROS
OXIDATIVOS EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cinara Ludvig Gonçalves

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

A663a Araújo, Simone Lespinasse.

Avaliação do sistema glnfático e parâmetros oxidativos em um modelo animal de autismo / Simone Lespinasse Araújo. - 2025.

87 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2025.

Orientação: Cinara Ludvig Gonçalves.

1. Transtorno do espectro autista. 2. Sistema glnfático. 3. Estresse oxidativo. 4. Transtornos do sono do ritmo circadiano. I. Título.

CDD 23. ed. 616.85882



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

PARECER


No dia 27 (vinte e sete) do mês de fevereiro de 2025, às 8 (oito) horas e 30 (trinta) minutos, na Sala 101/Bloco R1, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: “**SISTEMA GLINFÁTICO E PARÂMETROS OXIDATIVOS EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO**”, da candidata **Simone Lespinasse Araújo**. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): **Dr. Eduardo Pacheco Rico** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Samira da Silva Valvassori** (Membro Interno – UNESC), **Dra. Fernanda de Oliveira Meller** (Membro Externo – UNESC) e **Dra. Gislaine Tezza Rezin** (Membro Externo – UNISUL). Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

Trabalho aprovado


Trabalho não aprovado

Observações:


Criciúma, SC, 27 de fevereiro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **EDUARDO PACHECO RICO**
 Data: 05/03/2025 15:00:00-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. EDUARDO PACHECO RICO
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente
 **SAMIRA DA SILVA VALVASSORI**
 Data: 27/02/2025 19:39:29-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDA DE OLIVEIRA MELLER**
 Data: 05/03/2025 14:06:37-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. FERNANDA DE OLIVEIRA MELLER
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente
 **GISLAINE TEZZA REZIN**
 Data: 05/03/2025 08:15:10-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. GISLAINE TEZZA REZIN
Membro Externo – UNISUL

Documento assinado digitalmente
 **CINARA LUDVIG GONCALVES**
 Data: 27/02/2025 13:32:42-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente
 **JOSIANE BUDNI**
 Data: 11/03/2025 17:44:48-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. JOSIANE BUDNI
Coordenadora Titular do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

Esta tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT conforme orientado pela resolução n. 05/2024 do Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Pesquisa em Autismo e Neurodesenvolvimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

In memoriam Adriana Alves

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer sinceramente a todos que contribuíram para esse trabalho e para mais essa etapa de um sonho que se realiza todos os dias e em particular;

À Deus pela minha existência;

À minha mãe, Maria Lúcia, por todo amor e apoio que muito contribuíram para a realização deste trabalho;

Ao meu filho João Pedro, minha maior inspiração para realização dos meus projetos pessoais;

Agradeço ao meu esposo, Rodrigo, que me incentivou nos momentos difíceis e compreendeu a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste estudo;

Agradeço à Dr^a Cinara Gonçalves, minha orientadora, pelo acolhimento, compreensão, incentivo, correções e ensinamentos, que me levaram a desenvolver o meu melhor neste processo de formação profissional;

Agradeço à Dr^a Jaqueline Generoso sem a qual este estudo não teria se realizado;

E agradeço aos pesquisadores do Laboratório de Pesquisa em Autismo e Neurodesenvolvimento - LAND, pela colaboração para realização deste estudo.

“A questão de todas as questões, tanto para a ciência quanto para a religião, é determinar nosso lugar verdadeiro e nosso verdadeiro papel no universo.”

(Thomas Huxley)

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um grupo heterogêneo de transtornos do neurodesenvolvimento que apresentam déficits sociais e de comunicação, comportamentos repetitivos, interesses restritos e processamento sensorial anormal. Até 80% das crianças autistas têm pelo menos uma comorbidade médica, sendo os problemas de sono uma queixa comum e que pode afetar o neurodesenvolvimento pós-natal pois, durante o sono ocorre a eliminação dos resíduos metabólicos tóxicos pelo sistema glinfático, uma via de transporte de fluidos presente no cérebro identificada há cerca de 10 anos. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a relação entre sistema glinfático e o TEA em um modelo animal VPA exposto. Para tanto, a indução do modelo animal foi realizada com a administração de 600 mg/Kg de ácido valpróico (VPA) no 12^o dia pré-natal e para validá-lo foram realizados testes de busca pelo ninho no dia pós-natal (DPN) 10, a geotaxia negativa no DPN 15, abrir dos olhos no DPN 12-16 e a medida do peso nos DPNs 9, 17, 25 e 30-39. Os animais foram divididos em dois protocolos, o primeiro identificou o tempo para disfunção do sistema glinfático e o segundo investigou os parâmetros de estresse oxidativo e os efeitos do tratamento com aripiprazol (ARIP). Os resultados do protocolo 1 evidenciaram que os animais do modelo precisaram de mais tempo para encontrar o ninho materno, para girar sobre o próprio eixo e para abrir os olhos. Além disso, foi encontrada uma disfunção significativa no sistema glinfático dos animais expostos ao VPA após a infusão do corante Azul de Evans (EBA) na cisterna magna. Já no protocolo 2, foi verificado que a exposição pré-natal ao VPA aumenta a oxidação de diacetado de 2', 7' - diclorofluoresceína (DCFH-DA) na amígdala e cerebelo, diminui o conteúdo de sulfidrilas (SH) na amígdala e diminui a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no cerebelo. O tratamento com ARIP associado ao modelo animal de TEA por VPA prejudicou o ganho de peso dos animais, no entanto o ARIP melhorou os parâmetros de dano oxidativo (DCFH-DA e SH) na amígdala e cerebelo, além de aumentar a atividade da SOD neste último. Portanto, foi possível concluir que o modelo animal de TEA induzido por VPA prejudica o neurodesenvolvimento e o sistema glinfático e induz estresse oxidativo na amígdala e cerebelo dos animais. No entanto, o tratamento com ARIP parece ser capaz de reverter algumas alterações bioquímicas causadas pelo VPA.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista; sistema glinfático; estresse oxidativo; transtornos sono-vigília; aripiprazol.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders that present with social and communication deficits, repetitive behaviors, restricted interests, and abnormal sensory processing. Up to 80% of autistic children have at least one medical comorbidity, with sleep problems being a common complaint that can affect postnatal neurodevelopment because, during sleep, toxic metabolic waste is eliminated through the glymphatic system, a fluid transport pathway present in the brain that was identified approximately 10 years ago. Thus, the aim of the present study was to investigate the relationship between the glymphatic system and ASD in an animal model exposed to VPA. To this end, the induction of the animal model was performed with the administration of 600 mg/kg of valproic acid (VPA) on the 12th prenatal day. To validate it, nest search tests were performed on postnatal day (PND) 10, negative geotaxis on PND 15, eye opening on PND 12-16 and weight measurement on PNDs 9, 17, 25 and 30-39. The animals were divided into two protocols, the first identified the time for glymphatic system dysfunction and the second investigated the oxidative stress parameters and the effects of treatment with aripiprazole (ARIP). The results of protocol 1 showed that the animals in the model needed more time to find the maternal nest, to turn on their own axis and to open their eyes. Furthermore, significant dysfunction was found in the glymphatic system of animals exposed to VPA after infusion of Evans Blue (EBA) dye into the cisterna magna. In protocol 2, it was found that prenatal exposure to VPA increased the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the amygdala and cerebellum, decreased the sulfhydryl (SH) content in the amygdala and decreased the activity of superoxide dismutase and catalase enzymes in the cerebellum. Treatment with ARIP associated with the animal model of ASD by VPA impaired the weight gain of the animals, however, ARIP improved the parameters of oxidative damage (DCFH-DA and SH) in the amygdala and cerebellum, in addition to increasing the activity of SOD in the latter. Therefore, it was possible to conclude that the animal model of ASD induced by VPA impairs neurodevelopment and the glymphatic system and induces oxidative stress in the amygdala and cerebellum of the animals. However, treatment with ARIP appears to be able to reverse some biochemical alterations caused by VPA.

Keywords: Autism spectrum disorder; glymphatic system; oxidative stress; sleep-wake disorders; aripiprazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Indução do ciclo e desenvolvimento.....	44
Figura 2: Desenho experimental Protocolo 1.....	46
Figura 3: Desenho experimental Protocolo 2.....	47
Figura 4: Peso corporal das ninhadas antes do tratamento com aripiprazol (ARIP) entre os grupos salina (CT) e os expostos ao ácido valproico (VPA).....	52
Figura 5: Avaliação do abrir dos olhos antes do tratamento com aripiprazol (ARIP) entre os grupos salina (CT) e os expostos ao ácido valproico (VPA).....	53
Figura 6: Teste da busca pelo ninho antes do tratamento com aripiprazol (ARIP) entre os grupos salina (CT) e os expostos ao ácido valproico (VPA)	53
Figura 7: Teste de geotaxia negativa ninho antes do tratamento com aripiprazol (ARIP) entre os grupos salina (CT) e os expostos ao ácido valproico (VPA).....	54
Figura 8: Quantificação de EBA no soro e no encéfalo dos grupos salina (CT) e exposto ao ácido valproico (VPA) dosados em 4h, 24h, 3 e 7 dias após a injeção.....	55
Figura 9: Distribuição macroscópica de EBA nos encéfalos dos grupos salina (CT) e expostos ao ácido valproico (VPA) eutanasiados após 4 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias após a injeção.....	56
Figura 10: Peso corporal dos animais durante o tratamento de animais expostos ao ácido valproico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (ARIP) entre o DPN 30 e o DPN 39.....	57
Figura 11: Efeito do tratamento pós-natal com aripiprazol (ARIP) sobre parâmetros estresse oxidativo na região da amígdala cerebral de animais submetidos ao modelo animal de TEA induzido por ácido valproico(VPA).....	58
Figura 12: Efeito do tratamento pós-natal com aripiprazol (ARIP) sobre parâmetros estresse oxidativo na região do cerebelo de animais submetidos ao modelo animal de TEA induzido por ácido valproico (VPA).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos experimentais do Protocolo 1.....	45
Tabela 2: Grupos experimentais do Protocolo 2.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS DE SIGLAS

- APA** – Associação Americana de Psiquiatria (do inglês, *American Psychiatric Association*)
- AQP-4** – Aquaporina-4
- ARIP** – Aripiprazol
- A β** – Beta-amiloide
- BHE** – Barreira Hematoencefálica
- cAMP** – Adenosina Monofosfato Cíclico
- CARS** – Escala de Avaliação do Autismo Infantil (do inglês, *Childhood Autism Rating Scale*)
- CAT** – Catalase
- CDC** – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)
- CEUA** – Comitê de Ética no Uso de Animais
- CID-11** – Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde, 11ª edição
- CONCEA** – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CT** – Grupo Controle
- DA** – Doença de Alzheimer
- DCF** – Diclorofluoresceína
- DCFH-DA** – Diacetato de Diclorofluoresceína
- DG** – Dia Gestacional
- DPM** – Desvio Padrão da Média
- DPN** – Dia Pós-Natal
- DSM-5** – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 5ª edição
- DSM-IV-TR** – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, 4ª edição, texto revisado
- DTI** – Imagem por Tensor de Difusão (do inglês, *Diffusion Tensor Imaging*)
- DTI-ALPS** – Imagem por Tensor de Difusão – Análise ao Longo do Espaço Perivascular (do inglês, *Diffusion Tensor Imaging – Analysis Along the Perivascular Space*)
- EBA** – Albumina azul de Evans (do inglês, *Evans Blue Albumin*)

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês: *Extracellular signal-Regulated Kinase*)

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês, *Food and Drug Administration*)

GABA – Ácido Gama-Aminobutírico (do inglês, *Gamma-Aminobutyric Acid*)

GSH-Px – Glutationa Peroxidase

GSK-3 β – Glicogênio Sintase Quinase-3 beta

HDAC – Histona Desacetilase

i.p. – Injeção Intraperitoneal

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ – Interferon gama

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

LAND – Laboratório de pesquisa em autismo e neurodesenvolvimento

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

MDA – Malondialdeído

MO – Missouri

PDE – Fosfodiesterase (do inglês, *Phosphodiesterase*)

PET – Tomografia por Emissão de Pósitrons (do inglês, *Positron Emission Tomography*)

PTEN – Homólogo de fosfatase e tensina (do inglês, *Phosphatase and Tensin Homolog*)

PVS – Espaços Perivasculares

S100B – Proteína S100B

SAL – Solução Salina 0,9% estéril com pH 7,4

SCZ – Esquizofrenia

SG – Sistema Glinfático

SH – Grupo Sulfidril

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido Dismutase

TDM – Transtorno Depressivo Maior

TEA – Transtorno do Espectro Autista

TGD – Transtornos Globais do Desenvolvimento

TGD-SOE – Transtorno Global do Desenvolvimento Sem Outra Especificação

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês, *Tumor Necrosis Factor-alpha*)

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

VPA – Ácido Valproico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA</i>	19
1.1.1 Aspectos epidemiológicos	20
1.1.2 Etiologia do TEA	22
1.1.2.1 Variabilidade genética	22
1.1.2.2 Fatores de risco ambientais	24
1.1.3 Fisiopatologia do TEA	26
1.1.3.1 Alterações imunológicas	26
1.1.3.2 Estresse oxidativo	28
1.1.4 Diagnóstico	29
1.1.4.1 Características clínicas do TEA	32
1.2.4 Comorbidades clínicas	34
1.1.4.2 Distúrbios no sono	36
1.1.5 Tratamento	37
1.1.5.1 Aripiprazol	38
1.2 <i>SISTEMA GLINFÁTICO</i>	38
2 OBJETIVO	41
2.1 <i>OBJETIVO GERAL</i>	41
2.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	41
3. METODOLOGIA	42
3.1 <i>ANIMAIS</i>	42
3.2 <i>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</i>	42
3.2.1 Fase experimental 1	42
3.2.2 Fase experimental 2	44
3.2.2.1 Protocolo 1: Avaliação temporal da disfunção do sistema glinfático no modelo de TEA	44
3.2.2.1 Protocolo 2: Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo no modelo de TEA associado ao tratamento com ARIP	46
3.3 <i>PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO</i>	47
3.3.1 Avaliação do ganho de peso	47
3.3.2 Teste da busca pelo ninho	48
3.3.3. Abrir dos olhos	48
3.3.4 Geotaxia negativa	48
3.4. <i>PARÂMETROS OXIDATIVOS</i>	49
3.4.1 Oxidação de DCFH-DA	49
3.4.2 Conteúdo de SH totais	50
3.4.3 Atividade de SOD	50
3.4.4 Atividade da CAT	50
3.4.5 Avaliação do sistema glinfático	51
3.5 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	51
4.RESULTADOS	52
4.1 <i>PARÂMETROS DE NEURODESENVOLVIMENTO</i>	52
4.1.1 Peso corporal	52
4.1.2 Abrir dos olhos	52
4.1.3. Busca pelo ninho	53
4.1.4. Geotaxia negativa	54
4.2. <i>AVALIAÇÃO DO SISTEMA GLINFÁTICO</i>	54
4.2.1 Quantificação de EBA no soro e no cérebro de ratos	54

5.2 EFEITOS DO TRATAMENTO DO ARIPIPAZOL	56
5.2.1 Peso corporal.....	57
5.2.2 Parâmetros bioquímicos.....	58
6. DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

O termo “autismo” foi cunhado pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler no início do século XX para descrever um sintoma comportamental de auto-retraimento em pacientes esquizofrênicos. As primeiras descrições do termo como transtorno foram feitas pelo psiquiatra americano Leo Kanner em sua obra “Distúrbios do contato afetivo” (do inglês, *Disturbances of affective contact*), publicada em 1943. Em 1944, outros casos foram descritos pelo pediatra austríaco Hans Asperger (Ostrowski *et al*, 2024). Ambos utilizaram o termo para descrever uma síndrome em crianças caracterizada por alterações comportamentais na interação e comunicação social, bem como por apresentarem interesses restritos e repetitivos (Grabrucker, 2021).

Atualmente, o termo genérico “transtorno do espectro autista” (TEA) é usado para descrever um grupo clinicamente heterogêneo de transtornos do neurodesenvolvimento (Kodak e Bergmann, 2020), conforme estabelecido na quinta edição do Manual Diagnóstico de Transtornos Mentais (DSM-5) da Associação Americana de Psiquiatria (APA) (APA, 2013) e pela Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID-11) da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019). Com a instituição do DSM-5, o que era denominado por Transtornos Globais do Desenvolvimento (TGD) no DSM-IV (APA, 1994) como Autismo, Síndrome de Asperger, Transtorno Desintegrativo da Infância (também conhecido com Síndrome de Heller), Síndrome de Rett e TGD Sem Outra Especificação (TGD-SOE), tornaram-se parte de um único conceito, chamado de TEA. Este termo é reconhecido como uma coleção de transtornos relacionados de diferentes etiologias, embora a Síndrome de Rett e do TGD SOE sejam exceções, pois várias descobertas posteriores levaram a uma compreensão genética e fisiopatológica aprofundada de ambos (Soares e Brito, 2024).

Assim, o TEA consiste em um espectro de sintomas que refletem comunicação social prejudicada e comportamentos restritos e repetitivos, variando em gravidade de levemente prejudicada a grave. As manifestações do TEA são heterogêneas e podem incluir indivíduos com deficiência intelectual e capacidade limitada de linguagem, além daqueles com função intelectual e de linguagem significativamente acima da média que têm dificuldade com

comunicação social (Hirota e King, 2023). Apesar dos esforços significativos de pesquisas e do entendimento atual que a etiologia do TEA envolve uma interação complexa entre herança e fatores ambientais influenciados pela epigenética, as causas exatas do TEA ainda não foram totalmente compreendidas (Grabrucker, 2021; Mordomo e Genovese, 2023).

1.1.1 Aspectos epidemiológicos

Os estudos epidemiológicos apresentam uma variabilidade considerável nas estimativas globais e em diferentes regiões do mundo (Zeidan *et al.*, 2022). Foi estimado que o TEA afetasse apenas 0,01% dos indivíduos na década de 1960, estudos de prevalência da década de 1980 sugeriram que até 0,72% dos indivíduos tinham TEA, chegando a 1% na década de 2000 (Taylor *et al.*, 2020). Em 2012 outro estudo epidemiológico mostrou que a prevalência era de 0,62% (Elsabbagh *et al.*, 2012). Posteriormente, a revisão sistemática conduzida por Zeidan *et al.* (2022), também relatou a prevalência global de 1% dos indivíduos.

Salari e cols. (2022), em outra revisão sistemática, constataram que a prevalência de TEA no mundo foi de 0,6% e as análises de subgrupos indicaram que a na Ásia foi de 0,4%, na Europa 0,5%, América e África 1% e na Austrália 1,7%. Ostrowski e cols (2024) em seu artigo citam estudos que mostraram uma prevalência de 0,38% a 3,13% na população europeia, 0,11% a 1,53% no Oriente Médio, 0,08% a 9,3% na Ásia, 0,87% a 2,21% na América do Norte, cerca de 1% na África e 1,7% na Austrália. Os países do Conselho de Cooperação do Golfo apresentaram uma prevalência crescente de TEA, sendo considerado uma das deficiências mais comuns, com taxa de 0,29% nos Emirados Árabes Unidos, 0,014% em Omã e 0,043% em Bahrein (Alrehaili *et al.*, 2023).

Baseado nos estudos de Zeidan e cols. (2022), a variabilidade substancial observada nas estimativas pode ser, em parte, explicada por diferenças metodológicas e contextuais entre os estudos, além da natureza evolutiva da definição clínica do TEA e sua diferenciação de condições sobrepostas.

Dados das estatísticas norte-americanas do Centro de Controle de Doenças (CDC, do inglês *Central of Disease Control*) mostram que, entre crianças de 8 anos, a prevalência do TEA teve um aumento significativo nos últimos anos, sendo de 0,66% entre os anos 2000 e 2002, 1,4% entre 2010-2012, 1,6% em 2014 e 1,8% em 2016 (Taylor *et al.*, 2020; Gabis *et al.*,

2021). Nos dados do ano de 2020, alcançou-se a marca de 2,7% (Maenner *et al.*; 2023). Já o estudo de Li *et al.* (2022) apresentou a prevalência de TEA em crianças e adolescentes entre três e dezessete anos de 2,79% em 2019, 3,49% em 2020 e 3,14% em 2019 e 2020 nos Estados Unidos da América (EUA). As mudanças nos critérios de diagnóstico, maior conscientização sobre o TEA, melhor averiguação e maior acesso a serviços, como intervenção comportamental precoce e educação com programas individualizados projetados para crianças com TEA, provavelmente contribuíram para a maior prevalência de TEA nos EUA. Além disso, a definição de autismo inclui um espectro mais amplo, o que pode explicar parcialmente o aumento da prevalência em relação às estimativas anteriores (Hirota e King, 2023). No entanto, ainda não está claro se esse aumento de casos é devido a um crescimento real na prevalência do TEA ou uma combinação de todos esses fatores (Persico *et al.*, 2021).

No Brasil, estima-se que 0,94% da população apresente o TEA, mas esse número ainda é impreciso. Em 2019, a Lei 13.861 determinou que Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mapeasse quantas pessoas apresentam TEA no Brasil. No dia primeiro de agosto de 2022 foi iniciado o censo demográfico brasileiro e até o momento não foi publicado nenhum resultado sobre pessoas com deficiência (Brasil, 2022).

O sexo masculino é um dos fatores etiológicos melhor estabelecido para o autismo e esse padrão é confirmado por estimativas revisadas, onde os homens superam as mulheres em todos os estudos de uma revisão sistemática recente (Zeidan *et al.*, 2022). Em uma revisão sistemática e metanálise de 54 estudos, incluindo cerca de 13.700.000 indivíduos, a proporção geral de homens para mulheres foi de 4,2. Estudos que usaram métodos rigorosos para averiguação de casos relataram menores proporções entre homens e mulheres da prevalência estimada de TEA: 3,7% em meninos e 1,5% em meninas, indicando que o TEA pode ser subdiagnosticado em meninas (Al-Dewik *et al.*, 2020). O atraso ou ausência do diagnóstico de TEA no sexo feminino pode ser por meninas e mulheres serem mais propensas ou mais capazes de minimizar os sintomas de TEA, incluindo dificuldades de comunicação social, clinicamente chamadas de “camuflagem”. Também é possível que os procedimentos diagnósticos atuais sejam menos sensíveis ao TEA no sexo feminino (Hirota e King, 2023; Ochoa-Lubinoff *et al.*, 2023).

Antes de 2016, a prevalência de TEA era consistentemente maior entre crianças brancas do que em outros grupos raciais ou étnicos. Em 2020 observou-se que aumentos

relativos na prevalência foram maiores entre crianças negras, hispânicas e asiáticas ou das ilhas do Pacífico; sendo a primeira vez que a prevalência foi menor entre crianças brancas. Embora a variabilidade regional na prevalência de TEA indique persistência de disparidades raciais ou étnicas, as tendências americanas relatadas pelo CDC podem refletir melhor identificação, alcance e acesso a serviços para grupos historicamente carentes (Grosvenor *et al.*, 2024).

Com o aumento do número de pessoas com o diagnóstico de TEA houve também um aumento dos cuidados com os indivíduos com essa condição, que em sua maioria requer assistência em várias esferas da vida como educação, saúde e serviços comunitários. Estes cuidados têm um custo alto para o indivíduo com o transtorno, sua família, sistemas de seguro de saúde privado e/ou público e programas de ajuda financeira do Estado (Rogge e Janssen, 2019).

Blaxill e cols (2023) em seu estudo utilizando um modelo de previsão de custos, que leva em consideração o aumento real da prevalência do TEA, projetaram um custo total dos indivíduos com TEA em toda a população americana de cerca de 5,54 trilhões de dólares ao ano até 2060. Esse valor, levando em consideração a inflação e uma possível economia de 1,9 trilhão de dólares por ano com medidas de prevenção do TEA. Essas projeções reforçam a importância de considerar o aumento da prevalência do autismo não apenas como uma urgência de saúde pública mas também como uma questão política relacionada à origem desses recursos além de reduzir e prevenir os piores cenários (Blaxill *et al.*, 2023).

1.1.2 Etiologia do TEA

1.1.2.1 Variabilidade genética

Em 1944, Kanner observou que os pais compartilhavam características comuns com seus filhos autistas, introduzindo o “fenótipo mais amplo do autismo”, ou seja, características autistas abaixo do limiar e reconhecendo a importância da genética. Trinta anos depois, os estudos sobre gêmeos revolucionaram o campo da pesquisa sobre o TEA, sendo considerado o transtorno do neurodesenvolvimento com maior componente hereditário (Havdahl *et al.*, 2021 e Kanner, 1944). Foram reconhecidos mais de 800 genes relacionados ao TEA com

centenas de alterações cromossômicas, dezenas de síndromes identificadas e uma interação complexa entre herança e fatores ambientais influenciados pela epigenética (Genovese e Butler, 2020). Investigações recentes identificaram mais de 100 genes que atendem a rigorosos limiares estatísticos para associação com o fenótipo do TEA (Manoli e State, 2021).

Estudos com gêmeos evidenciam diferenças em taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos *versus* dizigóticos apontando para um componente hereditário do TEA (Hughes *et al.*, 2024). As correlações para gêmeos monozigóticos foram de 0,98 enquanto as correlações para gêmeos dizigóticos foram de 0,53, quando a taxa de prevalência do TEA foi assumida como 5% (com base no fenótipo mais amplo do autismo) e aumentou para 0,67 quando a prevalência foi de 1% (com base na definição mais rigorosa) (Havdahl *et al.*, 2021). Estes trabalhos apoiam um forte papel da genética, no entanto, as taxas de concordância de estudos com gêmeos frequentemente variam, e fatores ambientais compartilhados podem estar contribuindo para a suscetibilidade (Hughes *et al.*, 2024).

