



Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde
Mestrado e Doutorado - UNISUL

ANDRESSA MANFREDINI SOLIZ ENCINAS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SISTEMA MELATONÉRGICO SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE AUTISMO**

TUBARÃO

2015

ANDRESSA MANFREDINI SOLIZ ENCINAS

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SISTEMA MELATONÉRGICO SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE AUTISMO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^ª . Jucélia Jeremias Fortunato, Dra.

**TUBARÃO
2015**

E46 Encinas, Andressa Manfredini Soliz, 1976-
Avaliação da influência do sistema melatonérgico sobre
parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo
experimental de autismo/ Andressa Manfredini Soliz Encinas;
-- 2015.

87 f. il. ; 30 cm

Orientadora : Jucélia Jeremias Fortunato.
Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa
Catarina, Tubarão, 2015.
Inclui bibliografias.

1. Autismo. 2. Sistema nervoso - Doenças. 3. Estresse
Oxidativo. 4. Ansiedade. I. Fortunato, Jucélia Jeremias. II.
Universidade do Sul de Santa Catarina - Mestrado em Ciências
da Saúde. III. Título.

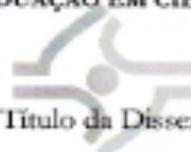
CDD (21. ed.) 616.8982



UNISUL

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

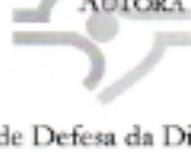


Título da Dissertação

“Influência do sistema metalonérgico sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em um modelo experimental de autismo”.

ANDRESSA MANFREDINI SOLIZ ENCINAS

AUTORA



Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 21 de maio de 2015.



Doutora Jucélia Jeremias Fortunato (orientador)

J. Fortunato

Doutora Éria Cardoso (avaliador externo – IFSC)

E. Cardoso

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (avaliador interno)

F. C. Petronilho

Jefferson Traebert

Professor Doutor Jefferson Traebert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Dedico esse trabalho à toda minha família, em especial ao meu pai, meu maior incentivador, que proporcionou meios para realização de todos meus sonhos. Com todo amor e carinho!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom a mim conferido, pelas oportunidades, por dar-me força, coragem e paciência para jamais desistir dos desafios lançados.

À minha família, meu alicerce, minha base e incentivo em muitos momentos. Em especial a meu pai EneDir (*in memoriam*) que me deixou no meio desta caminhada e minha maravilhosa mãe, Haydê, exemplo de mulher.

Ao meu marido Leonardo pela paciência, apoio e por toda ajuda na execução desse trabalho. À minha filha Maria Fernanda que mesmo tão pequena tentou entender e respeitar o trabalho da mamãe. À vocês dois o meu obrigado coletivo pelas longas horas de ausência dentro e fora de casa.

Agradeço a minha professora, orientadora Prof^ª. Dra. Jucélia Jeremias Fortunato pela paciência, compreensão, apoio nos momentos delicados que passei durante estes dois anos.

Aos professores que atuaram como membros das bancas em que o projeto de pesquisa foi apresentado e qualificado, pelas boas arguições.

Às amigades que fiz durante o mestrado, à Monique, minha colega, amiga e companheira de idas e vindas a Tubarão, pelo apoio e companheirismo. À minha colega Andriele pelo seu alto astral e pela ajuda nas análises bioquímicas. À Drielly minha amiga, também companheira de estrada e de ajuda nas análises bioquímicas e testes comportamentais. A Dra. Marta Gava, Médica Veterinária, na execução das eutanásias e amizade.

Aos integrantes do FICEXP – Transtorno do Espectro do Autismo que me ajudaram no tratamento. Alunos de iniciação científica, meu muito obrigada por toda ajuda e disponibilidade. Meu obrigada em especial para Ana Olívia, Tamires, Tainã, Laís e Camila Orige. Vocês fizeram toda diferença! Aos que chegaram depois, mas também contribuíram no tratamento com os animais, Camila Michalak, Diego e Marina, muito obrigada.

As queridas colaboradoras Silvane e Franciéli pelo profissionalismo e gentileza durante todo mestrado.

Agradeço o apoio financeiro do projeto à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todas as pessoas não mencionadas, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“A paciência é amarga, mas seu fruto é doce.”(Jean Jacques Rousseau)

RESUMO

O transtorno do espectro do autismo (TEA) é uma doença do neurodesenvolvimento com prejuízos na interação social e comportamentos repetitivos e estereotipados. Normalmente, os sintomas aparecem durante os três primeiros anos de vida, com múltiplas etiologias, alta prevalência e gravidade variável. Entre as manifestações clínicas, alterações na qualidade do sono têm sido relatadas com frequência. O sistema melatonérgico que tem como responsável o hormônio melatonina tem como principal função regular o ciclo circadiano. A melatonina e seus análogos tem sido bem sucedidos na regulação do ciclo biológico, sincronizando o ritmo circadiano. Uma análise do potencial farmacológico do sistema melatonérgico através do análogo da melatonina, a agomelatina na dose de (2,5, 10 e 40) mg/kg foi realizada em tratamento crônico por 14 dias consecutivos em animais jovens e adultos utilizando um modelo experimental de autismo. A indução do modelo foi feita em fêmeas prenhes que receberam lipopolissacarídeo (LPS) por via intraperitoneal na dose de 100 µg/kg aos 9,5 dias gestacionais. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do tratamento crônico com agomelatina em parâmetros interação social, estereotipia e parâmetros de estresse oxidativo no córtex pré-frontal, córtex posterior, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos jovens e adultos. Os resultados mostraram que o LPS foi capaz induzir o comportamento autista na prole e a agomelatina foi capaz de reverter a estereotipia e aumentar um parâmetro de interação social nos animais jovens e adultos. Além disso, o tratamento com agomelatina aumentou os níveis de superóxido dismutase em todas as doses testadas. O conjunto desses resultados sugerem que um insulto pré-natal é capaz de interferir no desenvolvimento da prole ao longo prazo e, as alterações comportamentais e a alteração bioquímica sejam amenizadas após tratamento crônico com agomelatina sobre alguns parâmetros.

Descritores: Agomelatina. Ansiedade. Ativação imune materna. Autismo. Estresse oxidativo. Neuroinflamação. Receptores melatonérgicos.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a disease with neurodevelopmental impairments in social interaction and repetitive and stereotyped behaviors. The symptoms usually appear during the first three years of life, with multiple etiologies, a high prevalence and varying severity. Clinical manifestations, changes in sleep quality have been reported frequently. The melatonergic system whose responsibility the hormone melatonin's main regular function the circadian cycle. Melatonin and its análogos has been successful in regulating the biological cycle, synchronizing circadian rhythm. An analysis of the pharmacological potential of the melatonergic system through análogo melatonin, agomelatine in dose (2.5, 10 and 40) mg / kg in the chronic treatment was performed for 14 consecutive days in young and adult animals using an experimental model of autism. The induction of the model was done in pregnant females who received lipopolysaccharide (LPS) by intraperitoneal injection at 100 mg / kg to 9.5 days of gestation. The aim of this study was to evaluate the effect of chronic treatment with agomelatine in social interaction parameters, stereotyping and oxidative stress parameters in the prefrontal cortex, posterior cortex, striatum, hippocampus and cerebellum of young and adult rats. The results showed that the LPS was able to induce autistic behavior in offspring and agomelatine was able to reverse the stereotype and increase a parameter of social interaction in young and adult animals. In addition, treatment with agomelatine increased levels of superoxide dismutase in all tested doses. All these results suggest that prenatal insult can affect the development of offspring over time and, behavioral changes and the biochemical change are ameliorated after chronic treatment with agomelatine on some parameter settings.

Keywords: Agomelatine. Anxiety. Maternal immune activation. Autism. Oxidative stress. Neuroinflammation. Melatonérgics receivers.

LISTAS

Lista de abreviaturas

APA – Associação Americana de Psicologia (do inglês: *American Psychitric Association*)

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

CAT – Catalase

CEUA – Comissão de Ética em Utilização de Animais

CID – Classificação Internacional de Doenças

ERN - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

DNPH – Dinitrofenilhidrazina

DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (do inglês: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)

GA – Grupo Autista

GnA – Grupo não Autista

G1 – Grupo de matrizes com LPS

G2 - Grupo de matrizes com veículo

GD – Dia de Gestação

HEC – Hidroxietilcelulose

HPA - Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

LPS – Lipopolissacarídeo

μ g – Micrograma

MDA - Malondialdeído

MIA – Morte Indolor Assistida

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NaCl – Cloreto de Sódio

NIH – Instituto Nacional da Saúde (do inglês: *National Institutes of Health*)

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PN - Pós-Nascimento
QI - Quociente de Inteligência
SOD – Superóxido Dismutase
SPSS – Pacote Estatístico para Saúde (do inglês: *Statistical Package for the Sciences*)
TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)
TCA – Ácido Tricloroacético
TEA – Transtorno do Espectro Autista
TID – Transtorno Invasivo do Desenvolvimento
TLR – receptor Toll-like (do inglês: *Toll-like receptor*)
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
UNISUL – Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de quadros

Quadro 1 - Descrição dos grupos experimentais: Grupo não Autista (GnA) e Grupo Autista (GA).....	36
Quadro 2 - Resultados da Interação social após administração crônica de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg com média \pm erro padrão para GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. <i>Student</i>).	58
Quadro 3 - Efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40) mg/kg sobre os parâmetros comportamentais com +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. <i>Student</i>).....	59

Lista de figuras

Figura 1 - Efeito pleotrófico da melatonina.....	26
Figura 2 - Ação da agomelatina frente injúria com LPS pré-natal.....	31
Figura 3 - Mecanismo de ação e propriedade terapêutica da agomelatina.	32
Figura 4 - Diagrama esquemático com as etapas do delineamento experimental referente ao tratamento crônico com agomelatina em animais jovens.	38
Figura 5 - Diagrama esquemático com as etapas do delineamento experimental referente ao tratamento crônico com agomelatina em animais adultos.....	39

Figura 6 - Quantidade de ocorrências de movimentos estereotipados (<i>grooming</i>). .	46
Figura 7- Tempo de ocorrências de movimentos estereotipados (<i>grooming</i>).....	46
Figura 8 – Efeito da agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre o número de <i>crossing</i>	48
Figura 9 - Efeito da agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre o número de episódios de <i>crossing</i>	49
Figura 10 - Efeito da agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre o número de episódios de <i>rearing</i>	50
Figura 11 - Efeito da agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre o número de episódios de <i>rearing</i>	51
Figura 12 - Efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre o número de visitas ao centro.....	52
Figura 13 - Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre o número de visitas ao centro.....	53
Figura 14 – Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre a quantidade de <i>grooming</i>	54
Figura 15 - Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre o tempo de ocorrências de <i>grooming</i>	55
Figura 16 - Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre a quantidade de <i>grooming</i>	56
Figura 17 - Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre tempo de ocorrências de <i>grooming</i>	57
Figura 18 - Medida de substâncias reativas ao TBARS no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg.....	60
Figura 19 - Medida de dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg.....	61
Figura 20 - Medida de atividade da catalase (CAT) no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg.....	62
Figura 21 - Medida da atividade superóxido dismutase (SOD).....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 TRANTORNO DO ESPECTRO AUTISTA	17
1.2 NEUROINFLAMAÇÃO E O AUTISMO	20
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E O AUTISMO	23
1.4 SISTEMA MELATONÉRGICO E O AUTISMO	25
1.5 AGOMELATINA	28
2. OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. MÉTODOS	34
3.1 TIPO DE ESTUDO	34
3.2 APECTOS ÉTICOS	34
3.3 MODELO ANIMAL DE AUTISMO	34
3.4 MEDICAMENTOS E SOLUÇÕES	35
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
3.6 TRATAMENTO CRÔNICO	37
3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS	40
3.7.1 Testes de interação social e estereotipia	40
3.7.2 Teste do Campo Aberto (<i>Open Field</i>)	40
3.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	41
3.8.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	41
3.8.2 Medida do dano oxidativo em proteínas	42
3.8.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)	43
3.8.4 Dosagem de proteínas	44
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4. RESULTADOS	45
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS	45
4.1.1 Efeito da administração pré-natal de LPS em número de episódios e tempo de <i>grooming</i>	45
4.1.2 Avaliação da atividade locomotora e movimentos de auto-limpeza em Campo Aberto	47

4.1.3 Avaliação de parâmetros de interação social após o tratamento com agomelatina	57
4.1.4 Descrição geral dos parâmetros comportamentais avaliados a partir do tratamento crônico com agomelatina.	59
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	60
4.2.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	60
4.2.2 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil	61
4.2.3 Atividade da Catalase (CAT)	62
4.2.4 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	63
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO.....	87
ANEXO A- PARECER COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	87

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) tem sido descrito como um importante transtorno neurológico, cujas manifestações variam em grau de severidade ¹⁻⁴. O diagnóstico é clínico, baseado em instrumentos padronizados seguindo os critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ⁵ e revistos na quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), da Associação Americana de Psiquiatria (APA)².

Estudos têm apontado para alta prevalência devido a um maior reconhecimento sobre o transtorno e uma ampliação nos critérios diagnósticos ⁶⁻⁸. No Brasil, a Defensoria Pública do Estado de São Paulo relatou haver cerca de 250 pedidos de atendimento integrado à Saúde da pessoa portadora do TEA ⁹. Atualmente, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a prevalência aponta 1 em 68 crianças com diagnóstico de TEA nos Estados Unidos ¹⁰. Somado ao fato de ser um distúrbio de alta prevalência, até hoje não existe um tratamento eficaz para o TEA ¹¹.

Várias linhas de investigação têm demonstrado que fatores genéticos como alterações em cromossomos, fatores ambientais como neuroinflamação, presença de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, desordens bioquímicas e infecções pré-natais foram apontados como capazes de prejudicar o cérebro em desenvolvimento, levando a desordens neuropsiquiátricas ¹²⁻¹⁴ que tendem a influenciar o curso de alterações nos circuitos neurais, que podem desencadear o TEA ¹⁵⁻¹⁷.

Devido a diversificação no diagnóstico clínico e nenhum dos aspectos serem exclusivos desse transtorno, seu diagnóstico além da observação clínica, requerem minuciosas avaliações neuropsicológicas e exames complementares (como estudos de cromossomos e neuroimagem)¹⁸. As características neurológicas do TEA podem abranger mudanças estruturais do encéfalo, incluindo anormalidades nos lobos cerebrais frontal e temporal e cerebelo (relacionado à disfunção das células de Purkinje)^{19,20}. Anormalidades inflamatórias, neuroquímicas e bioquímicas, ^{21,22} também têm sido apontadas como tentativas para esclarecer os mecanismos e os fatores de risco associados com TEA²³. Além disso, alguns estudos também têm discutido a influência dos distúrbios do sono nas funções. ²⁴⁻²⁹ Os distúrbios do sono

aparecem em 44 a 83% dos casos de TEA ^{30,31} e, são importantes na medida em que se associam a outras comorbidades clínicas como: hiperatividade, epilepsia, alterações de humor, ansiedade ³² e, ainda interesses restritos e comportamentos repetitivos ^{33,34}.

Normalmente, crianças autistas apresentam padrão imaturo de sono, alteração da estrutura do sono não compatível com idade cronológica, insônia e despertar precoce ^{35,40}. O sistema melatonérgico é o responsável por regular o processo do ritmo circadiano, incluindo a regulação fisiológica do ciclo sono/vigília e do humor ³⁹. A melatonina, principal hormônio desse sistema, exerce suas ações através dos receptores MT1/MT2 que pertencem à família de receptores acoplados à proteína G ^{41,42}. Uma vez que regula muitas ações cronobiológicas e é, em particular, responsável pela mudança de fase circadiana, a melatonina possui funções biológicas relevantes como modulação do sistema imune (incluindo propriedades anti-inflamatórias) ⁴³. A expressão de ambos os receptores MT1 e MT2, também tem sido relatada em neurônios e células gliais do córtex, tálamo, córtex cerebelar e também são expressos na glândula pineal ^{44,45}. No entanto, os mecanismos que envolvem as alterações da melatonina como marcador de susceptibilidade de TEA ainda parecem incertos ⁴⁶.

Estudos têm demonstrado que um potente análogo da melatonina tem sido capaz de restaurar os padrões de sono/vigília. A agomelatina é o único entre os antidepressivos na modulação ritmos circadianos ⁴⁷. Seu mecanismo de ação destaca-se por ser diferenciado em propriedades antidepressivas e ansiolíticas resultante do sinergismo dos receptores melatonérgicos e serotoninérgicos, em particular o receptor 5-HT_{2C} ⁴⁸. Em estudos experimentais e clínicos demonstrou-se que esta ação traduz-se em benefícios farmacológicos ^{49,51}, incluindo efeito antidepressivo ⁵²⁻⁵⁷. Isso deve-se ao fato de que a agomelatina possui exclusivamente propriedades antagonistas do receptor 5-HT_{2C}, conferindo uma vantagem terapêutica sobre a melatonina, que não é eficaz em pacientes deprimidos ⁵⁸. Já sua ação ansiolítica mostrou um efeito revertendo a ansiedade em teste do labirinto de cruz elevado através da ativação dos receptores melatonérgicos MT₁/MT₂ em sinergia com bloqueio de 5-HT_{2C} ^{59,60}. Assim, quando se liga fortemente a esses receptores, estimula e melhora as propriedades cognitivas demonstrada em estudos pré-clínicos ^{61,62}.

A agomelatina também reverteu as alterações neuroplásticas e comportamentais associadas a alterações do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em um estudo experimental com ratos transgênicos.⁶³ Em tratamento crônico reverteu a redução da neurogênese induzida no hipocampo ventral de ratos em modelo de estresse⁵⁹, assim como aumentou a proliferação de células do hipocampo em ratos expostos ao mesmo modelo de tratamento crônico⁶⁴. Sua administração crônica elevou a expressão de RNA mensageiro⁶⁵ e de fator neurotrópico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo, ocupando papel-chave nos efeitos comportamentais em tratamento de transtornos do humor⁶⁶. A agomelatina também reduziu citocinas pró-inflamatórias em tratamento crônico induzido por estresse pré-natal⁵⁵.

Sabe-se que há uma crescente evidência da relação do estresse oxidativo com o autismo^{15,16,23}, neste caso, partimos da premissa que a neuroinflamação possa estar envolvida na etiologia do transtorno. O estresse oxidativo seria o mecanismo sugerido resultante da interação de todos os fatores de risco associados ao TEA como fatores genéticos, ambientais, comportamentais, imunológicos. A agomelatina também apresentou ações antioxidantes em alguns estudos como no modelo experimental de convulsão por pilocarpina, sugerindo a agomelatina a condição de possuir alguma atividade antioxidante⁶⁷. Em outro estudo de modelo experimental a agomelatina atenuou significativamente a locomoção prejudicada, coordenação motora e aprendizagem de memória e na estrutura do estriado, houve uma deficiência bioquímica com diminuição do estresse oxidativo pela diminuição da peroxidação lipídica e aumento das enzimas SOD e CAT⁶⁸.

Considerando que evidências apontam para relação entre uma condição imune materna alterada e o desenvolvimento do TEA, é possível que a agomelatina através de suas ações psicotrópicas sobre o humor e estados ansiosos possa exercer efeitos farmacológicos benéficos a sintomatologia autista. Uma vez que uma variedade de modelos experimentais que baseiam-se na interação sinérgica do receptor melatolérgico MT₁ e MT₂ que, confere a restauração do ciclo circadiano e, seu antagonismo de receptor serotoninérgico 5-HT_{2A}, que a coloca sobre vantagens à outros fármacos como a melatonina e o ramelteon. Essa ação antagonista exclusiva da agomelatina que não interage com os alvos clássicos de fármacos antidepressivos, ou seja, Monoanina oxidadese (MAO) e os transportadores da recaptção da 5-HT, noradrenalina (NA) ou dopamina (DA). Por essa razão não

possui afinidade com receptores monoamínicos, adrenérgicos, muscarínicos. A agomelatina traz um diferencial por possuir menos efeitos adversos gastrointestinais e menos alterações do sono, efeitos comuns em indivíduos com TEA. Esses achados comprovados em estudos experimentais somados a sua eficácia comprovada em estudos clínicos randomizados e controlados com placebo, alia nossa hipótese de que a agomelatina possa trazer resultados positivos nos testes comportamentais de estereotipia e interação social em animais com comportamento autista.

1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

A denominação “autismo” foi utilizada pela primeira vez pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler, em 1911, para caracterizar pacientes com perda do contato com a realidade, prejudicando ou até mesmo impossibilitando sua comunicação^{18,69}. A Síndrome do Autismo foi conceituada pela primeira vez por Leo Kanner, em 1943, a partir da observação de um grupo de crianças que apresentavam características como movimentos repetitivos e estereotipado antes dos três anos de idade⁷⁰. Em 1944, Hans Asperger descreveu um grupo de crianças com alterações na interação social similares aos do autismo⁷¹. Mesmo com diversos estudos feitos após as definições de Kanner, somente em 1980 com a publicação da terceira edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-III), da Associação Americana de Psiquiatria (APA) que o autismo foi classificado como um Transtorno Invasivo do Desenvolvimento (TID), distinguindo-se então da esquizofrenia⁷², pois crianças com autismo não desenvolviam alucinações, característica comum na esquizofrenia⁷³.

Por décadas, os pesquisadores tentaram classificar a heterogeneidade do TEA^{74,75}. O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, em sua 4ª edição (DSM-IV), utilizou um sistema multi-categórico do diagnóstico de TID, que incluía o transtorno autista, transtorno de Asperger, transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação, transtorno desintegrativo da infância e transtorno de Rett^{76,77}. Em maio de 2013, a quinta edição do DSM (DSM-V) veio substituir o sistema de multi-categórico com uma única dimensão de diagnóstico: Transtorno do Espectro Autista (TEA)⁷⁸.

Com o advento dessa última edição do DSM, o TEA passou a ser reconhecido como um distúrbio neurobiológico e com o diagnóstico realizado através de avaliação clínica e observação comportamental a partir de dois critérios: déficits da comunicação-social e comportamentos e interesses restritos e repetitivos, sem exigência de início de idade ^{79,80}.

Segundo estudo de Huerta e colaboradores (2012), mais de 90% das crianças com TIDs definidos no DSM-IV foram identificados pelos critérios estabelecidos no DSM-V e ainda, a especificidade utilizando os novos critérios de diagnóstico foi melhorado substancialmente em comparação à edição anterior ⁸¹. Portanto, a então conhecida “tríade de prejuízos mentais”, sugerida por Gould e Wing em 1982, na qual englobava os critérios para diagnóstico como desafios de linguagem, déficits sociais e comportamentos estereotipados ficou em desuso com a exclusão do atraso de linguagem ⁸². O DSM-V concorda que um indivíduo deve apresentar sintomas desde o início da infância, mesmo que esses sintomas não sejam reconhecidos mais tarde. Esta mudança de critérios incentiva o diagnóstico precoce de TEA ⁸¹.

Em termos comportamentais, o TEA manifesta-se durante os primeiros anos de vida ⁸³, mas o diagnóstico clínico não é normalmente alcançado antes dos 3 anos de idade ^{84,85}. Dificuldades de aprendizagem também são observadas em indivíduos autistas. Essas dificuldades podem ser graves, presentes na interação social (ausência de reciprocidade afetiva e pobreza de comportamentos e formas de comunicação não verbais como linguagem gestual, contato visual, expressão facial, entre outros), padrões de comportamentos e interesses restritos (movimentos repetitivos ou estereotipados, preocupação excessiva com partes ou características não funcionais de objetos ou rotinas, preocupação exclusiva por um tema restrito) e ainda pobreza do pensamento abstrato de tipo simbólico e imaginativo ^{2,86}.

Conforme pesquisa recente do governo do Estados Unidos, os casos de autismo subiram para 1 em cada 68 crianças com idade em média de 8 anos, o equivalente a 1,47%. Esse número foi aferido pelo Centro de Controle e Prevenção de doenças e os dados são referentes a 2010 e foram divulgados em março de 2014 ^{87,88}. No Brasil, a taxa de prevalência da doença é de 27,2 para cada 10 mil habitantes com idade entre 5 e 18 anos ⁶. Os trabalhos voltados para o campo científico sobre o TEA indica uma necessidade cada vez maior de pesquisas com desenhos metodológicos mais complexos que permitam resultados mais ousados,

para o estabelecimento de taxas de prevalência na população brasileira. Segundo base de dados das Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAIE), da Associação de Amigos dos Autistas (AMA) e da Fundação Catarinense de Educação Especial (FCEE) a prevalência encontrada no Estado de Santa Catarina é de 1,31 para cada 10.000 habitantes ^{89,90}.

Algumas preocupações sobre o aparente aumento na frequência de diagnóstico de TEA avaliado na década passada levou pesquisadores a cogitarem a possibilidade da "Epidemia de Autismo" ⁹¹. De modo geral, o número de pessoas diagnosticadas mundialmente com transtorno é crescente, o que não indica, necessariamente, o aumento da sua prevalência. Esse fato pode ser explicado pela maior sensibilização da população para o transtorno, desencadeando maior frequência de encaminhamentos de crianças com comportamento anormal, expansão dos critérios diagnósticos, pelo incremento dos serviços de saúde relacionados ao transtorno e pela mudança na idade do diagnóstico, averiguação mais completa de casos em estudos epidemiológicos dentre outros fatores ^{92,93}.

A etiologia do TEA e sua base molecular ainda não estão bem compreendidas. É consensual que a interação entre fatores genéticos e ambientais seja apontada como condição merecedora de atenção ^{16,94}. As regiões encefálicas que podem estar envolvidas no comprometimento do transtorno autista são as estruturas do sistema límbico ⁹⁵ e o cerebelo ⁹⁶. Estudos envolvendo animais com lesões nas amígdalas e no hipocampo apontaram alterações na interação social, sugerindo um comportamento autista ⁹⁷. Alterações encontradas no córtex pré-frontal e no lobo temporal medial em outro estudo animal, afetaram a cognição social, mais especificamente a habilidade de manter atenção ⁹⁸.

É possível que a ativação microglial presente no cérebro de indivíduos com TEA possa alterar o desenvolvimento das vias fetais em resposta a fatores genéticos ou ambientais, como injúrias no período pré-natal porém, não se sabe se um desequilíbrio de uma citocina embrionária desencadearia tais desregulações imunes no cérebro já adulto e como esse estado imune alterado é estabelecido ²³.

O eixo HPA também mostrou-se modificado em indivíduos com TEA. ^{99,100} Foi encontrado maior concentração de cortisol na saliva de algumas crianças autistas ¹⁰¹ e níveis elevados de hormônio adrenocorticotrópico em adultos com a síndrome de Asperger. ¹⁰² Além disso, estudos clínicos mostraram anormalidades

imunes periféricas¹⁰³ na ativação de neuroglia¹⁰⁴ e no líquido de pacientes autistas entre 4 e 45 de idade^{23,105}.

Entendemos que processos infecciosos pré-natais como possíveis indutores do TEA, sem ignorar a influência que os fatores genéticos que ocorrem em muitos casos, pode contribuir a entender a razão da alta incidência de casos diagnosticados, já que qualquer indivíduo pode estar susceptível a infecções ao longo da vida, especialmente gestantes, que temporariamente apresentam seus sistemas imunológicos modificados. A possibilidade dos processos infecciosos pré-natais poderem ser responsáveis por doenças do neurodesenvolvimento como o TEA é um assunto que vem ganhando cada vez mais espaço em publicações por meios de estudos pré-clínicos e clínicos¹⁰⁶⁻¹¹⁰.

1.2 NEUROINFLAMAÇÃO E O AUTISMO

Evidências crescentes nos últimos anos têm apontado que a inflamação do Sistema Nervoso Central (SNC) possa estar envolvida na patogênese de doenças neuropsiquiátricas^{111,112}. Sabe-se que o sistema imunológico desempenha um papel importante nos primeiros passos na fisiologia da neuroinflamação de doenças psiquiátricas¹¹³. Essas evidências direcionam para uma disfunção imunológica com marcadores de inflamação identificados no encéfalo dos pacientes com TEA como TNF, IL-6, IL-1 β ¹¹¹. A resposta imune desregulada, acompanhada pelo aumento do estresse oxidativo, o metabolismo mitocondrial anormal e metabolismo lipídico prejudicado, aparentemente representa a base molecular comum de certos transtornos do desenvolvimento neurológico entre os quais está o TEA^{114,115}.

Estudos nos últimos cinco anos demonstraram alterações imunológicas em indivíduos com TEA e uma série deles têm relatado anormalidades nas citocinas no sangue periférico desses indivíduos¹¹⁶⁻¹¹⁹. Embora seu importante papel na regulação da resposta imune inflamatória, há evidências, a partir de estudos *in vitro*, que as citocinas modulam processos normais de desenvolvimento, tais proliferação, diferenciação, sobrevivência, crescimento de neurônios e sinaptogênese¹²⁰. Amostras de estruturas encefálicas de indivíduos com TEA exibiram sinais de neuroinflamação, incluindo a ativação de micróglia, astrócitos e aumento dos níveis sanguíneos de citocinas pró-inflamatórias¹⁰⁸. Dada a capacidade de citocinas em afetar os processos de desenvolvimento do SNC, a presença de moléculas

inflamatórias no encéfalo fetal pode afetar adversamente a sobrevivência neuronal¹²¹.

As infecções maternas, tanto de origem viral como bacteriana, têm sido associadas com o desenvolvimento comprometido na prole em modelos experimentais de TEA^{121,122}. Evidências em torno do envolvimento do ambiente pré-natal mostraram que injúrias para o feto durante a fase inicial do desenvolvimento podem comprometer a estrutura encefálica alterando suas funções e podendo agir como um dos fatores de risco para transtornos ao longo da vida¹²³. A ativação imune materna em modelo animal tem sido bastante usada para estudar doenças do neurodesenvolvimento que envolvam mudanças comportamentais, especialmente dentro dos domínios de função sensoriomotor, de exploração e em comportamentos sociais^{111,124}.

Dentre os modelos animais de autismo há o modelo de infecção pré-natal que propõe mimetizar uma infecção bacteriana a partir da administração intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea de lipopolissacarídeo (LPS) em roedores^{110,125}. O LPS utilizado origina-se de um complexo de lipídio-polissacarídeo liberado a partir da parede celular externa de bactérias gram-negativas que se liga ao receptor semelhante a Toll 4¹²⁵⁻¹²⁷.

Os receptores do tipo Toll ou (TLR: *toll-like receptor*) são uma família de proteínas transmembrânicas de tipo I que formam uma parte do sistema imunológico inato. Ficam localizados na membrana celular que possuem a capacidade de identificar os PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Patterns*) que são moléculas existentes em bactérias e vírus que estimulam a resposta inflamatória após serem identificadas pelos receptores TLR. Os PAMPs estão associados à patógenos cujo principal exemplo é o LPS^{128,129}. A interação entre os receptores Toll-like e um dos PAMPs dá início a resposta inflamatória expressa na superfície de certos tipos de células¹³⁰. Os TLRs intercedem o reconhecimento de microrganismos, regulam a ativação da resposta imune inata e influenciam a formação da imunidade adaptativa. Também podem ativar a via de NF-κB (Fator nuclear kappa), que regulam a expressão de citocinas. O NF-κB é um fator de transcrição que foi identificado como um fator nuclear necessário para a transcrição da cadeia leve de imunoglobulinas nas células B. Por seguinte, verificou-se que o NF-κB é expresso em uma grande variabilidade de tipos celulares, regulando a produção de várias citocinas.¹³¹⁻¹³³ Cada membro da família NF-κB desempenha um papel importante

na resposta mediada pelo LPS. NF- κ B conduz a iniciação da resposta adaptativa imune pela produção de citocinas inflamatórias tais como a IL-1, IL-6, IL-12, TFN- α ^{134,135}.

O TLR4 pode se ligar à duas proteínas adaptadoras distintas: o MyD88, que é recrutado pelo “*Toll-IL-1 receptor (TIR)-domain containing adapter protein*” (TIRAP – também chamado de Mal) e leva a produção de citocinas pró-inflamatórias; e “*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* ” (TRIF), que é recrutado pelo adaptador “*TRIF-like receptor adaptor molecule*” (TRAM) e ativa a produção de interferons tipo I, bem como de citocinas pró-inflamatórias¹³⁶. O TLR4 é expresso principalmente em monócitos, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Após a ativação do TLR4 pelo seu ligante, os macrófagos podem se tornar células efetoras que liberam citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas do oxigênio (EROS) para eliminar os antígenos estranhos^{137,138}.

Sabe-se que as células imunitárias têm o potencial de afetar a resposta imune e o desenvolvimento neuropsicomotor, provocando alterações nos monócitos/macrófagos e células NK em indivíduos com TEA¹²⁷. Alguns grupos de crianças autistas têm demonstrado aumento do número de monócitos. Esses monócitos foram capazes de produzir significativamente mais IL-1 β em resposta à estimulação de outro receptor do tipo Toll-like, o TLR-2. Os monócitos de indivíduos com TEA também foram exibidos para expressar produção aumentada de IL-1 β em resposta à estimulação do receptor TLR4 pelo LPS, sugerindo aumento na produção de citocinas pró-inflamatória, de células da linhagem monócito.¹³⁹ Em um estudo experimental¹⁴⁰, o LPS foi administrado em vacas prenhes para mimetizar as ações imuno-estimulantes de infecções bacterianas ou virais *in vivo*. A ativação resultante do fator de transcrição NF- κ B induziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias. O LPS materno não foi detectado no feto. Em vez disso, o LPS aumentou a expressão do RNAm da citocina pró-inflamatória no soro materno, fluido amniótico e placenta¹⁴⁰. Esses efeitos causados pelo LPS provocaram alterações genéticas no cérebro fetal. E, além das alterações citadas anteriormente, demonstrou-se mudanças estruturais e desenvolvimento neural alterado no córtex cerebral de ratos no 18° GD (dia de gestação)¹¹⁰ já quando foi administrado no 15° e 16° GD observou-se que a inflamação provocou danos à placenta, morte fetal e comprometimento neurológico da prole que sobreviveu¹⁴¹.

Considerando que doenças neuroinflamatórias crônicas e alterações no sistema imunológico têm sido encontradas em crianças e adultos com TEA¹⁴² e que os mecanismos exatos pelos quais a resposta imune interrompe o desenvolvimento neurológico do feto, resultando em alterações de comportamento permanecem obscuros, acredita-se que a infecção pré-natal induzida pelo LPS e a ação da cascata inflamatória possam ser responsáveis pelo desenvolvimento alterado encefálico fetal.

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E O AUTISMO

O estresse oxidativo permanece como um dos principais fatores associados à fisiologia de muitas doenças neuropsiquiátricas, sugerindo desempenhar papel-chave no desencadeamento do TEA¹⁴³. O estresse oxidativo é causado quando há produção exacerbada de EROs, ou seja, quando o equilíbrio é quebrado devido à depleção de antioxidantes e/ou aumento da formação de agentes pró-oxidantes além da capacidade das defesas antioxidantes¹⁴⁴.

Uma das principais fontes celulares de EROs é a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial representada pelo seus principais componentes o superóxido (O_2^-) que sofre dismutação que forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que proporciona como fonte geradora desses agentes tóxicos¹⁴⁵. Em condições normais, sistemas de defesa antioxidante podem atuar antes que ocorra a lesão causada pela ação dos radicais livres ou espécies não radicais, por meio da ação da glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase(SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GSH-Px). A SOD, presente em quase todas as células, é considerada a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio e catalisa a conversão do O_2^- em H_2O_2 e oxigênio¹⁴⁶. Já em presença a uma infecção o encéfalo é capaz de “preparar” uma resposta inflamatória baseada em ativação microglial, invasão local de células imunológicas circulantes e produção de EROs¹⁴⁷.

Neste contexto, surgem os biomarcadores, utilizados a fim de avaliar o balanço redox para análise dos danos causados pelo estresse oxidativo em uma infecção e com a finalidade de avaliar a deficiência das defesas antioxidantes. Os principais biomarcadores de estresse oxidativo são: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (avaliam os danos em componentes celulares e estruturas lipídicas), compostos carbonílicos e sulfidrílicos (mensuram o dano nas proteínas),

atividade das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), medida de glutathione reduzida (GSH) e métodos fluorescentes como o diclorodihidrofluoresceínadiacetato (DCFH-DA) ¹⁴⁸.

O encéfalo é um órgão sensível ao estresse oxidativo, uma vez que o SNC apresenta um elevado consumo de oxigênio em consequência do alto consumo de trifosfato de adenosina (ATP), podendo resultar em um aumento na produção de radicais O_2^- , além da presença de neurotransmissores auto oxidáveis, membrana neuronal rica em ácidos graxos poliinsaturados, alto conteúdo de ferro e uma modesta defesa antioxidante. A geração exacerbada de EROs durante um processo inflamatório compromete as funções celulares bem como a sua sobrevivência ¹⁴⁹.

Neste sentido, existem evidências sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de várias doenças psiquiátricas e neurológicas, ¹⁴⁸ incluindo o TEA. Estudos post-mortem revelaram que áreas encefálicas afetadas por indivíduos diagnosticados com TEA apresentaram morte celular acelerada em condições de estresse oxidativo ¹⁵⁰. Um estudo descreveu que as regiões encefálicas com os mais altos níveis do marcador de estresse oxidativo foram: o córtex orbito frontal, a área de Wernicke e o hemisfério cerebelar (áreas do encéfalo associadas com o processamento da fala, coordenação motora e sensorial, comportamento emocional e social e memória, respectivamente) em indivíduos diagnosticados com TEA ¹⁵¹. O malondialdeído (MDA) é o produto final da peroxidação, sendo utilizado como um marcador para a peroxidação lipídica, encontrado em nível elevado, quando verificado por reação ao ácido tiobarbitúrico em indivíduos com TEA ¹⁵⁰. Diversas enzimas antioxidantes como a CAT, SOD e a GPx catalisam reações para neutralizar EROs formando os mecanismos de defesa endógena, entretanto, estudos têm demonstrado a diminuição dos níveis de enzimas antioxidantes no plasma de crianças autistas ¹⁵².

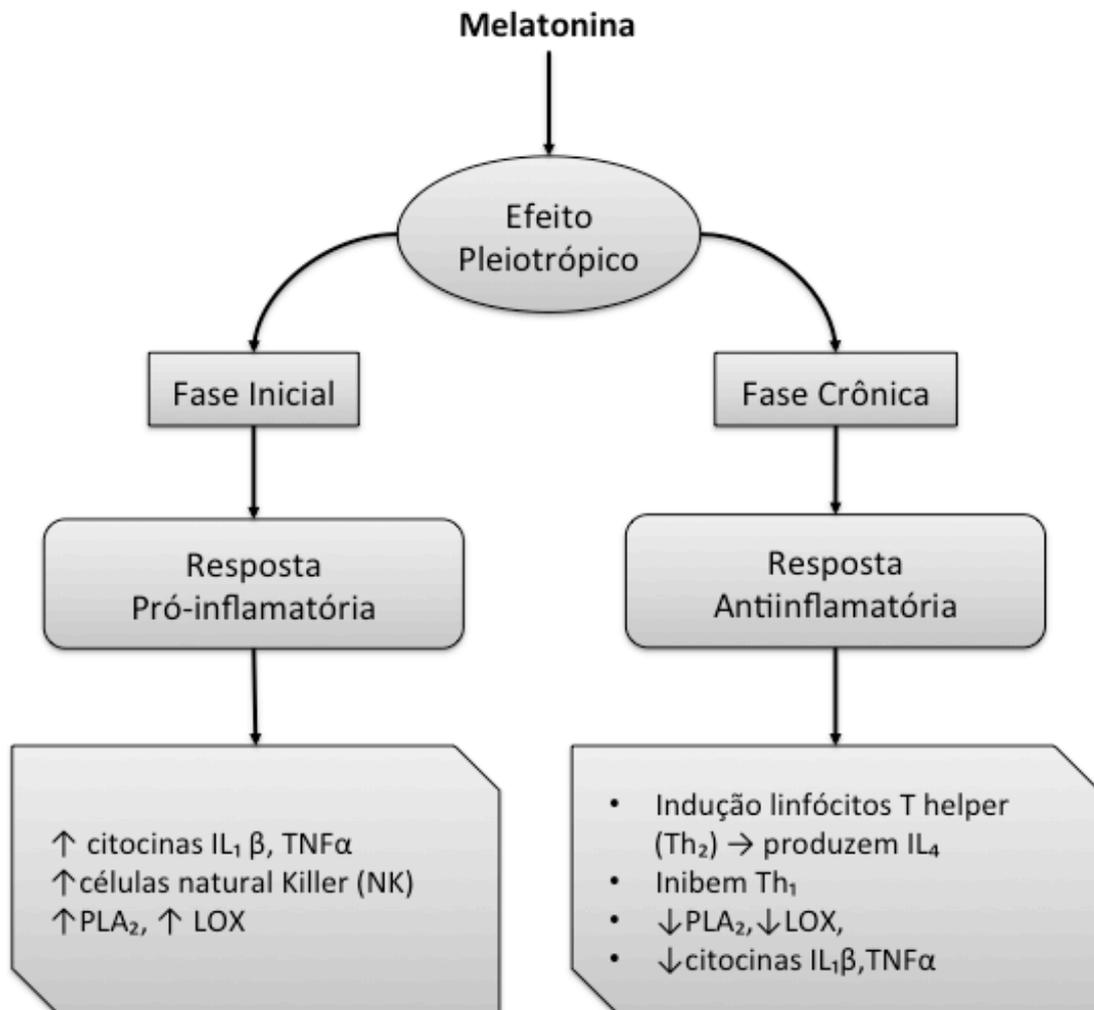
Desta forma, alterações nas atividades de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT, aliada a uma interação entre fatores genéticos, ambientais, e fatores imunológicos poderiam estar envolvidas no TEA, sendo o estresse oxidativo o mecanismo de ligação entre tais fatores. O mecanismo de ação exato de como uma infecção pré-natal que poderia resultar em alterações em longo prazo no SNC relacionadas ao TEA ainda não é completamente preciso, porém evidências demonstram que a peroxidação lipídica e o dano em proteínas resultante de um

processo de estresse oxidativo em células neuronais possam representar um marcador de susceptibilidade deste transtorno.

1.4 SISTEMA MELATONÉRGICO E O AUTISMO

A melatonina (N-acetil-metoxitriptamina) – um metabólito do triptofano é um hormônio sintetizado normalmente pela glândula pineal que se localiza no núcleo supraquiasmático do hipotálamo e atua no controle do sistema oscilatório endócrino de mamíferos ¹⁵³. A melatonina também regula processos inflamatórios e imunológicos que atuam tanto como um ativador ou como um inibidor destas respostas e ainda é considerada uma molécula pleiotrópica (pode atuar sobre tipos celulares diferentes) que pode agir em diferentes etapas do processo inflamatório. Na fase inicial ela exerce um papel pró-inflamatório ativando mediadores como fosfolipase (PLA2), lipoxigenase (LOX) e citocinas. Quando o processo inflamatório evolui para fase crônica, apresenta um efeito contrário, modulando negativamente os mediadores PLA2, LOX e citocinas, induzindo nos leucócitos uma via de sobrevivência e atuando como antioxidante ⁴³ (Figura 1).

Figura 1 - Efeito pleiotrófico da melatonina.



A síntese de melatonina em mamíferos, que é deflagrada na fase de escuro, depende de uma ativação do sistema nervoso autônomo na sua divisão simpática e a consequente liberação de noradrenalina pelos terminais que inervam a glândula¹⁵³. A noradrenalina, interagindo com os receptores pós-sinápticos dos tipos β1 e α1-adrenérgicos presentes nos pinealócitos, desencadeia uma série de eventos bioquímicos intracelulares que levam à síntese de melatonina, através de uma via bioquímica que começa com o triptofano passando por 5-hidroxitriptofano, serotonina, N-acetilserotonina e, finalmente, melatonina¹⁵⁴. Nos mamíferos, a melatonina interage central e periféricamente através de receptores do tipo 1 e tipo 2 denominados MT1 e MT2^{37,41}. Estes receptores estão presentes em muito tecidos e células, incluindo o NSQ e podem induzir efeitos biológicos quando acoplados a proteína G^{26,41}.

A melatonina participa da regulação de diversos eixos neuroendócrinos que tem importantes funções fisiológicas. Na periferia, a melatonina é um captador de radicais livres e um antioxidante eficaz,^{26,155} desempenha um papel essencial em ritmos de reprodução de animais sazonais, agindo na adenohipófise onde o receptor de melatonina é altamente expresso¹⁵⁵. Centralmente, a melatonina age diretamente sobre o NSQ no hipocampo através do receptor MT1 e modula a função de relógio¹⁵⁶. Já o receptor MT2 foi encontrado principalmente no hipocampo e retina⁴¹. A expressão de ambos os receptores MT1 e MT2, também tem sido relatada em neurônios, células da glia, células do córtex, tálamo, córtex cerebelar e na glândula pineal¹⁵⁷. A sinalização melatonérgica no receptor MT2 no hipocampo tem sido descrita por afetar substancialmente o comportamento cognitivo em estudos pré-clínicos. Em um desses estudos, camundongos para o gene MT2 foram encontrados com um pior desempenho no teste de investigação de habilidades de aprendizagem e memória, podendo implicar em um prejuízo no hipocampo mediando a plasticidade sináptica. Isso relata que a sinalização melatonérgica no receptor MT2 do hipocampo pode afetar substancialmente o comportamento cognitivo¹⁵⁸.

Distúrbios do sono aparecem em aproximadamente 44% a 83% dos casos de TEA, sendo a insônia o distúrbio primário^{30,31}. A etiologia dos problemas de sono em crianças com TEA parece ser multifatorial, incluindo a interrupção dos ritmos circadianos¹⁵⁹. Essas alterações no ciclo circadiano em crianças com TEA também têm sido associadas a níveis de melatonina insuficientes ou anormais^{160,161}. Além disso, um dos marcadores fisiológicos do estresse, o cortisol salivar, após a apresentação dos estímulos sensoriais, foi relacionado a problemas de sono.¹⁶² Isso pode ser demonstrado em estudo recente que apresenta evidências de que a ansiedade pode estar associada a problemas de sono em indivíduos com TEA¹⁶³. Em outros estudos associou-se as citocinas como biomarcadores de TEA em procedimentos de pesquisa com pacientes¹⁶⁴.

Estas alterações do sono revelam-se importantes na medida em que se associam a outras comorbidades clínicas como a hiperatividade, a epilepsia e ainda a comportamentos restritos e repetitivos¹⁶⁵. O tratamento aplicado para esses casos, passam por terapia comportamental e terapia farmacológica com melatonina e outros análogos melatonérgicos, demonstrando eficácia na melhoria do sono¹⁶⁶. Em se tratando especificamente da melatonina exógena, mesmo possuindo ações

farmacológicas como, ausências de ressaca no dia seguinte, de sintomas de abstinência e de vício, ela possui uma meia vida curta na ação como hipnótico leve. Sendo assim, tem perdido vantagens na indução do sono para seus análogos, como a agomelatina N- (2 - (7-metoxi-1-naftalenil) etil) acetamida, e o ramelteon ((S) - N - [2 (2-1,6,7,8-tetra-hidro H indeno [5,4 b] furano-8-il) etil] propionamida). Ambos possuem alta afinidade para receptores de melatonina MT1 e MT2 ⁴³. No entanto, os mecanismos das alterações da melatonina e seus análogos como marcador de suscetibilidade de TEA ainda permanecem incertos.

1.5 AGOMELATINA

A agomelatina (Valdoxan[®] / Thymanax[®]) foi relatada pela primeira vez em 1992, entre uma série de análogos sintéticos de melatonina, atua como um potente análogo melatonina que exibe um agonismo não seletivo de alta afinidade com receptores MT1/MT2 e um antagonismo do receptor serotoninérgico 5-HT_{2C} ^{42,50,169}. Tem como uma das propriedades farmacológicas mais importantes seu efeito cronobiológico ⁴⁷.

Nos seres humanos, dentre as características farmacocinéticas, a agomelatina tem uma ligação plasmática alta (> 95%) e é metabolizada no fígado, para formar metabólitos inativos que são principalmente excretados na urina (80%) e uma curta semi-vida plasmática (1-2 horas). Em níveis terapêuticos sua concentração sanguínea aumenta proporcionalmente com a dose. Cerca de 90% é metabolizado pelo citocromo P450 e 10% por suas isoformas. Recebeu autorização de comercialização na União Europeia em 2009, para o tratamento da depressão ¹⁶⁷.

Estudos em modelos animais de mudanças abruptas e desorganização do ciclo claro-escuro, de condições em modo exploratório, bem como de síndrome da fase atrasada do sono têm mostrado que a agomelatina acelera a ressincronização dos ritmos circadianos de atividade locomotora e parâmetros biológicos relevantes (temperatura do corpo, secreções de hormônios) ¹⁶⁸. Pandi-Perumala e colaboradores, em 2009, também descreveram a agomelatina com um perfil sinérgico único sem influenciar a liberação de serotonina ⁵⁵. A ligação existente entre distúrbios do sono e doenças psiquiátricas e neurológicas pode ser explicada a partir do momento que alterações no ritmo circadiano podem resultar em disfunção neurobiológica que por sua vez, podem se manifestar como sintomas de transtornos

do humor e ansiedade. Por outro lado, a diminuição do humor pode afetar o ciclo circadiano e causar insônia⁵⁹.