Nas duas últimas décadas observou-se um grande aumento nas descobertas genéticas moleculares publicadas sobre TEA. Estudos de todo o genoma (GWAS) em algumas áreas da ciência envolveram questionamentos sobre a variação genômica, com o intuito de identificar correlações entre variantes específicas e determinados transtornos ou características (Thapar e Rutter, 2021). Os GWAS envolvem a comparação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs; frequência > 5%) em casos e controles (Sullivan *et al.* 2018). Os SNPs constituem variações de um único nucleotídeo em certas características do DNA e as variantes comuns podem estar por trás de cerca de 40–60% dos casos de TEA (Kereszturi, 2023 e Genovese e Butler, 2020). Os SNPs associados ao TEA foram identificados em genes que codificam proteínas envolvidas em diferentes processos, incluindo: desintoxicação celular, alguns receptores neuronais e metabolismo de vários neurotransmissores e metabólitos, em particular aqueles dos circuitos metabólicos de metilação e transulfuração (Masini *et al.*, 2020).

Apesar de vários GWASs não terem conseguido identificar alguns *loci* relevantes (Masini *et al.*, 2020), as investigações de TEA com variação genética rara (frequência < 1%) foram melhor sucedidas até agora (Thapar e Rutter, 2021). Um exemplo de variante rara é a que afeta o genes SHANK3 e NRXN1, entre outros genes, e implica na transmissão sináptica e plasticidade na neurobiologia do TEA (Ní *et al.*, 2020). Outros estudos em TEA incluem a deleção 15q11-q13 (de origem materna como visto na síndrome de Angelman ou origem

paterna na síndrome de Prader-Willi) (Genovese e Butler, 2020). A incidência de autismo em ambas as síndromes é maior do que na população de controle, sendo a primeira de 3 a 57 vezes mais comum e a última 30 vezes mais (Kereszturi, 2023).

Variantes raras podem ser transmitidas de pais para filhos (herdadas), mas também podem ser *de novo* na origem, onde a variante surge primeiro na linha germinativa dos pais (oócito ou espermatozoide) ou mais tarde, após fertilização, quando são conhecidas como variantes somáticas pós-zigóticas (Thapar e Rutter, 2021). As variantes raras herdadas ou *de novo* apresentam um risco de TEA substancialmente maior. No entanto, elas podem ser responsáveis por apenas uma pequena porcentagem de casos de TEA (Iossifov, *et al.*, 2014). Distúrbios de gene único que incluem defeitos autossômicos e ligados ao X e têm o autismo como uma característica, incluem esclerose tuberosa (genes TSC1 e TSC2), neurofibromatose (genes NF1 e NF2), síndromes de Rett ligadas ao X (gene MECP2) e do X frágil (gene FMR1) (Genovese e Butler, 2023). Outras síndromes associados ao TEA, incluem Turner (45X), Down (trissomia 21), Williams (deleção do cromossomo 7q11.2), Smith-Magenis (deleção 17p11.2), Shprintzen/velocardiofacial (deleção 22q11) e Phelan-McDermid (deleção 22q13) (Genovese e Butler, 2020).

As alterações genéticas relacionados ao TEA afetam o desenvolvimento do cérebro, a neurotransmissão e a excitabilidade neuronal (McDougle *et al.*, 2005). Outras estão relacionados com a codificação de proteínas relevantes da sinapse neuronal ou associados a atividade neuronal (Manoli and State, 2020). Outros defeitos genéticos estão associados com neuroinflamação, como as que ocorrem nos genes MTOR e PTEN e modificações nos mecanismos epigenéticos, como metilação ou acetilação do DNA e modificação de histonas (Hodges *et al.*, 2020). De outra maneira, além dos fatores de risco associados à genética, como visto até aqui, existem também os fatores de risco ambientais que podem levar ao aparecimento do fenótipo do TEA.

1.1.2.2 Fatores de risco ambientais

Vários fatores ambientais são reconhecidos como potenciais contribuintes para o autismo. Duas grandes categorias associadas ao risco de TEA, são os estados fisiológicos maternos e as exposições ambientais (Beverdorf *et al.*, 2019). A idade materna (≥ 40 anos) e

idade paterna (≥ 50 anos) avançada foram associadas, de forma independente, ao risco de TEA, bem como intervalos curtos entre as gestações (< 24 meses) (Lord *et al.*, 2018). As condições metabólicas maternas como ganho de peso gestacional, diabetes, hipertensão arterial e suas interações, aumentam o risco de TEA pois estão associados à inflamação crônica e estresse oxidativo (Lyall *et al.*, 2017). Além disso, hipóxia ou asfixia fetal, histórico materno de múltiplos abortos espontâneos, sangramento durante a gravidez e complicações durante o parto também aumentam o risco de TEA dos descendentes (Chen *et al.*, 2024). Fatores mais específicos como infecções maternas bacterianas ou virais como sarampo, caxumba, rubéola, catapora, varicela-zóster e infecções por citomegalovírus, e história familiar de doença autoimune, também foram associados a um risco levemente aumentado de TEA e ao atraso no desenvolvimento combinados (Alrehaili *et al.*, 2023).

A exposição materna a poluentes, principalmente os do ar, tem sido consistentemente associada ao TEA. Há evidência de uma interação entre a exposição a poluentes do ar e os polimorfismos do gene do receptor MET da tirosina quinase (Beverdorsdorf *et al.*, 2019). A superexposição a metais pesados tóxicos ou ingestão inadequada de metais essenciais durante a vida fetal e infantil correlacionam-se positivamente com a prevalência de TEA (Chen *et al.*, 2024). Corroborando a isto, há evidência que crianças com TEA têm concentrações mais altas de cromo (Cr), mercúrio (Hg), arsênio (As), manganês (Mn), cobre (Cu) e alumínio (Al) no sangue em comparação com crianças neurotípicas, e que estão frequentemente acompanhadas por deficiências de zinco, que é essencial para a excreção de metais tóxicos. A presença aumentada de metais pesados no sangue dessas crianças, foram apontadas como uma das principais causas de dificuldades sociais e déficits de habilidades de linguagem (Chen *et al.*, 2024).

Outro fator de risco associado ao TEA, foi associado ao uso de medicamentos na gravidez, principalmente ao ácido valpróico (VPA) e talidomida, que são teratogênicos (Christensen *et al.*, 2013). Um trabalho mostrou um risco aumentado de TEA em associação com a exposição pré-natal a agonistas $\beta 2$ -adrenérgicos, usados para interromper o trabalho de parto prematuro. Há uma relação entre a exposição ao fármaco e polimorfismos maternos no gene do receptor $\beta 2$ -adrenérgico (Beverdorsdorf *et al.*, 2019). Outros fatores de risco estão sendo identificados, incluindo produtos químicos que promovem alterações hormonais, como bisfenol A e fatores dietéticos maternos, incluindo a falta de suplementação de folato durante

o início da gravidez (Levine *et al.*, 2018). Por fim, um estudo recente correlaciona o uso de Cannabis antes e durante a gestação, bem como no pré e no pós parto associado a um aumento do risco de TEA, sendo o risco relativo na faixa de 3.02 a 3.21 (Andrade, 2024). Embora muitos fatores sejam associados, ainda não é bem definido qual a etiologia exata do transtorno, assim como não está definido qual é a fisiopatologia.

1.1.3 Fisiopatologia do TEA

1.1.3.1 Alterações imunológicas

Desde 1982, sabe-se que o sistema imunológico afeta a função cerebral no TEA, portanto a desregulação imunológica neste transtorno não é uma teoria recente (Robinson-Agramonte *et al.*, 2022). Cada vez mais, tem-se observado evidências de que distúrbios neuroinflamatórios contribuem para a patogênese do TEA, caracterizado pela proliferação e alterações morfológicas de células gliais, como microglia e astrócito, e a liberação de citocinas e quimiocinas em resposta a alterações patológicas (Tan *et al.*, 2024).

A neuroinflamação é uma série de respostas inflamatórias mediadas por vários grupos de células gliais, particularmente astrócitos e microglia, e por moléculas após estímulos patológicos no cérebro, com o objetivo final de manter a homeostase e reparar danos (Tan *et al.*, 2024). Bjorklund e cols (2017) e Toscano e cols (2021) citam a hipótese de que a inflamação crônica, a neuroinflamação e as alterações no sistema imunológico durante o desenvolvimento cerebral inicial podem causar comprometimentos comportamentais e cognitivos, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento do TEA, apesar de não ser certeza se eles causam o início do TEA ou regulam a patogênese e a sintomatologia.

Vargas e colaboradores (2005) foram os primeiros a identificarem processos neuroinflamatórios ativos no córtex cerebral, substância branca e cerebelo de pessoas autistas, caracterizada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias no líquido cefalorraquidiano (LCR), aumento de autoanticorpos específicos do cérebro e alteração da função das células imunes. Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF) α , IL-6, fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos, proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) e fator de crescimento transformador β 1, já foram relatados em vários estudos *post-mortem* de tecido cerebral em indivíduos com TEA em

comparação com controles saudáveis (Runge *et al.*, 2023). Os níveis de citocina plasmática foram correlacionados com a gravidade dos sintomas do TEA, o que significa que os níveis crescentes de citocina foram associados a uma comunicação pior e comportamentos aberrantes (Hughes *et al.*, 2024). Os marcadores inflamatórios periféricos também podem prever comorbidades no autismo, destacando o papel da inflamação crônica na etiologia do TEA (Toscano *et al.*, 2021).

O estudo de Bjorklund *et al.* (2017), mostrou que um dos principais indicadores de neuroinflamação no TEA é a ativação microglial. Durante a embriogênese a microglia modula a proliferação e diferenciação de células precursoras de neurônios, oligodendrócitos e astrócitos, bem como a sobrevivência neuronal e a apoptose. A microglia também regula a formação, remodelação, eliminação e poda de sinapses durante o desenvolvimento (Fan *et al.*, 2023). Em condições fisiológicas a microglia exibe o soma pequeno e morfologia ramificada com alta motilidade e monitora constitutivamente o ambiente circundante para manter a homeostase do parênquima cerebral. A microglia pode liberar vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, além de fagocitar e limpar detritos celulares e proteínas mal dobradas (Meng *et al.*, 2024). Simultaneamente, fornece fatores que promovem a manutenção do tecido neuronal e plasticidade dos circuitos neuronais (Heneka *et al.*, 2015).

Assim como a micróglia, os astrócitos viabilizam a defesa do sistema nervoso central (SNC) e são as células mais abundantes no SNC. Essas células são muito heterogêneas tanto na morfologia quanto na função e demonstram uma capacidade adaptativa notável o que define a sua função no SNC, desde o neurodesenvolvimento ao envelhecimento (Verkhratsky e Nedergaard, 2017). Os astrócitos promovem homeostase molecular do SNC transportando os principais íons e prótons, removendo neurotransmissores liberados nas sinapses, como glutamato, glicina e ácido γ -aminobutírico (GABA), liberando seus precursores de volta aos neurônios após o metabolismo (Matta *et al.*, 2019) e fornecendo substratos energéticos aos neurônios (Toscano *et al.*, 2021).

Em um contexto neuroinflamatório e neurodegenerativo, a microglia ativada libera fatores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, e complemento subunidade 1q (C1q) que desencadeiam uma série de efeitos intracelulares em um astrócito local não reativo, convertendo-o em um fenótipo neurotóxico (Lawrence *et al.*, 2023). O efeito neurotóxico dos

astrócitos reativos promovem o dano sináptico ao regular negativamente os sinais sinaptogênicos enquanto regulam positivamente os genes da cascata do complemento, como C1r, C1s, C3 e C4, que levam a um dano sináptico e a redução da conectividade entre neurônios. Além de secretar componentes do complemento inflamatório como C3, os astrócitos reativos pró-inflamatórios também produzem quimioatraentes, para recrutar neutrófilos e para linfócitos T, contribuindo para o estabelecimento de um ambiente pró-inflamatório no SNC (Lawrence *et al.*, 2023).

Essas alterações inflamatórias no TEA podem ocorrer por diferentes vias: (1) por citocinas pró-inflamatórias decorrentes da inflamação materna, infecção ou alergia durante a gravidez, que atravessam a placenta, entram na circulação fetal, ultrapassam a barreira hematoencefálica fetal (BHE) e afetam o tecido cerebral fetal; (2) por um excesso de citocinas pró-inflamatórias liberadas no cérebro fetal causando neurogênese aberrante, sinaptogênese e a função neuronal prejudicadas; (3) pelo desenvolvimento cerebral alterado (Robinson-Agramonte *et al.*, 2022). Um outro mecanismo muito relacionado ao TEA e às alterações no sistema imunológico, é o estresse oxidativo (Uddin *et al.*, 2023).

1.1.3.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, resultando em uma ação prejudicial à célula causada por espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN). ERO são moléculas de sinalização, que podem promover a sobrevivência celular e a renovação do tecido ou neutralizar a expressão do gene de sobrevivência celular, levando a célula à apoptose (Bjørklund *et al.*, 2020). Normalmente são produzidas intencionalmente (para matar patógenos invasores ou como intermediários em reações enzimáticas, etc.) ou acidentalmente (por meio de vazamento de elétrons de cadeias de transporte de elétrons, metabolismo de medicamentos, exposição a produtos químicos, poluentes e radiação, etc.) durante processos fisiológicos normais de células (Liu *et al.*, 2022). As ERO são um grupo de moléculas proveniente do oxigênio molecular, como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH^{\cdot-}$) e radical peroxila ($RO^{\cdot-2}$), e a reatividade química de cada molécula de ERO é bastante diferente (Liu *et al.*, 2022).

Em condições normais, existe um equilíbrio dinâmico entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante da célula (Chauhan e Chauhan, 2006). Um dos principais mecanismos antioxidantes é composto pelo sistema enzimático formado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (Bjørklund *et al.*, 2020). O radical $O_2^{\bullet-}$, pode ser produzido pela redução de um elétron de O_2 dentro da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O $O_2^{\bullet-}$ pode então ser convertido em (H_2O_2) pela SOD. A SOD reage na isoforma dependente de manganês (Mn) na matriz das mitocôndrias (MnSOD1) ou na isoforma dependente de cobre ou zinco (Cu, ZnSOD2) no citosol e fluidos extracelulares (Cu, ZnSOD3). O H_2O_2 pode, por sua vez, ser convertido em radicais HO^{\bullet} altamente reativos pela reação de Fenton, e pode causar peroxidação lipídica. O H_2O_2 gerado é decomposto em água e oxigênio molecular pela CAT (Yenkoyan *et al.*, 2018).

A capacidade das células de responder adequadamente ao estresse oxidativo geralmente ocorre por um conteúdo relativamente baixo de ERO. Quando as células são submetidas a estresse oxidativo severo, e as ERO estão acima da capacidade antioxidante, ocorre um intenso dano em biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA, bem como algumas estruturas biológicas, por exemplo a biomembrana (Liu *et al.*, 2022).

O aumento do estresse oxidativo em indivíduos com TEA foi relatado como diminuição da atividade enzimática antioxidante e aumento de produtos de oxidação do DNA, de lipídios e das proteínas tanto no cérebro quanto na circulação periférica. Marcadores de estresse oxidativo aumentados foram encontrados em fluidos corporais periféricos e foram associados à gravidade do TEA (Usui *et al.*, 2023). Em resumo, a diminuição da capacidade antioxidante e o aumento do estresse oxidativo em pacientes com TEA podem ter consequências funcionais em termos de resposta inflamatória crônica e funcionamento anormal ou morte de células neuronais (Yenkoyan *et al.*, 2018).

1.1.4 Diagnóstico

O padrão de critério para um diagnóstico de TEA é o consenso clínico de melhor estimativa, definido como concordância dentro de uma equipe profissional multidisciplinar, embasada nas definições do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) e da Classificação Internacional de Doenças (CID11), e em um histórico detalhado do desenvolvimento e observação dos comportamentos do indivíduo usando ferramentas de

diagnóstico padronizadas. Essas avaliações são geralmente conduzidas por profissionais de saúde especializados como psiquiatras, pediatras, psicólogos e, às vezes, outros especialistas, como pedagogos e fonoaudiólogos (Ostrowski J *et al.*, 2024).

Os critérios diagnósticos de TEA segundo o DSM5 TR (2022) são os seguintes:

A. Déficits persistentes na comunicação social e interação social em vários contextos, manifestados por todos os seguintes, atualmente ou pela história: 1. Déficits na reciprocidade socioemocional, variando, por exemplo, de abordagem social anormal e falha de conversa normal de vai-e-vem; ao compartilhamento reduzido de interesses, emoções ou afetos; à falha em iniciar ou responder a interações sociais. 2. Déficits em comportamentos comunicativos não verbais usados para interação social, variando, por exemplo, de comunicação verbal e não verbal mal integrada; a anormalidades no contato visual e linguagem corporal ou déficits na compreensão e uso de gestos; a uma total falta de expressões faciais e comunicação não verbal. 3. Déficits no desenvolvimento, manutenção e compreensão de relacionamentos, variando, por exemplo, de dificuldades em ajustar o comportamento para se adequar a diversos contextos sociais; a dificuldades em compartilhar brincadeiras imaginativas ou em fazer amigos; à falta de interesse pelos pares.

B. Padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades, manifestados por pelo menos dois dos seguintes, atualmente ou pela história: 1. Movimentos motores estereotipados ou repetitivos, uso de objetos ou fala (por exemplo, estereotipias motoras simples, enfileirar brinquedos ou lançar objetos, ecolalia, frases idiossincráticas). 2. Insistência na mesmice, adesão inflexível a rotinas ou padrões ritualizados de comportamento verbal ou não verbal. 3. Interesses altamente restritos e fixos que são anormais em intensidade ou foco (por exemplo, forte apego ou preocupação com objetos incomuns, interesses excessivamente circunscritos ou 4. Hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesse incomum em aspectos sensoriais do ambiente (por exemplo, aparente indiferença à dor/temperatura, resposta adversa a sons ou texturas específicas, cheiro ou toque excessivo de objetos, fascínio visual por luzes ou movimento).

C. Os sintomas devem estar presentes no período inicial do desenvolvimento (mas podem não se manifestar completamente até que as demandas sociais excedam as

capacidades limitadas, ou podem ser mascarados por estratégias aprendidas na vida adulta).

D. Os sintomas causam prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, ocupacional ou em outras áreas importantes do funcionamento atual.

E. Esses distúrbios não são mais bem explicados por transtorno do desenvolvimento intelectual (deficiência intelectual) ou atraso global do desenvolvimento. O transtorno do desenvolvimento intelectual e o transtorno do espectro autista frequentemente ocorrem concomitantemente; para fazer diagnósticos comórbidos de transtorno do espectro autista e transtorno do desenvolvimento intelectual, a comunicação social deve estar abaixo do esperado para o nível geral de desenvolvimento.

O processo de diagnóstico abrange a observação direta da criança, bem como entrevistas minuciosas com os cuidadores para coletar informações sobre as interações sociais, habilidades de comunicação e padrões comportamentais da criança (Qin *et al.*, 2024). As ferramentas padrão-ouro utilizadas para o diagnóstico de TEA incluem a observação do indivíduo com a Entrevista de Diagnóstico do Autismo - Revisada (ADI-R) e uma entrevista semiestruturada com os pais e o Cronograma de Observação de Diagnóstico do Autismo - Segunda Edição (ADOS-2) (Roy e Strate, 2023). O ADI-R e o ADOS-2 têm sensibilidade de 80% e 91%, respectivamente. A especificidade é de 72% para o ADI-R e 76% para o ADOS-2. No entanto, essas ferramentas diagnósticas devem informar e não substituir o julgamento clínico. (Hirota e King, 2023).

Testes de função cognitiva e adaptativa, como as Escalas de Habilidade Diferencial, Escala de Inteligência Wechsler para Crianças e Escalas de Comportamento Adaptativo Vineland, bem como a avaliação das habilidades quantitativas e qualitativas de fala, linguagem e de comunicação são importantes para estabelecer o diagnóstico de TEA. As avaliações sensoriais e motoras podem fornecer informações suplementares úteis relacionadas às habilidades motoras finas e grossas funcionais e diferenças de processamento sensorial por exemplo, hipersensibilidade e hipossensibilidade sensoriais (Baranek *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, com uma compreensão mais profunda do TEA, novas técnicas e métodos de diagnóstico estão sendo desenvolvidos e adotados para melhorar a precisão e a eficiência do diagnóstico. As técnicas de neuroimagem no estudo do TEA fornecem uma maneira não invasiva de explorar mudanças na estrutura e função do cérebro, proporcionando

aos cientistas um entendimento melhor a base biológica do TEA. Dentre essas técnicas estão a ressonância magnética estrutural (sMRI), ressonância magnética funcional (fMRI), imagem por tensor de difusão (DTI) e tomografia por emissão de pósitrons (PET). Por meio dessas técnicas de neuroimagem, os pesquisadores são capazes de identificar diferenças estruturais e funcionais em regiões e redes específicas do cérebro em indivíduos com TEA (Hiremath *et al.*, 2021).

Uma outra ferramenta, é o teste genético para TEA, que possibilita a identificação de riscos associados ao TEA por meio da análise de variantes genéticas no DNA de um indivíduo. Esse teste procura variantes genéticas específicas que foram vinculadas por pesquisas científicas ao desenvolvimento do TEA. Embora o histórico genético do TEA seja extremamente complexo, envolvendo múltiplos genes e a interação de genes com fatores ambientais, variantes em genes específicos foram identificadas como tendo um impacto significativo no risco de TEA (Bauer, 2011). Isso não só ajudará a entender os mecanismos genéticos do TEA, mas também fornecerá estratégias de intervenção e suporte mais direcionadas para pacientes e famílias (Qin *et al.*, 2024). Embora essas abordagens ainda estejam em estágio de pesquisa e desenvolvimento, elas apontam para o grande potencial de utilização dos avanços tecnológicos para melhorar o processo diagnóstico de TEA (Qin *et al.*, 2024).

1.1.4.1 Características clínicas do TEA

Os sintomas clínicos do TEA variam entre os pacientes e dependem da idade, níveis de linguagem (de não verbal a totalmente fluente), habilidades cognitivas e sexo. Nos primeiros 2 anos de vida, características comuns incluem aquisição pobre ou declínios em habilidades de linguagem e gestos comunicativos ou falha em aprender ou adotar essas habilidades (Hirota e King, 2023). Sua gravidade também difere, tanto na área de comunicação social quanto em comportamentos sensório-motores restritos e repetitivos, independentemente de cultura, raça, etnia ou grupo socioeconômico (Lord *et al.*, 2018).

- **Comunicação Social:** Os primeiros sintomas do TEA geralmente se manifestam como atrasos e dificuldades na interação social, mas esses sinais podem ser sutis e

facilmente ignorados. Os sintomas mais característicos são déficits de empatia, vocabulário limitado, incapacidade de aderir a normas e comportamentos aceitos, dificuldades em manter contato visual e nenhuma resposta ao nome quando chamado (Sealey *et al.*, 2016; Alrehaili *et al.*, 2023). A falta de atenção mútua, caracterizada por uma falha em demonstrar interesse e compartilhar um foco de atenção, é particularmente indicativa de TEA (Yates e Le Couteur 2016). Além disso, comportamentos estereotipados, como expressões faciais insuficientes, ausência de sorriso social e uso limitado de gestos (por exemplo, bater palmas, sorrir, balançar a cabeça, acenar), são frequentemente observados. Pessoas com TEA podem apresentar uma compreensão diminuída das emoções dos outros e podem não perceber o impacto de suas próprias atitudes sobre aqueles ao seu redor (Alrehaili *et al.*, 2023).

- **Comportamentos, interesses e atividades restritos e repetitivos:** Comportamentos, interesses e atividades restritos e repetitivos são comumente observados em crianças com TEA e podem incluir atitudes motoras, como girar, estalar os dedos e bater as mãos (Yates e Le Couteur 2016). Crianças com TEA frequentemente usam de forma repetitiva itens, como alinhar brinquedos, palavras, especificamente palavras estereométricas com forma ou padrão constante, bem como apresentar ecolalia restrita (Ruparelia *et al.*, 2014). Além disso, pode existir a rigidez comportamental ou cognitiva (por exemplo, insistir que as rotinas sejam seguidas com precisão ou que outros sigam roteiros verbais específicos) e a falta de interesse em socializar, interesses restritos e falta de brincadeiras imaginativas, que geralmente se tornam mais aparentes à medida que a criança se desenvolve (Hirota e King, 2023).
- **Dificuldades de aprendizagem:** Historicamente, indivíduos com deficiência intelectual (definidas como um QI menor que 70) foram predominantemente identificados como portadores de autismo. Dentro do espectro contínuo, estima-se que transtornos de aprendizagem comórbidos afetem quase 50% dos indivíduos com TEA (Alrehaili *et al.*, 2023). Esses indivíduos podem exibir um perfil cognitivo irregular, caracterizado por variações significativas entre pontuações verbais e não verbais em qualquer direção. É importante observar, no entanto, que indivíduos com pontuações "mais altas" em habilidades verbais ou não verbais podem não refletir necessariamente

habilidades sociais aprimoradas ou proficiência em habilidades de enfrentamento da vida diária, que poderão ser severamente prejudicadas (Alrehaili *et al.*, 2023).