Muitos antidepressivos têm efeitos adversos indesejáveis sobre sono, particularmente podem causar ou piorar a insônia, sonolência diurna ou sedação⁵⁹. A eficácia da agomelatina em reduzir queixas de sono de pacientes com transtorno de humor foi avaliada em um estudo clínico na dosagem (25mg/dia por 6 semanas) contribuindo para restaurar a arquitetura do sono em pacientes deprimidos, melhorando sua qualidade e continuidade do sono de ondas de duração lenta (SWS) e ondas de duração aumentada (REM)¹⁶⁹. Além disso, a agomelatina reduziu o distúrbio na atividade de sono/vigília em outro grupo de pacientes deprimidos, sugerindo uma melhora da qualidade do sono e seu funcionamento¹⁷⁰. A agomelatina também influencia a arquitetura do ciclo sono / vigília em animais de controle, como foi demonstrado durante a duração aumentada de REM e sono de ondas lentas (SWS), durante 3 horas após a administração oral do medicamento nas doses (10 e 40) mg/kg, pouco antes a fase escura do ciclo em ratos¹⁷¹.

Diferentemente, a melatonina e o ramelteon, outro agonista da melatonina, exerceram efeitos diferentes sobre os mesmos parâmetros mencionados nos estudos anteriores, possivelmente, refletindo a ausência de ação antagônica dos receptores 5-HT, exercida unicamente pela agomelatina. Entende-se então a importância para o bloqueio de 5-HT que antagonizando sua ação serotoninérgica já na dose (10 mg kg), administrada intraperitoneal (i.p) no início da fase de escuro¹⁷¹. No estudo com animais de Mairesse e colaboradores, o tratamento crônico com agomelatina corrigiram anomalias do ritmo circadiano em atividades motora e sono/vigília, induzido pelo estresse pré-natal¹⁷². Estes efeitos foram bloqueados pelo agonistas de receptor MT₁/MT₂ de melatonina e antagonista do receptor serotoninérgico 5 TH_{2c}^{52,53}. Dada a relação bidirecional entre doenças psiquiátricas e neurológicas e os distúrbios do sono, um medicamento que melhora a qualidade do sono pode ser uma abordagem racional para a melhoria do estado de saúde dos pacientes psiquiátricos e, em especial, os com TEA, melhorando a qualidade de vida desses indivíduos.

Sua ação antidepressiva e efeito ansiolítico podem determinar uma interação sinérgica melatonérgica-serotoninérgica separadamente, o que é útil para a estabilização de anormalidades associadas com distúrbios do humor, da ansiedade e conseqüentemente, do ciclo circadiano, com destaque para o envolvimento do

receptor MT1 no SNC ^{57,173}. O antagonismo do receptor de serotonina 5-HT_{2c} promove o disparo dopaminérgico (DA) na área tegmental ventral, córtex frontal, no hipotálamo, hipocampo, medula e ponte, além da retina ¹⁷⁸. Nenhuma atividade significativa para receptores monoamínicos, muscarínicos, adrenérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgicos tem sido relatada ⁵⁴. As propriedades ansiolíticas da agomelatina também podem estar associada a essa sua ação antagonista do receptor 5-HT_{2c}, demonstrada em estudo com camundongos que carecem geneticamente desses receptores que houve redução no nível de ansiedade. Além disso, esse efeito também pode ser devido a ativação dos receptores melatonérgicos em resposta a estados de ansiedade ¹⁶⁹.

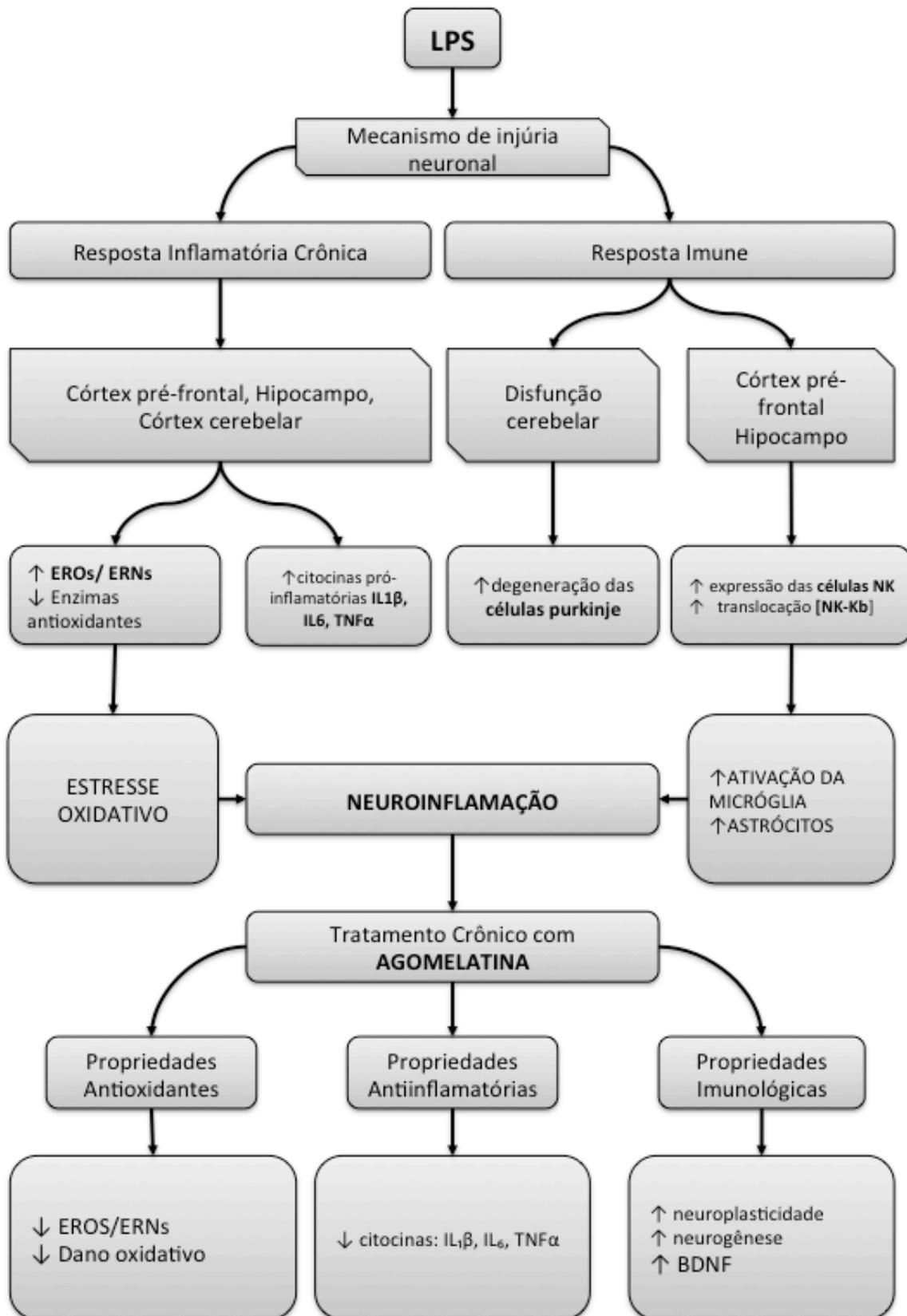
Em 2011, Calabrese e colaboradores descobriram a modulação da plasticidade molecular no tratamento de longo prazo com agomelatina, o que demonstrou um aumento da expressão dos fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF) no córtex pré-frontal de ratos ⁶⁵. Além disso, a agomelatina demonstrou a capacidade para aumentar a neurogênese no hipocampo em adultos e córtex pré-frontal, aumentando a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) ⁶⁴.

Estudos têm demonstrado que a agomelatina através de sua potente atividade dos receptores MT1 e MT2 estimula propriedades que melhoram funções cognitivas em estudos pré-clínicos ^{173,174} Laudurelle e *colaboradores*, em 2012, mostrou que, em ratos machos adultos que receberam agomelatina (40 mg / kg ip) uma vez por dia durante 22 dias tiveram um efeito pré-cognitivo ¹⁷⁴.

Outros resultados advindos do pré-tratamento crônico com agomelatina demonstraram a redução das citocinas pró-inflamatórias mediadas por LPS. Especificamente, o efeito da agomelatina em IL-1 β e IL-6 foram observados tanto a nível periférico, onde a substância bloqueou completamente o efeito de LPS, assim como em diferentes regiões do SNC (hipocampo ventral e dorsal e cortex pré-frontal). Dada à administração intraperitoneal de LPS que levou a uma inflamação aguda periférica, diferentes mecanismos contribuíram para a ação da agomelatina que reduziu significativamente a indução do LPS ⁵⁵.

A Figura-2 segue abaixo um diagrama relacionando da ação do LPS como mecanismo injuriante e a ação da agomelatina em seu combate ao danos possíveis causados a prole.

Figura 2 - Ação da agomelatina frente injúria com LPS pré-natal.

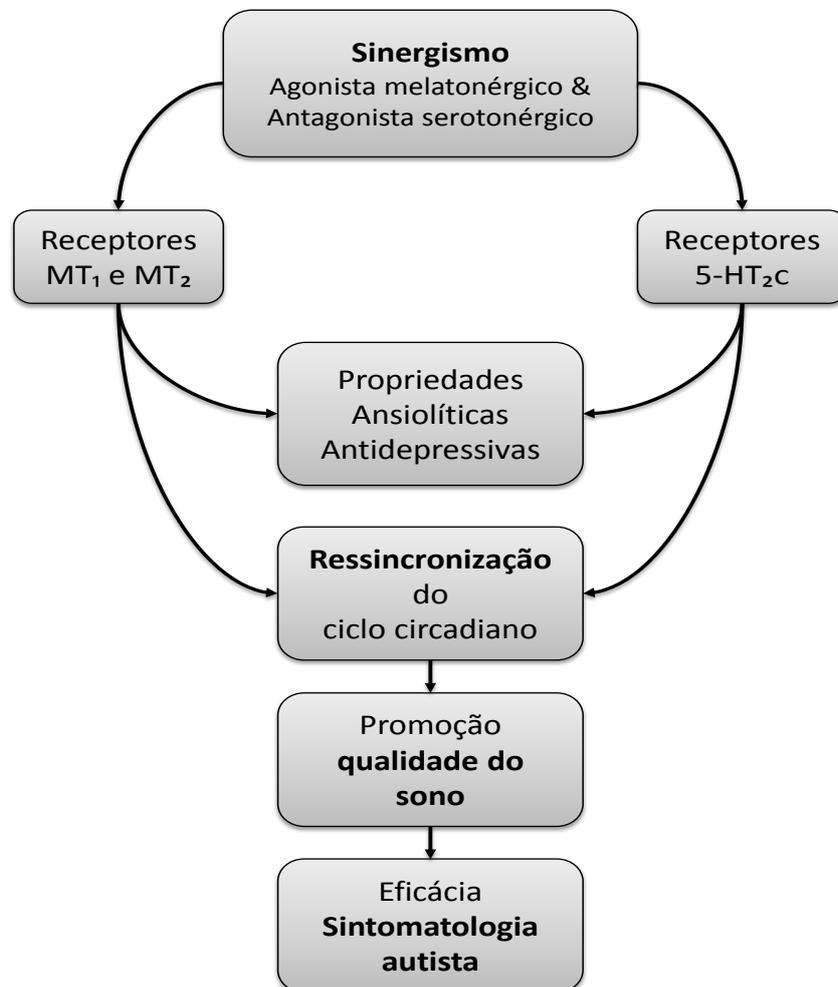


Efeitos terapêuticos em outros transtornos do desenvolvimento, com sintomas primários semelhantes pode, talvez, orientar o desenvolvimento de tratamentos em crianças autistas.

Devido às suas propriedades ansiolíticas, antioxidantes e anticonvulsivantes, a agomelatina também tem sido utilizada para tratar distúrbios psiquiátricos, embora o seu mecanismo de ação requeira uma investigação mais aprofundada. Entende-se que uma remodelação na etiologia do TEA, seja por fatores ambientais ou genéticos com estratégias terapêuticas inovadoras abre-se perspectivas para compreensão e intervenção farmacológica precoce para a sintomatologia das associadas ao autismo com suas possíveis comorbidades.

A Figura 3 abaixo, resume as propriedades terapêuticas do fármaco agomelatina.

Figura 3 - Mecanismo de ação e propriedade terapêutica da agomelatina.



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da administração crônica da agomelatina sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos de ratos Wistar submetidos a um modelo experimental de autismo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros de interação social e estereotipia em ratos jovens e adultos, após administração crônica de agomelatina;
- Avaliar os efeitos da administração crônica de agomelatina sobre a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas no córtex pré-frontal, córtex posterior, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos jovens e adultos;
- Avaliar os efeitos da administração crônica de agomelatina a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no córtex pré-frontal, córtex posterior, estriado, hipocampo e cerebelo de ratos jovens e adultos.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo pré-clínico utilizando modelo animal de doença.

3.2 APECTOS ÉTICOS

A utilização de animais neste estudo seguiu as normas da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (CONCEA, 2013) e aprovado pela Comissão de Ética em Utilização de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL, sob o protocolo n. 13.024.2.01.IV (Anexo A).

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclos de luz artificial, entre 7-19 horas (12 horas claro/escuro), recebendo ração comercial padronizada para ratos de laboratório e água *ad libitum*.

3.3 MODELO ANIMAL DE AUTISMO

Foram utilizados 80 casais de ratos *Wistar* adultos (60 dias), 40 para tratamento jovem, 40 para tratamento adulto, pesando entre 250 a 300g, provenientes do biotério da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI. Os animais foram acasalados ao fim do dia, em caixas individuais na proporção 2 fêmeas/1 macho, e as fêmeas (matrizes) foram monitoradas durante todo o período da prenhez. O diagnóstico da prenhez foi feito nas primeiras horas da manhã seguinte, pela análise microscópica do esfregaço vaginal. A presença de espermatozoides caracterizou o primeiro dia da prenhez.

Confirmada a prenhez, as matrizes (ratas prenhas) foram separadas de acordo com o protocolo experimental. O Grupo 1 (G1) foi constituído por matrizes que receberam administração intraperitoneal (ip) de uma única injeção de lipopolissacarídeo (LPS) obtido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*,

sorotipo 0127: B8 (Sigma®), na dose de 100 µg/kg no GD (dia de gestação) 9,5,^{125,175} diluída em 50 µg/ml de NaCl 0,9%.

O Grupo 2 (G2) foi constituído matrizes que receberam administração intraperitoneal de NaCl 0,9%, no volume equivalente aos animais do grupo autista (GA). Em ambos os grupos, as administrações ocorreram no DG 9,5^{131,184} sempre no período vespertino (15h – 17h).

3.4 MEDICAMENTOS E SOLUÇÕES

Os seguintes medicamentos e soluções foram utilizados ao longo do trabalho:

- **Agomelatina [2,5 / 10 / 40 mg/kg]:** - fármaco que atua no sistema melatonérgico e utilizado como substância de estudo.
- **Lipopolissacarídeo (LPS) [100 µg/kg]:** substância utilizada para mimetizar uma infecção bacteriana em fêmeas matrizes e induzir o modelo experimental de autismo.
- **Solução salina [NaCl 0,9%]:** substância utilizada como diluente para os medicamentos e injetado i.p nos grupos controle.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No décimo dia após o parto, foi realizada a sexagem e as ninhadas foram divididas nos grupos, caracterizados como grupo não autista (GnA) e grupo autista (GA), conforme segue:

- a) GnA: composto por ratos machos, originários de mães que receberam solução salina.
- b) GA: composto por ratos machos, originários de mães que receberam LPS.

Descrição dos grupos experimentais: Grupo não Autista (GnA) e Grupo Autista (GA) (Quadro1).

Quadro 1 - Descrição dos grupos experimentais: Grupo não Autista (GnA) e Grupo Autista (GA).

	Grupo Não Autista (GnA)			Grupo Autista (GA)		
	<i>Conjunto</i>	Dose Agomelatina [mg/Kg]	<i>Sigla</i>	<i>Conjunto</i>	Dose Agomelatina [mg/Kg]	<i>Sigla</i>
Grupo Jovem	<i>1</i>	0	<i>SAL-SAL</i>	<i>5</i>	0	<i>LPS-SAL</i>
	<i>2</i>	2,5	<i>SAL-2,5</i>	<i>6</i>	2,5	<i>LPS-2,5</i>
	<i>3</i>	10	<i>SAL-10,0</i>	<i>7</i>	10	<i>LPS-10,0</i>
	<i>4</i>	40	<i>SAL-40,0</i>	<i>8</i>	40	<i>LPS-40,0</i>
Grupo Adulto	<i>1</i>	0	<i>SAL-SAL</i>	<i>5</i>	0	<i>LPS-SAL</i>
	<i>2</i>	2,5	<i>SAL-2,5</i>	<i>6</i>	2,5	<i>LPS-2,5</i>
	<i>3</i>	10	<i>SAL-10,0</i>	<i>7</i>	10	<i>LPS-10,0</i>
	<i>4</i>	40	<i>SAL-40,0</i>	<i>8</i>	40	<i>LPS-40,0</i>

Para analisar as diferenças entre ratos jovens e adultos, os testes comportamentais e as análises bioquímicas foram realizados em 30-35 e 60-65 dias de idade, considerando ratos jovens e adultos, respectivamente. Na tentativa de reverter os possíveis déficits cognitivos e danos bioquímicos causados pela administração pré-natal de LPS, os animais receberam tratamento crônico de agomelatina, em diferentes doses, conforme a descrição abaixo:

- a) GnA + veículo: Ratos machos, originários de mães que receberam administração de solução salina no período gestacional. Os animais deste grupo receberam administração de salina NaCl 0,9%, usado como veículo, em “pós-nascimento com 30 dias” [PN30] (n = 10) ou em “pós-nascimento com 60 dias” [PN 60] (n = 10), conforme grupo experimental.
- b) GnA + Agomelatina: Ratos machos, originários de mães que receberam administração de solução salina no período gestacional. Os animais deste grupo receberam administração de agomelatina (2,5, 10 e 40) mg/kg em PN30 (n = 30) ou em PN 60 (n = 30), conforme grupo experimental.
- c) GA + veículo: Ratos machos, originários de mães que receberam administração de LPS no período gestacional. Os animais deste grupo receberam administração de salina NaCl 0,9%, usado como veículo, em PN30 (n = 10) ou em PN 60 (n = 10), conforme grupo experimental.

d) GA + Agomelatina: Ratos machos, originários de mães que receberam administração de LPS no período gestacional. Os animais deste grupo receberam administração de agomelatina (2,5, 10 e 40) mg/kg em PN30 (n = 30) ou em PN 60 (n = 30), conforme grupo experimental.

A agomelatina (2,5; 10 e 40) mg/kg foram escolhidas a partir de estudos que demonstraram alterações comportamentais^{53,173} e bioquímicas¹⁷⁶ em ratos expostos a este fármaco.

Os machos acasalados, as matrizes e os filhotes fêmeas que foram provenientes desses acasalamentos não foram submetidos a nenhum teste comportamental ou análise bioquímica, sendo mortos pelo procedimento de morte indolor assistida (MIA) pelo médico veterinário responsável pelo biotério central da UNISUL, campus Tubarão, após a conclusão de todos os procedimentos experimentais.

3.6 TRATAMENTO CRÔNICO

O tratamento crônico consistiu da administração diária de uma injeção intraperitoneal de agomelatina, nas diferentes doses de estudo, durante 14 dias consecutivos, às 17 horas (2 horas antes da fase escura)⁵³. Para as análises em animais jovens o tratamento foi iniciado no período entre 17-30 dias de idade e para os animais adultos, o início do tratamento foi entre 45-60 dias de idade.

Um diagrama esquemático das etapas descritas para o tratamento crônico é apresentado nas Figuras 4, para animais jovens e Figura 5, para animais adultos. O total de animais envolvidos nas análises comportamentais e bioquímicas foram de 160 machos.

Figura 4 - Diagrama esquemático com as etapas do delineamento experimental referente ao tratamento crônico com agomelatina em animais jovens.

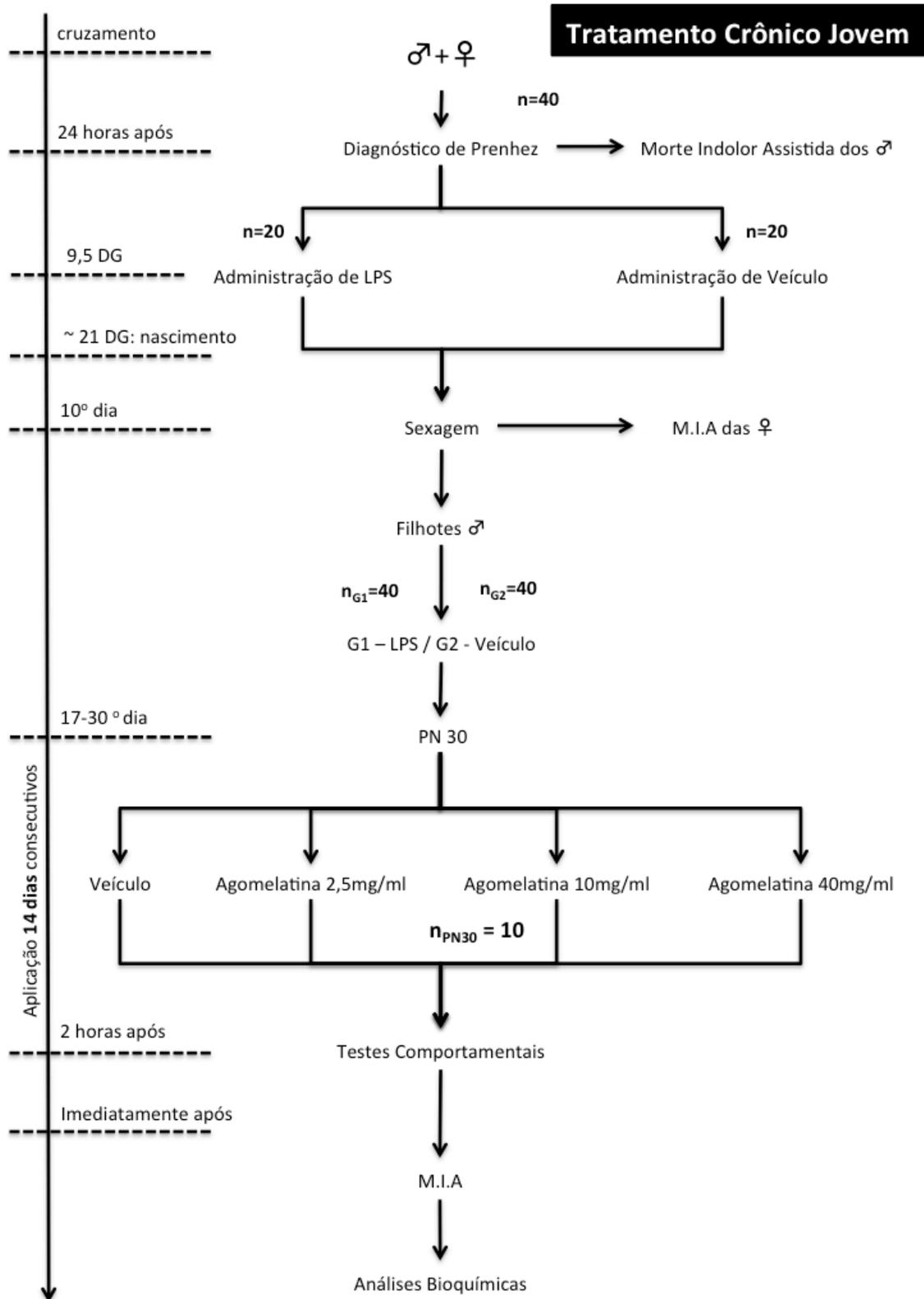
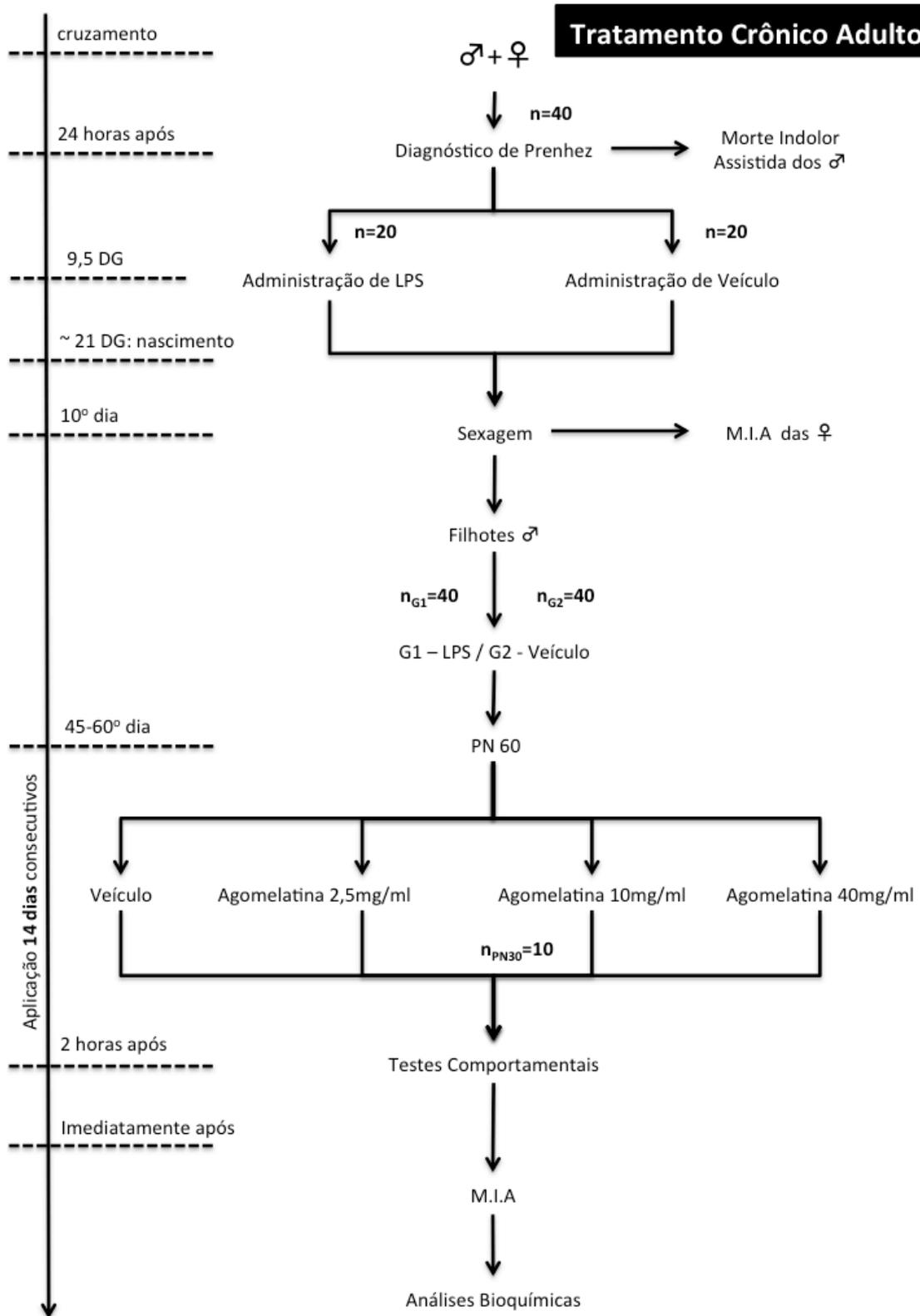


Figura 5 - Diagrama esquemático com as etapas do delineamento experimental referente ao tratamento crônico com agomelatina em animais adultos.