Crianças com TEA que não apresentam atrasos na aquisição da linguagem ou em outros marcos do desenvolvimento podem ter o diagnóstico de TEA tardio. Esses indivíduos procuram a atenção médica devido a problemas comportamentais associados ao TEA, como comportamentos disruptivos, dificuldades em seguir instruções devido ao interesse intenso em atividades preferidas ou presença de outros transtornos neurodesenvolvimentais ou psiquiátricos concomitantes. Indivíduos sem deficiência intelectual ou de aprendizagem moderada ou grave procuram avaliação profissional na idade adulta, se encontrarem dificuldades no processo educativo ou para manter o emprego e perceberem características de TEA (Hirota e King, 2023).

A diversidade de sintomas e os seus vários graus de gravidade levam a diferenças significativas nos níveis de independência de indivíduos com TEA. Enquanto alguns podem levar vidas independentes, outros precisam de apoio ao longo da vida, muitas vezes tendo níveis substanciais de incapacidade (Ostrowski *et al.*, 2024). A heterogeneidade clínica é marca registrada do TEA. Isto levou a sugestões de que em vez de um único transtorno, poderia ser construtivo reformular o TEA como “os autismos”, por considerar as múltiplas etiologias e distintas entidades clínicas (Geschwind *et al.*, 2007). Esta heterogeneidade é em parte decorrente dos múltiplos genes envolvidos, da miríade de fatores ambientais que impactam no curso do desenvolvimento da expressão dos sintomas, e da co-ocorrência de disfunções médicas e de saúde mental no TEA (Masi *et al.*, 2017).

1.2.4 Comorbidades clínicas

Além dos sintomas centrais do autismo, os indivíduos afetados experimentam uma quantidade maior de comorbidades que afetam uma ampla gama de sistemas corporais (Khachadourian *et al.*, 2023). Um estudo recente com 14.000 participantes autistas descreveu as comorbidades do TEA, sendo que as mais realtadas foram ansiedade, depressão, TDAH e deficiência intelectual (Masi *et al.*, 2017). Burns *et al.* (2023) investigaram um total de 1.858 crianças com TEA, 23,0% tinham um diagnóstico formal de Atraso global do desenvolvimento (GDD) e 5,76% tinham TDAH comórbido suspeito ou confirmado, sendo as doenças neurológicas a categoria de comorbidades mais observada, com 10,8%.

Dados recentes do CDC indicam que quase um terço das crianças de oito anos com TEA tinham um quociente de inteligência (QI) dentro da faixa de deficiência intelectual (70 ou menos) (Christensen e Zubler, 2020). Observa-se também anormalidades no eletroencefalograma (EEG) com ou sem epilepsia, com características dismórficas além de achados anormais de ressonância magnética (Genovese e Butler, 2020). Um estudo utilizando análise de registro eletrônico de saúde (EHR) revelaram uma prevalência de epilepsia de aproximadamente 20% e essas taxas são maiores em TEA com DI comórbida e distúrbios médicos de risco aumentado, como complexo de esclerose tuberosa (TSC) (Hodges *et al.*, 2019).

O TDAH é a comorbidade mais comum em pessoas com TEA (28,2%), e afeta consideravelmente o desenvolvimento de crianças autistas com inteligência média ou deficiência intelectual (Lord *et al.*, 2018). Ao mesmo passo, a depressão maior e o transtorno bipolar também são observado em uma alta taxa no TEA, em comparação a população em geral (Oakley *et al.*, 2021). Além disso, a ansiedade e a depressão são mais comuns, ou pelo menos mais observáveis, em indivíduos verbalmente fluentes e aumentam durante a adolescência em meninas, mas também ocorrem em uma minoria de meninos (Lord *et al.*, 2018).

Em porcentagens menores, tem-se a microcefalia, que ocorre em cerca de 10% dos indivíduos com autismo, o que pode estar associado a um prognóstico ruim. Porém, é comum em crianças com autismo um tamanho de cabeça de aparência grande, bem como volumes cerebrais aumentados no caso dos lobos frontais e diminuídos nos lobos occipitais (Kobayashi *et al.*, 2020). Além disso, o TEA pode estar associado a diversas síndromes, como a do X frágil e Rett, assim como mutações do gene supressor tumoral homólogo de fosfatase e tensina (PTEN) e macrocefalia extrema (Butler *et al.*, 2005). Já no sistema periférico, podem ser encontradas condições médicas como os distúrbios gastrointestinais (GI), incluindo restrições alimentares, seletividade alimentar, diarreia, constipação, refluxo e obesidade (Hodges *et al.*, 2019).

As comorbidades no TEA podem ter manifestações e sintomas atípicos, muitas vezes tornando seu reconhecimento mais difícil. Apesar dessas dificuldades potenciais no diagnóstico, os altos índices de comorbidade relatada no TEA ainda é substancial como mostra um estudo baseado na população na Suécia, no qual mais de 50% dos indivíduos com

TEA tinham quatro ou mais doenças associadas. (Khachadourian *et al.*, 2023). As observações de taxas mais altas de certas condições de saúde em TEA sugerem a possibilidade de uma etiologia compartilhada entre essas diferentes comorbidades e TEA o que pode levar a insights sobre a etiologia e os possíveis riscos do transtorno (Khachadourian *et al.*, 2023). Nesse sentido, uma comorbidade que ocorre em cerca de 50 a 80% nos indivíduos com TEA são os distúrbios do sono e curiosamente, estão correlacionados com a exacerbação da gravidade dos sintomas principais e à desregulação comportamental em crianças com TEA.

1.1.4.2 Distúrbios no sono

O sono é um processo fisiológico essencial no desenvolvimento dos circuitos neuronais e na saúde do cérebro ao longo da vida. Os distúrbios do sono são um dos maiores desafios enfrentados pelos jovens com TEA e, muitas vezes, por extensão, pelos familiares que cuidam deles (Johnson e Zarrinigar, 2021). Até 80% dos indivíduos com TEA apresentam distúrbios do sono, incluindo dificuldades em iniciar e manter o sono, não apenas na infância, mas também na adolescência e na fase adulta (Gisbert *et al.*, 2021). Além disso, a interrupção do sono é frequentemente observada antes do diagnóstico de TEA e sua gravidade pode estar relacionada a gravidade de outros fenótipos associados ao transtorno, sugerindo que a interrupção do sono é um sintoma precoce no TEA (Lord *et al.*, 2022).

Os transtornos do sono podem afetar o neurodesenvolvimento pós-natal interferindo na modulação neuronal diretamente relacionada aos processos fundamentais de aprendizagem causando déficits nas funções neurocognitivas (Cortese *et al.*, 2020). Em crianças e adolescentes, os distúrbios do sono estão associados a várias alterações emocionais e a exacerbação dos principais sintomas comportamentais como déficits nas habilidades sociais, piora dos comportamentos externalizantes (agressão e impulsividade) e internalizantes (retraimento, ansiedade e depressão) (Missig *et al.*, 2020). Além disso, a perda do sono pode induzir uma resposta inflamatória através da ativação de vários mediadores inflamatórios celulares, incluindo as interleucinas (IL) 6, IL-1 e o TNF, causando um aumento da ativação glial e estresse oxidativo (Pinato *et al.*, 2019).

Nos distúrbios circadianos do TEA, o ritmo diurno do cortisol está alterado, ficando elevado à noite. Observa-se também alterações na secreção de melatonina, sendo sua redução nos níveis periféricos o achado mais consistente (Pinato *et al.*, 2019). A melatonina é de particular interesse no TEA pois além do seu papel no neurodesenvolvimento e nos ritmos sono-vigília, anormalidades no sistema serotoninérgico são frequentemente identificadas no transtorno. Foi relatado que 40% das pessoas com TEA tinham níveis anormalmente altos de serotonina no sangue e 51% tinham níveis anormalmente baixos de melatonina, o que era esperado pois a atividade de acetilserotonina O-metiltransferase (ASMT) é reduzida durante a conversão da serotonina em melatonina (Missig *et al.*, 2020). Desta forma, é comum que a suplementação de melatonina seja recomendada como tratamento nos indivíduos que apresentam diminuição nos níveis deste hormônio (Esposito *et al.*, 2019).

1.1.5 Tratamento

Apesar de décadas de pesquisas para identificar novos tratamentos farmacológicos direcionados aos principais sintomas do TEA, até o momento poucos estudos atingiram seus desfechos primários ou foram replicados, e nenhum produziu evidências suficientes para aprovação regulatória ou uso justificado na prática clínica (Baribeau *et al.*, 2022). Atualmente, o tratamento é direcionado para comorbidades como agressividade, hiperatividade, ansiedade, irritabilidade, comportamento autolesivo, distúrbios do sono entre outros (Persico *et al.*, 2021).

Estudos sugerem que os principais medicamentos usados para o tratamento das comorbidades no TEA são os psicotrópicos (Grabrucker, 2021). Nos últimos 2 anos, nenhum novo agente se tornou disponível para tratar transtornos mentais e comportamentais associados ao TEA (Baribeau *et al.*, 2022). Os medicamentos mais prescritos para indivíduos com TEA são Abilify (aripirazol - ARIP) e Risperdal (risperidona), os únicos aprovados pela agência americana de Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês: *Food and Drug Administration* (FDA)) para o tratamento das alterações comportamentais (Grabrucker, 2021). Observa-se que estes medicamentos não foram desenvolvidos especificamente para tratar o TEA pois ambos são antipsicóticos atípicos (Pacheva e Ivanov, 2019).

As outras possibilidades de tratamento medicamentoso consistem alternativas para os sintomas comorbidos do TEA, como a N-acetilcisteína para irritabilidade (*off-label*), por

exemplo (Hardan *et al.*, 2012). Já o metilfenidato ou atomoxetina podem ser utilizados para sintomas de TDAH (Antshel e Russo, 2019), assim como os agentes alfa adrenérgicos, como guanfacina são usados também para controle de TDAH e de forma *off-label* para o comportamento disruptivo (Scahill *et al.*, 2015). Por sim, os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRSs) são indicados com frequência para ansiedade, depressão ou transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) concomitantes ao TEA (Fuentes *et al.*, 2019).

Os esforços para entender os mecanismos moleculares subjacentes que contribuem para o desenvolvimento do TEA continuam apesar da falta de novas opções de tratamento. Com os avanços recentes nas áreas de genômica do autismo, neurofisiologia e as intervenções comportamentais precoces, novas terapêuticas e estratégias de tratamento para o TEA podem estar surgindo (Baribeau *et al.*, 2022).

1.1.5.1 Aripiprazol

O ARIP é classificado como um medicamento antipsicótico atípico, com um mecanismo de ação incerto que atua por meio da combinação de atividade agonista parcial nos receptores de dopamina D2 e serotonina 5-HT1A e atividade antagonista nos receptores de serotonina 5HT2A (Bartram *et al.*, 2019). As formulações disponíveis incluem comprimidos orais, solução oral, um comprimido oral de desintegração rápida e injeção intramuscular. A versão oral é a formulação aprovada pela FDA dos EUA para irritabilidade associada ao autismo (Hirsch, 2016). Em estudos com modelos animais, foi constatado que os tratamentos com risperidona e aripiprazol são capazes de melhorar comportamentos semelhantes aos apresentados pelos pacientes com TEA, como a irritabilidade (Stepanova *et al.*, 2017).

1.2 SISTEMA GLINFÁTICO

Os vasos linfáticos representam uma segunda circulação, paralela aos vasos sanguíneos, responsável pela depuração do líquido intersticial (ISF), eliminação de excesso de fluidos e regulação da imunidade dos tecidos (Ilyff *et al.*, 2012). Historicamente, o SNC era considerado desprovido de vasos linfáticos, em grande parte devido à ausência de linfonodos e canais perivasculares convencionais, que caracterizam a angioarquitetura linfática nos

demais tecidos (Carlstrom *et al.*, 2022). Além disso, a presença da BHE limita o influxo do ultrafiltrado plasmático do leito microvascular, que, nos tecidos periféricos, promove a eliminação de resíduos (Hablitz e Nedergaard, 2021). Considerava-se que o LCR fosse o principal responsável pela eliminação de resíduos do cérebro. Este processo ocorre quando o ISF, por difusão, lança os solutos no LCR. Este, ao atingir as vilosidades aracnóides dos seios durais, as bainhas dos nervos cranianos e os linfáticos nasais é drenado para o sangue onde é depurado posteriormente (Iliff *et al.*, 2012).

Um estudo recente em modelos de roedores, bem como evidências clínicas, revelaram uma via de transporte de fluido em todo o cérebro, conhecida como sistema glinfático (SG), constituída por dois principais componentes o fluido e a glia, respectivamente representados pelo LCR subaracnóideo, ISF e astrócitos, e suas interações que permite a troca rápida de LCR e ISF ao longo das vias perivasculares (Iliff *et al.*, 2012). Esta rede única é composta de processos astrogliais que criam uma camada que envolve todas as arteríolas, capilares e vênulas do cérebro, formando túneis perivasculares (Hablitz e Nedergaard, 2021). As extremidades vasculares astrocíticas expressam aquaporina (AQP-4), canais de água, que permitem que o LCR flua para o cérebro através do espaço perivascular (PVS) arterial e depois para o ISF (Sotgiu *et al.*, 2023). Observa-se que a ultraestrutura dos processos astrocíticos e a expressão do canal AQP-4 parecem ser reguladas pelo ritmo circadiano (Barlattani *et al.*, 2023).

Especificamente, em relação aos movimentos de fluidos, o LCR é produzido predominantemente no plexo coróide dos ventrículos laterais e do terceiro ventrículo, de onde flui para o espaço subaracnóide, que circunda o cérebro, principalmente por pulsações arteriais e mudanças de pressão inspiratório-expiratória (Kylkilahti *et al.*, 2021). O espaço subaracnóide é contínuo com os espaços periarteriais dos vasos piais, por onde o LCR, via AQP-4, se mistura com o fluido extracelular, peptídeos e metabólitos no parênquima cerebral (Carlstrom *et al.*, 2022). O ISF então é coletado no espaço perivenoso de onde drena para fora do cérebro em direção ao sistema linfático cervical (Maloveska *et al.*, 2018).

Durante o sono ocorre um aumento da circulação liquórica, bem como o aumento da depuração de metabólitos, do excesso de glutamato, lactato, A β e outros neuropeptídeos em comparação com a vigília (Chong *et al.*, 2022). Portanto, alterações na arquitetura do sono e distúrbios do sono podem levar a uma disfunção do SG e redução da eliminação de resíduos

metabólicos do tecido nervoso que resulta em agregação de proteínas e aumento do risco de doenças neurológicas, como doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson, acidente vascular cerebral e hidrocefalia de pressão normal idiopática (Yan *et al.*, 2021). A disfunção da via glinfática também é evidente em modelos animais de diabetes, depressão, enxaqueca com aura, esclerose múltipla e uso crônico de álcool (Hablitz e Nedergaard, 2021).

Diferenças importantes entre os indivíduos no influxo de LCR são observadas em humanos saudáveis o que levou a especulação de que uma característica de baixo fluxo glinfático pode contribuir para o risco individual de desenvolver doenças neurodegenerativas esporádicas (Ringstad *et al.*, 2017). Por outro lado, o fluxo glinfático e as taxas de depuração estão aumentados em roedores após exercício físico (von Holstein-Rathlou *et al.*, 2018), ingestão de ácidos graxos poliinsaturados $\omega 3$ (Ren *et al.*, 2017), ingestão de baixas doses de álcool (Lundgaard *et al.*, 2018) e mudanças na postura corporal (Lee H *et al.*, 2015), possibilitando várias intervenções potenciais que podem ser implementadas facilmente.

Chong *et al.*, (2022) em sua revisão analisou seis estudos que correlacionavam síndrome de Down, distrofia muscular de Duchenne, epilepsia mioclônica juvenil, síndrome de Smith-Magenis e crianças com TEA e quais eram os distúrbios do sono nessas populações. Nestes estudos vários metabólitos e componentes do LCR foram medidos, sendo quatro deles associados a perturbações do sono. Em quatro desses estudos observou-se os níveis de A β e Tau estavam elevados, que os níveis de orexina estava diminuído, presença de autoanticorpos do receptor de glutamato e níveis mais baixos de levodopa (L-DOPA). De modo geral, observou-se que as crianças com TEA e as que apresentam os transtornos do sono têm o comportamento e o funcionamento diário afetados de forma negativa (Bishir *et al.*, 2020).

O que ainda não está totalmente esclarecidos são os mecanismos e fatores que possam responder, etiologicamente, a essa condição. Ainda, uma pergunta central seria: existe uma relação entre o SG e o TEA que tem como uma das principais comorbidades os transtornos do sono? Até a presente data não foram descritos estudos pré-clínicos correlacionando o sistema glinfático e o TEA. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou o SG do modelo animal de TEA induzido por VPA, bem como investigou os possíveis efeitos do fármaco ARIP nesta via.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a relação entre o SG e o TEA em um modelo animal de TEA induzido por ácido valproico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o ganho de peso nos dias pós-natais (DPN) 9, 17 e 25, monitorar a abertura dos olhos entre os DPN 12 e 16, realizar o teste de busca pelo ninho no DPN 10 e o teste de geotaxia negativa no DPN 15, como indicadores de desenvolvimento e crescimento em um modelo animal de TEA induzido por VPA;
- Verificar possíveis alterações no SG no modelo animal de TEA induzido por VPA;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em um modelo animal de TEA induzido por VPA e tratado com ARIP.

3. METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Este estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais. O projeto passou pela avaliação e aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) com o protocolo número 91/2023 (ANEXO A).

Para o experimento, foram utilizados ratos *Wistar (Rattus Norvegicus)* machos expostos no período pré-natal ao VPA. Todos os cuidados foram adotados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos. Os animais eram procedentes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e, após o nascimento foram acondicionados com as mães até o desmame no DPN 21. Após isso, os animais foram acondicionados em caixas com 4 animais cada, sob ciclo de claro e escuro de 12 horas (06:00 às 18:00h), com livre acesso à comida e água. O ambiente foi mantido à temperatura constante e diária de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. O material (maravalha) que forra as caixas dos animais foi trocado a cada 2 dias e a sala, onde os animais foram acondicionados no biotério, apresenta o sistema de exaustor, de modo a mantê-los com o máximo de conforto possível.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Fase experimental 1

Inicialmente, foi induzido o período fértil de 25 ratas, quando parte da maravalha da caixa contendo machos foi adicionada à caixa das fêmeas no fim do ciclo claro. Nos 7 dias seguintes, foi coletado a secreção vaginal das ratas para verificar em qual período do ciclo fértil elas se encontravam. A secreção foi coletada com pipeta automática, sendo que foi feito um lavado com 80 μL de salina 0,9% estéril com pH 7,4 (SAL) no orifício da vaginal da rata e avaliado em microscópio (40x) para averiguar o padrão de células encontradas. Quando encontrado o padrão de células que correspondessem a fase Estro, a rata era acasalada com

um rato em uma caixa isolada e na manhã seguinte ao acasalamento era realizado um outro lavado vaginal com SAL para verificar a presença de espermatozoide.

Quando encontrado espermatozoides, o dia era considerado o dia gestacional (DG) 0,5 e a rata era agrupada com outras ratas grávidas, denominadas matrizes. Para a indução do modelo de TEA, no DG 12,5 as 25 matrizes foram separadas em dois grupos, um com 12 e outro com 13 ratas. O grupo com 12 fêmeas recebeu uma dose de 600mg/Kg de VPA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) dissolvido em SAL via injeção intraperitoneal (i.p.), com o objetivo de induzir o modelo animal de TEA (grupo VPA-expostos). O outro grupo, com 13 ratas, recebeu apenas SAL (grupo SAL-expostos) no mesmo protocolo. A partir da injeção, as fêmeas não foram manuseadas até o DG 18, quando foram isoladas uma por caixa para poderem iniciar com comportamento de ninho livremente.

O protocolo de acasalamento, com 25 ratas e 25 ratos utilizados como matriz, deu origem a 28 filhotes machos VPA-expostos e 33 machos SAL-expostos, sendo utilizados para este estudo um total de 111 animais. O modelo animal prevê a utilização somente de machos, uma vez que as fêmeas não reproduzem bem o comportamento tipo autista (Anshu, *et al.*, 2017). As fêmeas matrizes e as fêmeas da prole foram eutanasiadas após o desmame, devido a exposição ao VPA ou à SAL. Isto foi feito o mais rápido possível para minimizar danos ao experimento e sofrimento aos animais. Os animais adultos machos utilizados no acasalamento foram devolvidos ao biotério, pois não foram expostos a nenhuma droga ou protocolo experimental.

Após o nascimento, todos os animais foram expostos aos testes de neurodesenvolvimento e crescimento. O acompanhamento do ganho de peso ocorreu nos DPN 9, 17 e 25 (e nos dias em que ocorreu o tratamento no Protocolo 2), os animais foram submetidos ao teste de busca pelo ninho no DPN 10, o registro do abrir dos olhos ocorreu entre os DPN 12 e 16 e a geotaxina negativa foi realizada no DPN 15. Após o desmame, no DPN 21, os animais foram acondicionados em gaiolas com 4 animais cada e foram direcionadas para o Protocolo 1 ou Protocolo 2. A metodologia aplicada para a realização da fase experimental 1, está ilustrada na figura 1.

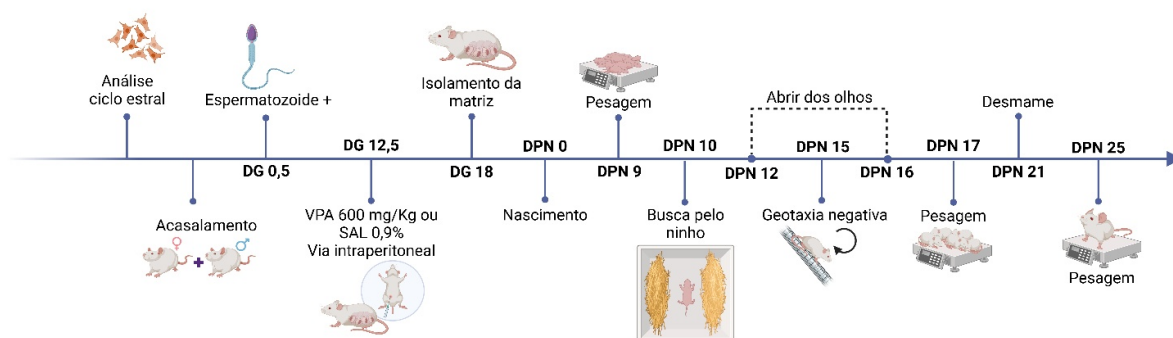


Figura 1 – Indução do ciclo e desenvolvimento. Fonte: figura elaborada pelo autor.

3.2.2 Fase experimental 2

Os primeiros filhotes a nascerem dos grupos VPA-expostos e SAL-expostos, foram direcionados ao Protocolo 1 e após a finalização deste, os demais animais foram submetidos ao Protocolo 2.

3.2.2.1 Protocolo 1: Avaliação temporal da disfunção do sistema glinfático no modelo de TEA

O Protocolo 1 avaliou o tempo de disfunção do SG. Desse modo, os animais expostos à SAL (n=19) ou ao VPA (n=20), com 30 dias de idade foram submetidos ao protocolo de avaliação do SG. Para isto, os animais foram devidamente anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina e em seguida, o rato foi posicionado no aparato estereotáxico e fixado a cabeça com o nariz ligeiramente apontado para baixo. Foi realizado a assepsia da região e então a cisterna magna foi identificada e uma cânula acoplada à seringa Hamilton foi inserida na perpendicular à dura-máter para realizar a injeção de 25uL de Evans Blue (EBA) 100mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) adicionados a 100 mg de albumina de rato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) diluída em 10 mL de LCR artificial para produzir uma solução a 1% de EBA (Ramos *et al.*, 2019; Wolf *et al.*, 2019). Os animais foram devolvidos ao biotério e foram mantidos com aquecimento e analgesia com dipirona.

Após esse procedimento, os animais VPA-expostos e SAL-expostos foram subdivididos em 4 grupos, correspondendo aos tempos que seriam eutanasiados, ou seja, 4h, 24h, 3 dias e 7 dias. A morte de 2 animais por grupo fora estimada devido a invasividade do procedimento. Na Tabela 1 está representado os grupos experimentais do Protocolo 1.

Tabela 1: Grupos experimentais do Protocolo 1.

GRUPO	MODELO	TEMPO EUTANÁSIA	N
1	SAL	4 horas	5
2	VPA	4 horas	5
3	SAL	24 horas	5
4	VPA	24 horas	5
5	SAL	3 dias	5
6	VPA	3 dias	5
7	SAL	7 dias	4
8	VPA	7 dias	5

N= número amostral; SAL = solução salina 0,9% estéril e com pH 7,4; VPA = ácido valpróico. Fonte: figura elaborada pelo autor.

Às 4 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias após a injeção da solução de EBA na cisterna magna, os ratos foram novamente anestesiados e então foi coletado sangue da artéria femoral, o qual foi centrifugado para isolar apenas o soro. Após, foi realizado a eutanásia por guilhotina e então o encéfalo total foi retirado e acondicionados em tubo falcon com 3 mL de formamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para permitir que o EBA se difundisse do tecido cerebral para a solução na qual permaneceu 72h. As concentrações de EBA foram medidas nas amostras de formamida usando espectrofotometria (620 nm) contra uma curva padrão gerada com soluções de concentração de EBA conhecida em LCR artificial ou formamida (Wolf *et al.*, 2019). A figura 2 mostra a linha do tempo do Protocolo 1.

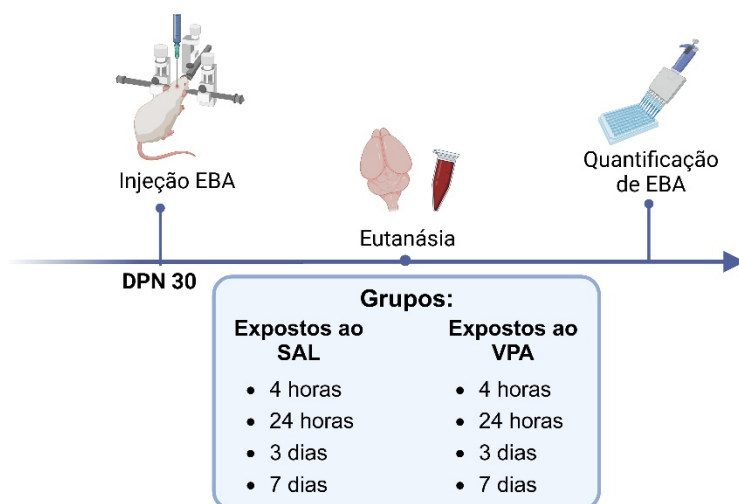


Figura 2 – Desenho experimental Protocolo 1. EBA=Evans Blue, SAL = solução salina 0,9% estéril e com pH 7,4; VPA = ácido valpróico. Fonte: figura elaborada pelo autor.

3.2.2.1 Protocolo 2: Avaliação de parâmetros de estresse oxidativo no modelo de TEA associado ao tratamento com ARIP.

O Protocolo 2 avaliou os parâmetros de estresse oxidativo no modelo de TEA associado ao tratamento com ARIP. Desse modo, animais expostos à SAL (n=14) ou ao VPA (n=8), com 30 dias de idade, foram subdivididos entre os grupos mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Grupos experimentais Protocolo 1.

GRUPO	MODELO	TRATAMENTO	N
A	SAL	SAL	6
B	VPA	SAL	5
C	SAL	ARIP	8
D	VPA	ARIP	3

n= número amostral; SAL = solução salina 0,9% estéril e com pH 7,4; VPA = ácido valpróico; ARIP = aripiprazol. Fonte: figura elaborada pelo autor.

O tratamento com ARIP ou SAL, foi administrado via i.p., 10mg/Kg, uma vez ao dia, por 10 dias, do 30º ao 39º DPN. No DPN 40, após o último dia de tratamento, os animais foram eutanasiados por guilhotina e a amígdala e o cerebelo foram dissecados para verificação de parâmetros de estresse oxidativo, como a oxidação de diclorofluoresceína (DCF), o conteúdo de sulfidrilas (SH), atividade das enzimas SOD e CAT. A figura 3 mostra o delineamento experimental do Protocolo 2.

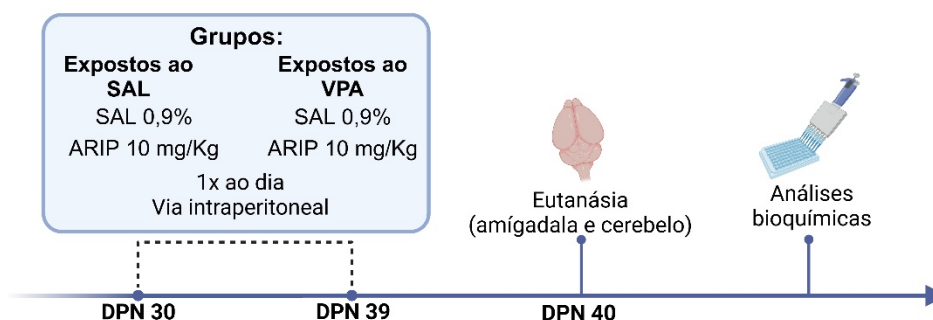


Figura 3 – Desenho experimental Protocolo 2. Fonte: figura elaborada pelo autor.

3.3 PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO

Em ambos os protocolos o neurodesenvolvimento e o desenvolvimento físico dos animais foram avaliados por parâmetros como pesagem, abrir dos olhos, busca pelo ninho, e geotaxia negativa.

3.3.1 Avaliação do ganho de peso

Antes do desmame, no 9º e 17º DPN, foi verificado o peso dos animais. Para a realização desse parâmetro, a matriz foi retirada da caixa dos animais ainda filhotes e foi colocada em uma caixa limpa. Antes da pesagem, um recipiente de pesagem foi preparado com uma pequena quantidade de maravalha do ninho. A pesagem foi realizada com uma ninhada de cada vez, dividindo o peso pela quantidade de filhotes de cada ninhada. Após o desmame no 21º DPN, os animais foram pesados de forma individual no DPN 25. No Protocolo 2, ainda foi realizado a pesagem individual durante o período de tratamento, do DPN 30 ao DPN 39. Após cada procedimento, todos os animais foram recolocados na caixa

original e devolvidos ao biotério. O recipiente de pesagem foi higienizado com álcool 70%, seguido de álcool 10%, assim como a luva do pesquisador foi trocada nas pesagens realizadas antes do desmame para não haver risco de transferir odor de uma ninhada para outra e a matriz abandonar ou matar os filhotes.

3.3.2 Teste da busca pelo ninho

Este teste mede o comportamento de busca de ninho mediado por pistas olfativas presentes na cama da gaiola doméstica (Gregory e Pfaff, 1971). O aparato consistia em uma caixa de alojamento padrão limpa (30 × 20 × 13 cm) com uma linha desenhada no centro e com dois estímulos olfativos colocados em extremidades opostas da caixa: um era a maravalha com o odor do ninho, o outro era maravalha estéril, com odor neutro. No DPN 10, os filhotes foram colocados individualmente no centro da gaiola, na linha do meio, com a cabeça voltada para o pesquisador. A partir de então foi cronometrado a latência, o tempo que o animal precisa para tomar uma atitude em escolher uma das maravalhas, e o tempo para atingir a maravalha escolhida.

3.3.3. Abrir dos olhos

Durante o intervalo entre o DPN 12 e DPN 16, foi observado o abrir dos olhos dos animais, uma vez ao dia, pela manhã. Esse parâmetro permite verificar o neurodesenvolvimento dos animais. Animais típicos, tendem a ter seus olhos abertos no DPN 14 e os animais com algum atraso na maturação do SNC tendem a levar mais dias para a abertura ocular total (Bâ, 2012). As caixas que tinham todos os animais com os olhos fechados eram consideradas como score 0. Já as caixas que continham alguns ou todos animais com os olhos abertos eram consideradas score 0,5 e 1, respectivamente.

3.3.4 Geotaxia negativa

A geotaxia negativa é uma resposta vestibular automática para detectar estímulos geogravitacionais e medir a competência sensorio-motora em filhotes. Durante o experimento, usamos uma plataforma com 45 graus. A prole VPA-exposta e a SAL-exposota foram testados no experimento de geotaxia negativa no DPN 15. Neste teste, os filhotes de ratos foram posicionados em um plano inclinado de 45°, com a cabeça direcionada para baixo e o tempo médio para girar 180° foi registrado. Os animais que não apresentaram reflexo na primeira tentativa foram testados mais duas vezes. A ocorrência de reflexo na primeira, segunda ou terceira tentativa, foram registrados (Alberts *et al*, 2004).

3.4. PARÂMETROS OXIDATIVOS

Para as análises bioquímicas, as estruturas encefálicas foram removidas, isoladas e armazenadas a -80 °C. Todas as mensurações dos parâmetros de estresse oxidativo foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas, que foram determinadas pelo método adaptado inicialmente descrito por (Lowry *et al.*, 1951), baseado na reação de Folin-Ciocalteu. A leitura das mensurações de proteínas foi realizada em leitor de microplacas por absorbância, expressas como mg de proteína.

3.4.1 Oxidação de DCFH-DA

A produção de espécies reativas em cérebros submetidos à exposição ao VPA pré-natal e ao ARIP pós-natal, foi determinada de acordo com o método de LeBel *et al.* (1992), utilizando-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA). Às alíquotas de amostras (80 µg de proteína) previamente homogeneizadas, foram adicionadas diacetato do DCF, a qual é permeável à membrana celular, sendo as alíquotas incubadas durante 30 minutos à 37 °C. No meio intracelular, esterases se clivaram o grupamento acetato do DCF-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidaram o DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclofluoresceína (DCF). A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 (excitação) e 535 nm (emissão). A curva de calibração foi

realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 μ M) e os resultados foram expressos como pmol de DCF.mg de proteína⁻¹.

3.4.2 Conteúdo de SH totais

Este método determina quantidade de SH não oxidadas, que estão presentes nos aminoácidos. Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). A oxidação dos tióis livres da amostra levou à formação de pontes dissulfeto; o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, foi reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo (TNB), lido a 412 nm em espectrofotômetro. Com isso, o método determina os tióis totais (TT) da amostra.

3.4.3 Atividade de SOD

Inicialmente foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Foram adicionados à amostra CAT 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente a 480 nm a temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U/mg de proteína.

3.4.4 Atividade da CAT

As amostras foram suspensas em tampão PBS e uma alíquota desta suspensão foi diluída em tampão CAT. Após a centrifugação da solução resultante, o meio reacional foi preparado com a adição de H₂O₂ 8,8 M e tampão CAT. O branco foi preparado sem a adição de H₂O₂ e a atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do H₂O₂ em 240 nm a temperatura ambiente nos tempos 0, 30, 60 e 90 segundos. A atividade da CAT foi expressa em U/mg de proteína.

3.4.5 Avaliação do sistema glinfático

Foram coletadas, em horários específicos, amostras de sangue por meio da artéria femoral e os encéfalos foram retirados e colocados em 3mL de formamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para permitir a difusão do EB no tecido cerebral. As amostras de sangue amostras foram centrifugadas por 10 minutos a $2000 \times g$ para isolar o soro. As concentrações de EBA foram medidas em amostras de soro e formamida (onde os encéfalos permaneceram por 72 horas), usando espectrofotometria (620 nm) contra uma curva padrão gerada com soluções de concentração de EBA conhecida ou formamida (Ramos *et al.* 2019; Wolf *et al.*, 2019).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados, foram empregados o teste de Shapiro-Wilk para analisar a normalidade e o teste de Levene para a homogeneidade. Se os dados apresentaram distribuição normal foram utilizados testes paramétricos; se os dados não cumpriram estas condições, foram utilizados os testes não paramétricos. Para as análises do teste de busca pelo ninho, abrir dos olhos e geotaxia negativa, foi utilizado teste T. Já para o peso e bioquímica, foi empregado ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* de Tukey. Os dados foram apresentados como média \pm DPM. Os valores foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$, com símbolo de asterisco (*) quando houve diferença entres os grupos, guiados por colchetes. Todas as análises foram executadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 9.0.0.

4.RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS DE NEURODESENVOLVIMENTO

4.1.1 Peso corporal

Os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso antes de receberem o tratamento (DPN 9, 17 e 25) e durante os 10 dias de tratamento (DPN 30 ao 39). A figura 4 apresenta o ganho de peso nos dias experimentais 9, 17 e 25. Tanto o grupo tratado com SAL (CT) quanto os expostos ao VPA tiveram ganho de peso normal, sem diferenças estatísticas.

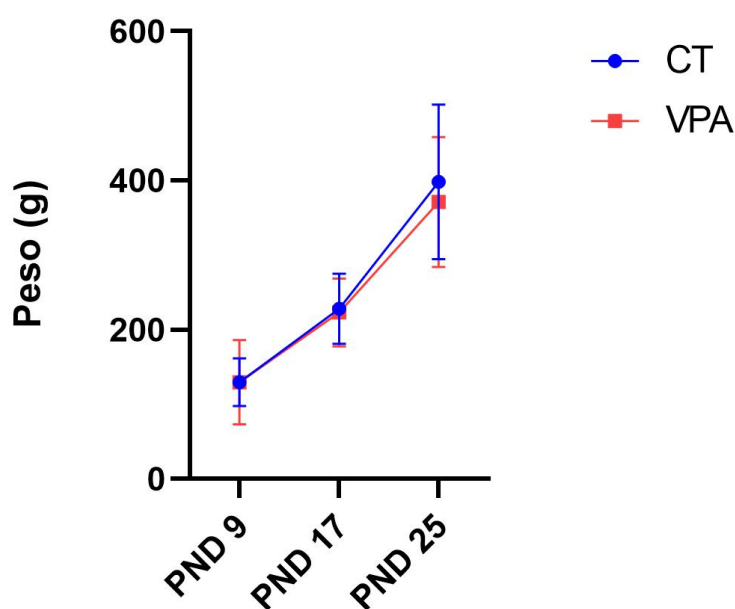


Figura 4 - Peso corporal das ninhadas antes do tratamento com aripiprazol (ARIP) entre os grupos salina (CT) e os expostos ao ácido valpróico. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). Os resultados foram avaliados com a ANOVA de uma via, seguido do *post-hoc* de Tukey, (n = 6-8 caixas/grupo). *p < 0,05 quando comparado ao grupo CT. Fonte: figura elaborada pelo autor.

4.1.2 Abrir dos olhos

Entre os DPN 11 e 16 foi registrado o dia de abertura dos olhos nos animais CT e os expostos ao VPA (figura 5). O grupo VPA apresentou um atraso significativo em relação ao grupo CT (p < 0,05).

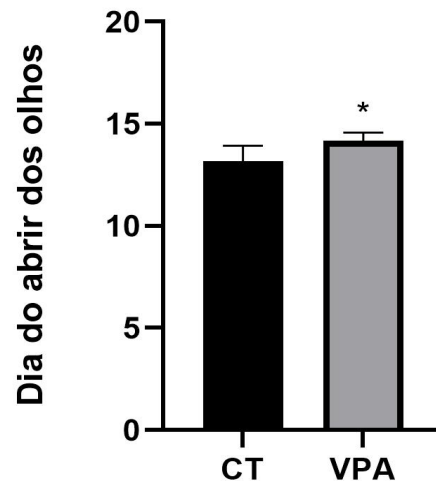


Figura 5 - Avaliação do abrir dos olhos antes do tratamento com aripiprazol (ARIP) entre os grupos salina (CT) e os expostos ao ácido valproico (VPA). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através do teste T, (n = 4-8 caixas/grupo). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CT. Fonte: figura elaborada pelo autor.

4.1.3. Busca pelo ninho

No DPN 10 foi realizado o teste da busca pelo ninho. A figura 6A representa o tempo de latência e a figura 6B o tempo de chegada ao ninho, em segundos, durante o teste comportamental. As análises estatísticas, revelaram uma diferença significativa entre o grupo CT e o grupo VPA nas duas situações. O grupo VPA precisou de mais tempo para tomar uma atitude entre as maravalhas (figura 6A), assim como apresentou um atraso em chegar na maravalha do ninho (figura 6B) ($p < 0,0001$ e $p < 0,01$, respectivamente).

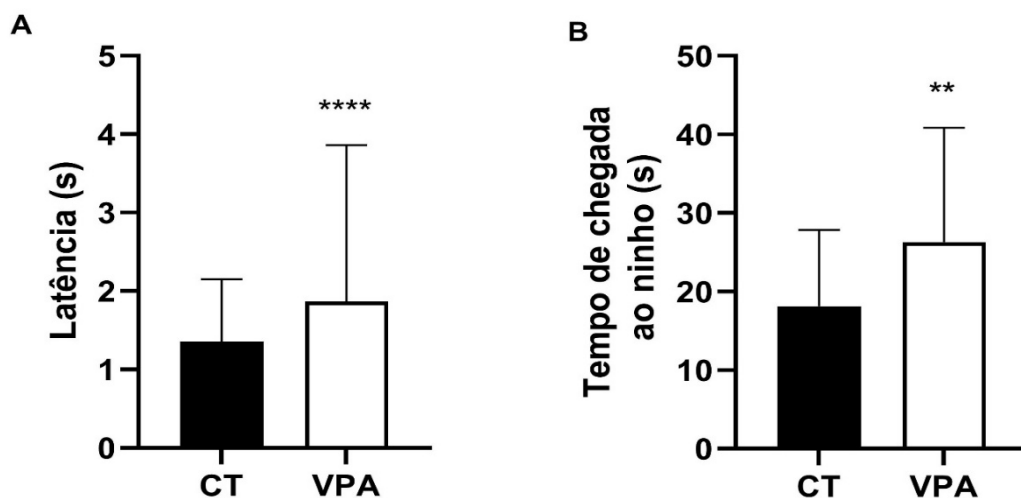


Figura 6 - Teste da busca pelo ninho antes do tratamento com aripiprazol (ARIP) entre os grupos salina (CT) e os expostos ao ácido valproico (VPA). Registro da latência, em segundos (s), para tomar uma atitude entre as maravalhas (A). O tempo de chegada no ninho, em segundos (s), (B). Os

dados são expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através do teste T ($n = 34-39$ animais/grupo). $**p < 0,01$ e $****p < 0,0001$ quando comparado com grupo CT. Fonte: figura elaborada pelo autor.

4.1.4. Geotaxia negativa

No DPN 15 foi realizado o teste da geotaxia negativa. A figura 7 mostra que o grupo exposto ao VPA precisou de um tempo significativamente maior ($p < 0,05$) para girar 180° no seu próprio eixo corporal sobre a plataforma para ficar com a cabeça voltada para cima, quando comparado com o grupo CT.

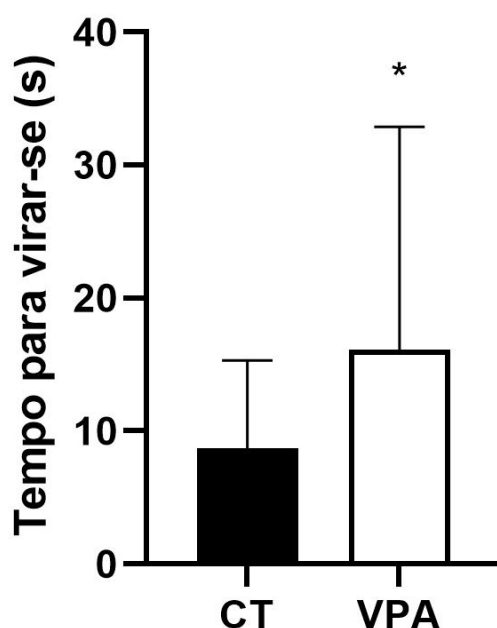


Figura 7 - Teste de geotaxia negativa ninho antes do tratamento com aripiprazol (ARIP) entre os grupos salina (CT) e os expostos ao ácido valproico (VPA). O tempo foi medido em segundos. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através do teste T, ($n = 34-39$ animais/grupo). $*p < 0,05$ quando comparado com grupo CT. Fonte: figura elaborada pelo autor.

4.2. AVALIAÇÃO DO SISTEMA GLINFÁTICO

4.2.1 Quantificação de EBA no soro e no cérebro de ratos

A figura 8 revela a quantificação de EBA no encéfalo (figura 8A) e soro (figura 8B) dos animais tratados pre-natalmente com SAL ou VPA e pós-natalmente com SAL ou ARIP. As concentrações foram medidas 4 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias após a injeção de EBA. Conforme visualizado na figura 8A, os níveis de EBA em 4h ($p < 0,01$), 24h ($p < 0,001$) e 3 dias ($p < 0,05$) após a administração de EBA foram significativamente maiores no grupo

VPA. A figura 8B evidencia a dosagem da concentração do EBA no soro dos animais. As medidas das 4 horas, 24 horas e 7 dias ($p < 0,05$) foram significativamente maiores no grupo CT.

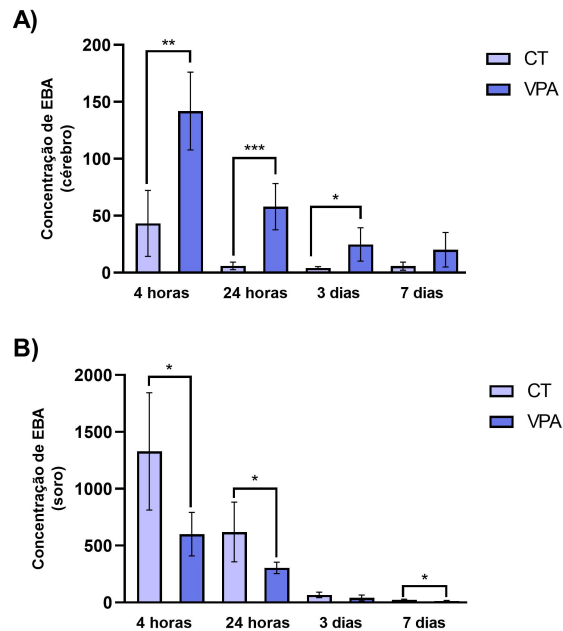


Figura 8 - Quantificação de EBA no soro e no encéfalo dos grupos salina (CT) e exposto ao ácido valproico (VPA) dosados em 4h, 24h, 3 e 7 dias após a injeção. Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através do teste T, ($n=4-5$ animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p <$ quando comparado ao grupo CT de cada tempo correspondente, guiado pelo colchete. Fonte: figura elaborada pelo autor.

A figura 9 mostra a distribuição macroscópica do EBA nos encéfalos dos animais do grupo CT e do VPA 4 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias após a eutanásia, evidenciando grosseiramente a presença do EBA mais intenso no grupo VPA.

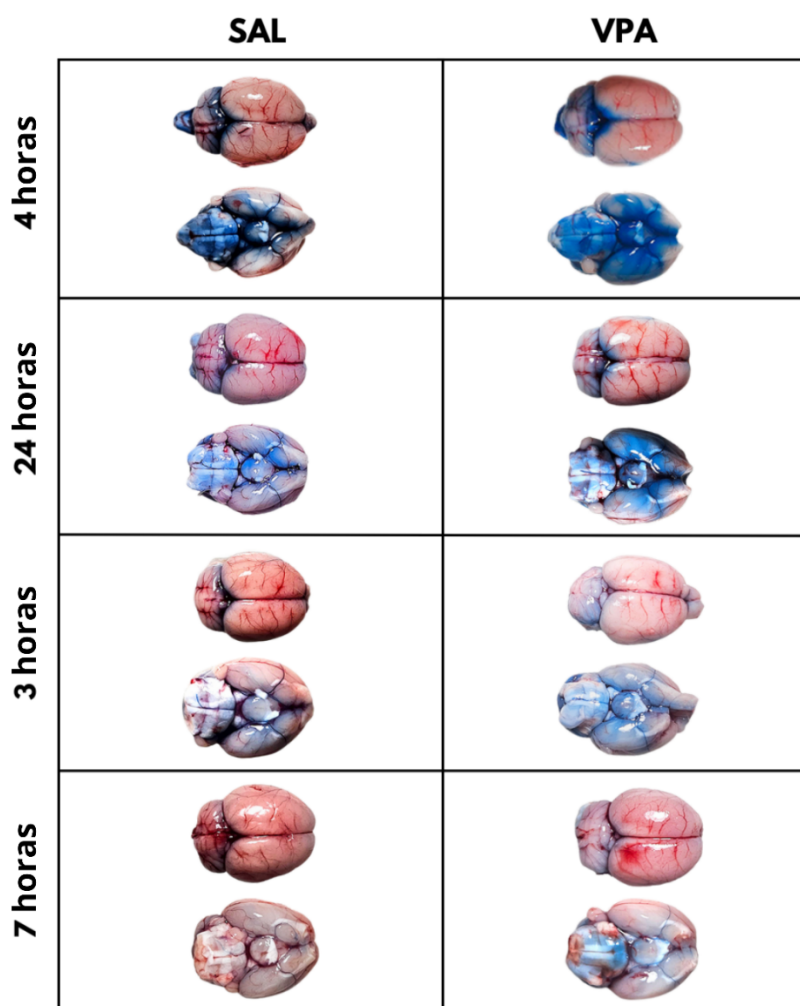


Figura - 9 Distribuição macroscópica de EBA nos encéfalos dos grupos grupos salina (CT) e exposto ao ácido valproico (VPA) eutanasiados após 4 horas, 24 horas, 3 dias e 7 dias após a injeção. Fotos representativas de cada um dos tempos/tratamentos. Fonte: figura elaborada pelo autor.

5.2 EFEITOS DO TRATAMENTO DO ARIPIPRAZOL

Conforme resultados da quantificação e visualização de EBA no Protocolo 1, foi realizado o Protocolo 2, com eutanásia 24 horas após a última administração de ARIP. Relembrando, no Protocolo 2 haviam 4 grupos experimentais: 1) animais tratados pré e pós-natal apenas com SAL (SAL+SAL); B) animais tratados com VPA no pré-natal e salina no pós-natal (VPA+SAL); 3) animais tratados com salina no pré-natal e ARIP no pós-natal (SAL+ARIP) e 4) animais tratados com VPA no pré-natal e ARIP no pós-natal (VPA+ARIP). Os animais receberam SAL ou ARIP 1 vez ao dia, via i.p., do DPN 30 ao DPN 39. No dia seguinte (DPN 40), 24 horas após a última injeção de ARIP, os animais foram eutanasiados e

o encéfalo dissecado para isolar amígdala e cerebelo para as análises bioquímicas. Se houvessem mais animais, parte deles receberiam EBA na cisterna magna e 4h depois seria feita a eutanásia, para análise do SG. No entanto, houve uma contaminação fúngica na ração da coorte de animais destinados à análise do SG. Neste sentido, estão apresentados aqui, somente os dados da coorte de animais que foi tratada e eutanasiada para as análises bioquímicas. Uma nova coorte de animais foi solicitada para as análises do SG serem realizadas em momento subsequente.

5.2.1 Peso corporal

Na figura 10 está representado o gráfico do ganho de peso do animais que comporam os quatro grupos do protocolo 2. Avaliou-se o ganho de peso durante o tratamento com ARIP, do DPN 30 ao DPN 39. Os grupos SAL+SAL, VPA+SAL e o SAL+ARIP tiveram ganho de peso sem diferenças estatísticas entre eles. Porém o grupo exposto ao VPA e tratado com ARIP (VPA+ARIP) a partir do DPN 34 apresentou uma perda significativa de peso em relação aos grupos SAL+SAL e SAL+ARIP ($p < 0,05$).