3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados 2 horas após a última injeção dos animais submetidos ao tratamento crônico.

Antes de se iniciarem os experimentos, os animais foram ambientalizados às condições experimentais em uma sala reservada do laboratório por um período de, no mínimo, 1 h. As sessões dos experimentos foram realizadas em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e foram monitoradas e registradas por uma câmera de vídeo com resolução 1280 x 720 e taxa de aquisição de 10 imagens por segundo, conectada por uma interface USB a um computador do tipo PC e controlada por um software desenvolvido para auxiliar a aquisição de vídeo dos testes.

3.7.1 Testes de interação social e estereotipia

O teste de interação social é baseado na tendência natural dos roedores em investigar com maior dedicação um indivíduo intruso que lhe for apresentado pela primeira vez. Foi realizado de acordo com Schneider e Prezewlocki (2005)¹⁷⁷. Neste experimento os animais foram submetidos individualmente a interagir com outro animal desconhecido do mesmo sexo em uma caixa denominada *Open Field* por 10 minutos. A análise realizada para quantificar o tempo de interação do modelo experimental abrangeu os episódios de cheirar, seguir, montar ou permitir a monta (número para cada episódio).

O comportamento estereotipado é bem definido pela permanência do animal em posição estacionária exibindo movimentos rápidos, repetidos da cabeça e membros dianteiros¹⁷⁸.

3.7.2 Teste do Campo Aberto (*Open Field*)

Os animais foram individualmente submetidos a uma análise de sua capacidade locomotora / exploratória e avaliados através de diferentes parâmetros.

Avaliação dos seus componentes têm sido amplamente utilizada para mensuração de emoção exploração atividade geral ou locomotora, medo e ansiedade¹⁷⁹. Neste experimento os animais foram submetidos individualmente a

análise de sua capacidade locomotora/exploratória e avaliados através de diferentes parâmetros. Este teste é considerado um modelo sensível a fármacos/atividade ansiolítica ¹⁸⁰. O ensaio experimental foi realizado em uma sala escura com luz branda apenas na caixa, onde os ratos foram individualmente inseridos em uma caixa de madeira na parte traseira e nas laterais e, vidro na parte da frente com dimensões (80 x 80 x 30 cm) dividida igualmente em 12 quadrantes. Durante 5 minutos eles puderam livremente explorar os quadrantes, onde foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: crossing (deambulação), grooming (movimentos de autolimpeza) tempo gasto e episódios, rearing: movimentos de elevação da pata dianteira, sem tocar as paredes do campo aberto (número), atividade vertical. A deambulação foi avaliada quantificando o número de quadrantes periféricos, médios e central explorados pelos animais. Os animais foram individualmente submetidos a uma análise de sua capacidade locomotora / exploratória e avaliados através de diferentes parâmetros. Houve uma sessão de treino, em que os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo da caixa a partir do qual foi explorado livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais voltaram para a caixa moradia. A sessão de teste foi 24 horas após o treino, na qual se repetiu o procedimento do treino ¹⁸¹.

3.8 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram submetidos a MIA e as estruturas encefálicas de interesse (córtex pré-frontal, córtex posterior, estriado, hipocampo, cerebelo) foram isoladas, homogeneizadas e armazenadas em freezer.

3.8.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como indício de peroxidação lipídica nas diferentes áreas encefálicas dos animais experimentais foi medida a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito por Draper e Hadley (1990) ¹⁸².

Os ácidos graxos presentes na membrana lipídica, após sofrerem dano oxidativo, geram o malondealdeído (MDA) que reage com duas moléculas de TBARS com eliminação de duas moléculas de água, formando um complexo rosa

com absorção máxima a 532 nm. Para a detecção do dano causado pela lipoperoxidação, 400 µl do homogeneizado foram misturados a 400 µl da solução (1% TBA/ 50 mM NaOH/ 0,1 mM BHT) e 200 µl de ácido fosfórico 7%. Posteriormente, a amostra foi incubada a 100 °C por 15 min e após descanso de 5 min em banho de gelo para estabelecer o término da reação, foram adicionados 1,5 ml de butanol.

Os tubos foram agitados vigorosamente e centrifugados a 3.000 rotações por minutos (r.p.m) durante 10 min. A fase orgânica foi removida e medida espectrofotometricamente em 532 e 600 nm em cubetas de quartzo para volume igual a 1 ml. Para o branco foi substituída a solução de TBA por HCl 3,0 mM. A concentração de TBAS (nmol/g) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de 156 mM TBARBS (nmol.g⁻¹) e fervidos por 15 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/g.

3.8.2 Medida do dano oxidativo em proteínas

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme descrito por Levine *et al* (1990)¹⁸³. As amostras foram homogeneizadas (na diluição de 1:10) em 5% de ácido sulfossalicílico gelado. Uma alíquota de 200 µL de homogenato foi adicionada a 800 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora, ao abrigo da luz, sendo vigorosamente agitadas a cada 15 min. Foram adicionados 800 µL de TCA 20% e os tubos foram agitados e centrifugados por 5 min a 5000g.

Os sobrenadantes foram descartados e o excesso de DNPH removido, lavando-se os precipitados inicialmente com 800 µL de TCA 10%, agitados e centrifugados por 5 min a 5000rpm e depois, lavados por três vezes, com 800 µL de uma solução de etanol: acetato de etila (1:1), sempre seguidos de agitação e centrifugação por 5 min a 14.000rpm. Após secagem das paredes dos tubos com o auxílio de um bastonete de algodão, os precipitados foram dissolvidos em 600 µL de guanidina 6 M, submetidos à agitação e incubados por 10 min a 37 °C, para dissolução.

Os brancos foram preparados substituindo-se DNPH por HCl 2M. As absorbâncias máximas em 360 nm foram determinadas e os valores finais das proteínas carboniladas foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar, a

concentração de proteínas totais previamente determinada e o conteúdo de proteína carbonilada foi calculado conforme equação abaixo:

$$\text{Proteína Carbonilada (nmol/mg)} = (\text{Abs360} \times 45,45) / [\text{Proteínas Totais}]$$

3.8.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) foi determinada conforme descrito por Abebi (1984)¹⁸⁴.

O princípio deste método baseia-se no decaimento da absorbância ocasionado pela redução de H₂O₂ a água, pela CAT presente na amostra, medido espectrofotometricamente a 240 nm, durante tempo predeterminado. Para esse ensaio, foi utilizada a solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) preparada e titulada no dia da análise.

Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de H₂O₂ e 20 µL de amostra. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do H₂O₂ foi medida durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata, e os valores foram expressos em mmol de H₂O₂ consumido por minuto e por grama (mmol.min⁻¹.g⁻¹).

A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) será determinada conforme descrito por Bannister *et al* (1987)¹⁸⁵.

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480 nm mediante a oxidação da epinefrina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que gera o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, cuja formação foi retardada pela enzima presente na amostra. Em uma cubeta contendo 1,95 mL de glicina 50 mM, pH 10,0 foram adicionados 50 µL de epinefrina 60 mM (mantida em gelo, frasco âmbar e pH em torno de 2,0 para evitar a oxidação).

A velocidade de formação do adrenocromo foi acompanhada durante cerca de 90 segundos antes do início da reação, para então ser adicionada a alíquota da amostra (em torno de 20 a 70 µL, dependendo da concentração e atividade da enzima presente na amostra). O tempo total de monitoramento da reação foi de três minutos. Curvas de quatro a sete pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD em tais condições.

Os valores da SOD foram expressos em U SOD g⁻¹, ou seja, em termos de atividade da enzima, em uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de

enzima necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do adrenocromo.

3.8.4 Dosagem de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry, Rosebrough e Randal (1951),¹⁸⁶ que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg.mL⁻¹. Os resultados foram expressos em mg/ml.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatística foram realizadas dentro do programa estatístico *Statistical Package for the Sciences* (SPSS), versão 22.0, e os dados foram apresentados na forma de média e erro padrão. As variáveis contínuas foram submetidas primeiramente a uma análise de *outliers* com significância de 95%. Posteriormente, nos conjuntos GnA e GA foi aplicado o teste de análise das variâncias (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste Post Hoc de Tukey. Os dados referentes aos conjuntos comparados entre doses de agomelatina foram analisados pelo teste t de *Student*. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os Resultados deste estudo são apresentados seguindo a sequência de divisão dos experimentos, em dois momentos:

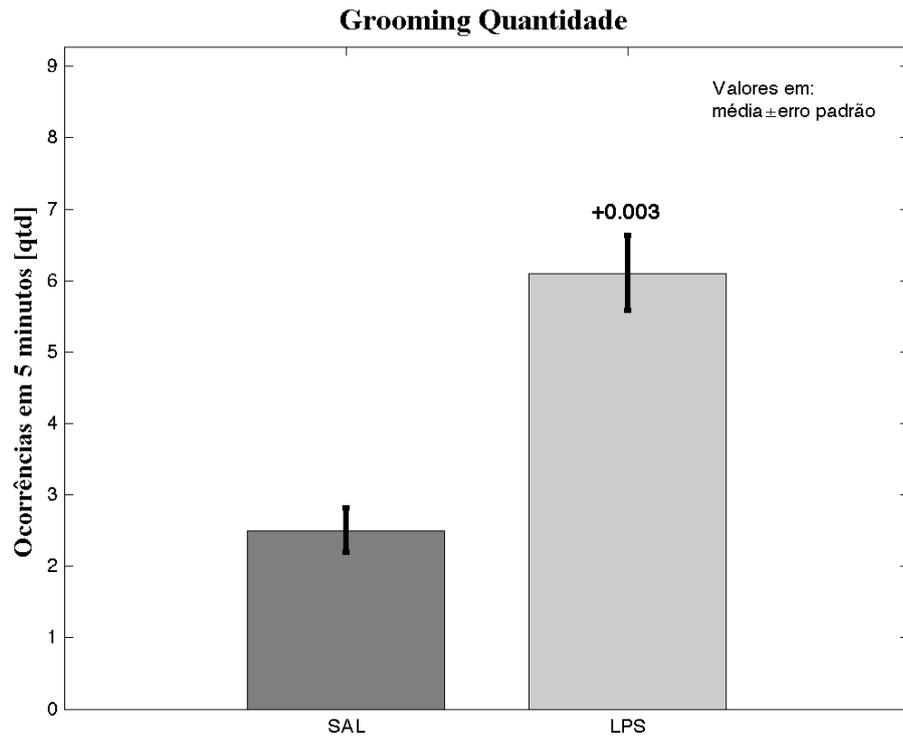
(1) Avaliações comportamentais, subdivididas em quatro testes: (a) teste de habituação ao campo aberto (PN 17-260); (b) teste de habituação ao campo aberto (PN 45-60); (c) teste de interação social (PN 17-20); (d) teste de interação social (PN 45-60);

(2) Análises bioquímicas, subdivididas em quatro provas: (a) medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); (b) medida do dano oxidativo em proteínas; (c) SOD; (d) CAT.

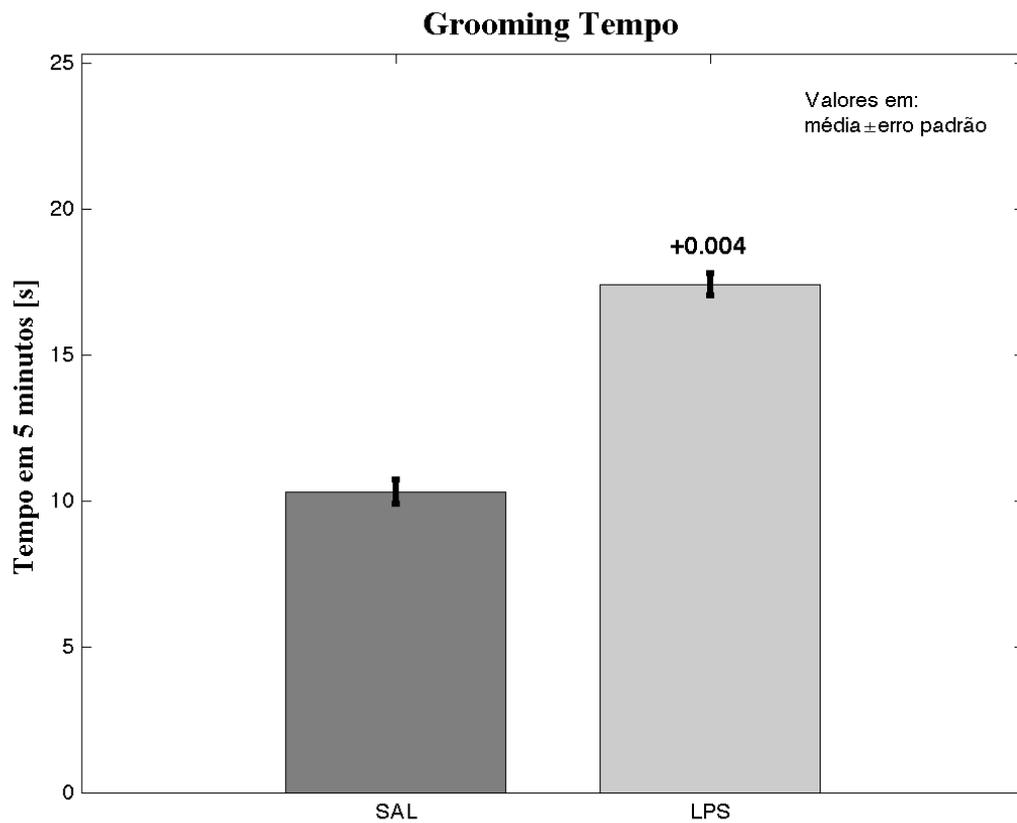
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.1.1 Efeito da administração pré-natal de LPS em número de episódios e tempo de *grooming*

Atividade de auto-limpeza têm sido amplamente utilizada como um relevante índice de comportamento repetitivo para um dos principais domínios dos sintomas em vários estudos pré-clínicos do TEA¹⁸⁷. Para confirmar a relação entre a exposição pré-natal de LPS e o desenvolvimento do comportamento autista, os animais jovens (PN 17-20) que receberam LPS (GA) em período pré-natal demonstraram um aumento significativo no número de episódios de groomings em quantidade [(F=1,162 e p=0,003)] e em tempo (F=1,002 e p=0,004) quando avaliados na arena de campo aberto e comparados aos animais não expostos (GnA) (Figura 6) em quantidade (Figura 7) em tempo.

Figura 6 - Quantidade de ocorrências de movimentos estereotipados (*grooming*).

Legenda: Quantidade de ocorrências de movimentos estereotipados (*grooming*). Os dados foram expressos em média ± erro padrão, n= 10 para cada grupo. +Diferença significativa entre o GnA (SAL) e GA (LPS) $p < 0,05$ (T. Student).

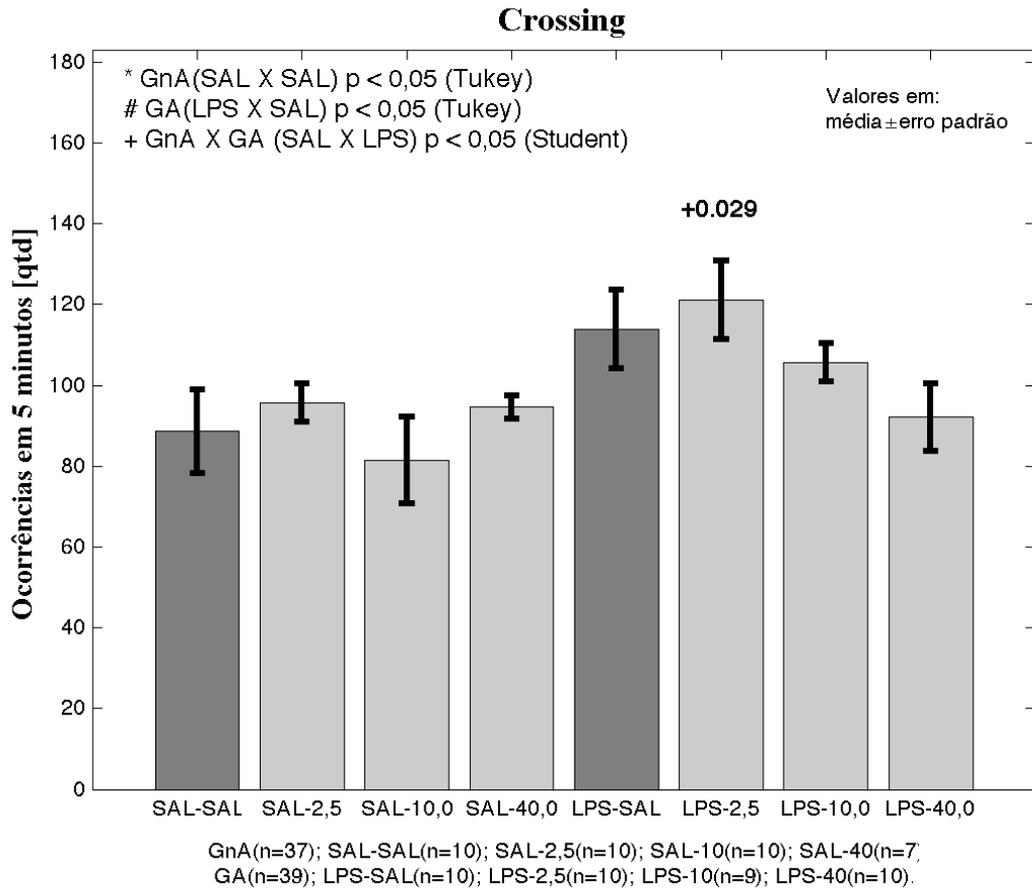
Figura 7- Tempo de ocorrências de movimentos estereotipados (*grooming*).

Legenda: Tempo de ocorrências de movimentos estereotipados (*grooming*). Os dados foram expressos em média \pm erro padrão, n= 10 para cada grupo. +Diferença significativa entre o GnA (SAL) e GA (LPS) $p < 0,05$ (T. *Student*).

4.1.2 Avaliação da atividade locomotora e movimentos de auto-limpeza em Campo Aberto

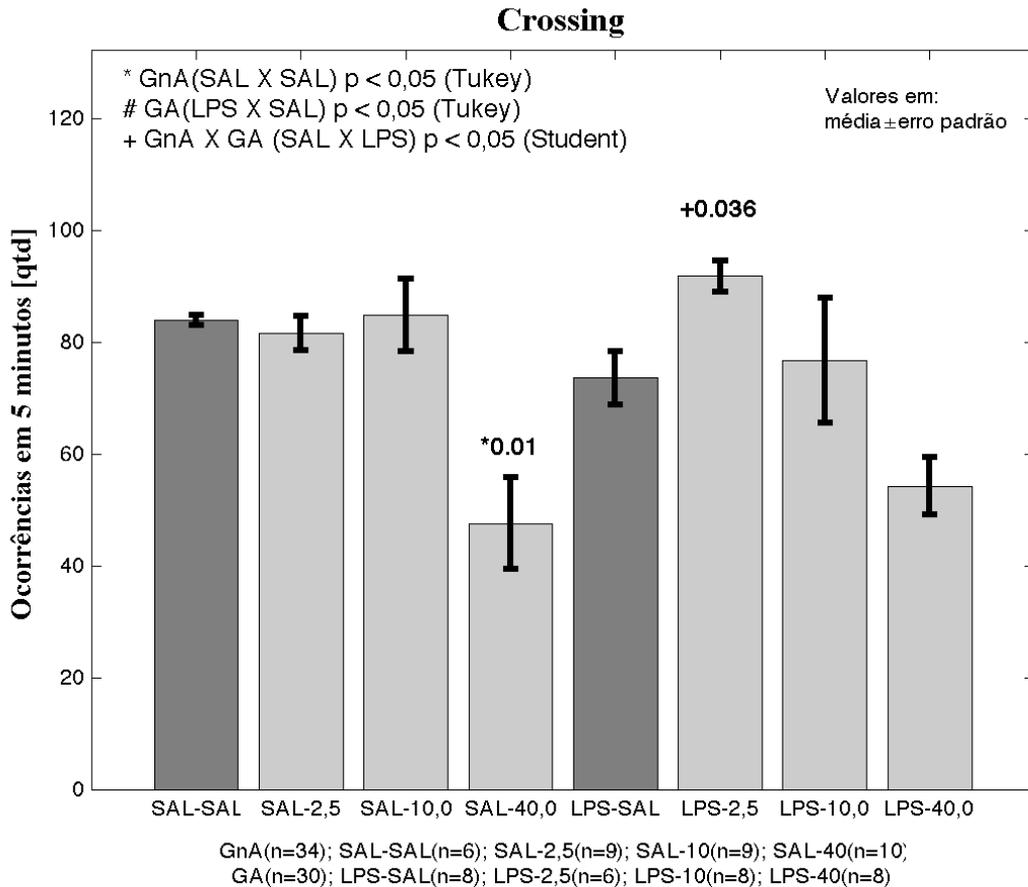
O Teste de Habituação ao Campo Aberto foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais (*crossings*, *rearing* e visitas ao centro) e comportamento de auto-limpeza, após o tratamento crônico com agomelatina. A Figura 8, mostra que o tratamento com agomelatina por 14 dias consecutivos, na dose de 2,5mg/kg, foi capaz de provocar aumento significativo [(F=2,562: e $p=0,029$)] no número de *crossing* de animais jovens (PN17-20) expostos ao LPS em período pré-natal quando comparados aos animais que receberam salina também em período pré-natal e o mesmo tratamento. Resultados semelhantes são encontrados quando os mesmos parâmetros foram avaliados em animais adultos (PN 45-60) (F=5,719 e $p=0,036$) (Figura 9). Além disso, a agomelatina (40mg/kg) administrada em animais não expostos ao LPS diminuiu o número de *crossings* [(F=5,719 e $p=0,01$)].

Figura 8 – Efeito da agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre o número de *crossing*.



Legenda: Efeito da agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) sobre o número de episódios de *crossing* em ratos jovens. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

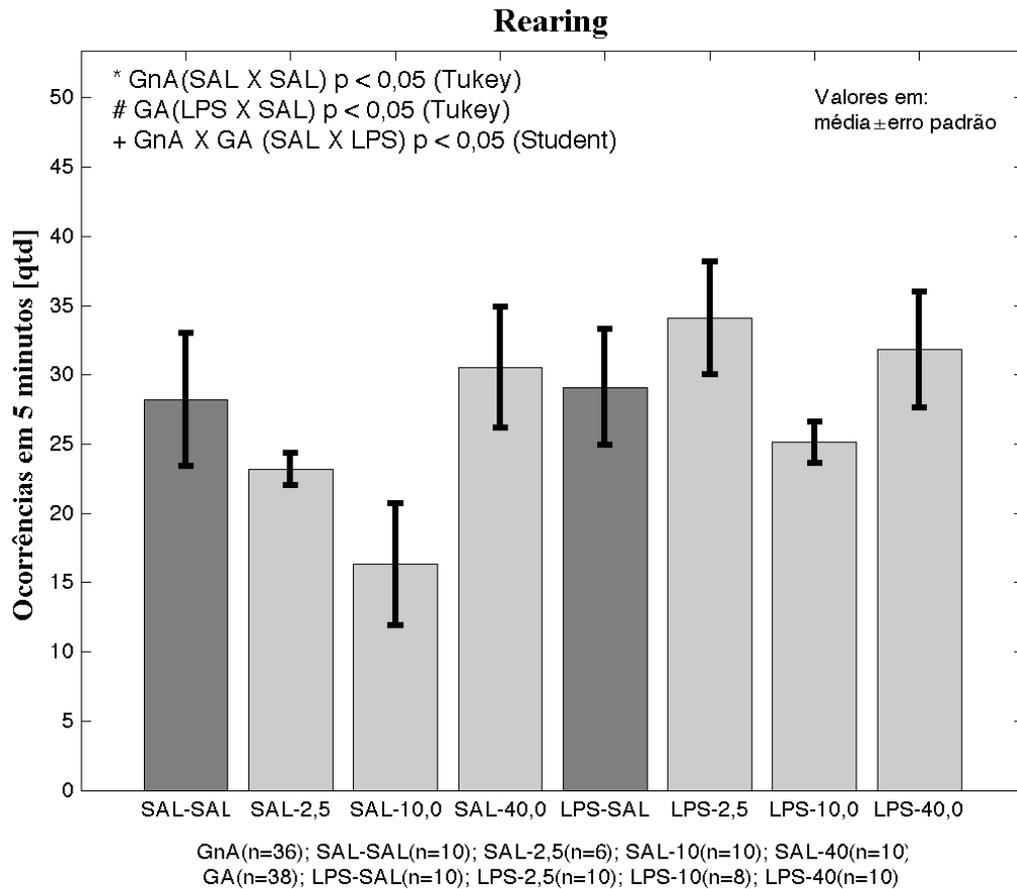
Figura 9 - Efeito da agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre o número de episódios de *crossing*.



Legenda: Efeito da agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) sobre o número de episódios de *crossing* em ratos adultos. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

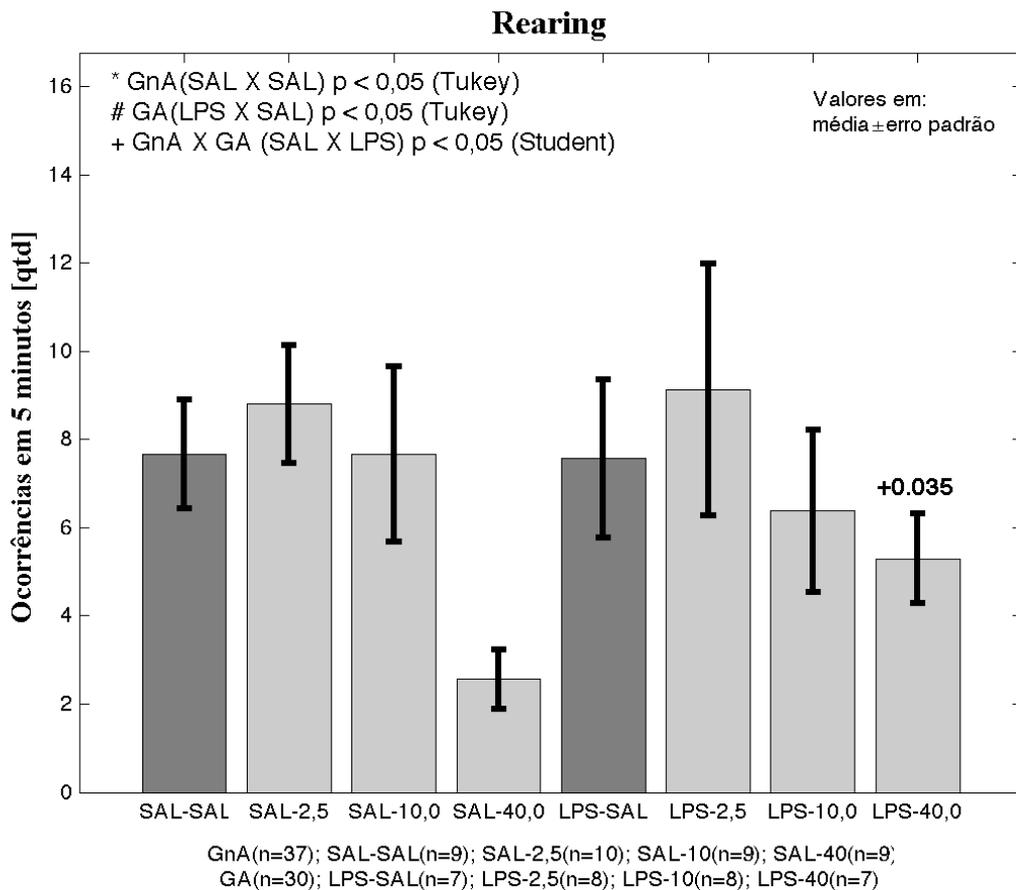
A atividade exploratória foi avaliada a partir do número de episódios de *rearing*. A Figura 10 mostra que a agomelatina não teve efeito significativo na atividade exploratória em animais jovens, no entanto, os animais adultos expostos ao LPS em período pré-natal tiveram um aumento significativo ($F=1,67$ e $p=0,35$) neste mesmo parâmetro após tratamento crônico de agomelatina, na dose de 40mg/kg (Figura 11) quando comparados aos animais não expostos.

Figura 10 - Efeito da agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre o número de episódios de *rearing*.



Legenda: Efeito da agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) sobre o número de episódios de *rearing* em ratos jovens. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA - grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

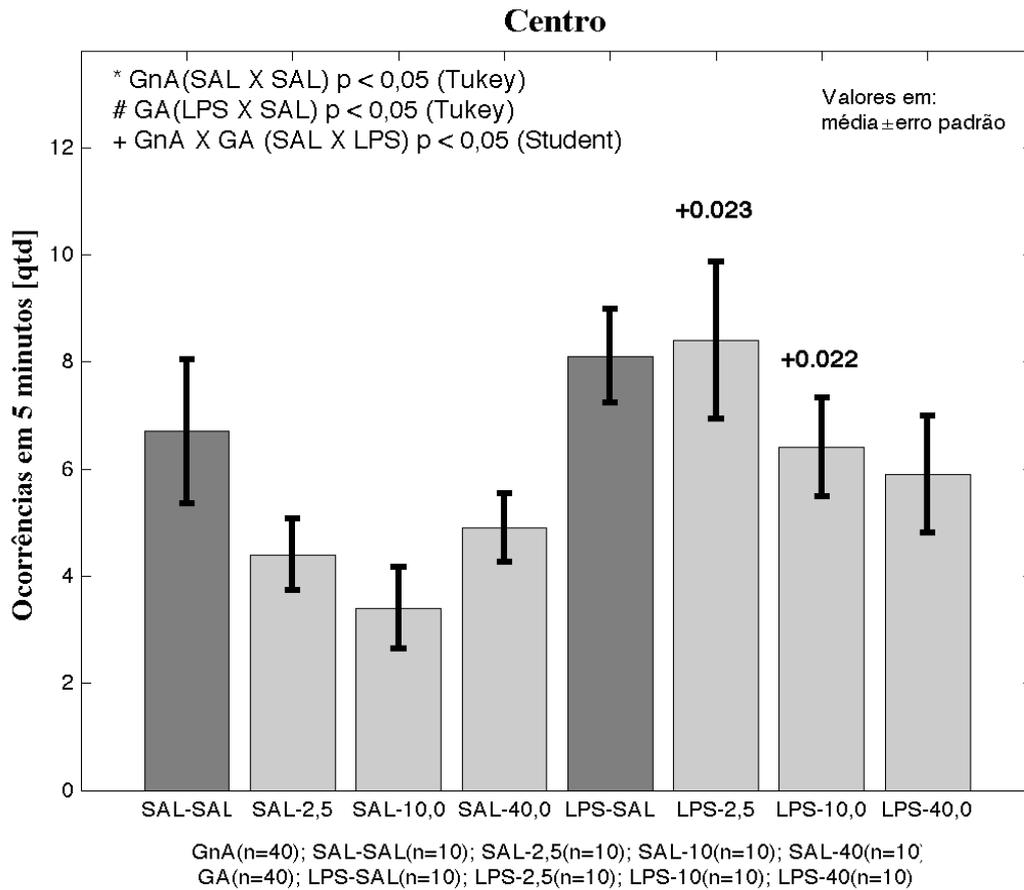
Figura 11 - Efeito da agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre o número de episódios de *rearing*.



Legenda: Efeito da agomelatina (2,5, 10 e 40 mg/kg) sobre o número de episódios de *rearing* em ratos adultos. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

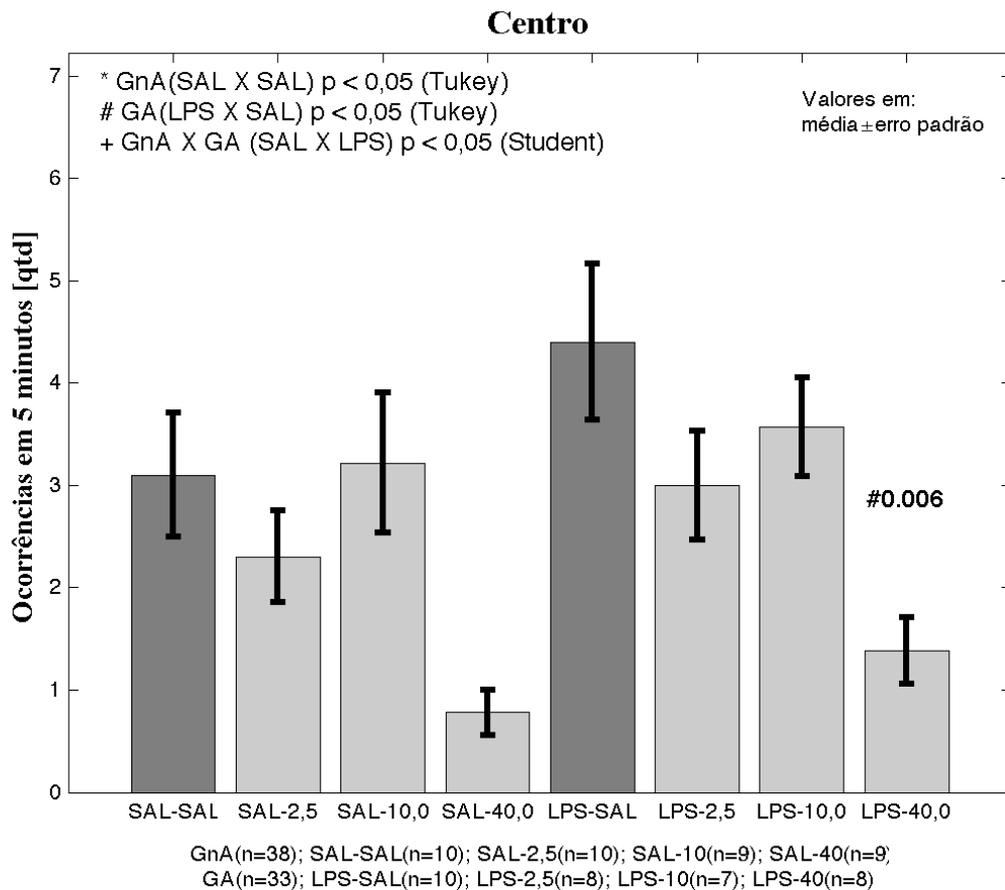
Visita ao centro tem sido utilizado como parâmetro para medir a ansiedade ou comportamento de risco.¹⁸⁸ O transtorno da ansiedade tem sido uma das comorbidades mais comuns encontradas nos pacientes com TEA¹⁸⁹. A Figura 12 mostra que os animais jovens expostos ao LPS entraram com mais frequência no centro da arena de campo aberto após tratamento com agomelatina, na dose de 2,5mg/kg e 10 mg/kg ($F=2,983$ e $p=0,023$; $F=4,592$ e $p=0,022$ respectivamente), quando comparados aos animais não expostos ao LPS e que tiveram o mesmo tratamento. Quando adultos, os animais tratados com LPS em período pré-natal mostraram diminuição no número de entradas no centro da arena após tratamento com agomelatina na dose de 40mg/kg ($F=4,592$ e $p=0,06$) quando comparados aos animais sem tratamento, como apresentado na Figura 13.

Figura 12 - Efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre o número de visitas ao centro.



Legenda: Efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) sobre o número de visitas ao centro. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

Figura 13 - Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre o número de visitas ao centro.

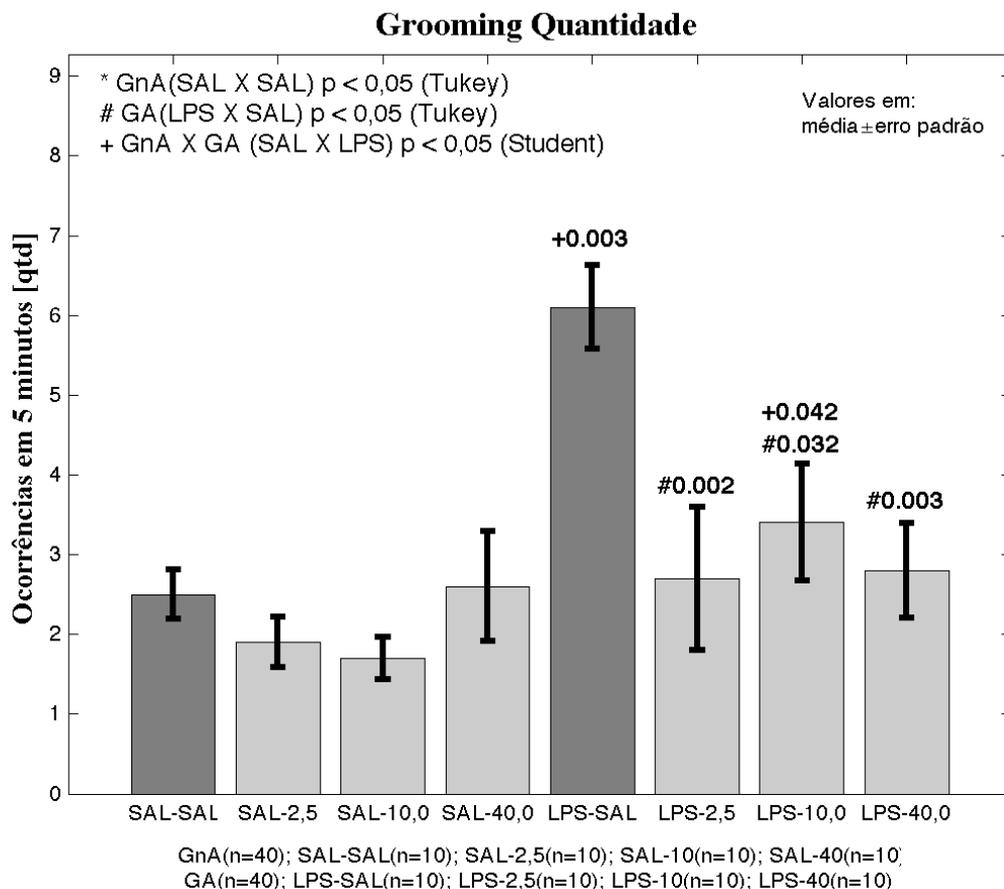


Legenda: Efeito da administração de agomelatina (2,5, 10 e 40 mg/kg) sobre o número de visitas ao centro. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA - grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

As atividades de auto-limpeza nos animais jovens expostos ao LPS pré-natal pode ser demonstrada após o tratamento crônico de agomelatina com significância para os episódios de quantidade de grooming na análise de variância de *T. de student* com [(T=0,796 e $p=0,003$)] quando comparados ao grupo não exposto, com significância também para a dose de 10mg/kg de agomelatina [(F=1,162 e $p=0,042$)]. Após análise de post-hoc de *Tukey*, a agomelatina demonstrou reverter os episódios de *grooming* em todas as doses 2,5, 10 e 40mg/kg [(F=1,162 e $p=0,002$; F=1,162 e $p=0,031$; F=1,162 e $p=0,003$)] respectivamente (Figura 14). O tempo de *grooming* nos ratos jovens também mostrou significância para o grupo exposto ao LPS [(T=4,811 e $p=0,004$)] e aumento significativo da dose de 40mg/kg de agomelatina nos animais não expostos (Figura 15).

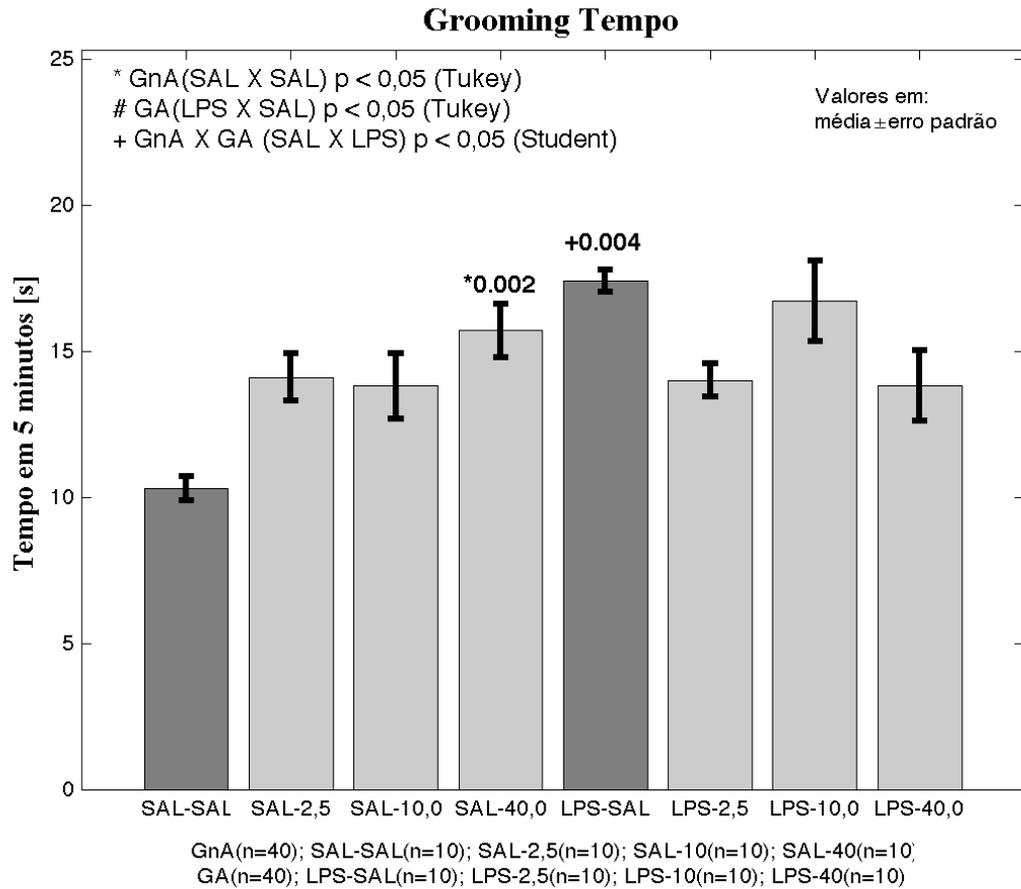
Nos animais adultos expostos ao LPS pré-natal após o tratamento crônico com agomelatina também apresentou significância para os episódios de quantidade de *grooming* na análise de variância de T. de *Student* com [(T=13,041 e p=0,006)], quando comparados com o não exposto, com significância também para a dose de 10mg/kg de agomelatina de [(T=0 e p= 0,042)]. Após análise de post-hoc de *Tukey*, a agomelatina demonstrou reverter os episódios de *grooming* em todas as doses 2,5,10 e 40mg/kg [(F= 3,835 e p=0,002; F=3,835 e p=0,031; F=3,836 e p= 0,003)] respectivamente (Figura 16). O tempo de *grooming* nos ratos adultos também mostrou significância para o grupo exposto ao LPS [(T= 3,544 e p=0,002)] e aumento significativo da dose de 40mg/kg de agomelatina nos animais não expostos [(F=3,544 p=0,002)] (Figura 17).

Figura 14 – Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre a quantidade de *grooming*.



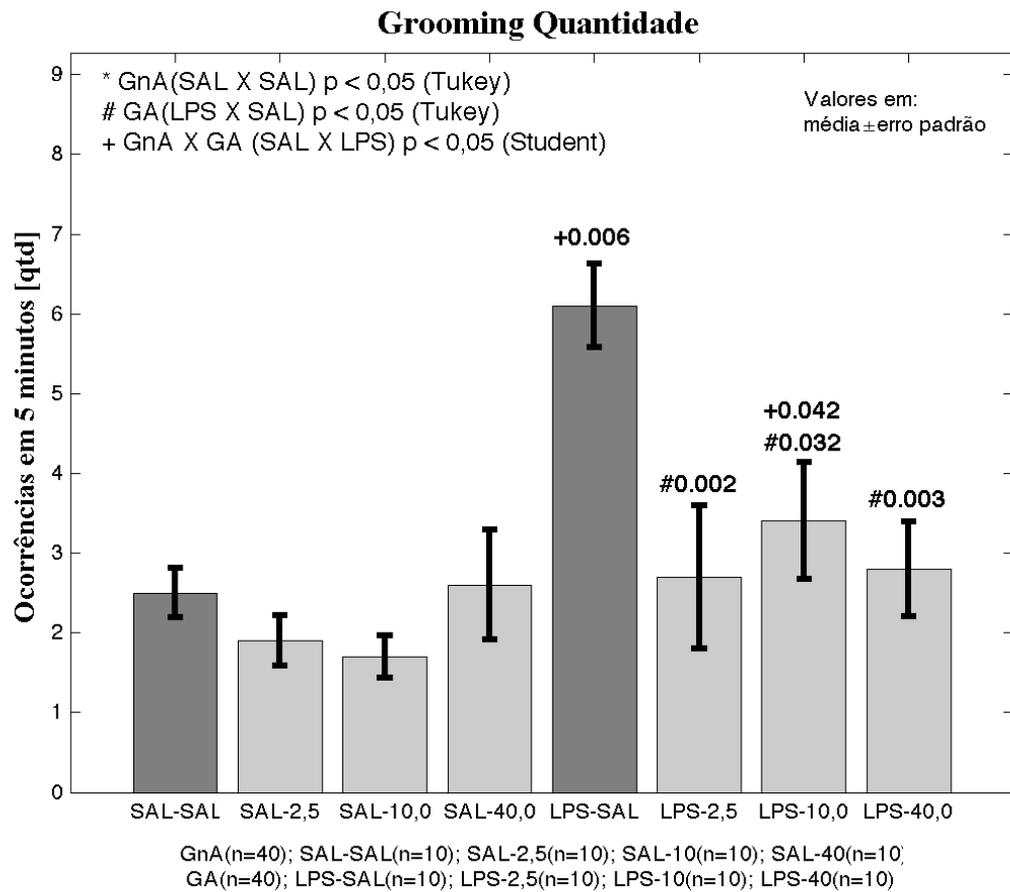
Legenda: Efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) sobre a quantidade de ocorrências *grooming*. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com p<0,05(*Tukey*); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com p<0,05 (*Tukey*) e +GnA X GA (SAL x LPS) com p<0,05 (T. *Student*).

Figura 15 - Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos jovens sobre o tempo de ocorrências de *grooming*.



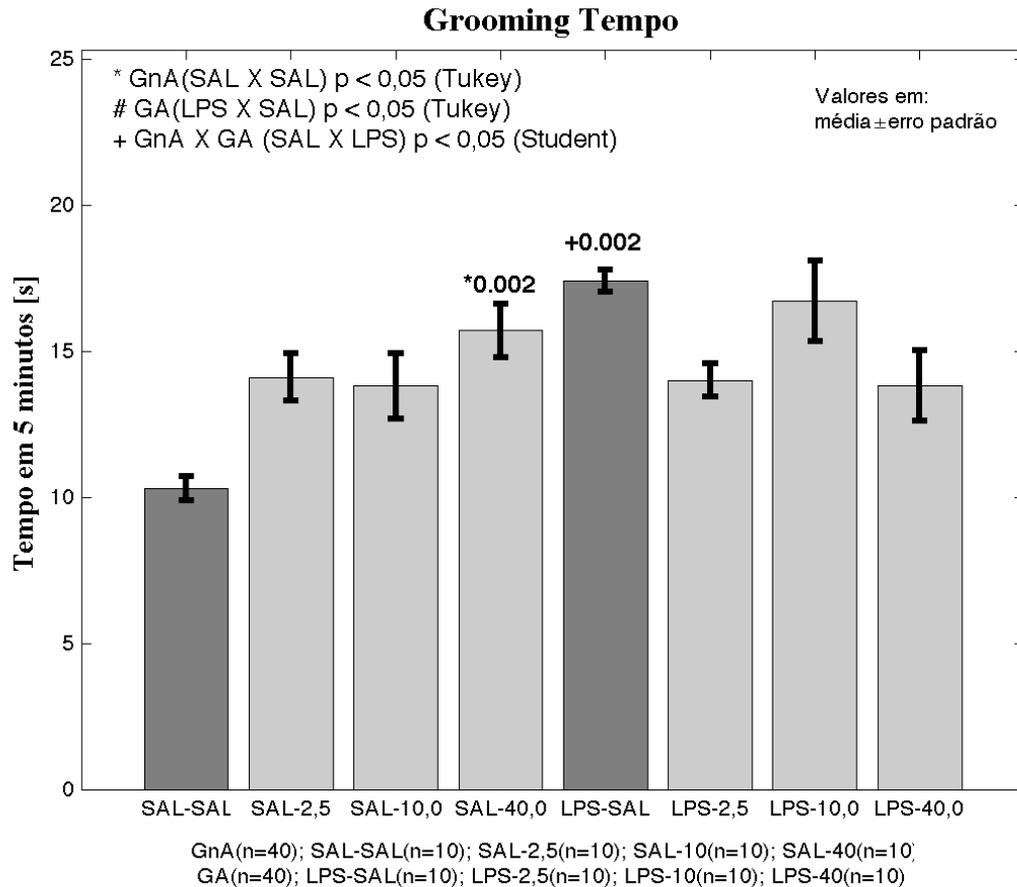
Legenda: Efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) sobre o tempo de ocorrências de *grooming*. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

Figura 16 - Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre a quantidade de *grooming*.



Legenda: Efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) sobre a quantidade de *grooming*. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA - grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

Figura 17 - Efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg em ratos adultos sobre tempo de ocorrências de *grooming*.



Legenda: Efeito da administração de agomelatina (2,5, 10 e 40 mg/kg) sobre tempo de ocorrências de *grooming*. Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA - grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

4.1.3 Avaliação de parâmetros de interação social após o tratamento com agomelatina

Uma das características mais relevantes do TEA é a diminuição na interação social, manifestando de diferentes formas como por exemplo: isolamento ou comportamento social impróprio, dificuldade em participar de atividades em grupo, indiferença afetiva ou demonstrações inapropriadas de afeto e falta de empatia social.¹⁹⁰ O Quadro 2, apresenta os parâmetros avaliados no Teste de Interação Social em animais jovens e adultos. Os resultados mostraram que animais jovens expostos ao LPS em período pré-natal tiveram diminuição nos parâmetros cheirar [(F=8,171 e $p=0,027$)] e permitir a monta [(F=4,395 e $p=0,545$)] quando comparados

aos animais não expostos. A agomelatina teve efeito negativo nos parâmetros permitir a monta nas doses de 10 e 40mg/kg [(F=4,395 e p=0,030 F=4,395 e p=0,006 respectivamente)] e cheirar, na dose de 2,5mg/kg (F e P) quando comparados os animais expostos e não expostos ao LPS. Por outro lado, o tempo de seguir o animal intruso foi significativamente maior [(F=5,766 e p=0,017)] em animais expostos ao LPS em período pré- natal e tratados cronicamente com agomelatina na dose de 10mg/kg, quando comparados aos animais não expostos e que receberam o mesmo tratamento.

A exposição ao LPS em animais adultos não mostrou nenhum resultado significativo quando comparados os animais expostos e não expostos em período pré-natal no parâmetro cheirar e permitir a monta. Porém, o tratamento com agomelatina, na dose de 40mg/kg, mostrou efeito positivo no parâmetro seguir quando comparados os animais expostos e não expostos ao LPS que receberam o mesmo tratamento [(F=2,945 e p=0,017)].

Quadro 2 - Resultados da Interação social após administração crônica de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg com média \pm erro padrão para GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

JOVENS	2,5 mg			10,0 mg			40,0 mg		
	p	Média		p	Média		p	Média	
		GnA	GA		GnA	GA		GnA	GA
Cheirar	$\frac{0,02}{7}$	23,50 0	18,40 0	$\frac{0,56}{8}$	23,50 0	22,22 0	$\frac{0,48}{0}$	16,20 0	15,00 0
Seguir	$\frac{1,00}{0}$	6,500	6,500	$\frac{0,01}{7}$	6,670	18,80 0	$\frac{0,08}{3}$	2,380	7,300
Permitir Monta	$\frac{0,54}{5}$	5,100	5,100	$\frac{0,03}{0}$	12,00 0	4,000	$\frac{0,00}{6}$	11,80 0	4,400
ADULTOS	2,5 mg			10,0 mg			40,0 mg		
	p	Média		p	Média		p	Média	
		GnA	GA		GnA	GA		GnA	GA
Cheirar	$\frac{0,10}{8}$	58,70 0	41,00 0	$\frac{0,72}{3}$	51,50 0	47,00 0	$\frac{0,65}{3}$	27,70 0	58,00 0
Seguir	$\frac{0,14}{1}$	1,250	2,600	$\frac{0,11}{9}$	2,560	8,430	$\frac{0,01}{7}$	0,600	2,500
Permitir Monta	$\frac{0,37}{7}$	0,140	0,000	$\frac{0,07}{6}$	1,000	3,830	$\frac{0,08}{2}$	0,000	5,380

4.1.4 Descrição geral dos parâmetros comportamentais avaliados a partir do tratamento crônico com agomelatina.

Sumarizando, o Quadro 3 apresenta a descrição geral das alterações comportamentais encontradas após o tratamento crônico com agomelatina nas diferentes doses de estudos.

Quadro 3 - Efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40) mg/kg sobre os parâmetros comportamentais com +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

JOVENS	2,5 mg		10,0 mg		40,0 mg	
	<i>p</i>	<i>Média</i>	<i>p</i>	<i>Média</i>	<i>p</i>	<i>Média</i>
Crossing	0,029	↑	0,062	↑	0,814	↓
Centro	0,023	↑	0,022	↑	0,439	↑
Rearing	0,061	↑	0,105	↑	0,832	↑
Quantidade Grooming	0,590	↑	0,042	↑	0,240	↑
Tempo Grooming	0,097	↓	0,192	↑	0,628	↓
Cheirar	0,027	↓	0,568	↑	0,480	↓
Seguir	1,000	=	0,017	↑	0,083	↓
Permitir Monta	0,545	=	0,030	↓	0,006	↓

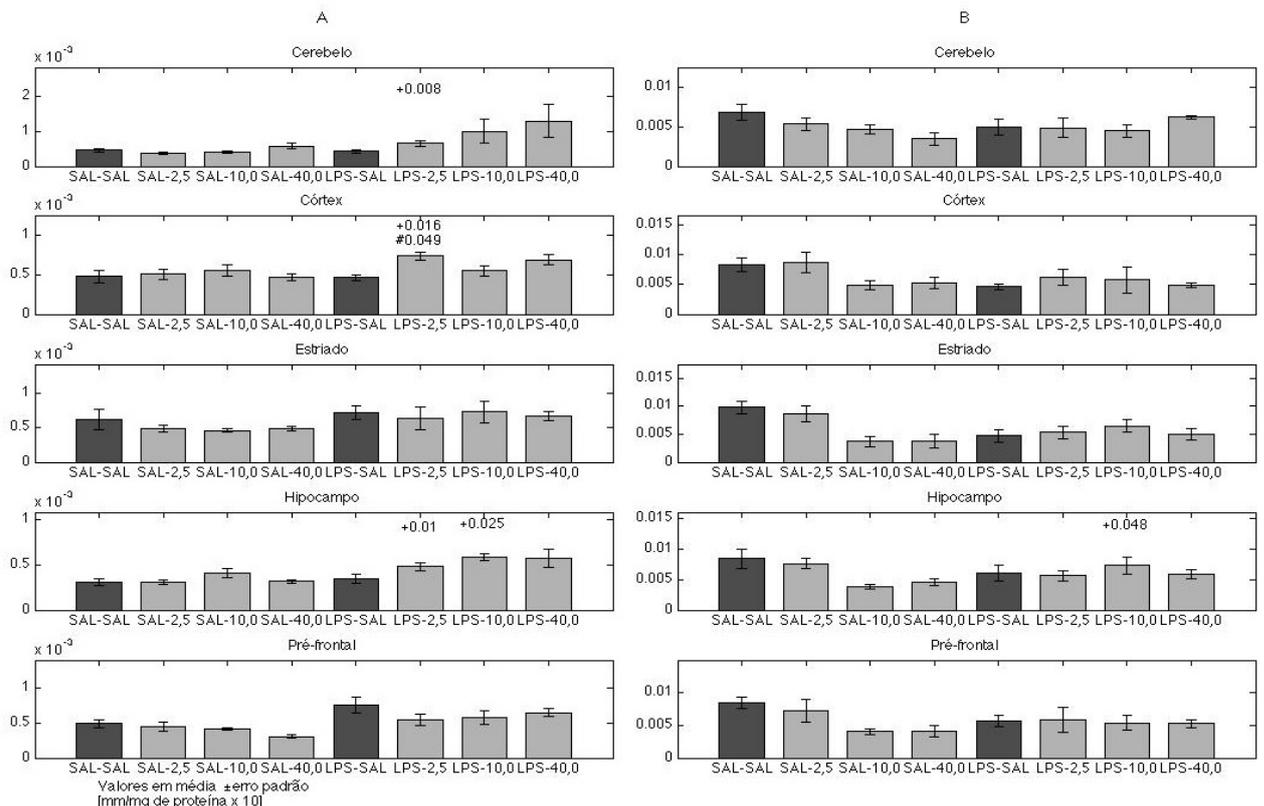
ADULTOS	2,5 mg		10,0 mg		40,0 mg	
	<i>p</i>	<i>Média</i>	<i>p</i>	<i>Média</i>	<i>p</i>	<i>Média</i>
Crossing	0,036	↑	0,527	↓	0,529	↑
Centro	0,327	↑	0,699	↑	0,142	↑
Rearing	0,913	↑	0,643	↓	0,035	↑
Quantidade Grooming	0,693	↓	0,042	↑	0,563	↓
Tempo Grooming	0,548	↓	0,845	↓	0,240	↓
Cheirar	0,108	↓	0,723	↓	0,653	↑
Seguir	0,141	↑	0,119	↑	0,017	↑
Permitir Monta	0,377	=	0,076	↑	0,082	↑

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.2.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A medida de dano oxidativo em lipídios foi avaliada a partir da concentração de malondialdeído (MDA) em cerebelo, córtex posterior, estriado, hipocampo e córtex pré-frontal de animais expostos ao LPS em período pré-natal e que receberam tratamento crônico com diferentes doses de agomelatina e seus respectivos grupos controle. Os resultados mostraram que o LPS foi capaz de aumentar a concentração de MDA nas estruturas encefálicas estudadas, com valores significativos em cerebelo ($F=1,954$ e $p=0,008$), córtex posterior ($F=2,933$ e $p=0,0015$) e hipocampo ($F=5,060$ e $p=0,0025$) de ratos jovens. No entanto, o tratamento com agomelatina não foi capaz de reverter o dano, conforme apresentado na Figura 18.

Figura 18 - Medida de substâncias reativas ao TBARS no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg.

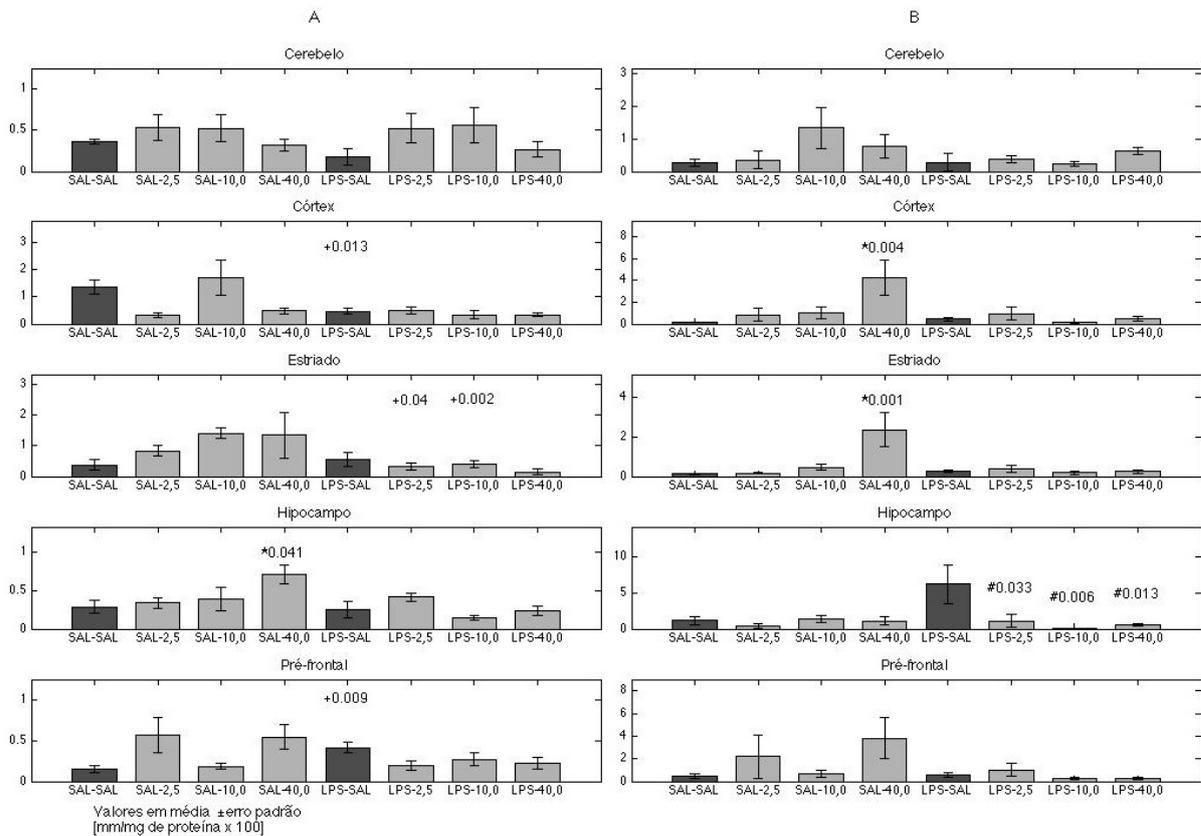


Legenda: Medida de substâncias reativas ao TBARS no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

4.2.2 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil

A Figura 19 mostra que a exposição pré-natal com LPS não revelou dano oxidativo em proteínas do grupamento carbonil em nenhuma das doses e idades estudadas. A agomelatina, por sua vez, diminuiu o dano oxidativo em hipocampo de ratos adultos quando comparados ao grupo LPS x SAL [(F=3,815 e $p=0,033$; F=3,815 e $p=0,006$; F=3,815 e $p=0,013$; nas doses 2,5, 10 e 40 mg/kg respectivamente).

Figura 19 - Medida de dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg.

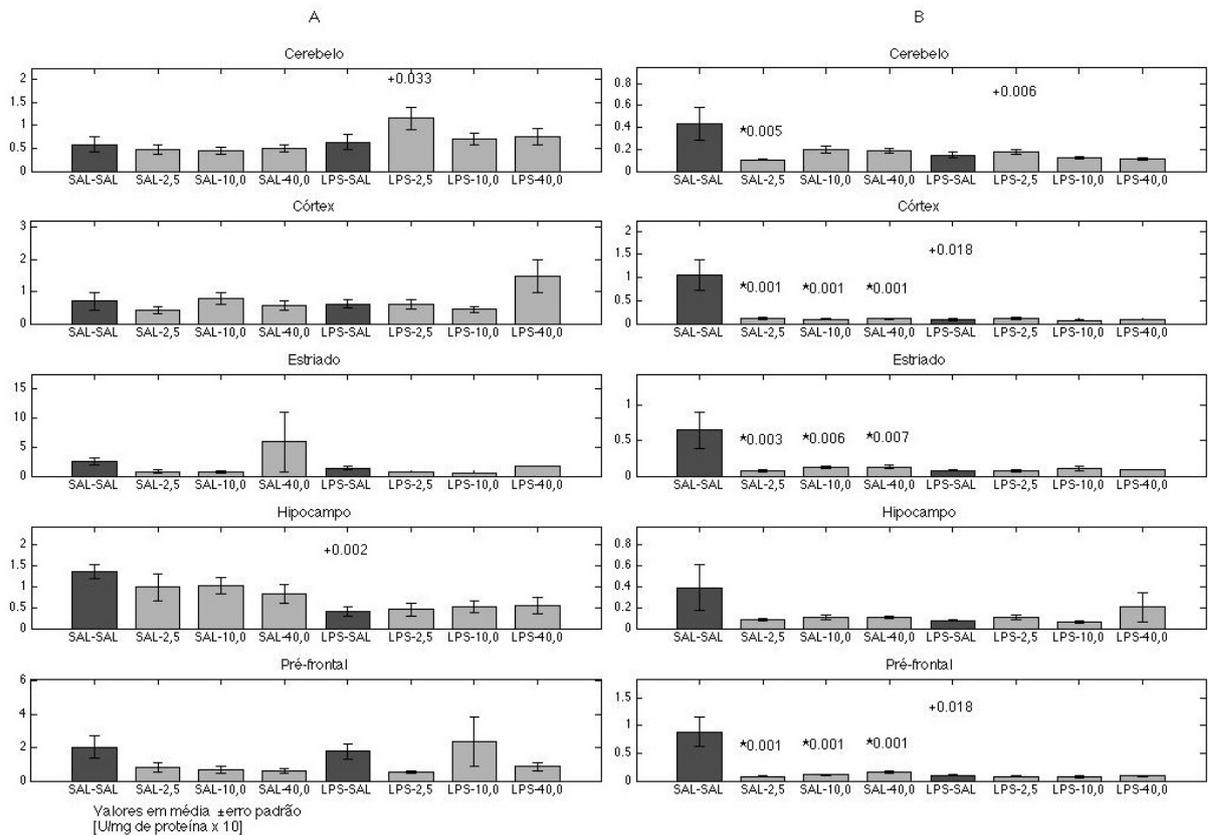


Legenda: Medida de dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

4.2.3 Atividade da Catalase (CAT)

A Figura 20 mostra que a exposição pré-natal ao LPS causou diminuição significativa na atividade da enzima antioxidante catalase em hipocampo de ratos jovens [(T=0,313; p=0,0020] e em córtex posterior [(T=4,721 e p= 0,018)] e córtex pré-frontal [(T=2,97 e p= 0,018)] de ratos adultos. No entanto, o tratamento crônico com agomelatina não mostrou efeito protetor a este parâmetro avaliado.

Figura 20 - Medida de atividade da catalase (CAT) no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5/10 e 40) mg/kg.



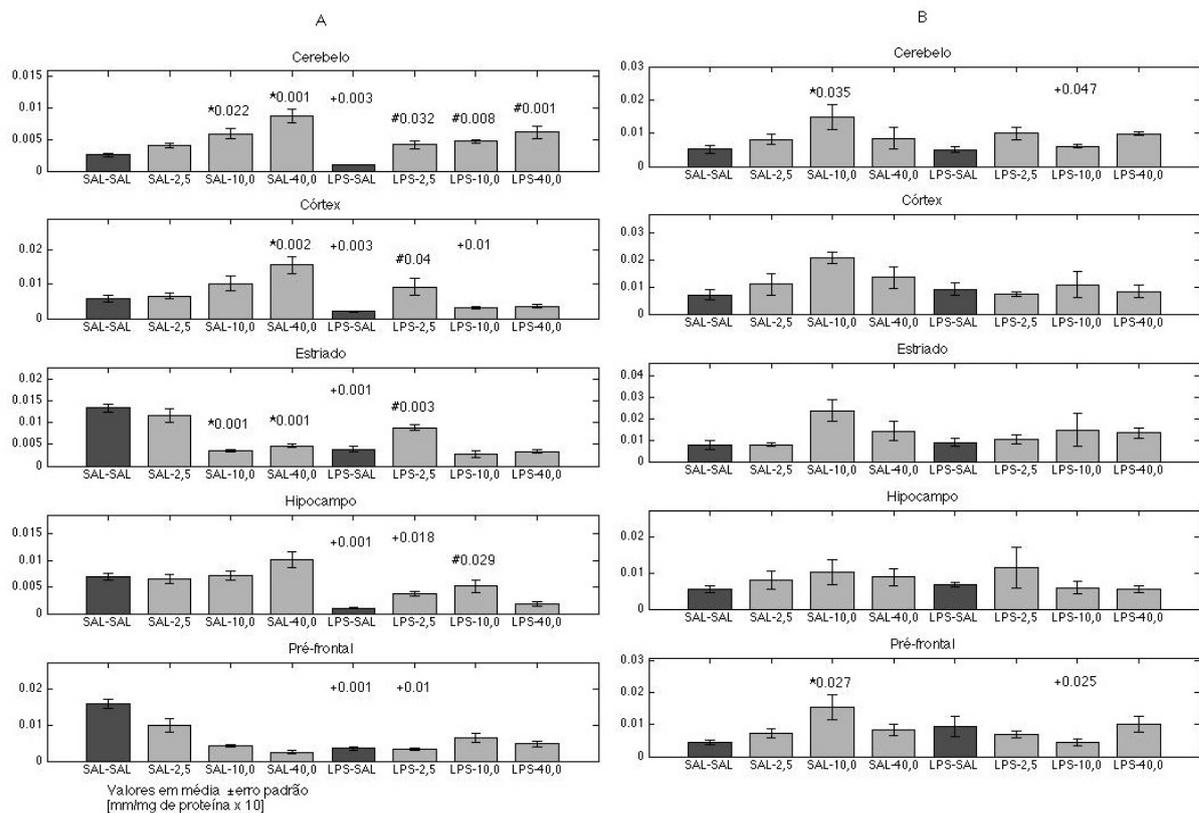
Legenda: Medida de atividade da catalase (CAT) no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com p<0,05(Tukey); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com p<0,05 (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com p<0,05 (T. Student).

4.2.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase, demonstrou significativamente diminuída em todas as estruturas encefálicas analisadas de animais jovens expostos ao LPS em período pré-natal, representadas pelo cerebelo [(T=6,316; p= 0,001)]; córtex posterior [(T=10,103 e p= 0,004)]; estriado [(T=8,223 e p= 0,001)]; hipocampo [(T= 4,239 e p= 0,001)] e córtex pré-frontal [(T=9,081 ; p= 0,001)]. O tratamento com agomelatina reverteu essa condição, aumentando a atividade antioxidante da SOD em cerebelo, nas doses 2,5,10 e 40 mg/kg [(F=12,881 e p= 0,031; F=12,881 e p=0,008; F= 12,881e p=0,001)], respectivamente; em córtex posterior e estriado, na dose de 2,5mg/k com [(F=12,75 ; p= 0,04; F=27,072 e p= 0,003)], respectivamente e em hipocampo, a dose de 10mg/kg [(F=8,78 e p= 0,029)].

No entanto, quando analisados os níveis de SOD em animais adultos, a agomelatina não apresentou efeito protetor.

Figura 21 - Medida da atividade superóxido dismutase (SOD).



Legenda: Medida da atividade superóxido dismutase (SOD) no tecido nervoso de animais jovens (A) e adultos (B) e efeito da administração de agomelatina (2,5,10 e 40 mg/kg) Com *GnA - grupo não exposto ao LPS pré-natal (SAL X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey); #GA- grupo exposto ao LPS pré-natal (LPS X SAL) com $p < 0,05$ (Tukey) e +GnA X GA (SAL x LPS) com $p < 0,05$ (T. Student).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a ação da agomelatina sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos no encéfalo de ratos Wistar expostos ao LPS (100 µg/kg no GD 9,5) em período pré-natal. Após 14 dias consecutivos, os animais foram submetidos ao tratamento crônico com agomelatina nas doses (2,5,10 e 40) mg/kg onde, comportamento social foi comprometido com aumento nas ocorrências de movimentos estereotipados, validando o modelo já reproduzido em outros estudos^{53, 125}. Os resultados desse estudo mostraram que a exposição pré-natal ao LPS em animais jovens nos testes realizados em arena de campo aberto foi capaz de promover modificações de caráter comportamental e bioquímico.

Uma avaliação da ansiedade em roedores pode ser medida analisando a disposição do animal em explorar um ambiente novo¹⁹¹. Nas avaliações comportamentais desse estudo, o teste exploratório “*Open Field*” para o parâmetro “visita ao centro”, em animais em idade jovem, mostrou-se aumentado após a administração crônica de agomelatina nas doses 2,5 e 10mg/kg. Isso significa que os animais jovens com comportamento autista, expostos ao LPS pré-natal, diminuíram o comportamento de ansiedade e risco ao receberem essas dosagens. Esse parâmetro tem sido muito utilizado em estudos pré-clínicos em modelos de transtorno de ansiedade¹⁸⁸. O transtorno da ansiedade tem sido uma das comorbidades mais comuns encontradas nos pacientes com TEA^{40,189}.

Estudos têm demonstrado as propriedades ansiolíticas de agomelatina em modelos animais^{52,163,192}. Tem sido sugerido que o efeito ansiolítico pode estar relacionado com propriedade antagonista 5-HT_{2c} do fármaco. Em estudo com animais que carecem geneticamente desses receptores mostrou-se uma redução no níveis de ansiedade^{169,192}, especialmente em hipocampo e amígdala^{53,54}. A atividade do tipo ansiolítica é compatível com o clorazepato de benzodiazepina no teste do labirinto em cruz elevado, onde a dose a partir de 40mg/kg conseguiu aumentar a entrada nos braços abertos do labirinto durante o período do ciclo de luz diurno. Sua ação ansiolítica no labirinto de cruz depende do mecanismo de bloqueio sinérgico dos receptores de 5-HT_{2c} e de receptores MT₁ / MT₂. Esta conclusão baseia-se nas observações de que essa ação não depende do momento de sua administração do (isto é, de manhã ou à noite)¹⁹³, isso é confirmado a partir dos

resultados de nosso estudo que demonstrou um efeito semelhante quando administrado duas horas antes do anoitecer.

Estudos que corroboram com nossos resultados na ação ansiolítica da agomelatina foram demonstrados na administração crônica com doses de (40-50 mg/kg, ip) por 21 dias consecutivas, revertendo o aumento da ansiedade em modelos de depressão, tais como modelo de estresse pré-natal.^{59,60} Em outro estudo experimental os ratos que receberam a dose de 50 mg/kg por 3 dias, exibiram significativamente comportamento menos ansioso. Nesse modelo, o efeito ansiolítico da agomelatina foi acompanhada por uma normalização da expressão de genes relacionados com ciclo circadiano¹⁹³.

Evidências crescentes demonstraram associação entre a comorbidade ansiedade e distúrbio do sono já na população em geral, com uma acentuada prevalência de insônia entre os indivíduos com o transtorno de ansiedade (70-90%)⁴². Além disso, tem-se encontrado altas taxas de ansiedade também em crianças e adolescências com diagnóstico de TEA, onde fobias sociais, transtorno obsessivo-compulsivo e distúrbios do sono são mais prevalentes⁹³. Em amostras clínicas, aproximadamente 55% das crianças com TEA foram encontradas dentro dos critérios de diagnóstico para pelo menos um transtorno de ansiedade¹⁹⁴. O que ainda não está claro é se os sintomas da ansiedade constituem uma condição separada ou alinhada estreitamente com os sintomas do TEA¹⁹⁴. O isolamento social do TEA pode parecer muito semelhante com a evitação social do transtorno da ansiedade o que confunde os profissionais na hora de fazer o diagnóstico¹⁹⁴. A ansiedade em pacientes autistas podem amplificar os sintomas da síndrome e desencadear maiores dificuldades comportamentais.

Parâmetros comportamentais de ansiedade e interação social avaliados em animais com comportamento autista apresentaram efeitos positivos após o tratamento crônico com agomelatina.

Sabe-se que uma das características mais relevantes do TEA é a diminuição na interação social, manifestada por características como: isolamento ou comportamento social impróprio, dificuldade em participar de atividades em grupo, indiferença afetiva ou demonstrações inapropriadas de afeto e falta de empatia social¹⁹⁰. Um estudo realizado por Karen e colaboradores (2010)¹⁹⁵, mostrou que o estresse pré-natal aumentou o nível de ansiedade em animais experimentais a partir da diminuição da interação social. Neste mesmo estudo, os autores levantam a

hipótese que a mudança nas condições do ambiente intrauterino e níveis de ansiedade podem estar associados. Os achados de nosso estudo corroboraram com estudos prévios¹⁹⁵, demonstrando que uma condição pré-natal alterada, neste caso a partir da mimetização de uma infecção bacteriana, foi capaz de comprometer o desenvolvimento neurológico a ponto de induzir um comportamento autista na prole. Com o objetivo de reverter o comprometimento comportamental da prole, a agomelatina foi administrada cronicamente e o mostrou-se eficaz no parâmetro “seguir” avaliado no teste de interação social tanto em animais jovens quanto adultos. Esse mesmo tratamento amenizou os sintomas de comportamento ansioso avaliados pelo número de visitas ao centro. É possível que a ação ansiolítica da agomelatina encontrada neste modelo experimental possa estar relacionada primeiramente ao seu mecanismo de ação que antagoniza os receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C} altamente expressos em regiões do sistema límbico, além de estar relacionada à tentativa de resincronizar o ciclo circadiano, também alterado no TEA.

Embora nenhum estudo até o presente tenha demonstrado a relação direta de alteração em níveis de um biomarcador específico para o TEA, algumas linhas sugerem que alterações no sistema serotoninérgico possa representar um alvo importante para a compreensão da fisiopatologia desta síndrome. A serotonina (5-HT) tem funções específicas no SNC e na periferia, regulando muitas atividades fisiológicas¹⁹⁶. Em estudos com seres humanos, o 5-HT tem sido demonstrado ser importante para o desenvolvimento do cérebro tanto pré como pós-natal, regulando em ambos o crescimento e a maturação de neurônios¹⁹⁷. Problemas na sinalização serotoninérgica têm sido implicados em comorbidades manifestadas no TEA¹⁹⁸, e alguns dados sugerem uma associação entre a hiperserotonemia (encontrada em 25-35% de indivíduos autistas¹⁹⁹ com comportamento estereotipado ou auto-agressivo²⁰⁰.

A relação próxima entre estresse oxidativo e desenvolvimento do TEA têm sido suportada extensamente pela literatura científica. A alteração de condições ambientais, como manipulação do ambiente intra-uterino, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças neurológicas, indicando que o sistema nervoso é um alvo particularmente susceptível à essas alterações.¹⁴³ A interferência no ambiente intra-uterino influencia no estado redox celular, promovendo estresse oxidativo e iniciando respostas adaptativas que incluem a redução da atividade de metilação²⁰¹.

A metilação tem um papel importante na síntese e compactação da mielina e representa um passo importante no desenvolvimento do SNC ²⁰² e qualquer alteração neste processo conduz a um atraso na sincronização neuronal que é uma característica típica do TEA ²⁰³.

O estresse oxidativo resultante da produção e liberação de radicais livres tem sido implicado ao desenvolvimento do TEA. Evidências apontam para aumento dos níveis de estresse oxidativo em regiões encefálicas de indivíduos autistas especialmente em lobo temporal, frontal, hipocampo e cerebelo. ^{204,205} Estudos *post-mortem* com avaliação de marcadores de estresse oxidativo em crianças autistas apresentaram níveis elevados de hidroperóxidos de lípidos no cerebelo e córtex temporal ²⁰⁶. Considerando esses achados, entre os objetivos deste estudo estava avaliar parâmetros de estresse oxidativo em estruturas encefálicas a partir da ativação imunológica materna. Os resultados mostraram a diminuição da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase no tecido nervoso dos animais experimentais em animais expostos ao LPS em período pré-natal, que foi revertida pelo tratamento com agomelatina. Os resultados mais expressivos em animais jovens quando comparados aos animais adultos podem estar relacionados com o nível de desenvolvimento encefálico. O cérebro em desenvolvimento, ou jovem, é mais excitável que o cérebro maduro, o que o torna mais vulnerável. Esta maior excitabilidade se deve a combinação de inúmeros fatores, tais como: o rápido crescimento e desenvolvimento que torna o cérebro imaturo mais vulnerável a insultos exógenos ²⁰⁷, neurotransmissores como o GABA e glicina que enquanto exercem atividade inibitória no cérebro maduro, realizam atividade excitatória no imaturo ²⁰⁸ o predomínio de sistema de sinalização excitatório em relação ao inibitório facilitando a instalação e a propagação da atividade elétrica sincronizada. ²⁰⁹ e a manifestação da sintomatologia autista.

A melatonina é citada por seu efeito antioxidante e por exercer efeito protetor contra dano oxidativo em células do sistema nervoso. Considerando a ação agonista de melatonina exercida pela agomelatina, é possível que esta substância possa representar um alvo terapêutico para o tratamento dos sintomas do TEA, atenuando os efeitos do estresse oxidativo e protegendo o tecido nervoso contra o processo de apoptose referidos na fisiopatologia desta síndrome. ²¹⁰ Em nossos achados, o tratamento crônico com agomelatina foi capaz de aumentar os níveis da enzima superóxido dismutase no córtex posterior, estriado, hipocampo e cerebelo dos ratos

jovens. O efeito protetor da agomelatina, nesta condição, pode estar associado ao mecanismo de ação na interação dos sistemas melatonérgicos e serotoninérgicos. Em um estudo utilizando um modelo animal de estresse agudo, a agomelatina reduziu o efluxo de GABA nas regiões do hipocampo e amígdala aumentando a variedade de medidas de neuroplasticidade através do sinergismo metatonina/serotonina²¹¹.

No geral, a base neurobiológica do TEA permanece pouco compreendida, em grande parte devido a dificuldades na obtenção de amostras *post mortem* de qualidade e a falta de informações sobre o desenvolvimento inicial do cérebro. No entanto, uma série de estudos neuroanatômicos mostram conectividade neuronal anormal no cerebelo de pacientes autistas, com redução das células de Purkinje²⁰. O suposto papel do cerebelo na fisiopatologia do TEA deixou de ser restrito à disfunções sensoriais e motoras e passou a ganhar mais espaço a partir do momento em que foi relacionado com áreas associativas do sistema nervoso e com funções cognitivas. Além do cerebelo, outras regiões associadas com a cognição como o córtex pré-frontal e córtex anterior, também apresentam conectividade alterada comprometendo funções de linguagem, memória e cognição social¹²⁴, todas relacionadas com o TEA.

Embora haja uma crescente evidência de que a ativação imune materna possa alterar aspectos comportamentais e bioquímicos de animais com comportamento autista, os mecanismos exatos que envolvem essas alterações, provocando o comprometimento encefálico na prole ainda permanecem incertos. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a agomelatina possa apresentar efeitos positivos para o TEA. Estudos mais específicos envolvendo melhoria terapêutica do TEA podem representar perspectivas futuras a novos pesquisadores uma vez que, a agomelatina já comprovou eficácia em outras doenças com sintomatologia semelhante.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que a exposição pré-natal ao LPS causou comportamentos característicos do espectro autista a partir do aumento do número de movimentos repetitivos e estereotipados em ratos Wistar, confirmando a hipótese de que a interferência imune materna está relacionada ao desenvolvimento da síndrome.

O tratamento crônico com agomelatina foi capaz de reverter sintomas de ansiedade e estereotipia, além de melhorar os parâmetros de interação social. Nas análises bioquímicas, o tratamento com agomelatina aumentou a atividade da superóxido dismutase, mostrando efeito protetor, neste aspecto, contra o estresse oxidativo causado pela administração pré-natal de LPS.

Um dos frutos que podem ser colhidos com esse estudo é a aplicação desse modelo experimental de autismo na intervenção farmacológica para buscar um possível tratamento para o TEA, uma doença grave, crônica e de alta prevalência. Nossos resultados mostraram a ação de um agonista metalonérgico em sinergismo com antagonista serotoninérgico que trouxe, em partes, resultados positivos para manifestações clínicas associadas ao TEA.

Como perspectiva, nossos resultados abrem caminhos para novos estudos sobre o efeito da agomelatina no distúrbio do sono e ansiedade no TEA. Outros estudos com o fármaco já mostraram sua eficácia em transtornos da ansiedade e humor e na ressincronização do ciclo do sono, o que confere a agomelatina um provável contribuinte na melhoria da qualidade de vida do autista e de seus cuidadores.

REFERÊNCIAS

1. Volkmar FR, State M, Klin A. Autism and autism spectrum disorders: diagnostic issues for the coming decade. *J Child Psychol Psychiatry*. 2009; 50:108–115.
2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th edition. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
3. Ijichi S, Ijichi N, Ijichi Y, Hirota K, Sameshima H, Kawaike Y, Morioka H. Quantitative Nature of Social Vulnerability and Autism: An Important Paradigm Shift in the DSM-5 for Autism Spectrum Disorder. *SRN Neurol*. 2013; 20171:9:5.
4. Harris JC. Biological Basis of Neurological and Psychiatric Disorders. *Neurobiol Br Dis*. 2015; (6):78-97.
5. OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Classificação dos transtornos Mentais e de comportamento da CID10: Descrições Clínicas e Diretrizes Diagnósticas*. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993.
6. Paula CS, Ribeiro SH, Fombonne E, Mercadante MT. Brief Report: Prevalence of Pervasive Developmental Disorder in Brazil: A Pilot Study. *J. Autism Dev Disord* 2011; 41(12):1738-42.
7. Bower BUS. autismo rate continues to rise: prevalence estimate hits new high at 1 in 88 children. *Sci News*. 2012; 181(9):14.
8. Pedersen A, Pettygrove S, Meaney FJ, Mancilla K, Gotschall K, Kessler DB, Grebe TA, Cunniff C . Prevalence of autism spectrum disorders in Hispanic and non-Hispanic white children. *Pediatr*. 2012; 129(3):629-35.
9. Petição Pública Brasil. Abaixo-assinado pela aprovação projeto dos cinco Centros de Referência em Autismo em São Paulo. São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.peticaopublica.com.br/PeticaoVer.aspx?pi=P2012N23097>. Acesso em 3 março de 2014.
10. CDC. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network 11 sites, United States, 2010 Morbidity and mortality weekly report. *Surveill Summ*. 2014. 63 (2):1–21.
11. Mcpheeters ML, Warren Z, Sathe N, Bruzek JL, Krishnmaswa S, Jerome RN, Veenstra-Vanderweele J. A systematic review of medical treatments for children with autism spectrum disorders. *Pediatr*. 2001; 127(5):1312- 1321.
12. Wink LK, Plawecki MH, Erickson CA, Stigler KA, Mcdougale CJ. Emerging drugs for the treatment of symptoms associated with autism spectrum disorders. *Expert Opin. Emerg. Dr*. 2010; 15(3):481- 494.
13. Herbert MR Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol*. 2010; 23:103–110.

14. Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Moreira JC, Riesgo R, Gottfried C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res.* 2011;1408:8–16
15. Gadad BS, Hewitson L, Young KA, German DC. Neuropathology and Animal Models of Autism: Genetic and Environmental Factors. *Autism Res Treat.* 2013; 1-12.
16. Tordjman S, Somogyi E, Coulon N, Kermarrec S, Colhen D, Gronsard G, et al Gene × Environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. *Front Psychiatry.* 2014; 5:53.
17. Rinaldi T, Perrodin C, Markram H. Hyper-connectivity and hiper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic Acid animal model of autism. *Front Neural Circuits.* 2008; 2:4.
18. Gadia CA, Tuchman R, Rotta NT. Autism and pervasive developmental disorders. *J. Pediatr.* 2004; 80:83-94.
19. Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos PA clinicopathological study of autism. *Brain.* 1998; 125:889–905.
20. Kern JK. Purkinje cell vulnerability and autism: a possible etiological connection. *Brain Dev.* 2003; 25:377–382.
21. Tardito D, Milanese M, Bonifacino T, Musazzi L, Grilli M, Mallei A, Mocaer E, Gabriel-Gracia C, Racagni G, Popoli M, Bonanno G. Blockade of stress-induced increase of glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex by agomelatine involves synergy between melatonergic and 5-HT_{2C} receptor-dependent pathways. *BMC Neurosci.* 2010; 3:68.
22. Anderson G. Genetics of childhood disorders: XLV. Autism, part 4: serotonin in autism. *J. Am Acad Child Adolesc. Psychiatry.* 2002; 41:1513-16.
23. Pardo CA, Vargas DL, Zimmerman AW. Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int Rev Psychiatry.* 2005; 17(6):485-95.
24. Dubocovich ML. Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Med.* 2007; 8:34–42.
25. Wu Y, Zhou JN, Balesar R, Unmehopa U, Bao A, Jockers R, Van Heerikhuizen J, Swaab DF. Distribution of MT1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: Colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. *J Comp Neurol.* 2006; 499:897–910.
26. Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res.* 2010; 181,127–151.

27. Hazlerigg DG, Morgan PJ, Messenger S. Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: what can we learn from the pars tuberalis? *J Biol Rhythms*. 2001; 16:326–335.
28. Peve P, Agez L, Bothorel B, Saboureau M, Gauer F, Laurent V, Masson-Pevet M. Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiol Int*. 2006; 23:39–51.
29. Bachevalier J. Medial temporal lobe structures and autism: A review of clinical and experimental findings. *Neuropsychol*. 1994; 32:627–648.
30. Malow A, Marzec L, McGrew SG, Wang L, Henderson LM, Stone WL. Characterizing sleep in children with autism spectrum disorders children: a multidimensional approach. *Sleep* 2006; 29:1563-71.
31. Miano S, Bruni O, Elia M, Trovato A, Smerieri A, Verrillo E, *et al*. Sleep in children with autistic spectrum disorder: a questionnaire and polysomnographic study. *Sleep Med*. 2007; 9:64-70.
32. Laudon M, Frydman-Marom A. Therapeutic Effects of Melatonin Receptor Agonists on Sleep and Comorbid Disorders. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(9):15924-15950.
33. Dalton P, Deacon R, Blamire A, Pike, M.; McKinlay, I.; Stein, J.; *et al*. Maternal neuronal antibodies associated with autism and a language disorder. *Ann. Neurol*. 2003; 53:533-7.
34. Liu X, Hubbard A, Fabes RA, Adam JB. Sleep disturbances and correlates of children with autism spectrum disorders. *Child Psychiatry Hum Dev*. 2006; 37(2):179-191.
35. Nunes ML, Cavalcante V. Avaliação clínica e manejo da insônia em pacientes pediátricos. *J. de Pediatr*. 2005; 81(4):277-286.
36. Tsai FJ, Chiang HL, Lee CM, Gau SSF, Lee WT, Fan PC, Wu YY, Chiu YN. Sleep problems in children with autism, attention-deficit hyperactivity disorder, and epilepsy *Res Autism Spect Dis*. 2012; 6(1):413–421.
37. Ferry G, Hecht S, Berger S, Moulharat N, Coge F, Guillaumet G, Leclerc V, Yous S, Delagrance P, Boutin JA. Old and new inhibitors of quinone reductase 2. *Chem Biol Interact*. 2010; 186:103–109.
38. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: Implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res*. 2006; 40:1-9.

39. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Trahkt I, Spence DW, Poeggeler B, Hardeland R, Cardinali DP. Melatonin and melatonergic drugs on sleep: possible mechanisms of action. *Int J Neurosci*. 2009; 119:821-46.
40. Mazurek MO, Petroski GF. Sleep problems in children with autism spectrum disorder: examining the contributions of sensory over-responsivity and anxiety. *Sleep Medicine* 2015; 2(16):270–279.
41. Dubocovich M.L, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*. 2005; 27:101–110.
42. Wu YH, Zhou JN, Balesar R, Unmehopa U, Bao A, Jockers R, Van Heerikhuize J, Swaab DF. Distribution of MT1 melatonin receptor immunoreactivity in the human hypothalamus and pituitary gland: Colocalization of MT1 with vasopressin, oxytocin, and corticotropin-releasing hormone. *J Comp Neurol*. 2006; 499:897–910.
43. Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem Pharmacol*. 2010; 80:1844–1852.
44. Al-Ghoul WM, Herman MD, Dubocovich ML. Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *Neuroreport*. 1998; 9:4063–4068.
45. Mazzucchelli C, Pannacci M, Nonno R, Lucini V, Fraschini F, Stankov BM. The melatonin receptor in the human brain: Cloning experiments and distribution studies. *Brain Res. Mol Brain Res*. 1996; 39:117–126.
46. Chaste P, Clements N, Mercati O, Guillaume JL, Delorme R, Botros HG, et al. Identification of Pathway-Biased and Deleterious Melatonin Receptor Mutants in Autism Spectrum Disorders and in the General Population. *PLoS One*. 2010; (7):1-11.
47. Niederhofer H. Efficacy of Duloxetine and Agomelatine Does Not Exceed That of Other Antidepressants in Patients with Autistic Disorder: Preliminary Results in 3 patients. *Prim Care Companion CNS Disord*. 2011; 13(1):1010-1038.
48. Racagni G, Popoli M, Molteni R, Musazzi L, Calabrese F, Tardito D *et al*. Mode of action of agomelatine: synergy between melatonergic and 5-HT_{2C} receptors. *World J Biol Psychiatry*. 2011; 12:574–587.
49. Kennedy SH, Rizvi S, Fulton K, Rasmussen J. A double-blind comparison of sexual functioning, antidepressant efficacy, and tolerability between agomelatine and venlafaxine XR. *J Clin Psychopharmacol*. 2008; 28:329–333.
50. Kennedy SH, Rizvi SJ. Agomelatine in the treatment of major depressive disorder: potential for clinical effectiveness. *CNS Drugs*. 2010; 24: 479–499.

51. Martinotti G, Sepede G, Gambi F, Di IG, De BD, Di NM *et al.* Agomelatine versus venlafaxine XR in the treatment of anhedonia in major depressive disorder: a pilot study. *J Clin Psychopharmacol.* 2012; 32:487–491.
52. Pandi-Perumala SR, Moscovitch A, Srinivasan V, Warren Spence D, Cardinali DP, Brown, GM. Bidirectional communication between sleep and circadian rhythms and its implications for depression: Lessons from agomelatine. *Prog Neurobiol* 2009; 88:264–271.
53. Dagt y  G, Crescente I, Postema F, Seguin L, Moca r CGE, Den Boerb JA, Koolhaas JM. Agomelatine reverses the decrease in hippocampal cell survival induced by chronic mild stress. *Behav Brain Res.* 2011; 218:121–128.
54. Norman TR, Cranston I, Irons JA, Gabriel C, Dekeyne A, Millan MJ *et al.* Agomelatine suppresses locomotor hyperactivity in olfactory bulbectomised rats: a comparison to melatonin and to the 5-HT(2c) antagonist, S32006. *Eur J Pharmacol.* 2012; 674:27–32.
55. Molteni R, Macchi F, Zecchillo C, Dell’Agli M, Colombo E, Calabrese F.; *et al.* Modulation of the inflammatory response in rats chronically treated with the antidepressant agomelatine. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2013; 23:1645-55.
56. Guardiola-Lemaitre B, De Bodinat C, Delagrang  P, Millan PJ, Munoz C, Moca r E. Agomelatine: mechanism of action and pharmacological profile in relation to antidepressant properties. *Br J Pharmacol.* 2014; 171(15):3604-3619.
57. Kennedy SH, Avedisova A, Giménez-Montesinos N, Belaidi C, de Bodinat C A placebo-controlled study of three agomelatine dose regimens (10 mg, 25 mg, 25-50 mg) in patients with major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014; 24(4):553-63.
58. Hickie IB, Rogers NL. Novel melatonin-based therapies: potential advances in the treatment of major depression. *Lancet.* 2011; 378:621–631.
59. Morley-Fletcher S, Mairesse J, Soumier A, Banasr M, Fagioli F, Gabriel C *et al.* Chronic agomelatine treatment corrects behavioral, cellular, and biochemical abnormalities induced by prenatal stress in rats. *Psychopharmacol.* 2011; 217:301–313.
60. Marrocco J, Reynaert ML, Gatta E, Gabriel C, Mocaer E, Di PS *et al.* The effects of antidepressant treatment in prenatally stressed rats support the glutamatergic hypothesis of stress-related disorders. *J Neurosci.* 2014; 34:2015–2024.
61. Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Dekeyne A, Newman-Tancredi A, Pasteau V, *et al.* The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine2C receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 306:954–64.

62. Tardito D, Molteni R, Popoli M, Racagni G. Synergistic mechanisms involved in the antidepressant effects of agomelatine. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012; 22:482–486.
63. Paizanis E, Renoir T, Lelievre V, Saurini F, Melfort M, Gabriel C *et al.* Behavioural and neuroplastic effects of the new-generation antidepressant agomelatine compared to fluoxetine in glucocorticoid receptor-impaired mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2010; 13:759–774.
64. Dagyte G, Trentani A, Postema F, Luiten PG, Den Boer JA, Gabriel C *et al.* The novel antidepressant agomelatine normalizes hippocampal neuronal activity and promotes neurogenesis in chronically stressed rats. *CNS Neurosci Ther.* 2010; 16:195–207.
65. Calabrese F, Molteni R, Gabriel C, Mocaer E, Racagni G, Riva MA. Modulation of neuroplastic molecules in selected brain regions after chronic administration of the novel antidepressant agomelatine. *Psychopharmacol.* 2011; 215:267–275.
66. Taliáz D, Haramati S, Chen A, Zangen A. The role of brain-derived neurotrophic factor in the effect of antidepressant treatments. *J Neurosci,* 2010; 12:904-907.
67. Aguiar CCT, Almeida AB, Araújo PVP, Vasconcelos GS, Chaves EMC, Vale OC, Macêdo DV, Leal LKAM, Viana GSB, Vasconcelos SMM. Effects of Agomelatine on Oxidative Stress in the Brain of Mice After Chemically Induced Seizures. *Cell Mol Neurobiol.* 2013; 33:825–835.
68. Gupta S, Sharma B. Pharmacological benefits of agomelatine and vanillin in experimental model of Huntington's disease. *Pharmacol Biochem and Behavior.* 2014; (122):122–135.
69. Ajuriaguerra J. *Manual de Psiquiatria Infantil.* Barcelona: Toray-Masson Ed; 1977.
70. Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child.* 1943; 2:217-50.
71. Rutter M, Schopler E. Classification of pervasive developmental disorders: some concepts and practical considerations. *J Autism Dev Disord.* 1992; 22:459-82.
72. Sugranyes G, Kyriakopoulos M, Corrigall R, Taylor E, Frangou S. Autism spectrum disorders and schizophrenia: meta-analysis of the neural correlates of social cognition. *PLoS One.* 2011; 6(10):1-13.
73. Rumsey JM, Andreasen NC, Rapoport JL. Thought, language, communication, and affective flattening in autistic adults. *Arch Gen Psychiatry.* 1986; 43:771-7.
74. Charman T, Jones C, Pickles A, Simonoff E, Baird G, Happé F: Defining the cognitive phenotype of autism. *Brain Res.* 2011;1380:10–21.
75. Tager-Flusberg H. Defining language phenotypes in autism. *Clin Neurosci Res.* 2006; 6:219–224.

76. Walker D, Thompson A, Zwaigenbaum L, Goldberg J, Bryson S, Mahoney W, et al :Specifying PDD-NOS: a comparison of PDD-NOS, Asperger syndrome, and autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004; 43:172–180.
77. Lord C, Petkova E, Hus V, Gan W, Lu F, Martin D, et al: A multisite study of the clinical diagnosis of different autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 2011; 69:306–313.
78. McPartland J, Reichow B, Volkmar F. Sensitivity and specificity of proposed DSM-5 diagnostic criteria for autism spectrum disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2012; 51:368–383.
79. Hewitt S. Compreender o Autismo. Estratégia para alunos com autismo nas escolas regulares. Porto: Editora Porto; 2006.
80. Grzadzinski R, Huerta M, Lord C: DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes. *Mol Autism*. 2013; 4(12):5-6.
81. Huerta M, Bishop SL, Duncan A, Hus V, Lord C. Aplicação do DSM-5 critérios para o transtorno do espectro do autismo a três amostras de crianças com diagnósticos do DSM-IV de transtornos invasivos do desenvolvimento. *Am J Psychiatry*. 2012; 169:1056-64.
82. Wing L, Gould J, Gillberg C. Autism spectrum disorders in the DSM-V: Better or worse than the DSM-IV? *Res Dev Disabil*. 2011; 32(2)768–773.
83. Steiner AM, Goldsmith TR. Snow A.V. Practitioner’s guide to assessment of autism spectrum disorders in infants and toddlers. *J Autism Dev Disord*. 2012; 42(6):1183–1196.
84. Shriver E. Autism Overview: What we know [Internet]. 2005 [updated 2005 May]. Available from: http://www.nichd.nih.gov/search.cfm?search_string=AUTISM&submitb=.
85. Rego SWSE. Autismo: fisiopatologia e biomarcadores [Dissertação]. Covilhã: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior. 2012.
86. Ozonoff S, Iosif AM, Baguio F, Cook IC, Hill MM, Hutman T, Young GS. A prospective study of the emergence of early behavioral signs of autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010; 49(3):256– 66.
87. Elsabbagh M, Divan G Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marci’n C, *et al*. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res*. 2012; 5:160–179.
88. Centers for Disease Control. Prevalence of Autism Spectrum Disorders Among Children Aged 8 Years – Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2010. *Surveill Summ*. 2014; 63(SS02), 1–21).

89. Ferreira ECV. Prevalência de autismo em Santa Catarina: uma visão epidemiológica contribuindo para a inclusão social [dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2008.
90. Teixeira MCTV, Mecca TP, Velloso RI, Bravo RB, Ribeiro SHB, Mercadante MT, et al. Literatura científica brasileira sobre transtornos do espectro autista. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56(5):607-14.
91. Fombonne E. The prevalence of autism. *JAMA.* 2003;289:87–9.
92. Regina Basso Zanon; Bárbara Backes; Cleonice Alves Bosa. Identificação dos primeiros sintoma do sintomas do autismo pelos pais *Psic.: Teor. E Pesq.* vol.30 no.1 Brasília jan./mar. 2014;Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
93. Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JT. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med.* 2015; 3:601-613.
94. Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet.* 2008; 9:341–55.
95. Zilbovicius M, Meresse I, Boddaert N. Autismo: neuroimagem. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006; 28:21-8.
96. Bugalho P, Correa B, Viana-Baptista M. Role of the cerebellum in cognitive and behavioural control: scientific basis and investigation models. *Acta Med. Port.* 2006; 19:257-67.
97. Bachevalier J. Brief Report: Medial temporal lobe and autism: a putative animal model in primates. *J autism Dev Disord.* 1996; 26(2):217-20.
98. Baptista CR, Bosa C. Autismo e Educação: reflexões e propostas da intervenção. Porto Alegre: Artmed: 2002.
99. Waterhouse L, Fein D, Modahl C. Neurofunctional mechanisms in autism. *Psychol Rev.* 1996; 103:457-89.
100. Lakshmi Priya A, Geetha V, Suganya S, Sujatha .Abnormal circadian rhythm and cortisol excretion in autistic children:. 2013; 54:33–41.
101. Jasen LM., Gispén-de wíed CC, Van der Gaag RJ, Van Engeland H. Differentiation between autism and multiple complex developmental disorder in response to psychosocial stress. *Neuropsychopharmacol.* 2003; 28(3):582-590.
102. Tani P, Lindberg N, Matto V, Appelberg B, Nieminen-VonWent, T, Von Wend L, Porkka-Heiskanen T. Higher plasma ACTH levels in adults with Asperger syndrome. *J Psychosom Res.* 2005; 58(6):533-536.

103. Coyle P, Tran N, Fung JN, Summers BL, Rofe AM. Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. *Behav Brain Res.* 2009; 197(1):210-218.
104. Vargas DL, Nascibene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.* 2005; 57(1):67-81.
105. Rodriguez JI, Kern JK. Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *Neuron Glia Biol.* 2011; 7(2-4):205–213.
106. Meyer U, Nyfeeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav Immun.* 2008; 22:(4):469-486.
107. Meyer U, Feldon J, Fatemi SH. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav R.* 2009; 33(7):1061-1079.
108. Meyer U, Feldon J, Damman O. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation? *Pediatr Res.* 2011; 69(5)(2):26-33 2011.
109. Meyer U, Feldon J. To poly(I:C) or not to poly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacol.* 2012; 62(3):1308-1321.
110. Boksa, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. *Brain Behav Immun* 2010; 249(6):881-897.
111. Theoharides TC, Asadi S, Patel AB. Focal brain inflammation and autism. *J Neuroinflamm.* 2013; 10:46.
112. Hagberg H, Gressens P, Mallard C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol.* 2012; 71:444-57.
113. Theoharides TC, Kempuraj D, Redwood L. Autism: an emerging neuroimmune disorder' in search of therapy. *Expert Opin Pharmacol.* 2009; 10(13):2127-2143.
114. El-Ansary AK, Ben Bacha AG, Al-Ayadhi LY. Proinflammatory and proapoptotic markers in relation to mono and di-cations in plasma of autistic patients from Saudi Arabia. *J Neuroinflamm.* 2011; 8:142.
115. Lintas C, Sacco R, Persico AM. Genome-wide expression studies in autism spectrum disorder, Rett syndrome, and Down syndrome. *Neurobiol Dis.* 2012; 45(1):57-68.

116. Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun.* 2011; 25: 40–45.
117. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. Neuroinflammation in autism spectrum disorders *Journal of Neuroinflamm.* 2012; 9:265.
118. Goines PE, Ashwood P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment. *Neurotoxicol and Teratol.* 2013; 36:67–81.
119. Ricci S, Businaro R, Ippoliti F, VL Vasco, F Massoni, E Onofri, et al. Altered cytokine and BDNF levels in autism spectrum disorder. *Neurotox Res.* 2013; 24:491–501.
120. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS Development. *Neuron.* 2009; 24(1) 61–78.
121. Garay PA, Hsiao EY, Patterson PH, McAllister AK. Maternal immune activation causes age- and region-specific changes in brain cytokines in offspring throughout development *Brain Behav Immun.* 2013; 31:54-68.
122. Atladotir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, Parner, ET. Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* 2010; 40:1423–1430.
123. Hsiao EY Immune dysregulation in autism spectrum disorder. *Int Rev Neurobiol.* 2013; 113:269-302.
124. Vorhees VC, Graham DL, Braun AA, Schaefer TL, Skelton MR, Richtand NM, Michael Williams MT. Prenatal immune challenge in rats: Altered responses to dopaminergic and glutamatergic agents, prepulse inhibition of acoustic startle, and reduced route-based learning as a function of maternal body weight gain after prenatal exposure to Poly IC. *Synapse.* 2012; 66(8):725–737.
125. Bernardi MM, Kirsten TB, Trindade MO. Sobre o Autismo, Neuroinflamação e Modelos Animais para o Estudo de Autismo: Uma Revisão. *Rev Neurocienc.* 2012; 20:117-27.
126. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J. Immunol.* 1992; 162: 2749–3752.
127. Enstrom AM, Onore CE, Van de Water JA, Ashwood P. Differential monocyte responses to TLR ligands in children with autism spectrum disorders *Brain Behav Immun.* 2010; 24(1):64–71.

128. Hurst J, Von Landenberg P. Toll-like receptors and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 2008; 7:204–208.
129. Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, Kidd GJ, Bergmann CC, Stohlman SA, Trapp BD. Neurobiology of Disease Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation and Neuroprotection against Experimental Brain Injury Is Independent of Hematogenous TLR4. *J. Neurosci.* 2012; 32(34):11706–11715.
130. Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, Rossetti C, Molteni M, Casalgrandi M, Manfredi AA, Bianchi ME, Vezzani A. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med.* 2010; 16(4):413-9.
131. Liu ZQ, Kunimatsu M, Yang JP, Ozaki Y, Sasaki M, Okamoto T. Proteolytic processing of nuclear factor kappa B by calpain in vitro. *FEBS Lett.* 1996; 385:109-113,1996.
132. Chu ZL, Mckinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malin MH, Ballad DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kB control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 10057–10062.
133. Cullen SJ, Ponnappan S. Proteasome inhibition up-regulates inflammatory gene transcription by an atypical of NF- kappaB activation. *Biochem. Pharmacol.* 1979; (5):706-714.
134. O'neil LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2007; (7):353-364.
135. Raison CL, Rook GW, Miller AH, Begay TK. Role of Inflammation in Psychiatric Disease; Biological Basis of Neurological and Psychiatric Disorders. *Neurobiol Brain Dis.* 2015; 26:396–421.
136. Watts C. Location: identifying the neighborhoods of LPS signaling. *Nature.* 2008; 9:343-345.
137. Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Manoj Kumar PP, Mantovali A. Toll-like receptor family and signaling pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 2000; 28:563-566.
138. Lucas K, Maes M. Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway. *Mol Neurobiol.* 2013; 48(1):190-204.
139. Jennifer Meada, b, Paul Ashwood Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunol Lett.* 2015; 163(1)49–55.
140. Bolan H, Stilman M, Lev V, Huleihel M. Normal aging of offspring mice of mothers with induced inflammation during pregnancy. *Neurosci.* 2006; 141:1909-1918.

141. Girard S, Tremblay L, Lepage M, Sébire G. IL-1 receptor Antagonist Protects against Placental and Neurodevelopmental Defects Induced by Maternal Inflammation. *J Immunol.* 2013; 184(7):3997-4005.
142. Rossignol DA, Frye RE. Melatonin in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol.* 2011; 53:783–792.
143. Hegazy HG, Elham HA, Ali Amany H, Elgoly M. Interplay between pro-inflammatory cytokines and brain oxidative stress biomarkers: Evidence of parallels between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain physiopathology in autism rat model. *Cytokine.* 2015; 173–180.
144. Pandey KB, Rizvi SI. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2010; 3(1): 2–12.
145. Cadenas E, Davies KJ. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29:222-230.
146. Sharma R, Awasthi S, Zimniak P, Asthi Y. C Transport of glutathione-conjugates in human erythrocytes. *Acta Biochim Pol.* 2000; 47(3):751-762.
147. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Exp Neurol.* 2007; 208(1):1-25.
148. Hallwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs and Aging.* 2001; 18:685-716.
149. Hallwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn. Oxford University Press, 2006.
150. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen IL. Oxidative stress in autism: Increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin - the antioxidant proteins, *Life Sci.* 2004; 25:39-49.
151. Sajdel-Sulkowska EM, Xu M, McGinnis W, Koibuchi N. Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD) *Cerebellum.* 2011; 10:43-8.
152. Adams JB, Audhya T, Donough-Means S, Rubin RA, Quig D, Geis E, Gehn E, Loresto M, Mitchell J, Atwood S, Barnhouse S, Lee W: Nutritional and Metabolic Status of Children with Autism vs. Neurotypical Children, and the Association with Autism Severity. *Nutr Metab.* 2011; 8:34.
153. Falcon J, Besseau L, Fuentes M, Sauzet S, Magnanou E, Boeuf G. Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1163:101–11.
154. Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: “the Timezyme”. *J Biol Chem.* 2007; 282: 4233–4237.

155. Bruni O, Alonso-Alconada D, Besag F, Biran V, Braam W, Cortese S, Moavero R, Parisi P, Smits M, Van der Heijden K, Curatolo P. Current role of melatonin in pediatric neurology: Clinical recommendations. *Eur J Pediatr Neurol.* 2015; 19(2):122–133.
156. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, *et al.* Melatonin signaling and cell protection function. *Faseb J.* 2010; 24:3603-24.
157. Brunner P, Sozer-Topcular N, Jockers R, Ravid R, Angeloni D, Fraschini F, Eckert A, Muller-Spahn F, Savaskan E. Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. *Eur J Histochem.* 2006; 50, 311–316.
158. Larson, J, Jessen RE, Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Manev H. Impaired hippocampal long-term potentiation in melatonin MT2 receptor-deficient mice. *Neurosci Lett.* 2006; 393:23–26.
159. Malow B, Adkins KW, McGrew SG, Wang L, Goldman SE, Fawke D. Melatonin for Sleep in Children with Autism: A Controlled Trial Examining Dose, Tolerability, and Outcomes. *J Autism Dev Disord.* 2012; 42:1729–1737.
160. Melke J, Goubran Botros H, Chaste P, Betancur C, Nygren G, Anckarsater H, *et al.* Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry.* 2008; 13:90-8.
161. Cusmano DM, Mong JA. In utero exposure to valproic acid changes sleep in juvenile rats: a model for sleep disturbances in autism. *Sleep.* 2014; 37(9):1489-99.
162. Yang CJ, Tan HP, Yang FY, Liu CL, Sang B, Zhu XM, Du YL. The roles of cortisol and pro-inflammatory cytokines in assisting the diagnosis of autism spectrum disorder. *Res Spect Dis.* 2015; 9:174–181.
163. De Berardis D, Marini S, Fornaro M, Srinivasan V, Iasevoli F, Tomasetti C, Valchera A, Perna G, *et al.* The Melatonergic System in Mood and Anxiety Disorders and the Role of Agomelatine: Implications for Clinical Practice. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(6):12458-12483.
164. Mead J, Ashwood P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunol Lett.* 2015; 163(1):49-55.
165. Chen MH, Wei HT, Chen LC, Su PT, Bai YM, Hsu JW, Huang KL, Chang WH, Chen TJ, Chen YS, Autistic spectrum disorder, attention deficit hyperactivity disorder, and psychiatric comorbidities: A nationwide study. *Res Spect Dis.* 2015; 10:1–6.
166. Jeste S. A neurologia das perturbações do espectro do autismo. *Curr Opin Neurol.* 2011; 1: 329-36.

167. Kasper S., Hajak G., Wulff K., Hoogendijk W.J., Montejo A.L., Smeraldi E., Rybakowski J.K., Quera-Salva M.A., Wirz-Justice A.M., Picarel-Blanchot F., et al. Efficacy of the novel antidepressant agomelatine on the circadian rest-activity cycle and depressive and anxiety symptoms in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind comparison with sertraline. *J. Clin. Psychiatr.* 2010; 71:109–120.
168. Maclsaac S.E., Carvalho A.F., Cha D.S., Mansur R.B., McIntyre R.S. The mechanism, efficacy, and tolerability profile of agomelatine. *Expert Opin. Pharmacother.* 2014; 15:259–274.
169. Fornaro M, McCarthy MJ, De Berardis D, De Pasquale C, Tabaton M, Martino M, Colicchio S, Cattaneo CI, D'Angelo E, Fornaro P. Adjunctive agomelatine therapy in the treatment of acute bipolar II depression: a preliminary open label study. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2013; 9:243-51.
170. Grosshans M., Mutschler J., Luderer M., Mann K., Kiefer F. Agomelatine is effective in reducing insomnia in abstinent alcohol-dependent patients. *Clin. Neuropharmacol.* 2014; 37:6–8.
171. Descamps A, Rousset C, Millan MJ, Spedding M, Delagrangé P, Cespuoglio R. Influence of the novel antidepressant and melatonin agonist/serotonin_{2C} receptor antagonist, agomelatine, on the rat sleep–wake cycle architecture. *Psychopharmacol.* 2009; 205: 93–106.
172. Mairesse J, Silletti V, Laloux C, Zuena AR, Giovine A, Consolazione M *et al.* Chronic agomelatine treatment corrects the abnormalities in the circadian rhythm of motor activity and sleep/wake cycle induced by prenatal restraint stress in adult rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013; 16:323–338.
173. Bertaina-Anglade V, Drieu-La-Rochelle C, Mocaër E, Seguin L. Memory facilitating effects of agomelatine in the novel object recognition memory paradigm in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2011; 98:511–517.
174. Ladurelle N, Gabriel C, Viggiano A, Mocaer E, Baulieu EE. Agomelatine modulates the expression of cytoskeletal microtubular proteins, synaptic markers and BDNF in the rat hippocampus, amygdala and PFC. 2012. *Psychopharmacol.* 2008; 221:493–509.
175. Bernardi MM, Spinosa HS, Górnica SL. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal: Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006; 807-16.
176. Chenu F, El Mansari M, Blier P. Electrophysiological Effects of Repeated Administration of Agomelatine on the Dopamine, Norepinephrine, and Serotonin Systems in the Rat Brain. *Neuropsychopharmacol.* 2013; 38:275-84.
177. Schneider T, Przewlocki R, Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacol.* 2005; 30:80-89.

178. Battisti A, Cantini R, Feci E, Frigimelica G, Guido M, Roques A. Detection and evaluation of seed damage of cypress. *Cupressus semprevirens* L. *Seed Sci Technol.* 2000; 28(3):731-40.
179. Courvoisier H, Moisan MP, Sarrieu A, Hendley ED, Morméde P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. *Brain Res.* 1996; (743):77-85.
180. Prut I, Belzunc C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003; 463:3-33.
181. Moreira RM. Depleção cerebral de serotonina durante o período neonatal programa homeostase metabólica energética e a expressão comportamental de ratos adultos [Dissertação]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Veterinária, 2008.
182. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Met Enzyme.* 1990; 186:421-31.
183. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Met Enzyme.* 1990; 186:464-478.
184. Abebi H. Catalase in vitro. *Met Enzyme.* 1984; 105:121.
185. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Crit Rev Biochem.* 1987; 22:111–180.
186. Lowry OH, Rosebrough AL, Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265–275.
187. Crawley JN, Paylor R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav.* 1997; 3:197-211.
188. Einat H. Modelling facets of mania new directions related to the notion of endophenotypes. *J. Psychopharmacol.* 2006; 20:714-22.
189. Cervantes P, Matson JL, Tureck K, Adams HL. The relationship of comorbid anxiety symptom severity and challenging behaviors in infants and toddlers with autism spectrum disorder. *Res Autism Spect Dis.* 2013; 7(12):1528–1534.
190. Geschwind DH. Advances in autism. *Annu Rev Med.* 2009; 60:367-380.
191. Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988; 31(4):959-62.

192. Millan MJ, Brocco M, Gobert A, Dekeyne A. Anxiolytic properties of agomelatine, an antidepressant with melatonergic and serotonergic properties: Role 5-HT (2C) receptor blockade. *Psychopharmacol.* 2005;177:1-12.
193. Koresh O, Kozlovsky N, Kaplan Z, Zohar J, Matar MA, Cohen H. The long-term abnormalities in circadian expression of *Period 1* and *Period 2* genes in response to stress is normalized by agomelatine administered immediately after exposure. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012; 22:205–221.
194. Francisca J. Van Steensel A, Bögels SM, Perrin S, Anxiety Disorders in Children and Adolescents with Autistic Spectrum Disorders: A Meta-Analysis *Clin. Child. Fam. Psychol. Rev.* 2011; 14(3):302–317.
195. Karen L. Jones, Ryan M. Smith, Kristin S. Edwards, Bennet Givens, David Q. Beversdorf Combined effect of maternal serotonin transporter genotype and prenatal stress in modulating offspring social interaction. *Int J Dev Neurosci.* 2010; 28(6):529–536.
196. Yang CJ, Liu CL, Sang B, Zhu XM, Du YJ. The combined role of serotonin and interleukin-6 as biomarker for autism. *Neuroscience.* 2015; (284):290-296.
197. Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res Bull.* 2001; (56):479–485.
198. Meyer RR, A review of the serotonin transporter and prenatal cortisol in the development of autism spectrum disorders. *Mol Autism.* 2013; (4):554-561.
199. Hranilovic D, Bujas-Petkovic Z, Vragovic R, Vuk T, Hock K, Jernej B. Hyperserotonemia in adults with autistic disorder. *J Autism Dev Disord.* 2007; (37):1934–1940.
200. Veenstra-VanderWeele J, Muller CL, Iwamoto H, Sauer JE, Owens WA, Shah CR, *et al.* Autism gene variant causes hyperserotonemia, serotonin receptor hypersensitivity, social impairment and repetitive behavior. *Proc Natl Acad Sci.* 2012; (109):5469–5474.
201. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005; (12):1161–1208.
202. Campagnoni AT. Molecular biology of myelin proteins from the central nervous system. *J Neurochem.* 1988; (51)1–14.
203. Deth R, Muratore C, Benzecry J, Power-Charnitsky VA, Waly M. How environmental and genetic factors combine to cause autism: a redox/methylation hypothesis. *Neurotoxicology.* 2008; (29):190–201.
204. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Rev. Toxicol.* 1987; 27-79.

205. Evans TA, Siedlak SL, Lu L, Fu X, Wang Z, McGinnis WR, et al. The autistic phenotype exhibits a remarkably localized modification of brain protein by products of free radical-induced lipid oxidation. *Am. J. Biochem.* 2008; 4:61-72.
206. Chauhan A, Gu F, Essa M M, Wegiel J, Kaur K, Brown WT, et. al. Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. *J. Neurochem.* 2011; 117:209-20.
207. Mizrahi EM. Acute and chronic effects of seizures in the developing brain: lessons from clinical experience. *Epilepsia.* 1999; 40(1):42- 50.
208. Galanopoulou AS. Sexually dimorphic expression of KCC2 and GABA function. *Epilepsy Res.* 2008; (80):99-113.
209. Holmes GL. Epilepsy in the developing brain: lessons from the laboratory and clinic. *Epilepsia.* 1997; (38):29.
210. Vimala PV, Bhutada PS, Patel FR. Therapeutic potential of agomelatine in epilepsy and epileptic complications. *Med Hypotheses.* 2015; (85):105-110.
211. Reagan LP, Reznikov LR, Evans AN, Gabriel, C, Mocaër E, Fadel JR. The antidepressant agomelatine inhibits stress-mediated changes in amino acid efflux in the rat hippocampus and amygdala. *Brain Res.* 2012; 1466: 91–98.

ANEXO

ANEXO A- Parecer Comissão de Ètica no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
 COMISSÃO DE ÈTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISUL

Tubarão, 10 de março de 2014.

Registro na CEUA (código): 13.024.2.01.IV

Ao pesquisador: Jucélia Jeremias Fortunato

Curso de Biologia - Campus Universitário Tubarão

Prezado(a) Pesquisador(a) ,

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa "**Avaliação da influência do sistema metalonérgico sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em um modelo experimental de autismo**", foi aprovado pela Comissão de Ètica no Uso de Animais - CEUA da UNISUL.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, o disposto na legislação federal aplicável à criação e a utilização de animais em atividades de ensino e de pesquisa, realizadas pelos corpos docente, discente e técnico-administrativo da UNISUL e pesquisadores de outras instituições, caracterizando-se a sua atuação como educativa, consultiva, de assessoria e fiscalização nas questões relativas à matéria, sob os aspectos: I - Ètico; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostariamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informado imediatamente à Comissão de Ètica no Uso de Animais da UNISUL.

Atenciosamente.

Peter Johann Bürger

Coordenador da Comissão de Ètica no Uso de Animais – CEUA/UNISUL

Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina

☎ (48) 3279-1036

✉ ceua@unisul.br peter.burger@unisul.br



Antes de imprimir este e-mail pense em sua responsabilidade e compromisso com o MEIO AMBIENTE