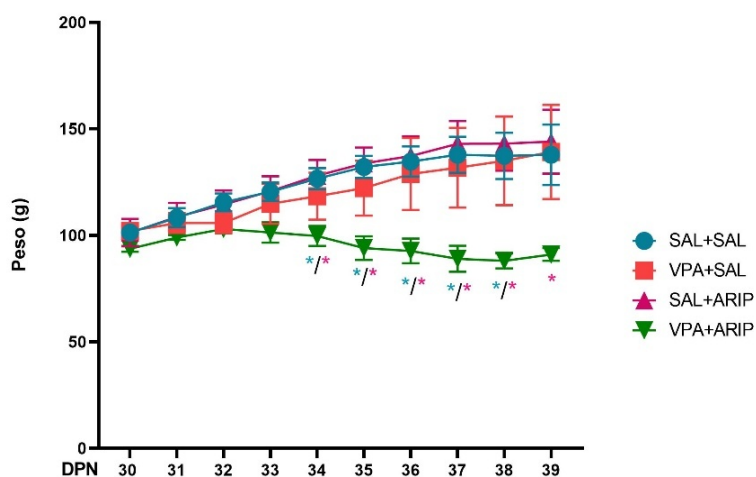


Figura 10 - Peso corporal dos animais durante o tratamento de animais expostos ao ácido valpróico (VPA) no período pré-natal e tratados com aripiprazol (ARIP) entre o DPN 30 e o DPN 39. Grupo SAL+SAL representado em azul, VPA+SAL em rosa, SAL+ARIP em roxo e VPA+RISP em verde. Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). Os resultados foram avaliados com a ANOVA de uma via, seguido do *post-hoc* de Tukey, ($n=3-8$ animais/grupo). * $p < 0,05$. Fonte: figura elaborada pelo autor.

5.2.2 Parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo foram avaliados na amígdala e no cerebelo. Para tanto, foram realizadas técnicas que mensuram o conteúdo de SH e oxidação de DCF, bem como a atividade das enzimas CAT e SOD.

Com relação a região da amígdala, os parâmetros de dano oxidativo foram verificados pela quantificação da oxidação de DCFH-DA (figura 11A) e conteúdos de SH (figura 11B). Houve um aumento significativo no grupo VPA+SAL ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo SAL+SAL (figura 11A). Quando comparados os grupos VPA+SAL e VPA+ARIP, observa-se uma tendência da diminuição deste parâmetro no grupo VPA+ARIP ($p = 0,08$). Com relação ao conteúdo de SH, houve uma diminuição significativa no grupo VPA+SAL quando comparado com os grupos SAL+SAL ($p < 0,05$) e com o grupo VPA+ARIP ($p < 0,05$) (figura 11B). Quanto as atividades das enzimas antioxidantes SOD (figura 11C) e CAT (figura 11D), não foram observadas diferenças estatísticas significativas.

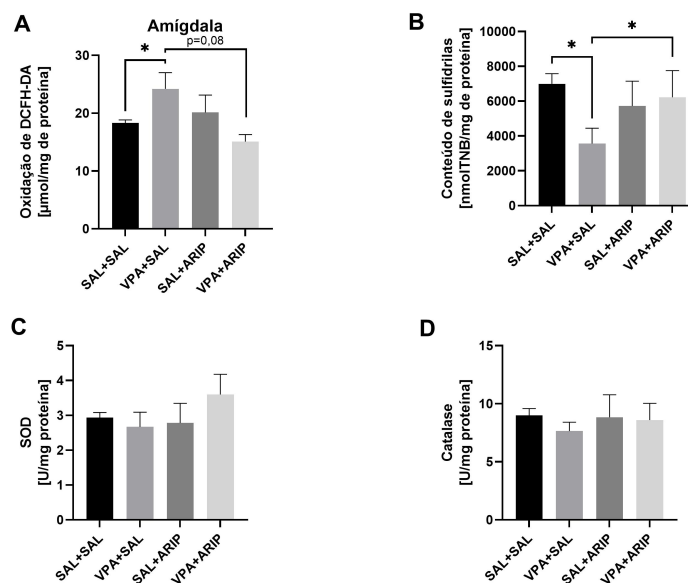


Figura 11 - Efeito do tratamento pós-natal com aripiprazol (ARIP) sobre parâmetros estresse oxidativo na região da amígdala cerebral de animais submetidos ao modelo animal de TEA induzido por ácido valpróico (VPA). (A) Oxidação de diclorofluoresceína (DCFH-DA), (B) Conteúdo de sulfidrilas (SH), (C) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e (D) Atividade da enzima catalase (CAT). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey, ($n=3-8$ animais/grupo). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SAL+SAL. Fonte: figura elaborada pelo autor.

Com relação a região cerebelar foi observado um aumento significativo na oxidação de DCFH-DA (Figura 12A) no grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo SAL+SAL ($p < 0,05$). Curiosamente, no grupo SAL+ARIP foi verificada a presença de uma tendência ao aumento ($p = 0,06$), quando comparado ao grupo SAL+SAL. Além disso, o grupo VPA+ARIP apresentou uma redução significativa neste parâmetro quando comparado ao grupo SAL+ARIP ($p < 0,05$) e ao grupo VPA+SAL ($p < 0,01$). Em relação a quantificação do conteúdo de SH (Figura 12B), não houve diferença estatística entre os grupos estudados. Quanto a atividade da enzima SOD (Figura 12C), foi evidenciada sua redução significativa no grupo VPA+SAL quando comparado com o grupo SAL+SAL ($p < 0,05$). O grupo VPA+SAL também apresentou uma diminuição significativa do parâmetro em relação ao grupo VPA+ARIP ($p < 0,01$). Além disso, o grupo VPA+ARIP apresentou um aumento significativo da atividade da SOD quando comparado com o SAL+ARIP ($p < 0,05$). Por fim, com relação a atividade da enzima CAT (figura 12D), houve uma diminuição significativa no grupo VPA+SAL em relação ao grupo SAL+SAL ($p < 0,05$).

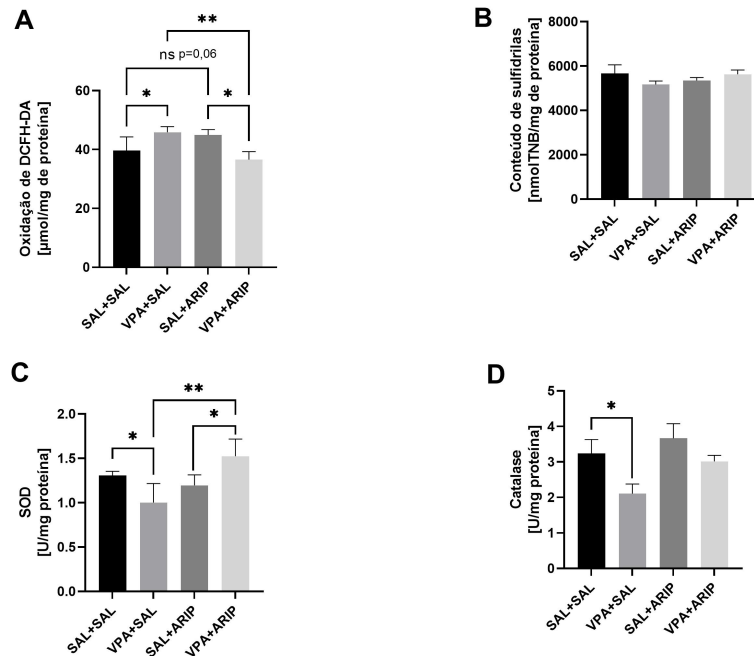


Figura 12 - Efeito do tratamento pós-natal com aripiprazol (ARIP) sobre parâmetros estresse oxidativo na região do cerebelo de animais submetidos ao modelo animal de TEA induzido por ácido valpróico (VPA). (A) Oxidação de diclorofluoresceína (DCFH-DA), (B) Conteúdo de sulfidrilas (SH), (C) Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e (D) Atividade da enzima catalase (CAT). Dados expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). As análises estatísticas foram realizadas através de ANOVA de duas vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey, ($n=3-8$ animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo SAL+SAL. Fonte: figura elaborada pelo autor.

6. DISCUSSÃO

O TEA é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits na comunicação social e pela presença de comportamentos restritos e repetitivos (Zahedi *et al.*, 2023). Embora o TEA possa impactar diferentes aspectos da vida de uma pessoa, sua apresentação varia muito de um indivíduo para outro (Rajabi *et al.*, 2024). O TEA não é uma condição rara, sua prevalência tem aumentado ao longo dos anos e afeta pessoas de todas as origens raciais, étnicas e socioeconômicas (Shen *et al.*, 2023). A prevalência atual na população global é estimada em 1–2% (Zeidan *et al.*, 2022). Acredita-se que as causas do TEA sejam multifatoriais, envolvendo desde a interação de fatores genéticos a ambientais (Ostrowski *et al.*, 2024). Nos últimos anos, a inflamação e o estresse oxidativo foram amplamente associados a neurobiologia do TEA (Usui *et al.*, 2023). A análise do tecido cerebral post-mortem do giro cingular anterior, cerebelo e regiões frontais médias do cérebro de indivíduos com TEA, variando de 5 a 44 anos, mostrou sinais de inflamação caracterizados pelos níveis aumentados das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, interferon gama e TNF- α (Rose e Ashwood., 2014).

Observa-se também, diferenças neuroanatômicas nos cérebros de indivíduos com TEA em seus primeiros anos de vida, como crescimento excessivo do volume cerebral, espessura cortical e aumento do volume dos PVS, também chamados de espaços de Virchow-Robin (Sotgiu *et al.*, 2023). O LCR circula pelo tecido cerebral por meio de uma rede recentemente descoberta de PVS, agora conhecido como SG, fornecendo fatores de crescimento e removendo solutos neuroinflamatórios para manter a homeostase neural (Garic *et al.*, 2023).

Apesar da intensificação nas pesquisas à nível mundial, o tratamento do TEA inclui uma variedade de abordagens psicoterapêuticas e o tratamento farmacológico, até o momento, não é direcionado aos principais sintomas do TEA, mas sim a transtornos comórbidos e comportamentos problemáticos (Tonge *et al.*, 2014; Persico *et al.*, 2019). Neste contexto, o presente estudo se propôs a avaliar o funcionamento do SG em um modelo animal de TEA induzido por VPA no primeiro protocolo, bem como avaliar os resultados do tratamento com o antipsicótico ARIP no encéfalo através de parâmetros de estresse oxidativo no segundo protocolo.

Neste estudo, o modelo animal de TEA usado foi o induzido por VPA, visto que este modelo proposto por Rodier *et al.* (1996) é um dos modelos animais de TEA mais

frequentemente estudados (Chomiak *et al.*,2013). O VPA é um ácido graxo de cadeia curta amplamente usado como um medicamento antiepiléptico e estabilizador de humor (Li *et al.*,2021). Neste modelo animal o VPA atua modulando a neurotransmissão e regulando a expressão gênica por meio da remodelação da cromatina (epigenética) pela inibição da atividade da histona desacetilase (HDAC) (Nicolini e Fahnestock, 2018). O VPA inibe a HDAC diretamente, causando hiperacetilação transitória no cérebro, inibindo a transcrição, aumentando as células apoptóticas e diminuindo a proliferação celular em áreas específicas do cérebro (Nicolini *et al.*, 2018).

O rato exposto ao VPA mostra uma diminuição na densidade de espinhos dendríticos no córtex pré-frontal, mas uma elevação no número de espinhos do hipocampo ventral (Chaliha *et al.*, 2020). Outros mecanismos de ação do VPA incluem a potencialização da sinalização do GABA pela inibição de enzimas envolvidas na degradação do GABA, as transaminases do GABA, enquanto promove a enzima de síntese do GABA, a descarboxilase do ácido glutâmico, a ativação da via β -catenina-Ras-ERK-p21 e a inibição indireta da GSK-3 β (Nicolini e Fahnestock, 2018). Conforme revisado por Dufour-Rainfrayetal *et al.*, (2010) este modelo exibe muitas das características estruturais e comportamentais que podem ser observadas em pacientes com TEA, por exemplo, ratos expostos ao VPA in utero podem exibir malformações em orelha que foram comparadas a anormalidades semelhantes, como a rotação posterior da orelha externa, observadas em alguns pacientes autistas. Além disso, Chomiak *et al.* (2013) em sua pesquisa mostrou que a exposição pré-natal ao VPA pode levar a anormalidades comportamentais que são semelhantes às observadas em indivíduos autistas, incluindo diminuição das interações sociais e sensibilidade à dor, aumento da sensibilidade a estímulos não dolorosos, atividade repetitiva/estereotipada, aumento da ansiedade, memórias de medo anormalmente altas e duradouras que são generalizadas e mais difíceis de extinguir, e por fim, mudanças em tipos específicos de vocalizações ultrassônicas de filhotes. Este modelo tem obtido apoio de pesquisa, demonstrando tanto a validade de construto quanto a validade de face como um modelo animal (Mabunga *et al.*,2015; Zarate-Lopez *et al.*, 2024).

No presente estudo, os parâmetros de neurodesenvolvimento dos animais foram avaliados pela análise da peso, abrir dos olhos, busca pelo ninho e geotaxia negativa. Após a indução do modelo TEA e o nascimento da prole, os animais dos grupos CT e VPA expostos, foram pesados no 9º e 17º dias e após o desmame, no 25º dia, com o intuito de avaliar o

desenvolvimento físico geral e a consequência da exposição ao VPA. Nos dois primeiros dias a pesagem foi realizada por ninhada e a partir do 25º DPN, foi realizada de forma individual. Conforme constatado, nos dois primeiros dias ambos os grupos obtiveram um ganho de peso similar e no 25º DPN o grupo VPA teve uma perda de peso em comparação ao grupo CT, porém sem diferença estatística entre eles. Isto significa que o VPA não causou uma alteração significativa no peso em comparação ao grupo CT neste período do neurodesenvolvimento. Este resultado está em concordância com os estudos de Bambini-Junior *et al.* (2011), no qual os aspectos somáticos observados durante o desenvolvimento dos filhotes, incluindo peso corporal, desdobramento das orelhas e abertura dos olhos não foram diferentes entre os grupos. Outro estudo avaliou a saúde geral durante o desenvolvimento no modelo VPA-rato de autismo, e não observou efeito do tratamento com VPA no ganho de massa corporal na prole da semana pós-natal 2 até a idade adulta (semana 38) e considerou esta discordância em relação aos estudos que indicavam uma perda de peso como o de Schneider e Przewlocki (2005). Os autores explicaram a diferença entre os dois estudos devido o uso de 600 mg/Kg de VPA no período gestacional, os machos terem sido colocados em número de cinco em uma mesma gaiola, o que poderia ter alterado a hierarquia social, a ansiedade social e os níveis de exercício, bem como as cepas diferentes dos animais. Todas estas situações poderiam refletir no peso da prole (Favre *et al.*, 2013). Outro estudo que avaliou as alterações do córtex cerebelar em um modelo de autismo em ratos induzido por VPA indicou que apenas os ratos no grupo experimental que recebeu uma dose única de 600 mg/kg de VPA no embrião 15 apresentaram um aumento no peso estatisticamente significativo em comparação com os ratos do grupo de CT da mesma idade (Alpay e Yucel , 2022). Assim, permanece incerto se as observações de peso corporal em diferentes versões do modelo VPA estão diretamente ligadas a sintomas semelhantes ao autismo ou se esses efeitos são independentes do autismo e específicos para uma cepa ou dosagem (Favre *et al.*, 2013).

O outro teste padrão de avaliação do neurodesenvolvimento analisado foi o de discriminação olfativa ou teste de busca pelo ninho realizado no 10º DPN. Este teste além de analisar o neurodesenvolvimento do sistema olfativo e vestibular, também investiga interações sociais e memória do animal (Haratizadeh *et al.*, 2020). Sabe-se que o olfato tem sido implicado no desenvolvimento de comportamento social vital (orientação, amontoamento e sucção) em filhotes de rato e, em particular, o aprendizado olfativo precoce dentro do ninho

parece crítico em aspectos de reconhecimento social e pode representar a base de relacionamentos sociais (Rouillet *et al.*, 2010). Os resultados do presente estudo mostram que filhotes expostos ao VPA (VPA+SAL) têm o tempo de latência para escolha aumentado em relação ao grupo CT com uma diferença estatística relevante bem como o tempo de chegada ao ninho. Estes resultados concordam com o estudo de Schneider e Przewlocki (2005) que mostrou que a discriminação olfativa dos filhotes foi retardada no grupo VPA-exposto e que também levou mais tempo do que os filhotes do grupo CT para chegar à maravalha do ninho. Essa latência aumentada na busca por ninhos pode estar relacionada a um déficit de discriminação olfativa precoce nos animais devido a exposição ao VPA intrauterino, o que sugere a interferência do VPA no neurodesenvolvimento. Devido ao impacto do sentido olfativo na comunicação social dos roedores, a atenuação dos parâmetros do comportamento de seleção de ninhos indica comprometimento social precoce neste modelo animal de autismo (Haratizadeh *et al.*, 2020). O estudo realizado por Ruhela *et al.* (2019) também evidenciou que a exposição ao VPA resultou em déficits na discriminação olfativa em ratos, sugerindo dificuldades em reconhecer e responder a estímulos olfativos.

Outro parâmetro de desenvolvimento avaliado neste estudo foi a abertura dos olhos que é o parâmetro mais comumente avaliado do desenvolvimento pós-natal, por ser, além de um marco do crescimento corporal, um sinal externo de maturação do SNC em vertebrados (Zaccarelli *et al.*, 2020). Os ratos nascem funcionalmente cegos, suas pálpebras abrem durante a segunda semana de vida pós-natal. Assim, monitora-se o status de abertura dos olhos no PND 11 a 16 em ratos CT e tratados com VPA. Nossos resultados mostraram que ratos VPA-expostos apresentaram um atraso significativo na abertura dos olhos em comparação com grupo CT, o que expressa um atraso na maturação do SNC. Embora o mecanismo exato de abertura dos olhos ainda não tenha sido elucidado, o atraso do neurodesenvolvimento em filhotes VPA é semelhante a estudos anteriores que fornecem validade de construção. Da mesma forma Yang *et al.* (2016) em sua pesquisa na qual investiga as semelhanças entre o modelo animal de TEA induzido por VPA e o modelo PTEN nocaute, incluindo aumento proporcional do peso do cérebro, identificaram um atraso significativo na abertura ocular dos animais tratados com VPA no 13º DPN.

Sandhu *et al.* (2023) avaliou o efeito farmacológico da administração de Ibutilast, um inibidor não seletivo da adenosina monofosfato cíclico 3',5' (cAMP) fosfodiesterase (PDE),

que apresenta propriedades neuroprotetoras e anti-inflamatórias, no modelo pré-natal de VPA de TEA em ratos *Wistar*. O estudo apontou um atraso significativo na abertura dos olhos em filhotes expostos ao VPA em comparação com os respectivos filhotes de CT, indicado pela pontuação média de abertura dos olhos no PND 13, 14 e 15 o que corrobora com os nossos resultados. Uma pesquisa recente cujo objetivo era determinar o efeito neuroprotetor do ácido cáprico em alterações comportamentais e bioquímicas no modelo de autismo induzido por VPA também demonstrou um efeito ligeiramente menor na pontuação de abertura dos olhos nos dias 14 e 21 dos animais VPA expostos (Shekhar e Thakur, 2024). Porém, Bambini-Junior *et al.* 2011 em seu estudo que avaliou as alterações comportamentais e parâmetros hepáticos de um modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA demonstrou que os ratos de ambos os grupos, CT e VPA, cujos aspectos somáticos foram observados durante o desenvolvimento dos filhotes e incluíam peso corporal, desdobramento das orelhas e abertura dos olhos não apresentaram alterações entre os grupos, discordando dos nossos resultados.

Por fim, outro parâmetro avaliado foi o reflexo de geotaxia negativa que expressa o desenvolvimento motor (reflexos), atividade e função vestibular (Ruhela *et al.*, 2019), função sensorial (Motz e Alberts, 2005) bem como desenvolvimento do ajuste postural dinâmico e, portanto, é muito utilizado como avaliação das funções vestibular e proprioceptiva (Zaccarelli *et al.*, 2020). Os resultados deste estudo mostram que o grupo VPA precisou de um tempo significativamente maior que o grupo CT para girar o corpo 180° sugerindo uma função motora e sensório-motora alteradas devido a exposição ao VPA intrauterino. Além disso, o atraso no desenvolvimento desse reflexo sugere alterações na maturação das estruturas cerebrais envolvidas na função motora, em especial do cerebelo (Zaccarelli *et al.*, 2020), cujas funções estão relacionadas com a sintomatologia do TEA como déficits na comunicação social e interação social, bem como aumento de comportamentos repetitivos (Bruchhage *et al.*, 2018).

No estudo de Shekhar e Thakur (2024), também foi medida a geotaxia negativa. Os filhotes VPA expostos avaliados no DPN 20 levaram mais tempo para girar 180° do que os filhotes do grupo CT validando nossos resultados. Um estudo avaliou um novo modelo neurocomportamental de autismo em camundongos por exposição pré e pós-natal ao VPA Os animais nascidos de mães tratadas nos dias E12–E17 com 200 mg/kg de VPA apresentaram déficits quando testados para geotaxia negativa nos dias pós-natais 6 a 14 e o dia que

apresentou maior latência foi o 10° (Wagner *et al.*, 2006). De forma semelhante, Sandhu *et al.* (2023) apresentaram os dados da geotaxia negativa do seu estudo avaliada nos PND 6, 10, 15 e 17 e indicaram que os filhotes expostos ao VPA levaram significativamente mais tempo para se reorientar (rotação de 180°) em comparação aos CT no PND 10. Assim, os resultados das avaliações do neurodesenvolvimento no modelo animal de TEA induzido por VPA do presente estudo evidenciam um atraso relevante em comparação aos animais CT indicando que o VPA, pelos diversos mecanismos de ação mencionados acima, afeta o neurodesenvolvimento de forma semelhante aos humanos com TEA.

Outro fator de risco relacionado ao desenvolvimento do TEA, que afeta diretamente o desenvolvimento e a função do SNC é o LCR que atua carreando fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização necessárias para o crescimento neural saudável e promovendo a remoção de neurotoxinas e resíduos metabólicos subprodutos da função neuronal do tecido nervoso (Shen *et al.*, 2018). Assim, alterações nesta via de transporte de fluidos denominada SG, está implicada nos mecanismos fisiopatológicos de várias doenças no SNC como Doença de DA, acidente vascular encefálico, entre outras (Licastro *et al.*, 2024).

Estudos *post-mortem* identificaram elevação nos níveis de proteína A β nos neurônios do SNC, LCR periférico e sangue de indivíduos com TEA, o que estaria associada a um SG prejudicado (Wang *et al.*, 2023). Neste estudo com modelo animal VPA exposto a avaliação do SG foi realizada pela mensuração do tempo necessário para a depuração do EBA no cérebro. Os resultados evidenciaram que nos animais VPA expostos a concentração do EBA em 4h, 24h e 3 dias foram significativamente maiores em relação ao grupo CT, o que indica que a depuração do corante no cérebro dos animais VPA expostos foi extremamente lentificada em comparação aos CT. Além disso, a concentração do EBA no soro dos animais CT nos períodos de 4h, 24h e 7 dias apresentaram-se significativamente maior em contraste com o grupo VPA, validando os dados encontrados no cérebro. Esta constatação permite concluir que o tratamento com VPA para induzir o modelo TEA nos animais gerou um comprometimento significativo do SG ao reter o EBA no cérebro sem liberá-lo consistentemente na corrente sanguínea. Até o momento não há estudos sobre o SG em modelos animais de TEA. Barlattani *et al.* (2024), fizeram SG em doenças psiquiátricas como esquizofrenia (SCZ) e transtorno depressivo maior (TDM). Sobre a relação entre o SG e SCZ eles encontraram dois estudos conduzidos por Wu *et al.* (2018, 2020) em Taiwan. O primeiro

com o objetivo de esclarecer se os polimorfismos do gene e o haplótipo de AQP-4 influenciaram o nível sérico de proteína B de ligação ao cálcio S100 (S100B), uma proteína periférica utilizada como marcador de injúria cerebral. O segundo investigava a relação entre polimorfismos do gene AQP-4 e SCZ. Os resultados sugerem que o AQP-4 influencia a neuroinflamação cerebral em indivíduos com SCZ, dado seu papel importante na manutenção da integridade, estrutura e permeabilidade da BHE. Este estudo apresenta uma possível associação entre o envolvimento de variações genéticas no gene AQP-4 e o resultado funcional de pacientes com SCZ.

Jutla *et al.* (2022), em sua revisão sistemática, descreve sobre algumas áreas de convergência entre TEA e SCZ, no qual mostrou vários estudos que indicam que a inflamação, tanto no SNC quanto no sangue periférico, parece desempenhar um papel no TEA e SCZ. Na revisão os estudos de PET encontraram, nos dois transtornos, o aumento da ativação da microglia na substância cinzenta total, do lobo frontal e do lobo temporal; além de níveis sanguíneos periféricos elevados de citocinas pró-inflamatórias, sendo a IL-6 aumentada comum aos dois transtornos.

Um estudo do Grupo Transdiagnóstico do Consórcio de Genômica Psiquiátrica (do inglês, *Cross-Disorder Group do Psychiatric Genomics Consortium*) estimou similaridades em todo o genoma entre cinco grandes transtornos psiquiátricos e encontraram correlação genética estatisticamente significativa entre múltiplos transtornos, incluindo TEA e SCZ (Lee *et al.*, 2013). A sobreposição no risco genético, conforme refletido pela extensa herdabilidade entre transtornos, é amplamente vista em várias condições de desenvolvimento e psiquiátricas (Jutla *et al.*, 2022). Em termos mais restritos, no entanto, certas variantes de risco podem contribuir para o risco de apresentações fenotípicas específicas, incluindo aquelas de TEA, SCZ ou sua combinação (Jutla *et al.*, (2022).

Liu *et al.* (2020) realizaram um estudo que o modelo de estresse leve crônico imprevisível de depressão em camundongos apresenta sintomas comportamentais semelhantes à depressão e alteração cognitiva associados ao comprometimento acentuado do SG. Esta disfunção do SG, seria decorrente da neuroinflamação intensa com conseqüente diminuição da pulsação e complacência arterial, que interromperiam o influxo perivascular, expressão despolarizada de AQP-4 astrocítica e redução da depuração de A β exógeno (Brown *et al.*, 2018).

A literatura enfatiza cada vez mais importantes características compartilhadas e potenciais patomecanismos comuns na DA, DP e TEA pois alterações nas principais proteínas associadas à neurodegeneração, como A β , tau e α -sinucleína, estão cada vez mais associadas a etiopatologia do TEA (Thomas *et al.*, 2024). O TDM é uma doença mental potencialmente fatal, no entanto, muitos pacientes têm uma resposta ruim aos tratamentos atuais. Estudos sugeriram que o estresse oxidativo induzido por trauma e a inflamação podem ser fatores importantes envolvidos no desenvolvimento do TDM, mas os mecanismos permanecem desconhecidos (Lindqvist *et al.*, 2017).

Gu *et al.* (2022) sugerem em seu estudo que devido ao alto consumo de oxigênio no cérebro há uma maior produção ERO porém uma defesa antioxidante deficiente. As ERO por sua vez levam a ativação dos astrócitos que produzem e liberam citocinas próinflamatórias levando a neuroinflamação e alterações no SG. Com a diminuição da função depurativa do SG há um acúmulo de ERO e produtos do catabolismo celular, intensificando ainda mais a neuroinflamação, que está relacionada com o desencadeamento do TDM (Gu *et al.*, 2022). Sabe-se que os transtornos de ansiedade e depressivos co-ocorrem com mais frequência em pessoas com TEA do que aquelas sem TEA (20% vs 7% para transtorno de ansiedade e 11% vs 5% para transtornos depressivos) (Hirota e King, 2023).

O sono é um estado altamente conservado fisiologicamente e necessário em todas as espécies de vertebrados. Uma das principais funções biológicas do sono é promover a eliminação de resíduos metabólicos tóxicos que se acumulam no cérebro durante a vigília (Deng *et al.*, 2024) pelo SG. Estudos atuais documentam que a circulação do LCR aumenta durante o sono, com consequente aumento do influxo de LCR e da depuração do excesso de glutamato, lactato, A β e outros neuropeptídeos em comparação com a vigília (Aalling *et al.*, 2018). Em um estudo realizado com microscopia de varredura a laser de dois fótons, a função do SG em camundongos foi observada com traçadores fluorescentes, sendo encontrada uma expansão maior que 60% no espaço intersticial e na quantidade de LCR entrando nas vias perivasculares quando os camundongos estavam dormindo quando comparados com os estados de vigília, sugerindo assim que um grande espaço intersticial poderia refletir a troca do SG (Chong *et al.*, 2022). As descobertas foram replicadas em humanos, onde o sono foi associado a uma maior depuração glnfática em comparação com os estados de vigília e uma noite de privação de sono (Chong *et al.*, 2022).

Deng *et al.* (2024), em seu estudo pré-clínico descreveu que a fragmentação do sono crônica, por 30 dias, suprimiu significativamente o influxo glinfático no cérebro, o efluxo de LCR via linfonodos cervicais profundos e a depuração de A β 1-40 exógeno, do córtex pré-frontal, sugerindo um comprometimento geral do transporte de LCR. Shokri-Kojori *et al.* (2018) avaliaram os efeitos da privação de uma noite do sono na carga de A β em indivíduos saudáveis para investigar se o sono afeta a depuração de A β do cérebro humano. Eles utilizaram a PET com a qual é possível medir o carga de A β no cérebro humano in vivo e o radiotraçador 18F-florbetaben. Esses radiotraçadores se ligam a placas A β 42 solúveis e insolúveis. As imagens evidenciaram aumentos na carga de A β após uma noite de privação de sono no hipocampo, que é considerado uma das regiões cerebrais mais sensíveis à neuropatologia da DA. Isto pode refletir a diminuição da depuração de A β , presumivelmente por falta de sono, apoiando assim o papel do SG na limpeza de A β do cérebro durante o sono. Estes dados são consistentes com dados epidemiológicos que apontam o sono prejudicado como um fator de risco para DA e com evidências recentes mostrando que a interrupção do sono profundo aumenta o A β no LCR humano (Shokri-Kojori *et al.*, 2018).

Os distúrbios do sono são um dos maiores desafios enfrentados por jovens com TEA e, muitas vezes, por extensão, pelos familiares que cuidam deles (Gisbert Gustemps *et al.*, 2021). Aproximadamente 50% a 80% das crianças e adolescentes diagnosticados com TEA sofrem de problemas de sono (Cortese *et al.*, 2020). Os problemas de sono mais comuns vivenciados por essa população incluem dificuldades para iniciar e manter o sono, despertares noturnos frequentes e muitas vezes prolongados, acordar cedo pela manhã e horários de sono e vigília irregulares (Johnson *et al.*, 2021). A relação entre a desregulação do sono e a desregulação comportamental recebeu atenção considerável em estudos de TEA atualmente. Muitos deles apoiam a hipótese de que sono insuficiente exacerba os sintomas comportamentais do TEA (Johnson e Zarrinagar, 2021; Bishir *et al.*, 2020; Doldur-Balli *et al.*, 2022). Em crianças com TEA, menos horas de sono por noite preveem maior gravidade dos comportamentos centrais como os déficits em habilidades sociais (Missing *et al.*, 2020). Além disso, níveis mais altos de problemas de sono estão associados a níveis mais altos de problemas comportamentais externalizantes (por exemplo, agressão, impulsividade) e internalizantes (por exemplo, retraimento, ansiedade, depressão) (Missig *et al.*, 2020).

O primeiro estudo sobre o SG e o TEA é um estudo clínico de imagem que utilizou a técnica de DTI ao longo do espaço perivascular (DTI-ALPS) (Li *et al.*, 2022). Ele apresentava 55 indivíduos selecionados com base nos critérios de inclusão e exclusão os quais foram idade gestacional de 37 semanas ou mais; e sem histórico de lesão cerebral, traumatismo craniano ou infecções do SNC. O diagnóstico do TEA foi realizado utilizando os critérios DSM-IV-TR, critérios da American Psychological Association (APA, 2000), no qual o conceito de espectro não era incluído. Foram selecionados 30 indivíduos para grupo TEA e 25 para o CT com uma média de idade entre 3 a 6 anos. As imagens foram realizadas durante o sono das crianças para eliminar artefatos de movimento e facilitar o exame de ressonância magnética (Li *et al.*, 2022). Os grupos TEA e CT não tiveram diferenças significativas em idade, sexo ou idade gestacional. Os pacientes com TEA tinham índice ALPS significativamente menor do que CT saudáveis, sugerindo que pacientes com TEA têm disfunção do SG. Além disso, o índice ALPS foi positivamente correlacionado com a idade em pacientes com TEA, o que demonstra que a função do SG declina em pacientes com TEA. O autor relata limitações como o tamanho da amostra pequeno e dificuldades com a técnica de imagem utilizada (Li *et al.* 2022).

Recentemente foi publicado outro trabalho que teve como objetivo avaliar a função glinfática e a integridade da substância branca em crianças com TEA, usando ressonância magnética multiparamétrica e associado a machine learning para aumentar a precisão do diagnóstico. As imagens da ressonância magnética multimodal foram realizadas em crianças de 3 a 7 anos com TEA entre setembro de 2017 e maio de 2023. O diagnóstico clínico foi realizado por dois pediatras com base nos critérios descritos na DSM-5 e avaliações usando a CARS que avalia a severidade do TEA. Os critérios de exclusão foram histórico de trauma, epilepsia, convulsões, distúrbios neurológicos ou psiquiátricos, ou achados de ressonância magnética indicando lesões focais ou difusas, como amolecimento cerebral, atrofia ou lesões focais da substância branca. O estudo revelou que o volume do PVS era maior, e o índice DTI-ALPS era menor em crianças com TEA, sugerindo uma interrupção subjacente no SG. A disfunção do SG foi associada tanto à integridade interrompida da substância branca quanto aos sintomas clínicos do TEA. A análise de mediação mostrou que a integridade da substância branca exacerbou os atrasos no desenvolvimento em crianças com TEA, influenciando a função glinfática (Wang *et al.*, 2025). Porém, a validade do DTI-ALPS

é questionada como um marcador de depuração cerebral glinfática, técnica utilizada em várias pesquisas sobre o assunto, e alguns acreditam ser insuficiente utilizá-la como marcador (Ringstad, 2024).

O ARIP é um antipsicótico atípico cuja ação parece ser farmacologicamente distinta da de outros antipsicóticos atípicos. É um agonista parcial do receptor D2 da dopamina com uma ação dupla, atuando como antagonista em estados hiperdopaminérgicos e como agonista em estados hipodopaminérgicos. O ARIP também tem uma alta afinidade pelos receptores D3 e 5-HT2A e uma afinidade moderada pelos receptores de dopamina D4, serotonina 5-HT2C e 5-HT7, alfa1-adrenérgicos e histamina H1, bem como pelos locais de recaptação da serotonina. O antagonismo no receptor 5-HT2A pode ser responsável pela redução dos efeitos colaterais extrapiramidais, em relação aos antipsicóticos típicos, minimizando o bloqueio dopaminérgico excessivo (Gettu e Saadabadi, 2022; Rizzo e Pavone, 2016). O ARIP é metabolizado principalmente no fígado pelas enzimas CYP2-D6 e CYP3-A4. Sua meia-vida de eliminação é de 75 horas para metabolizadores rápidos e 150 horas para metabolizadores lentos (Coustals *et al.*, 2021).

Em um estudo recente, os efeitos colaterais frequentemente relatados com o uso do ARIP foram semelhantes aos dos outros antipsicóticos, sendo as reações adversas mais comuns (ocorrendo em $\geq 5\%$ e pelo menos o dobro do placebo) foram sedação (21% vs 4%), fadiga (17% vs 2%), sonolência (10% vs 4%) e letargia (5% vs 0%). Efeitos colaterais neuromotores incluíram tremor (10% vs 0%) e distúrbio extrapiramidal (6% vs 0%). As reações gastrointestinais incluíram vômitos (14% vs 7%) aumento do apetite (7% vs 3%) e diminuição do apetite (7% vs 2%), sialorreia (9% vs 0%) e hipersecreção salivar (6% vs 1%) (Bartram *et al.*, 2019).

Dois ensaios clínicos randomizados duplo-cegos avaliaram a eficácia e segurança do ARIP em crianças com TEA. O primeiro estudo incluiu 218 crianças e adolescentes autistas. Esses pacientes foram randomizados para receber uma das três doses diferentes de ARIP (5, 10 ou 15 mg/d) ou placebo por oito semanas. Todas as três doses reduziram significativamente a irritabilidade desses indivíduos em comparação com o placebo. O segundo estudo envolveu 98 crianças e adolescentes (com idades entre 6–17 anos) com diagnóstico de TEA que também exibiram comportamentos agressivos ou autolesivos. Os pacientes receberam uma dose flexível de ARIP (dose média de 8,6 mg/d) ou placebo. O

ARIP foi eficaz na redução da irritabilidade já na primeira semana e manteve seu efeito até o final do ensaio (OWEN *et al.*, 2009).

O ARIP devido aos ensaios acima mencionados, foi o segundo antipsicótico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para o tratamento da irritabilidade e da agressividade relacionadas ao autismo (Salloum-Asfar *et al.*, 2024), porém, os mecanismos envolvidos para esses efeitos neuroprotetores no TEA não são totalmente conhecidos. Dados de uma revisão recente sobre o efeito clínico nos pacientes com TEA tratados com ARIP durante 8 semanas, em comparação com o placebo, revelaram que o medicamento provavelmente reduz a gravidade geral dos sintomas; a estereotipia e o comportamento repetitivo; a linguagem inapropriada e problemas comportamentais. Em relação a comunicação social e ao funcionamento o ARIP provavelmente causou pouca ou nenhuma diferença (Fieiras *et al.*, 2021). Sobre os efeitos adversos do ARIP, outro estudo, em modelo animal, evidenciou que houve uma média de aumento de peso em 8 semanas de 0,3 kg para placebo, 1,3 kg para o grupo que foi tratado com 5 mg/dia, 1,3 kg para os tratados com 10 mg/dia e 1,5 kg para grupos de 15 mg/dia, todos $P < 0,05$ vs placebo (Hellings., 2023).

Um estudo de 2017 demonstrou que tratamentos crônicos (14 dias) com risperidona e ARIP individualmente melhoram os déficits de interação social e o comprometimento da memória de reconhecimento no modelo animal VPA de TEA bem como levou a um aumento de dopamina extracelular no córtex pré-frontal (Hara *et al.*, 2017). Outro estudo recente examinou os efeitos do tratamento materno com ARIP (10 mg/kg) em camundongos jovens expostos pré-natalmente ao VPA em comportamentos do neurodesenvolvimento. Com os resultados foi concluído que ARIP preveniu significativamente a perda de peso corporal, autocorreção, abertura dos olhos, interações sociais, comunicação social e déficits de memória de trabalho em camundongos expostos pré-natalmente ao VPA (de Oliveira *et al.* 2023).

No segundo protocolo, a avaliação do peso da prole após o início do tratamento com ARIP foi realizado do 30º ao 39º DPN. Curiosamente, o grupo exposto ao VPA e tratado com ARIP (VPA+ARIP) a partir do 34º DPN teve uma perda significativa de peso em relação aos grupos SAL+SAL e SAL+ARIP. Este resultado discorda de uma revisão sistemática publicada recentemente (Fieiras *et al.*, 2023) que descreveu que indivíduos em tratamento com ARIP tenderam a apresentar ganho de peso, e consideraram esta característica como um possível efeito colateral do antipsicótico. Da mesma forma, uma revisão atual avaliou a ação

farmacológica do ARIP no tratamento da irritabilidade em pacientes com TEA e constatou que nos dois principais ensaios de curto prazo, os grupos de tratamento com ARIP foram associados ao aumento de peso, variando de 28,9% a 32,7% dos indivíduos com ganho de peso corporal clinicamente relevante ($\geq 7\%$) (Bartram *et al.*, 2019). Também foram observadas alterações no índice de massa corporal no grupo ARIP versus grupo placebo (Bartram *et al.*, 2019).

Porém, Varela *et al.* (2013) em seu estudo que comprovou que a administração repetida de ARIP do 10º ao 20º DPN levou a uma regulação positiva do receptor D2 de dopamina, além de uma hipersensibilidade à DA em ratos jovens, avaliou o peso dos animais no 21º e 24º dias após o tratamento com ARIP foram significativamente reduzidos em relação aos CT Mas, no 28º DPN não havia mais esta diferença entre os tratados com VPA e os CT, indicando que o tratamento não afetou de forma relevante o peso dos animais. Gupta *et al.* (2021) em seu estudo comparou o perfil metabólico e o peso de pacientes que foram tratados com clozapina, olanzapina e risperidona com pacientes que usaram clozapina, olanzapina e risperidona associados ao ARIP, como terapia adjuvante, na dose de 5mg/d, por 12 semanas. Foi observado que 13 dos 14 pacientes em uso de clozapina obtiveram redução de peso com o uso do ARIP. Os autores concluíram que devido à ação agonista parcial dos receptores de dopamina D2, relatados como redutores da ingestão de alimentos ao atuarem em áreas hipotalâmicas, e de serotonina 5-HT_{2c}, associado à diminuição do apetite e perda de peso, o ARIP poderia estar relacionado com a mudança do peso no grupo clozapina associado ao ARIP.

Os parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo foram avaliados na amígdala e no cerebelo. Para tanto, foram realizadas técnicas que mensuram a oxidação de DCFH-DA, o conteúdo de SH e bem como a atividade das enzimas CAT e SOD.

A amígdala é uma estrutura límbica, localizada no lobo temporal, composta por duas sub-regiões a amígdala centromedial e a amígdala basolateral. A primeira, mais superficial, constituída pelos núcleos cortical, medial e central e a segunda, mais profunda, que consiste dos núcleos basal, lateral e basal acessório (McDonald, 2014). Esta estrutura desempenha um papel crucial em todos os tipos de estados, características e distúrbios relacionados ao medo e à ansiedade por meio de suas projeções para o tronco cerebral (LeDoux 2003). Além disso, ela desempenha uma importante função em aspectos da percepção social e tomada de decisão,

teoria da mente, modulação emocional da memória declarativa e aversão à perda por recompensas (Fox e Shackman 2024). Os interneurônios inibitórios GABAérgicos parvalbumina-positivos (PVI) são uma grande subpopulação de neurônios na amígdala, constituindo 50% dos interneurônios da amígdala basolateral. (Sah *et al.*, 2003). Estes interneurônios inibitórios, desempenham um papel essencial no processamento de informações em todo o cérebro, fornecendo um equilíbrio em relação aos neurotransmissores excitatórios por causar no neurônio pós-sináptico uma hiperpolarização. A regulação da transmissão de informações e da função neuronal depende dessa regulação inibitória (Zahedi *et al.*, 2023).

O amplo alcance da amígdala nestes vários processos comportamentais afetivos e cognitivos está embasado em suas vastas conexões estruturais com uma variedade de regiões corticais e subcorticais (Meisner *et al.*, 2022). Ao examinar as conexões amígdalo-corticais, a amígdala mostra conexões extensas com os córtices frontal, insular, temporal e occipital. No entanto, de longe, as projeções mais densas existem entre a amígdala e o córtex pré-frontal medial e o córtex orbitofrontal (Meisner *et al.*, 2022), chamado "cérebro social" (Zahedi *et al.*, 2023).

Estudos mais recentes investigaram os circuitos neuronais sociais, principalmente os circuitos pré-frontais-amígdala que foram implicados em uma variedade de comportamentos sociais, incluindo percepção social, aprendizagem e tomada de decisão (Gangopadhyay *et al.*, 2021), e as projeções amígdala-hipocampal que foram associadas à memória social e comportamentos de interação (Ortiz *et al.*, 2019). Estudos em bebês com autismo encontraram um volume maior e números neuronais maiores na amígdala em comparação aos CT com desenvolvimento neurotípico (Schumann *et al.*, 2004). Outros estudos da amígdala no TEA relataram diminuição do tamanho e aumento da densidade de neurônios nos núcleos medial, central e cortical, embora quantificações mais recentes tenham mostrado uma redução significativa nos números neuronais na amígdala como um todo ou no núcleo lateral da amígdala em indivíduos com TEA (Meisner *et al.*, 2022).

Dado que a amígdala em indivíduos neurotípicos continua a crescer em tamanho durante a adolescência e na idade adulta, o aumento inicial no tamanho da amígdala seguido pela redução subsequente observada no TEA indicaria que a trajetória do desenvolvimento da amígdala pode ser criticamente afetada no TEA (Schumann *et al.*, 2011).

Estudos em modelos animais de VPA evidenciam que a exposição ao VPA leva à diminuição da espessura do córtex frontal cortical e da amígdala basolateral em idades precoces, e do CA1 hipocampal em todas as idades. Outras áreas cerebrais afetadas incluem o cerebelo, que diminui de tamanho, e a amígdala, que aumenta (Varghese *et al.*, 2017).

No modelo animal de autismo por indução pré-natal com VPA foi evidenciado que existe um desequilíbrio entre a excitação e a inibição na região da amígdala, especialmente em seu núcleo lateral. Os animais do modelo apresentaram redução da interação social, aumento da ansiedade e aumento do aprendizado condicionado ao medo e prejuízos na extinção desse tipo de memória (Lin *et al.*, 2013). A eletrofisiologia da região da amígdala mostrou um aumento dos potenciais de longa duração enquanto se estimulava a via talâmica-amígdala, uma via importante de retransmissão de estímulos sensoriais no encéfalo (Lin *et al.*, 2013) o que significa, possivelmente, uma hiperreatividade aos estímulos sensoriais.

Considerando a relevância da amígdala na fisiopatologia do TEA, o presente estudo avaliou os parâmetros de dano oxidativo na referida região pela quantificação da oxidação do DCFH-DA e do conteúdo de SH. Foi observado um aumento significativo na oxidação de DCFH-DA no grupo VPA+SAL, quando comparado ao grupo SAL+SAL. Este resultado indica que o tratamento com VPA ocasionou danos oxidativos na amígdala, validando o modelo animal VPA induzido utilizado no presente estudo. Em concordância com os nossos resultados, Zahedi *et al.* (2023) em um estudo recente no qual avaliava a disfunção dos interneurônios da parvalbumina da amígdala em modelo de TEA murino induzido por VPA também indicou um aumento relevante deste marcador de dano oxidativo na amígdala de ratos expostos ao VPA em comparação aos animais de CT.

O tratamento com ARIP evidencia que houve uma tendência a diminuição da oxidação do DCFH-DA entre os grupos VPA+SAL e VPA+ARIP. Este resultado indica que o tratamento com o antipsicótico, apesar de não estatisticamente relevante, apresentou uma redução no dano oxidativo na amígdala. Este resultado corrobora com a literatura na qual já foi descrito a melhora de parâmetros oxidativos com a administração de ARIP. Jayaprakash *et al.* (2024) comparou o efeito do tratamento com ARIP e o com flavonoide apigenina nos comportamentos repetitivos estereotipados semelhantes aos autistas e no estresse oxidativo cerebral em um modelo animal de TEA geneticamente modificado, o camundongo BTBR. Neste estudo foi observado que o ARIP (1 mg/Kg) aumentou significativamente os níveis de

SOD e CAT no hipocampo e cerebelo quando comparado aos camundongos BTBR CT, demonstrando o efeito antioxidante do antipsicótico.

A quantificação conteúdo de SH na amígdala expressou uma diminuição do parâmetro no grupo VPA+SAL quando comparado com o grupo SAL+SAL ($p < 0,05$). Este resultado também indica dano oxidativo na amígdala. Este resultado coaduna com estudos prévios que evidenciam uma redução do conteúdo SH em animais expostos ao VPA. Campos *et al.* (2025), em seu recente estudo que avalia os parâmetros oxidativos e inflamatórios e os efeitos específicos do sexo em um modelo animal de autismo induzido por VPA combinado com privação materna, evidenciou uma redução no conteúdo SH no cortex pré frontal nos animais VPA-expostos, indicando aumento do estresse oxidativo no modelo. No presente estudo, o tratamento com o ARIP promoveu um aumento significativo no conteúdo de SH no grupo VPA+ARIP quando comparado ao grupo VPA+SAL. Este resultado sugere que o tratamento com o antipsicótico reverteu de forma significativa o dano oxidativo relacionado a este parâmetro, em concordância com a literatura.

Zargar *et al.* (2018) em seu estudo avaliou o efeito das alterações no conteúdo de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos no soro de um grupo de camundongos tratado com H_2O_2 e outro grupo tratado com $H_2O_2 + ARIP$. Os parâmetros avaliados foram as enzimas alanina aminotransferase e creatinoquinase, nitrogênio ureico no sangue, proteínas e creatinina. O grupo $H_2O_2 + ARIP$ apresentou uma melhora estatisticamente relevante em todos os parâmetros, indicando que o tratamento com ARIP reverteu as alterações oxidativas presentes nos ratos tratados com H_2O_2 .

Um estudo atual analisou o malondialdeído (MDA), um composto químico que resulta da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, em animais tratados pré-natal com VPA e animais tratados pré-natal com VPA e pós natal com ARIP. O ARIP foi administrado i.p., na dose de 3mg/kg por 29 dias. Observou-se uma redução estatisticamente significativa do MDA no hipocampo, córtex pré-frontal e cerebelo. Este resultado é congruente com os nossos resultados indicando que o ARIP levou a uma redução significativa deste biomarcador de estresse oxidativo (Nakhal *et al.*, 2023).

A atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT na amígdala, em nossos resultados, não evidenciou diferenças estatísticas significativas em nenhum dos quatro grupos tratados, o que diverge da literatura recente. Yenkeyan *et al.* (2018) observou uma diminuição

significativa da SOD, aumento da CAT e um aumento no conteúdo de carbonila foram no plasma de pacientes com TEA em comparação com CT pareados. Este resultado sugere o estresse oxidativo implicado na patologia do TEA está intimamente relacionado ou é o resultado da diminuição da atividade da SOD e/ou desequilíbrio da SOD/CAT. Um estudo utilizando modelo animal de TEA induzido por VPA analisou a atividade das enzimas CAT em amostras de tecido hepático, SOD e GSH-Px em amostras de tecido cerebral. Os resultados evidenciaram uma diminuição significativa nas atividades enzimáticas da SOD, GSH-Px e CAT no grupo tratado com VPA, corroborando com estudos anteriores que postulavam que o VPA induz a geração de ROS e apoptose (Hamzawy *et al.*, 2018).

Sandhya *et al.* (2012) avaliaram parâmetros oxidativos em modelo de autismo induzido por VPA e constataram que os níveis totais de nitrito tiveram um aumento significativo e que os níveis de GSH e CAT em tecido cerebral total tiveram uma redução também significativa em comparação ao grupo de CT. A ausência de mudanças significativas na atividade da CAT e da SOD reforça a necessidade de uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos bioquímicos específicos afetados no TEA e de como diferentes tratamentos podem modular essas vias (Sweeten *et al.*, 2004).

Há um interesse crescente em compreender as contribuições cerebelares na fisiopatologia do TEA, dada a crescente evidência de anomalias estruturais e funcionais presentes no transtorno (Bloomer *et al.*, 2022). A visão tradicional sobre o cerebelo é que ele controla o comportamento motor (Bruchhage *et al.*, 2018). Embora trabalhos recentes tenham revelado que o cerebelo também esteja envolvido em funções não motoras, como cognição e afeto (Van Overwalle *et al.*, 2020). O chamado cerebelo cognitivo localizado predominantemente no lobo posterior, está envolvido em funções cognitivas e executivas, bem como processos de pensamento de ordem superior, como planejamento, formação de estratégias, aprendizado e linguagem (Wang *et al.*, 2014). A hipótese mais dominante é que o cerebelo auxilia no aprendizado e na compreensão de sequências de ações sociais e, portanto, facilita a cognição social ao apoiar previsões ótimas sobre interação e cooperação social iminentes ou futuras (Samson e Claassen, 2017).

Observa-se que crianças com TEA apresentam déficits em habilidades motoras finas e grossas, falta de coordenação e baixo desempenho na estabilidade postural. Até 80% das crianças com TEA apresentam déficits de coordenação motora e estes déficits estão

correlacionados com a gravidade do transtorno e o quociente de inteligência (Becker e Stoodley, 2013). Assim, as deficiências motoras estão entre as primeiras alterações clínicas identificáveis no TEA sendo incluídas como características principais do TEA (Mosconi e Sweeney, 2015).

Alterações histopatológicas no cerebelo foram frequentemente observadas em estudos *post-mortem* de cérebros com TEA. Em particular, a perda de células de Purkinje (CP) cerebelares foi consistentemente descrita em cérebros com TEA em comparação com CT bem como alterações no GABA (Fetit *et al.*, 2021). A densidade de CP foi mais afetada em Crus I e II, uma área fortemente interconectada com o córtex pré-frontal em homens e mulheres, enquanto a densidade de CP foi reduzida no lóbulo X apenas em homens afetados, uma região associada a regulação vestibular e coordenação do olhar. De fato, descobriu-se que a densidade de CP no lóbulo X se correlaciona com o uso do contato visual social pelo paciente (Beckinghausen *et al.*, 2019). Anormalidades estruturais cerebelares também foram associadas aos principais sintomas do TEA, como a diminuição do comportamento exploratório e comportamento repetitivo e estereotipado e a redução do volume do vermis cerebelar (Varghese *et al.*, 2017).

Em alguns estudos pré-clínicos tem sido usado modelos de camundongos de TEA que envolvem deleções específicas ou mutações de genes candidatos que demonstraram ser influentes no desenvolvimento do transtorno, como CADPS2 e GABRB3. (Bloomer *et al.*, 2022). GABRB3 foi identificado como um gene de interesse, pois a expressão do gene GABRB3 foi reduzida no cerebelo de indivíduos autistas (DeLorey *et al.*, 2008). Camundongos GABRB3-KO mostram tanto anormalidades estruturais cerebelares de hipoplasia cerebelar, mas também hiperatividade, habilidades motoras precárias e comportamento social diminuído consistente com o que é frequentemente encontrado em TEA (Bloomer *et al.*, 2022). Um estudo mostra que o cerebelo dos animais que receberam uma única dose de VPA (600 mg/Kg) no E15, em comparação com os CT, foram observados um aumento na densidade numérica de células granulares no cerebelo e uma redução relevante na densidade numérica de discos sinápticos e no seu diâmetro médio na camada granular cerebelar. Porém a proporção sinapse-neurônios, um parâmetro que indica conectividade interneural, foi a mesma. Conseqüentemente, a administração de VPA em filhotes em dias pré-natais ou pós-natais iniciais causa alterações no número de neurônios e

sinapses no cerebelo de ratos que é compatível com as alterações encontradas no TEA (Alpay *et al.*, 2022).

Estudos anteriores indicaram que o desenvolvimento cerebelar aberrante está associado ao TEA, em particular, alterações nos lóbulos VI e VII com uma diminuição no número de CP (Guerra *et al.*, 2023). Em um estudo em modelo de TEA de camundongo com VPA, foi utilizada a coloração imuno-histoquímica para o marcador de CP calbindina e realizadas análises estereológicas de seções cerebelares. Os resultados mostraram uma diminuição significativa de CP especificamente nos lóbulos VI e VIII de camundongos tratados com VPA em comparação com os CT, enquanto nenhuma diferença foi observada no lóbulo VII (Guerra *et al.*, 2023).

No presente estudo foi observado um aumento significativo na oxidação de DCFH-DA no cerebelo do grupo VPA+SAL quando comparado ao grupo SAL+SAL, o que está em acordo com a literatura atual. Um recente estudo que avaliou o parâmetro DCFH-DA no cerebelo de modelo animal VPA exposto apresentou um resultado curioso. Os animais do sexo masculino VPA exposto não apresentaram diferença quando comparados aos CT no parâmetro, porém as do sexo feminino VPA expostos apresentaram um aumento significativo do DCF em relação ao grupo CT (Campos *et al.*, 2025). Morakotsriwan *et al.* (2016) e Mirza *et al.* (2019) também observaram índices de dano oxidativo alterados, como o aumento de peroxidação lipídica no cerebelo em um animal VPA.

Em contrapartida, no grupo SAL+ARIP foi verificada a presença de uma tendência ao aumento, na oxidação de DCFH-DA, quando comparado ao grupo SAL/SAL, sugerindo um potencial pró-oxidativo do ARIP no cerebelo que é corroborado por estudos prévios. Doblado *et al.* (2021) em seu artigo relata que estudos pré-clínicos, *in vitro* e clínicos demonstraram que o ARIP pode gerar ou reduzir o estresse oxidativo. Foi observado que tanto em mitocôndrias do fígado de camundongo isoladas quanto em células sanguíneas isoladas de pacientes saudáveis, a respiração mitocondrial foi interrompida pela administração de ARIP. Este medicamento levou à indução da produção de EROS e peroxidação lipídica, (Doblado *et al.*, 2021).

Além disso, o grupo VPA+ARIP apresentou uma redução significativa na oxidação do DCFH-DA quando comparado ao grupo SAL+ARIP e ao grupo VPA+SAL. O efeito neuroprotetivo do antipsicótico foi observado em um estudo cuja administração de ARIP a

ratos por 30 dias em doses de 1 e 2 mg/Kg resultou em níveis reduzidos do marcador de estresse oxidativo MDA e do marcador inflamatório COX-2 para ambas as concentrações do medicamento. Além disso, as atividades antioxidantes de GSH e CAT aumentaram (Mani *et al.*, 2023). O efeito antioxidante do ARIP foi mostrado em outro estudo realizado com modelo animal de TEA VPA exposto no qual, os níveis de MDA no cerebelo do animal VPA exposto e tratado com ARIP (3mg/Kg) por 29 dias, apresentou uma redução relevante quando comparado com animal VPA exposto (Nakhal *et al.*, 2023).

Quanto a atividade da enzima SOD foi evidenciada sua redução no grupo VPA+SAL quando comparado com o grupo SAL+SAL. A diminuição na enzima antioxidante induzidas pelo VPA, no cerebelo pode contribuir para um aumento nos níveis de ânions $O_2^{\cdot-}$, os oxidantes mais potentes do sistema biológico, H_2O_2 além de produzir radicais hidroxila na presença de íons de metais de transição, o que favorece a neuroinflamação na fisiopatologia (Mattos *et al.*, 2020). Este resultado é validado por estudos prévios. Morakotsriwan *et al.* (2016) avaliando o efeito antioxidante de um composto vegetal em modelo de TEA VPA exposto evidenciou uma diminuição significativa da SOD no grupo VPA exposto em comparação ao CT. Uma análise semelhante em modelo animal genético de TEA, indicou também aumento no estresse oxidativo no cerebelo do animal TEA em comparação com o CT. A atividade da SOD apresentou redução significativa tanto no cerebelo quanto no hipocampo em relação ao grupo CT (Jayaprakash *et al.*, 2024). Shekhar *et al.* (2024) em seu estudo que avaliou o efeito ácido cáprico em um modelo de TEA VPA exposto, mostrou uma redução significativa da atividade da SOD no cerebelo do modelo VPA exposto quando comparado ao grupo salina, corroborando com os nossos resultados. Este resultado também é apresentado em um modelo animal genético de TEA, o rato BTBR, no qual houve uma redução significativa da atividade enzimática da SOD no cerebelo do animal (Jayaprakash *et al.*, 2024).

Quanto ao efeito do tratamento do ARIP, o grupo VPA+ARIP apresentou um aumento relevante da atividade da SOD quando comparado com o SAL+ARIP e o grupo SAL+VPA. Este resultado sugere o efeito antioxidante do ARIP. Resultado semelhante foi mostrado em outro estudo no qual o animal VPA exposto tratado com ARIP apresentou um aumento relevante na atividade da enzima SOD no cerebelo quando comparado com o animal VPA exposto (Nakhal *et al.*, 2023).

Por fim, com relação a atividade da CAT houve uma diminuição relevante no grupo VPA+SAL em relação ao grupo SAL+SAL indicando o efeito pró oxidante do VPA que é corroborado por estudos prévios como o do Sandhya *et al.* (2012). Neste estudo, que avaliou marcadores oxidativos no autismo induzido por VPA em ratos, foi apresentado uma redução na atividade enzimática da CAT no cerebelo dos animais VPA expostos em relação aos CT. No nosso estudo, não houve mudança na ação da CAT com o tratamento com ARIP, porém, o estudo de Nakhal *et al.* (2023) mostra uma recuperação significativa da ação enzimática no cerebelo após o tratamento.

Os resultados apresentados neste estudo indicam que o SG no modelo animal de TEA exposto ao VPA apresentou um comprometimento significativo expresso pela retenção do EBA no cérebro, com uma consequente demora para atingir a corrente sanguínea. Em relação ao tratamento com ARIP pode-se concluir que os efeitos benéficos deste antipsicótico sobre a irritabilidade e hiperatividade constatados em pessoas com TEA pode ser devido aos efeitos neuroprotetores decorrentes de sua ação antioxidante. Porém não se pode ignorar os outros mecanismos de ação do ARIP não documentados neste trabalho, como os efeitos anti-inflamatórios (Yoo *et al.*, 2018), antiapoptóticos (Zhao *et al.*, 2019) entre outros.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou uma disfunção no SG em um modelo animal de TEA induzido por exposição pré-natal ao VPA. Diversos estudos foram realizados mostrando a correlação do SG com doenças neuropsiquiátricas. Porém, apenas dois estudos foram publicados correlacionando o SG ao TEA e ambos foram estudos radiológicos, sendo o primeiro estudo questionado quanto a capacidade da técnica utilizada para identificar adequadamente o SG.

Assim, o nosso estudo é pioneiro na caracterização de alterações glinfáticas em modelo animal de TEA induzido por VPA. Destacamos também a necessidade de implementação de pesquisa sobre este tópico, tanto para definição de marcadores quanto para adaptação de ferramentas específicas de diagnóstico radiológico. O presente estudo também corroborou para a validade do construto do modelo animal VPA exposto quanto os danos oxidativos apresentados, reforçando o estresse oxidativo como um dos mecanismos fisiopatológicos do TEA.

Por fim, o tratamento com o ARIP atenuou alguns os parâmetros de estresse oxidativos com a reversão da redução da atividade enzimática da SOD. Este resultado associado a avaliação do SG após o tratamento com ARIP nos animais VPA expostos, auxiliaria no entendimento do mecanismo de ação do medicamento e sua repercussão no SG. No entanto, uma limitação do estudo foi o tamanho amostral que acarretou na impossibilidade de avaliação do SG após o tratamento com o ARIP.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, J. R.; MOTZ, B. A.; SCHANK, J. C. Positive Geotaxis in Infant Rats (*Rattus norvegicus*): A Natural Behavior and a Historical Correction. *Journal of Comparative Psychology*, v. 118, n. 2, p. 123–132, 2004.
- AL-DEWIK, N. *et al.* Overview and Introduction to Autism Spectrum Disorder (ASD). *Advances in Neurobiology*, v. 24, p. 3-42, 2020.
- ALPAY M.; YUCEL F. Changes of cerebellar cortex in a valproic acid-induced rat model of autism. *Int J Dev Neurosci*. 2022 Nov;82(7):606-614.
- ALPERT, J. S. Autism: A Spectrum Disorder. *American Journal of Medicine*, v. 134, n. 6, p. 701-702, 2021.
- ALREHAILI, R. A. *et al.* Exploring Early Childhood Autism Spectrum Disorders: A Comprehensive Review of Diagnostic Approaches in Young Children. *Cureus*, v. 15, n. 12, p. e50111, 2023. DOI: 10.7759/cureus.50111.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*. 5. ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.
- ANDERSON, G. Autism Spectrum Disorder: Pathophysiology and Treatment Implications. *Current Pharmaceutical Design*, v. 25, n. 41, p. 4319-4320, 2019. DOI: 10.2174/138161282541191230102715.
- ANDRADE, C. Maternal Cannabis Use in Pregnancy and Autism Spectrum Disorder or Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Offspring. *Journal of Clinical Psychiatry*, v. 86, n. 1, p. 24f15717, 2024. DOI: 10.4088/JCP.24f15717.
- ANTSHEL, K. M.; RUSSO, N. Autism Spectrum Disorders and ADHD: Overlapping Phenomenology, Diagnostic Issues, and Treatment Considerations. *Current Psychiatry Reports*, v. 21, n. 5, p. 34, 2019. DOI: 10.1007/s11920-019-1020-5.
- BÂ, A. Paradoxical effects of alcohol and thiamine deficiency on the eye opening in rat pups. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 25, n. 11, p. 2435-2440, 2012.
- BAI, D. *et al.* Association of Genetic and Environmental Factors with Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA Psychiatry*, v. 76, n. 10, 2019.
- BAMBINI-JUNIOR V. *et al.* Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res*. 2011 Aug 23;1408:8-16.
- BARANEK, G. T.; PARHAM, L. D.; BODFISH, J. W. Sensory and motor features in autism: assessment and intervention. In: *Handbook of Autism and Pervasive Developmental Disorders*. 3. ed. John Wiley & Sons, 2005. p. 831-857. DOI: 10.1002/9780470939352.ch6.
- BARIBEAU, D.; VORSTMAN, J.; ANAGNOSTOU, E. Novel treatments in autism spectrum disorder. *Current Opinion in Psychiatry*, v. 35, n. 2, p. 101-110, 2022. DOI: 10.1097/YCO.0000000000000775.

- BARLATTANI, T. *et al.* Glymphatic System and Psychiatric Disorders: A Rapid Comprehensive Scoping Review. *Current Neuropharmacology*, v. 22, n. 12, p. 2016-2033, 2024. DOI: 10.2174/1570159X22666240130091235.
- BARTON B.B. *et al.* Update on weight-gain caused by antipsychotics: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf.* 2020 Mar;19(3):295-314.
- BARTRAM LA, LOZANO J, COURY DL. Aripiprazole for treating irritability associated with autism spectrum disorders. *Expert Opin Pharmacother.* 2019 Aug;20(12):1421-1427. doi: 10.1080/14656566.2019.1626825. Epub 2019 Jun 10. PMID: 31180743.
- BAUER, S. C.; MSALL, M. E. Genetic testing for autism spectrum disorders. *Developmental Disabilities Research Reviews*, v. 17, n. 1, p. 3–8, 2011.
- BECKER E.B.; STOODLEY C.J.. Autism spectrum disorder and the cerebellum. *Int Rev Neurobiol.* 2013;113:1-34.
- BEVERSDORF, D. Q. *et al.* Prenatal Stress and Maternal Immune Dysregulation in Autism Spectrum Disorders: Potential Points for Intervention. *Current Pharmaceutical Design*, v. 25, n. 41, p. 4331-4343, 2019. DOI: 10.2174/1381612825666191119093335.
- BISHIR, M. *et al.* Sleep Deprivation and Neurological Disorders. *Biomed Research International*, v. 2020, p. 5764017, 2020. DOI: 10.1155/2020/5764017.
- BJORJKLUND, G. *et al.* Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. *Molecular Neurobiology*, v. 57, n. 5, p. 2314-2332, 2020. DOI: 10.1007/s12035-020-01985-1.
- BJORKLUND, G. *et al.* Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, v. 76, n. 4, p. 257-268, 2016. DOI: 10.21307/ane-2017-025.
- BLAXILL, M.; ROGERS, T.; NEVISON, C. Autism Tsunami: The Impact of Rising Prevalence on the Societal Cost of Autism in the United States. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 52, n. 6, p. 2627-2643, 2022. DOI: 10.1007/s10803-021-05120-7.
- BLOOMER B.F. *et al.* Cerebellar Structure and Function in Autism Spectrum Disorder. *J Psychiatr Brain Sci.* 2022;7:e220003.
- BRANDÃO, S. C. S. *et al.* Papel do imunometabolismo, receptores Toll-Like e ECA 2 na COVID-19. *Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia*, v. 5, n. 1, p. 66-78, 2021.
- BROWN R. *et al.* Understanding the role of the perivascular space in cerebral small vessel disease. *Cardiovasc Res.* 2018 Sep 1;114(11):1462-1473.
- BRUCHHAGE, M. M. K.; BUCCI, M. P.; BECKER, E. B. E. Cerebellar involvement in autism and ADHD. *Handbook of Clinical Neurology*, v. 155, p. 61-72, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-444-64189-2.00004-4.
- BURNS, J. *et al.* Comorbidities Affecting Children with Autism Spectrum Disorder: A Retrospective Chart Review. *Children*, v. 10, n. 8, p. 1414, 2023. DOI: 10.3390/children10081414.
- BUTLER, M. G. *et al.* Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *Journal of Medical Genetics*, v. 42, p. 318–321, 2005.

- CARLSTROM, L. P. *et al.* A Clinical Primer for the Glymphatic System. *Brain*, v. 145, n. 3, p. 843-857, 2022. DOI: 10.1093/brain/awab428.
- CHALIHA D. *et al.* A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. *Dev Neurosci*. 2020;42(1):12-48.
- CHEN, Z. *et al.* Neuroplasticity of children in autism spectrum disorder. *Frontiers in Psychiatry*, v. 15, p. 1362288, 2024. DOI: 10.3389/fpsyt.2024.1362288.
- CHOMIAK, T.; TURNER, N.; HU, B. What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid. *Pathology Research International*, v. 2013, p. 712758, 2013. DOI: 10.1155/2013/712758.
- CHONG, P. L. H. *et al.* Sleep, cerebrospinal fluid, and the glymphatic system: a systematic review. *Sleep Medicine Reviews*, v. 61, p. 101572, fev. 2022.
- CHRISTENSEN, D.; ZUBLER, J. CE: From the CDC: understanding autism spectrum disorder. *American Journal of Nursing*, v. 120, n. 10, p. 30-37, out. 2020.
- CHRISTENSEN, J. *et al.* Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA*, v. 309, n. 16, p. 1696-1703, 24 abr. 2013.
- CORTESE, S.; WANG, F.; ANGRIMAN, M.; MASI, G.; BRUNI, O. Sleep disorders in children and adolescents with autism spectrum disorder: diagnosis, epidemiology, and management. *CNS Drugs*, v. 34, n. 4, p. 415-423, abr. 2020.
- DAS, N.; DHAMIJA, R.; SARKAR, S. The role of astrocytes in the glymphatic network: a narrative review. *Metabolic Brain Disease*, v. 39, n. 3, p. 453-465, mar. 2024.
- DENG, S. *et al.* Chronic sleep fragmentation impairs brain interstitial clearance in young wildtype mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v. 44, n. 9, p. 1515-1531, set. 2024.
- DELOREY T.M. *et al.* Gabrb3 gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: a potential model of autism spectrum disorder. *Behav Brain Res*. 2008 Mar 5;187(2):207-20.
- DOBLADO, L. *et al.* The SGAs Olanzapine and Aripiprazole Inhibit Mitochondrial Respiration and Induce Oxidative Stress. *Free. Radic. Biol. Med*. 2021, 165, 58–59
- DOLDUR-BALLI F. *et al.* Synaptic dysfunction connects autism spectrum disorder and sleep disturbances: A perspective from studies in model organisms. *Sleep Med Rev*. 2022 Apr;62:101595.
- DORCE, A. L.; BELLOT, R. G.; DORCE, V. A.; NENCIONI, A. L. Effects of prenatal exposure to *Tityus bahiensis* scorpion venom on rat offspring development. *Reproductive Toxicology*, v. 28, n. 3, p. 365-370, nov. 2009.
- DUFOUR-RAINFRAY, D.; VOURE'H, P.; LE GUIQUET, A. *et al.* Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: a model for autism. *Neuroscience Letters*, v. 470, n. 1, p. 55-59, 2010.
- EL-ANSARY, A. Autoantibodies and PLA2/PE ratio as potential biomarkers to clinically predict autism spectrum disorders. *Scientific Reports*, 2024.

- EREN, I.; NAZIROĞLU, M.; DEMIRDA, S., A. Protective Effects of Lamotrigine, Aripiprazole and Escitalopram on Depression-Induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Neurochem. Res.* 2007, 32, 1188–1195.
- ESPÓSITO, S. *et al.* Pediatric sleep disturbances and treatment with melatonin. *Journal of Translational Medicine*, v. 17, n. 1, p. 77, 12 mar. 2019.
- ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Immune mediators in the brain and peripheral tissues in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 16, n. 8, p. 469-486, ago. 2015.
- FAVRE M.R. *et al.* General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Front Behav Neurosci.* 2013 Jul 24;7:88.
- FETIT, R. *et al.* The neuropathology of autism: a systematic review of post-mortem studies of autism and related disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 129, p. 35-62, out. 2021.
- FIEIRAS, C. *et al.* Risperidone and aripiprazole for autism spectrum disorder in children: an overview of systematic reviews. *BMJ Evidence-Based Medicine*, v. 28, n. 1, p. 7-14, fev. 2023.
- FUENTES, J.; HERVÁS, A.; HOWLIN, P. (ESCAP ASD WORKING PARTY). ESCAP practice guidance for autism: a summary of evidence-based recommendations for diagnosis and treatment. *European Child & Adolescent Psychiatry*, v. 30, n. 6, p. 961-984, jun. 2021.
- GABIS, L. V. *et al.* The myth of vaccination and autism spectrum. *European Journal of Paediatric Neurology*, v. 36, p. 151-158, jan. 2022.
- GABRIELLI, A. P. *et al.* GeneAnalytics pathways and profiling of shared autism and cancer genes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 5, p. 1166, 7 mar. 2019.
- GARIC D. *et al.* Infant Brain Imaging Study (IBIS) Network. Enlarged Perivascular Spaces in Infancy and Autism Diagnosis, Cerebrospinal Fluid Volume, and Later Sleep Problems. *JAMA Netw Open.* 2023 Dec 1;6(12):e2348341.
- GENOVESE, A.; BUTLER, M. G. Clinical assessment, genetics, and treatment approaches in autism spectrum disorder (ASD). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 13, p. 4726, 2 jul. 2020.
- GRABRUCKER, A. M., ed. *Autism spectrum disorders* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications, 20 ago. 2021.
- GREGORY, E. H.; PFAFF, D. W. Development of olfactory-guided behavior in infant rats. *Physiology & Behavior*, v. 7, p. 573-576, 1971.
- GROSVENOR, L. P. *et al.* Autism diagnosis among US children and adults, 2011-2022. *JAMA Network Open*, v. 7, n. 10, p. e2442218, 1 out. 2024.
- GU, S.; LI, Y.; JIANG, Y.; HUANG, J. H.; WANG, F. Glymphatic dysfunction induced oxidative stress and neuro-inflammation in major depression disorders. *Antioxidants (Basel)*, v. 11, n. 11, p. 2296, 20 nov. 2022.
- GUERRA M. *et al.* Fetal exposure to valproic acid dysregulates the expression of autism-linked genes in the developing cerebellum. *Transl Psychiatry.* 2023 Apr 5;13(1):114.

- GUPTA B. *et al.* Effect of aripiprazole as an adjunct to atypical antipsychotics on weight and metabolic profile: a 12-week open-label trial. *Ther Adv Psychopharmacol.* 2021 Oct 9;11:20451253211046765.
- GYAWALI, S.; PATRA, B. N. Autism spectrum disorder: trends in research exploring etiopathogenesis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, v. 73, n. 8, p. 466-475, ago. 2019.
- HABLITZ, L. M.; NEDERGAARD, M. The glymphatic system. *Current Biology*, v. 31, n. 20, p. R1371-R1375, 25 out. 2021.
- HAN, V. X. *et al.* Maternal acute and chronic inflammation in pregnancy is associated with common neurodevelopmental disorders: a systematic review. *Translational Psychiatry*, v. 11, n. 1, p. 71, 21 jan. 2021.
- HARATIZADEH, S. *et al.* An overview of modeling and behavioral assessment of autism in the rodent. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 81, n. 3, p. 221-228, maio 2021.
- HARDAN, A. Y. *et al.* A randomized controlled pilot trial of oral N-acetylcysteine in children with autism. *Biological Psychiatry*, v. 71, n. 11, p. 956-961, 1 jun. 2012.
- HAVDAHL, A.; NIARCHOU, M.; STARNAWSKA, A.; UDDIN, M.; VAN DER MERWE, C.; WARRIER, V. Genetic contributions to autism spectrum disorder. *Psychol Med*, v. 51, n. 13, p. 2260-2273, out. 2021. DOI: 10.1017/S0033291721000192.
- HENEKA, M. T. *et al.* Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, v. 14, n. 4, p. 388-405, abr. 2015. DOI: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5.
- HIREMATH, C. S. *et al.* Emerging behavioral and neuroimaging biomarkers for early and accurate characterization of autism spectrum disorders: a systematic review. *Transl Psychiatry*, v. 11, n. 1, p. 42, 2021.
- HIROTA, T.; KING, B. H. Autism spectrum disorder: a review. *Jama*, v. 329, n. 2, p. 157-168, 2023.
- HODGES, H.; FEALKO, C.; SOARES, N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Transl Pediatr*, v. 9, supl. 1, p. S55-S65, fev. 2020. DOI: 10.21037/tp.2019.09.09.
- HUGHES, H. K.; MORENO, R. J.; ASHWOOD, P. Innate Immune Dysfunction and Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder (ASD). *Focus (Am Psychiatr Publ)*, v. 22, n. 2, p. 229-241, abr. 2024. DOI: 10.1176/appi.focus.24022004.
- ILIFF, J. J. *et al.* A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*, v. 4, n. 147, p. 147ra111, ago. 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3003748.
- ILIFF, J. J.; GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M. Implications of the discovery of brain lymphatic pathways. *Lancet Neurol*, v. 14, n. 10, p. 977-979, out. 2015. DOI: 10.1016/S1474-4422(15)00221-5.
- IOSSIFOV, I. *et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, v. 515, n. 7526, p. 216-221, 2014.
- JAYAPRAKASH P. *et al.* Apigenin Alleviates Autistic-like Stereotyped Repetitive Behaviors and Mitigates Brain Oxidative Stress in Mice. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024 Apr 9;17(4):482.

- JESSEN, N. A. *et al.* The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*, v. 40, n. 12, p. 2583-2599, dez. 2015.
- JOHNSON, K. P.; ZARRINNEGAR, P. Autism Spectrum Disorder and Sleep. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*, v. 30, n. 1, p. 195-208, jan. 2021.
- JUTLA, A.; FOSS-FEIG, J.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. Autism spectrum disorder and schizophrenia: An updated conceptual review. *Autism Res*, v. 15, n. 3, p. 384-412, mar. 2022.
- KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, v. 32, p. 217-253, 1943.
- KAUFMANN, W. E.; MACDONALD, S. M.; ALTAMURA, C. R. Dendritic cytoskeletal protein expression in mental retardation: an immunohistochemical study of the neocortex in Rett syndrome. *Cereb Cortex*, v. 10, p. 992-1004, 2000.
- KERESZTURI, É. Diversity and Classification of Genetic Variations in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*, v. 24, n. 23, p. 16768, nov. 2023.
- KHACHADOURIAN, V. *et al.* Comorbidities in autism spectrum disorder and their etiologies. *Transl Psychiatry*, v. 13, n. 1, p. 71, fev. 2023.
- KOBAYASHI, A. *et al.* Increased grey matter volume of the right superior temporal gyrus in healthy children with autistic cognitive style: A VBM study. *Brain Cogn*, v. 139, p. 105514, mar. 2020.
- KODAK, T.; BERGMANN, S. Autism Spectrum Disorder: Characteristics, Associated Behaviors, and Early Intervention. *Pediatr Clin North Am*, v. 67, n. 3, p. 525-535, jun. 2020.
- KRAMAR, B. *et al.* Antipsychotic Drug Aripiprazole Protects Liver Cells from Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 8292.
- KYLKILAHTI, T. M. *et al.* Achieving brain clearance and preventing neurodegenerative diseases-A glymphatic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 41, n. 9, p. 2137-2149, set. 2021.
- LAWRENCE, J. M. *et al.* Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. *Acta Neuropathol Commun*, v. 11, n. 1, p. 42, mar. 2023.
- LEE, H. *et al.* The effect of body posture on brain glymphatic transport. *J Neurosci*, v. 35, p. 11034-11044, 2015.
- LEEKAM S.R.; PRIOR M.R.; ULJAREVIC M. Restricted and repetitive behaviors in autism spectrum disorders: a review of research in the last decade. *Psychol Bull.* 2011 Jul;137(4):562-93.
- LEVINE, S. Z. *et al.* Association of Maternal Use of Folic Acid and Multivitamin Supplements in the Periods Before and During Pregnancy With the Risk of Autism Spectrum Disorder in Offspring. *JAMA Psychiatry*, v. 75, n. 2, p. 176-184, fev. 2018.
- LI, X. *et al.* Children with autism spectrum disorder present glymphatic system dysfunction evidenced by diffusion tensor imaging along the perivascular space. *Medicine (Baltimore)*, v. 101, n. 48, p. e32061, dez. 2022.

- LICASTRO E. *et al.* Glymphatic and lymphatic communication with systemic responses during physiological and pathological conditions in the central nervous system. *Commun Biol.* 2024 Feb 24;7(1):229.
- LINDQVIST D. *et al.* Oxidative stress, inflammation and treatment response in major depression. *Psychoneuroendocrinology.* 2017 Feb;76:197-205.
- LIU, X. *et al.* Polyunsaturated fatty acid supplement alleviates depression-incident cognitive dysfunction by protecting the cerebrovascular and glymphatic systems. *Brain Behav Immun,* v. 89, out. 2020, p. 357-370.
- LIU, X. *et al.* Polyunsaturated fatty acid supplement alleviates depression-incident cognitive dysfunction by protecting the cerebrovascular and glymphatic systems. *Brain Behav Immun,* v. 89, out. 2020, p. 357-370.
- LIU, X. *et al.* Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder-Current Progress of Mechanisms and Biomarkers. *Front Psychiatry,* v. 13, 1 mar. 2022, p. 813304.
- LORD, C.; *et al.* Autism spectrum disorder. *Nat Rev Dis Primers,* v. 6, n. 1, 16 jan. 2020, p. 5.
- LORD, C.; ELSABBAGH, M.; BAIRD, G.; VEENSTRA-VANDERWEELE, J. Autism spectrum disorder. *Lancet,* v. 392, n. 10146, 11 ago. 2018, p. 508-520.
- LORD, J. S. *et al.* Early life sleep disruption potentiates lasting sex-specific changes in behavior in genetically vulnerable Shank3 heterozygous autism model mice. *Mol Autism,* v. 13, n. 1, 29 ago. 2022, p. 35.
- LOUVEAU, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature,* v. 523, n. 7560, 16 jul. 2015, p. 337-341.
- LUNDGAARD, I.; WANG, W.; EBERHARDT, A. *et al.* Beneficial effects of low alcohol exposure, but adverse effects of high alcohol intake on glymphatic function. *Sci Rep,* v. 8, 2018, p. 2246.
- LYALL, K. *et al.* The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu Rev Public Health,* v. 38, 20 mar. 2017, p. 81-102.
- MABUNGA, D. F. *et al.* Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Exp Neurobiol,* v. 24, n. 4, dez. 2015, p. 285-300.
- MAENNER, M. J. *et al.* Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *MMWR Surveill Summ,* v. 72, n. 2, 24 mar. 2023, p. 1-14.
- MAKRIS, G.; AGORASTOS, A.; CHROUSOS, G. P.; PERVANIDOU, P. Stress System Activation in Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorder. *Front Neurosci,* v. 15, 13 jan. 2022, p. 756628.
- MALOVESKA, M. *et al.* Dynamics of Evans blue clearance from cerebrospinal fluid into meningeal lymphatic vessels and deep cervical lymph nodes. *Neurol Res,* v. 40, n. 5, maio 2018, p. 372-380.
- MANI, V.; ALSHAMMERI, B.S. Aripiprazole Attenuates Cognitive Impairments Induced by Lipopolysaccharide in Rats through the Regulation of Neuronal Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis. *Medicina* 2023, 60, 46.

- MANOLI, D. S.; STATE, M. W. Autism Spectrum Disorder Genetics and the Search for Pathological Mechanisms. *Am J Psychiatry*, v. 178, n. 1, 1 jan. 2021, p. 30-38.
- MASI, A.; DEMAYO, M. M.; GLOZIER, N.; GUASTELLA, A. J. An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. *Neurosci Bull*, v. 33, n. 2, abr. 2017, p. 183-193.
- MASI, A.; MONI, M. A.; AZIM, S. I. *et al.* Clinical and behavioral attributes leading to sleep disorders in children on the autism spectrum. *Autism Res*, v. 15, n. 7, p. 1274-1287, jul. 2022.
- MASINI, E.; LOI, E.; VEGA-BENEDETTI, A. F. *et al.* An overview of the main genetic, epigenetic and environmental factors involved in autism spectrum disorder focusing on synaptic activity. *Int J Mol Sci*, v. 21, n. 21, p. 8290, nov. 2020.
- MATTA, S. M.; HILL-YARDIN, E. L.; CRACK, P. J. The influence of neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Brain Behav Immun*, v. 79, p. 75-90, jul. 2019.
- MCDOUGLE, C. J.; ERICKSON, C. A.; STIGLER, K. A.; *et al.* Neurochemistry in the pathophysiology of autism. *J Clin Psychiatry*, v. 66, suppl. 10, p. 9-18, 2005.
- MCKNIGHT, C. D.; ROULEAU, R. M.; DONAHUE, M. J.; CLAASSEN, D. O. The regulation of cerebral spinal fluid flow and its relevance to the glymphatic system. *Curr Neurol Neurosci Rep*, v. 20, n. 12, p. 58, 19 out. 2020.
- MIRZA R., SHARMA B. Benefits of Fenofibrate in prenatal valproic acid-induced autism spectrum disorder related phenotype in rats. *Brain Res Bull*. 2019 Apr;147:36-46.
- MISSIG, G.; MCDOUGLE, C. J.; CARLEZON, W. A. Jr. Sleep as a translationally-relevant endpoint in studies of autism spectrum disorder (ASD). *Neuropsychopharmacology*, v. 45, n. 1, p. 90-103, jan. 2020.
- MORAKOTSRIWAN N.; WATTANATHORN J.; KIRISATTAYAKUL W.; CHAISIWAMONGKOL K. Autistic-Like Behaviors, Oxidative Stress Status, and Histopathological Changes in Cerebellum of Valproic Acid Rat Model of Autism Are Improved by the Combined Extract of Purple Rice and Silkworm Pupae. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3206561.
- MOSCONI M.W.; SWEENEY J.A. Sensorimotor dysfunctions as primary features of autism spectrum disorders. *Sci China Life Sci*. 2015 Oct;58(10):1016-23.
- MOTZ, B. A.; ALBERTS, J. R. The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicol Teratol*, v. 27, n. 4, p. 529-533, jul./ago. 2005.
- NÍ GHRÁLAIGH, F.; GALLAGHER, L.; LOPEZ, L. M. Autism spectrum disorder genomics: The progress and potential of genomic technologies. *Genomics*, v. 112, n. 6, p. 5136-5142, nov. 2020.
- NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp Neurol*, v. 299, pt. A, p. 217-227, jan. 2018.
- NYCZ, B.; MANDERA, M. The features of the glymphatic system. *Auton Neurosci*, v. 232, p. 102774, maio 2021.
- OAKLEY, B.; LOTH, E.; MURPHY, D. G. Autism and mood disorders. *Int Rev Psychiatry*, v. 33, n. 3, p. 280-299, maio 2021.

- OCHOA-LUBINOFF, C.; MAKOL, B. A.; DILLON, E. F. Autism in Women. *Neurol Clin*, v. 41, n. 2, p. 381-397, maio 2023.
- ORNOY, A.; ECHEFU, B.; BECKER, M. Valproic Acid in Pregnancy Revisited: Neurobehavioral, Biochemical and Molecular Changes Affecting the Embryo and Fetus in Humans and in Animals: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*, v. 25, n. 1, p. 390, 27 dez. 2023.
- OSTROWSKI, J.; RELIGIONI, U.; GELLERT, B.; SYTNIK-CZETWERTYŃSKI, J.; PINKAS, J. Autism Spectrum Disorders: Etiology, Epidemiology, and Challenges for Public Health. *Med Sci Monit*, v. 30, p. e944161, 4 jun. 2024.
- PACHEVA, I.; IVANOV, I. Targeted Biomedical Treatment for Autism Spectrum Disorders. *Curr Pharm Des*, v. 25, n. 41, p. 4430-4453, 2019.
- PERSICO, A. M.; RICCIARDELLO, A.; CUCINOTTA, F. The psychopharmacology of autism spectrum disorder and Rett syndrome. *Handb Clin Neurol*, v. 165, p. 391-414, 2019.
- PERSICO, A. M.; RICCIARDELLO, A.; LAMBERTI, M.; TURRIZIANI, L.; CUCINOTTA, F.; BROGNA, C.; VITIELLO, B.; ARANGO, C. The pediatric psychopharmacology of autism spectrum disorder: A systematic review - Part I: The past and the present. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 110, p. 110326, 30 ago. 2021.
- PINATO, L.; GALINA SPILLA, C. S.; MARKUS, R. P.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. Dysregulation of Circadian Rhythms in Autism Spectrum Disorders. *Curr Pharm Des*, v. 25, n. 41, p. 4379-4393, 2019.
- QIN, L.; WANG, H.; NING, W. *et al.* New advances in the diagnosis and treatment of autism spectrum disorders. *Eur J Med Res*, v. 29, p. 322, 2024.
- RAJABI, P.; NOORI, A. S.; SARGOLZAEI, J. Autism spectrum disorder and various mechanisms behind it. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 245, p. 173887, dez. 2024.
- RASMUSSEN, M. K.; MESTRE, H.; NEDERGAARD, M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol*, v. 17, n. 11, p. 1016-1024, nov. 2018.
- REID, B.; DANESE, A. Challenges in researching the immune pathways between early life adversity and psychopathology. *Development and Psychopathology*, v. 32, n. 5, p. 1597-1624, 2020.
- REN, H.; LUO, C.; FENG, Y. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids promote amyloid- β clearance from the brain through mediating the function of the glymphatic system. *FASEB J*, v. 31, p. 282-293, 2017.
- RINGSTAD, G.; VATNEHOL, S. A. S.; EIDE, P. K. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Brain*, v. 140, p. 2691-2705, 2017.
- RIZZO R.; PAVONE P. Aripiprazole for the treatment of irritability and aggression in children and adolescents affected by autism spectrum disorders. *Expert Rev Neurother*. 2016 Aug;16(8):867-74.
- ROBINSON-AGRAMONTE, M. L. A. Immune Dysregulation in Autism Spectrum Disorder: What Do We Know about It? *Int J Mol Sci*, v. 23, n. 6, p. 3033, 11 mar. 2022.
- ROGGE, N.; JANSSEN, J. The Economic Costs of Autism Spectrum Disorder: A Literature Review. *J Autism Dev Disord*, v. 49, n. 7, p. 2873-2900, jul. 2019.

- ROSA, M. A.; CRISAFULLI, C. Molecular Pathways within Autism Spectrum Disorder Endophenotypes. *J Mol Neurosci*, v. 71, n. 7, p. 1357-1367, jul. 2021.
- ROSE D.; ASHWOOD P. Potential cytokine biomarkers in autism spectrum disorders. *Biomark Med*. 2014;8(9):1171-81.
- ROULLET, F. I.; WOLLASTON, L.; DECATANZARO, D.; FOSTER, J. A. Behavioral and molecular changes in the mouse in response to prenatal exposure to the anti-epileptic drug valproic acid. *Neuroscience*, v. 170, n. 2, p. 514-522, 13 out. 2010.
- ROY, M.; STRATE, P. Autism Spectrum Disorders in Adulthood-Symptoms, Diagnosis, and Treatment. *Dtsch Arztebl Int*, v. 120, n. 6, p. 87-93, 10 fev. 2023.
- RUHELA, R. K.; SONI, S.; SARMA, P.; PRAKASH, A.; MEDHI, B. Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Ann Neurosci*, v. 26, n. 1, p. 25-31, jan. 2019.
- RUNGE, K. *et al.* Altered cytokine levels in the cerebrospinal fluid of adult patients with autism spectrum disorder. *Journal of Psychiatric Research*, v. 158, p. 134-142, fev. 2023.
- RUPARELIA, K. *et al.* Autism spectrum disorders in Africa: Current challenges in identification, assessment, and treatment: A report on the International Child Neurology Association Meeting on ASD in Africa, Ghana, April 3-5, 2014. *Journal of Child Neurology*, v. 31, p. 1018-1026, 2016.
- SALARI, N. *et al.* The global prevalence of autism spectrum disorder: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Italian Journal of Pediatrics*, v. 48, n. 1, p. 112, 8 jul. 2022. DOI: 10.1186/s13052-022-01310-w.
- SANDHU A. Phosphodiesterase inhibitor, ibudilast alleviates core behavioral and biochemical deficits in the prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Brain Res*. 2023 Sep 15;1815:148443.
- SCAHILL, L. *et al.* Extended-release guanfacine for hyperactivity in children with autism spectrum disorder. *American Journal of Psychiatry*, v. 172, p. 1197-1206, 2015.
- SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, n. 1, p. 80-89, jan. 2005.
- SEALEY, L. A. *et al.* Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environment International*, v. 88, p. 288-298, 2016.
- SEO, M.; ANDERSON, G. Gut-Amygdala interactions in autism spectrum disorders: developmental roles via regulating mitochondria, exosomes, immunity and microRNAs. *Current Pharmaceutical Design*, v. 25, n. 41, p. 4344-4356, 2019.
- SHAPIRO, D.A. *et al.* Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. *Neuropsychopharmacology* 28 (8), 1400–1411.
- SHEKHAR N.; THAKUR A. K. Evaluation of the protective effect of capric acid on behavioral and biochemical alterations in valproic acid-induced model of autism. *Neurochem Int*. 2024 Jul;177:105767.
- SHEN MD. Cerebrospinal fluid and the early brain development of autism. *J Neurodev Disord*. 2018 Dec 13;10(1):39.

- SHEN, Y. *et al.* Bibliometric study of neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Frontiers in Psychiatry*, v. 14, 2023.
- SHOKRI-KOJORI, E. *et al.* β -Amyloid accumulation in the human brain after one night of sleep deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 17, p. 4483-4488, 24 abr. 2018.
- SOARES, V. L. G.; BRITO, L. L. de. Autism in DSM-5-TR, what has changed? *Research, Society and Development*, v. 13, n. 9, p. e9313946866, 2024. DOI: 10.33448/rsd.v13i9.46866.
- SOMMERFELD-KLATTA K.. The Effect of Neuropsychiatric Drugs on the Oxidation-Reduction Balance in Therapy. *Int J Mol Sci*. 2024 Jul 3;25(13):7304.
- SORIA-CHACARTEGUI P. Genetic Polymorphisms Associated With the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Adverse Effects of Olanzapine, Aripiprazole and Risperidone. *Front Pharmacol*. 2021 Jul 14;12:711940.
- SOTGIU, M. A. *et al.* Brain perivascular spaces and autism: clinical and pathogenic implications from an innovative volumetric MRI study. *Frontiers in Neuroscience*, v. 17, 23 jun. 2023.
- STATE, M.; THAPAR, A. Genetics. In: THAPAR, A. *et al.* (Eds.). *Rutter's Child and Adolescent Psychiatry*. 6th ed. Oxford: John Wiley and Sons Limited, 2015.
- STEINMAN, G. The putative etiology and prevention of autism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, v. 173, p. 1-34, 2020.
- TAMOUZA, R. *et al.* HLA polymorphism in regressive and non-regressive autism: a preliminary study. *Autism Research*, v. 13, n. 2, p. 182-186, fev. 2020.
- TAN, Z. *et al.* Potential key pathophysiological participant and treatment target in autism spectrum disorder: Microglia. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 131, p. 103980, dez. 2024.
- TAYLOR, M. J. *et al.* Etiology of autism spectrum disorders and autistic traits over time. *JAMA Psychiatry*, v. 77, n. 9, p. 936-943, 1 set. 2020.
- THAPAR, A.; RUTTER, M. Genetic advances in autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, v. 51, n. 12, p. 4321-4332, dez. 2021.
- THOMAS, S. D. *et al.* Targeting microglia in neuroinflammation: H3 receptor antagonists as a novel therapeutic approach for Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and autism spectrum disorder. *Pharmaceuticals (Basel)*, v. 17, n. 7, p. 831, 25 jun. 2024.
- TONGE, B. J. *et al.* A review of evidence-based early intervention for behavioural problems in children with autism spectrum disorder: the core components of effective programs, child-focused interventions and comprehensive treatment models. *Current Opinion in Psychiatry*, v. 27, p. 158-165, 2014.
- TOSCANO, C. V. A. *et al.* Neuroinflammation in autism spectrum disorders: exercise as a "pharmacological" tool. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 129, p. 63-74, out. 2021.
- UDDIN, M. N. *et al.* Oxidative stress and neuroimmune proteins in a mouse model of autism. *Cell Stress & Chaperones*, v. 28, n. 2, p. 201-217, mar. 2023.

- VARELA F. A. *et al.* Repeated aripiprazole treatment causes dopamine D2 receptor up-regulation and dopamine supersensitivity in young rats. *J Psychopharmacol.* 2014 Apr;28(4):376-86.
- WAGNER G.C. *et al.* A new neurobehavioral model of autism in mice: pre- and postnatal exposure to sodium valproate. *J Autism Dev Disord.* 2006 Aug;36(6):779-93. doi: 10.1007/s10803-006-0117-y. PMID: 16609825.
- WANG, K. *et al.* Classification of common human diseases derived from shared genetic and environmental determinants. *Nature Genetics*, v. 49, n. 9, p. 1319-1325, set. 2017.
- WANG, M. *et al.* Application of multimodal MRI in the early diagnosis of autism spectrum disorders: a review. *Diagnostics (Basel)*, v. 13, n. 19, p. 3027, 22 set. 2023.
- WANG, M. *et al.* Assessment of glymphatic function and white matter integrity in children with autism using multi-parametric MRI and machine learning. *European Radiology*, 23 jan. 2025.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. ICD-10: International statistical classification of diseases and related health problems: tenth revision. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 2004.
- YAN, T. *et al.* Glymphatic dysfunction: a bridge between sleep disturbance and mood disorders. *Frontiers in Psychiatry*, v. 12, p. 658340, 7 maio 2021.
- YANG, E. J. *et al.* Early behavioral abnormalities and perinatal alterations of PTEN/AKT pathway in valproic acid autism model mice. *PLoS One*, v. 11, n. 4, e0153298, 12 abr. 2016.
- YATES, K.; LE COUTEUR, A. Diagnosing autism/autism spectrum disorders. *Paediatrics & Child Health*, v. 26, p. 513-518, 2016.
- YENKOYAN, K.; HARUTYUNYAN, H.; HARUTYUNYAN, A. A certain role of SOD/CAT imbalance in pathogenesis of autism spectrum disorders. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 123, p. 85-95, 1 ago. 2018.
- ZACCARELLI, M. J. *et al.* Neurotoxicidade do nascimento à puberdade em roedores: revisão dos principais agentes tóxicos e suas implicações. *Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento*, v. 20, n. 2, p. 10-63, 2020.
- ZAHEDI E.; SADR S. S.; SANAEIERAD A.; ROGHANI M. Valproate-induced murine autism spectrum disorder is associated with dysfunction of amygdala parvalbumin interneurons and downregulation of AMPK/SIRT1/PGC1 α signaling. *Metab Brain Dis.* 2023 Aug;38(6):2093-2103.
- ZARATE-LOPEZ, D. *et al.* Three decades of valproate: a current model for studying autism spectrum disorder. *Current Neuropharmacology*, v. 22, n. 2, p. 260-289, 2024.
- ZARIMEIDANI, F. *et al.* Gut microbiota and autism spectrum disorder: a neuroinflammatory mediated mechanism of pathogenesis? *Inflammation*, 2 ago. 2024.
- ZEIDAN, J. *et al.* Global prevalence of autism: a systematic review update. *Autism Research*, v. 15, n. 5, p. 778-790, maio 2022.
- ZHAO Q.L. *et al.* Antipsychotic drugs scavenge radiation-induced hydroxyl radicals and intracellular ROS formation, and protect apoptosis in human lymphoma U937 cells. *Free*

Radic Res. 2019 Mar;53(3):304-312. doi: 10.1080/10715762.2019.1572889. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30668194.

ZOU, K. *et al.* Glymphatic system: a gateway for neuroinflammation. *Neural Regeneration Research*, v. 19, n. 12, p. 2661-2672, 1 dez. 2024.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Título do projeto	Avaliação do sistema glinfático em um modelo animal de autismo tratado com aripiprazol
Project title	Evaluation of the glymphatic system in an animal model of autism treated with aripiprazole
Número do protocolo Protocol number	91/2023
Pesquisador principal Principal Investigator	Cinara Ludvig Gonçalves
Pesquisadores Researchers	Amanda Duarte Machado, Ana Cláudia Carminati Medeiros, Eduarda Rezin, Estefania Miranda Borges, Flávia da Silva Darós, Gabriela Miranda Motta, Germano Lapa Viana, Gizela Judith da Silva do Nascimento Neto, Giseli da Silva, José Marcelo Botacin Campos, José Marcelo Botacin Campos, Leonardo Pelegrini, Maiara de Aguiar da Costa, Maria Carolina Marciano Campos de Souza, Maria Fernanda Pedro Ebs de Souza Maria Julia Ferro, Nathan de Souza Colonetti, Renato Faria Santos, Rosiane Ronchi Nascimento Costa, Simone Lespinnasse Araujo, Sofia Januário Bolan, Victória Linden de Rezende,
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/03/2024 a 01/03/2025
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	60 dias / 250-300g
Número de animais	Masculino 63 / Feminino 63
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Idade/Peso	01 dias / 10g
Número de animais	Masculino 168 / Feminino 0
Procedência	Biotério Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 13 de setembro de 2024

Josiane Budni
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA