



**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**CAROLINE LIANA MENSCHHEIN MEDEIROS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RISPERIDONA E DO ARIPIRAZOL SOBRE O  
COMPORTAMENTO TIPO-AUTISTA E PARÂMETROS OXIDATIVOS EM RATOS  
JOVENS: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO.**

Tubarão

2019

**CAROLINE LIANA MENSCHHEIN MEDEIROS**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RISPERIDONA E DO ARIPIRAZOL SOBRE O  
COMPORTAMENTO TIPO-AUTISTA E PARÂMETROS OXIDATIVOS EM RATOS  
JOVENS: ENSAIO PRÉ-CLÍNICO.**

**LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS**

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

Orientador: Prof. Rafael Mariano Bitencourt, Dr  
Co-orientadora: Prof. Jucelia Jeremias Fortunado, Dr

Tubarão

2019



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Avaliação do efeito da risperidona e do aripiprazol sobre o comportamento tipo-autista e parâmetros oxidativos em ratos jovens: estudo pré-clínico.

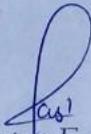
CAROLINE LIANA MENSCHHEIN MEDEIROS  
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 29 de julho de 2019.

Doutor Rafael Mariano de Bitencourt (orientador)

Doutora Flávia Karine Rigo (Avaliador externo - Unesc)

Doutora Fabricia Cardoso Petronilho (avaliador interno)



*Professora Doutora Fabiana Schuelter Trevisol*

COORDENADORA ADJUNTA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Dedico este trabalho a todas as crianças diagnosticadas com Transtorno do Espectro Autista, que nos inspiram a estudar em busca de repostas para o que tão pouco sabemos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me acompanhar e não me permitir desistir frente a tantos momentos de dificuldade. Só Ele sabe quão difícil foi chegar até aqui.

Agradeço infinitamente a minha querida co-orientadora, professora e amiga Dra. Jucelia Jeremias Fortunato, aquela que aceitou entrar nessa jornada comigo, que fez acreditar que seria possível, mesmo não estando mais vinculada ao PPGCS. Agradeço por toda paciência e ajuda, por me ensinar não só como fazer pesquisa e experimentação animal, mas como poder ser melhor como pessoa.

Ao professor Dr. Rafael Mariano Bitencourt, por ter aceito ser meu orientador de maneira inesperada e tardia, por se mostrar sempre tão solícito e colaborativo, eis admirável como professor e como ser-humano.

A toda equipe, colegas de experimentos, por toda paciência e colaboração, em especial a Fabiana Durante, Tamires Mateus Gomes, Naiana Da Rosa, Eduardo De Medeiros Peretti, Ana Oliva Martins, sem vocês este trabalho não teria sido possível.

A colaboradora da UNISUL, responsável pela secretaria do PPGCS Silvane, por sua dedicação e atenção para com os alunos, sempre disposta a nos ajudar, com um sorriso no rosto e palavras de carinho quando precisávamos.

A minha família, todos que me ajudaram de alguma maneira, especialmente os que cuidaram da minha filha para que conseguisse fazer os experimentos, as reuniões e escrever o trabalho.

Aos meus pais Laurentino e Itala, por serem minha base, minha motivação, por me apoiarem e por torcerem por mim, de maneira incondicional.

Ao meu marido, meu amor, Marcos, aquele que sempre acreditou e que repetiu incontáveis vezes que eu era capaz. Minha gratidão por tudo e por poder compartilhar estes momentos da vida ao teu lado.

A minha filha, minha Beatriz, aquela é a luz dos meus dias, que me faz sempre querer melhorar e que me motiva a ser alguém que ela possa sentir orgulho de chamar de mãe.

Por fim, a todas as pessoas não mencionadas, mas que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

## RESUMO

**Introdução:** o Transtorno do Espectro Autista é um distúrbio do neurodesenvolvimento com graus variáveis de comprometimento nos indivíduos. Os déficits na comunicação social e a presença de padrões comportamentais restritos e repetitivos são essenciais para o diagnóstico. Fatores etiológicos como neuroinflamação e estresse oxidativo no Sistema Nervoso Central podem estar envolvidos na sua fisiopatogênese. O crescente aumento da prevalência preocupa a comunidade científica e impulsiona a realização de estudos, inclusive nas possibilidades terapêuticas para melhora comportamental.

**Objetivo:** avaliar os efeitos do uso de risperidona e aripiprazol sobre os parâmetros comportamentais e estresse oxidativo em um modelo experimental de autismo.

**Métodos:** Para indução do modelo animal de autismo foi realizada ativação imune materna usando LPS. As fêmeas da prole foram separadas em dois grupos: tipo-autista e não-autista. Em seguida, foram divididas em grupos conforme o tratamento que receberam: risperidona ou aripiprazol ou salina, durante 21 dias. A partir do PND 43 os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Após, foram encaminhados para eutanásia e as estruturas encefálicas (hipocampo e córtex pré-frontal) dissecadas e o material enviado para análise bioquímica de TBARS, Carbonilação protéica, SOD e CAT.

**Resultados:** A ativação imune materna na prole foi confirmada através do parâmetro de cheirar do teste de interação social. O tratamento com aripiprazol e risperidona foi capaz de melhorar alguns padrões comportamentais de interação social e memória de curto prazo, com tendência a melhores resultados com aripiprazol. Em relação aos dados avaliados referentes ao estresse oxidativo, os resultados não foram significativos.

**Palavras-chave:** Transtorno do Espectro Autista, aripiprazol, risperidona, lipopolissacarídeos, estresse oxidativo

## ABSTRACT

**Introduction:** Autistic Spectrum Disorder is a neurodevelopmental disorder with varying degrees of impairment in individuals. Social communication deficits and the presence of restricted and repetitive behavioral patterns are essential for the diagnosis. Etiological factors such as neuroinflammation and oxidative stress in the Central Nervous System may be involved in its pathophysiology. The rising prevalence increases concern for the scientific community and drives studies, including the therapeutic possibilities for behavioral improvement.

**Objective:** To evaluate the effects of risperidone and aripiprazole use on behavioral parameters and oxidative stress in an experimental autism model.

**Methods:** To induce the animal model of autism, maternal immune activation was performed using LPS. The offspring females were separated into two groups: autistic type and non-autistic type. Then, they were divided into groups according to the treatment they received: risperidone or aripiprazole or saline for 21 days. From PND 43 the animals were submitted to behavioral tests. Afterwards, they were referred for euthanasia and the brain structures (hippocampus and prefrontal cortex) dissected and the material sent for biochemical analysis of TBARS, protein carbonylation, SOD and CAT.

**Results:** Maternal immune activation in offspring was confirmed by the smelling parameter of the social interaction test. Treatment with aripiprazole and risperidone was able to improve some behavioral patterns of social interaction and short-term memory, with a tendency for better outcomes with aripiprazole. Regarding the oxidative stress evaluated data, the results were not significant.

**Keywords:** Autistic Spectrum Disorder, aripiprazole, risperidone, lipopolysaccharides, oxidative stress

## LISTAS

### Lista de abreviaturas

AIM – Ativação Imune Materna

APA – Associação Americana de Psiquiatria (Do inglês, *American Association of Psychiatric*)

CAT - Catalase

CDC – Centro de Controle de Doenças (Do inglês, *Control Disease Center*)

CID – Código Internacional de Doenças

DSM – Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (Do inglês, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*)

DNPH – Dinitrofenilhidrazina

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FDA – do inglês, *Food and Drugs Administration*

GPx – Glutaciona peroxidase

GSH - Glutaciona

IL – Interleucina

IP – Intraperitoneal

IMC – Índice de Massa Corporal

LPS – Lipopolissacarideo

MDA – Malondialdeído

MCD – Memória de Curta Duração

MIA – Morte Indolor Assistida

MLD – Memória de Longa Duração

MIA – Morte Indolor Assistida

Poly C – Ácido policitidílico

PND - Dia Pós-Natal (Do Inglês, *Postnatal day*)

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SOD – Superóxido Dismutase

TBA – Ácido Tiobarbitúrico (Do Inglês, *acid thiobarbituric*)

TBARS – Medida de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (Do Inglês, *Reactive Substances measure Thiobarbituric Acid*)

TEA – Transtorno do Espectro Autista

TID – Transtorno Invasivo do Desenvolvimento

Th17 - Linfócitos Auxiliares T17 (Do Inglês, *Auxiliary lymphocytes T17*)

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa (Do Inglês *Tumor Necrosis Factor*)

## Lista de figuras

Figura 1 - Ativação Imune Materna .....	18
Figura 2 - Anatomia do hipocampo em ratos.....	22
Figura 3 - Diagrama esquemático das etapas do delineamento experimental realizado no estudo .....	32
Figura 4 - Número (4A) e frequência (4B) de episódios de <i>grooming</i> realizados pelos grupos experimentais (n:10-12) .....	41
Figura 5 - Parâmetros avaliados no teste de Interação Social: cheirar (5A), seguir (Figura 5B), montar (Figura 5C) e permitir a monta (Figura 5D) realizados pelos grupos experimentais (n:10-12).....	43
Figura 6 - Avaliação da MCD (6A) e MLD (6B) na fase de treino e teste nos grupos experimentais (n:10-12).....	44
Figura 7 - Avaliação da média de ganho de peso, entre o início e o fim do tratamento, observados nos grupos experimentais (n:10-12) .....	45
Figura 8 - Medida de substâncias reativas ao TBARS no córtex pré-frontal (Figura 8A) e hipocampo (Figura 8B) realizadas nos grupos experimentais (n=6) .....	46
Figura 9 - Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no córtex pré-frontal (Figura 9A) e hipocampo (Figura 9B) realizadas nos grupos experimentais (n=6).....	46
Figura 10 - Avaliação da atividade da CAT e SOD no córtex pré-frontal (A-CAT e A-SOD) e hipocampo (B-CAT e B-SOD) realizadas nos grupos experimentais (n=6).....	47



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
<b>1.1.1 Histórico do Autismo</b> .....	14
<b>1.1.2 Dados Epidemiológicos</b> .....	15
<b>1.1.3 Fatores Etiológicos</b> .....	16
1.1.3.1 TEA e modelo animal .....	17
1.1.3.2 Neuroinflamação no TEA .....	18
1.1.3.3 Estresse oxidativo e TEA .....	19
<b>1.1.4 Memória e TEA</b> .....	21
<b>1.1.5 Diagnóstico</b> .....	24
<b>1.1.6 Tratamento</b> .....	26
1.1.6.1 Antipsicóticos atípicos e estresse oxidativo .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	30
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3. MÉTODOS</b> .....	31
3.1 TIPO DE ESTUDO .....	31
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....	31
3.3 ANIMAIS .....	31
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	32
3.4.1 Acasalamento .....	32
3.4.2 Exposição pré-natal ao LPS .....	33
3.4.3 Padronização da ninhada .....	33
3.4.4 Tratamento com risperidona e aripiprazol .....	34
3.4.5 Protocolo de testes comportamentais .....	34
3.4.5.1 Teste de estereotipia .....	34
3.4.5.2 Teste de interação social .....	35
3.4.5.3 Reconhecimento de objetos .....	35
3.4.6 Procedimento de eutanásia e coleta de tecidos .....	36
3.4.7 Análises bioquímicas .....	36
3.4.7.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico .....	36
3.4.7.2 Medida do dano oxidativo em proteínas .....	37

3.4.7.3 Dosagem de superóxido desmutase e catalase .....	38
3.4.7.4 Dosagem de proteínas .....	39
3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS .....	39
3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA .....	39
<b>4.RESULTADOS</b> .....	41
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	41
4.1.1 Teste de estereotipia .....	41
4.1.2 Teste de interação social .....	42
4.1.3 Reconhecimento de objetos .....	43
4.2 GANHO DE PESO .....	45
4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS .....	45
4.3.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico .....	45
4.3.2 Medida do dano oxidativo em proteínas .....	46
4.3.3 Dosagem de superóxido desmutase e catalase .....	47
<b>5.DISSCUSSÃO</b> .....	48
<b>CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56
<b>ANEXO</b> .....	47
<b>ANEXO A - Parecer de Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	48

## 1.INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma doença do neurodesenvolvimento, que pode se manifestar com diferentes níveis de comprometimento<sup>1</sup>. Segundo o Centro de Controle de Doenças (do inglês, CDC – *Control Disease Center*), nos Estados Unidos no ano de 2012 havia uma prevalência de 1:68 em crianças com 8 anos de idade<sup>2</sup>. Novo estudo do ano de 2014 relatou prevalência nos Estados Unidos de 1:50<sup>5</sup>, e outro mais recente publicado em 2018 de 1:40<sup>4</sup>, também no Estados Unidos e com crianças de 3 a 17 anos. O TEA é cerca de 4,5 vezes mais comum nas crianças do sexo masculino<sup>5,6</sup>

Conforme última revisão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (do inglês, DSM – *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), de 2013, a classificação diagnóstica de TEA é realizada quando há presença de déficits persistentes na comunicação verbal e não-verbal, e na interação social, em múltiplos contextos, além de padrões restritos e repetitivos, seja em comportamentos, interesses e/ou atividades<sup>1</sup>. Estes podem ser motores como estereotípias, vocais e realização de atividades de maneira inflexível e ritualizadas<sup>1</sup>. Os sintomas devem estar presentes precocemente, no período do desenvolvimento e gerar prejuízos na vida destes pacientes. Ainda, os sintomas podem ser classificados quanto à gravidade e se há presença de deficiência intelectual associada ou outras condições médicas ou genéticas<sup>1,7</sup>.

Diversos mecanismos são estudados em busca de respostas quanto à etiologia do TEA. Pesquisas a respeito de ativação imune materna, estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC) e neuro-inflamação já evidenciam possíveis fatores causais<sup>8-10</sup>.

O tratamento dos pacientes com TEA tem como objetivos melhorar a interação social e diminuir comportamentos de padrões repetitivos<sup>11,12</sup>. Preferencialmente deve ser multidisciplinar, com auxílio de fonoaudiólogo, psicólogo e pedagogo. Nos casos em que as manifestações clínicas são exacerbadas, causam algum tipo de prejuízo, dificultam o acompanhamento ou evolução dos pacientes existe indicação de tratamento medicamentoso. O FDA (do inglês, *Food and Drugs Administration*), departamento de administração de drogas e alimentos dos Estados Unidos, aprovou duas medicações para o

tratamento do TEA, sendo que o primeiro foi a risperidona<sup>13,14</sup> e o segundo o aripiprazol<sup>13,15</sup>. De maneira habitual, tais substâncias são prescritas para tratamento de transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia e transtorno do humor bipolar. No caso dos pacientes com TEA, há evidência de eficácia positiva especialmente na irritabilidade, bem como, outros parâmetros comportamentais.<sup>16,17</sup>

A risperidona, medicação lançada em 1994, é um antagonista seletivo monoaminérgico com alta afinidade pelo receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> e baixa afinidade pelos dopaminérgicos D<sub>2</sub><sup>18</sup>. É amplamente utilizada para pacientes com esquizofrenia e transtorno do humor bipolar (especialmente nos episódios de mania), seu uso foi aprovado em 2006 para pacientes diagnosticados com TEA. Tem indicação para crianças com idade superior a 5 anos, com o objetivo de melhorar comportamento agressivo, interação social e irritabilidade. Os efeitos colaterais mais comuns são aumento da prolactina sérica<sup>14,18</sup>, ganho excessivo de peso<sup>13,18,19</sup> e sonolência<sup>13,14,17,18</sup>.

O aripiprazol é um medicamento agonista parcial D<sub>2</sub> e 5HT<sub>1A</sub> e antagonista 5HT<sub>2A</sub>. Foi lançada posteriormente à risperidona<sup>14</sup>, apresenta grande afinidade pelos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> e serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> e 5-HT<sub>2A</sub><sup>15,16</sup>. Aprovada para crianças a partir dos 6 anos, com grandes perspectivas para tratamento de crianças com TEA, especialmente na melhora do comportamento agressivo, irritabilidade e socialização<sup>15</sup>. Tem a vantagem de apresentar menos efeitos colaterais quando comparado a outros antipsicóticos atípicos, especialmente em relação ao aumento de peso e dos níveis séricos de prolactina<sup>14,15,17</sup>.

Entre as diferentes formas de estudar a fisiopatologia do TEA estão os modelos animais e, entre eles, os que fazem uso de lipopolissacarídeos (LPS), mimetizando infecção viral durante a gestação e resultando em uma prole com características tipo-autista. Objetiva-se, com este estudo, comparar diferentes respostas terapêuticas, tanto comportamentais quanto sob parâmetros de estresse oxidativo, após uso de duas possibilidades medicamentosas para o tratamento do TEA.

O TEA é uma doença que pode ser altamente incapacitante, com graves repercussões ao longo do desenvolvimento<sup>14</sup>. O diagnóstico precoce, somado ao acompanhamento com equipe multidisciplinar e uso de medicações, está

associado a um melhor prognóstico destes pacientes<sup>11,20</sup>. Dentre as mais novas possibilidades, é possível que o aripiprazol, através de sua via de ação, apresente maior benefício em relação ao dano oxidativo e aspectos comportamentais nos pacientes com TEA.

## 1.1 REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 1.1.1 Histórico do autismo

Ao longo dos anos, o TEA passou a ser conceitualizado como doença comportamental e, sequencialmente, como doença do neurodesenvolvimento<sup>3,7</sup>. É uma doença neurológica complexa, com comprometimento precoce no desenvolvimento do SNC. Assim como os demais transtornos psiquiátricos, o TEA é heterogêneo, tanto do ponto de vista biológico quanto fenotípico<sup>7,21</sup>.

Leo Kanner, psiquiatra austríaco que trabalhava no Hospital John Hopkins nos Estados Unidos, na década de 1940, estudou 11 crianças que apresentavam isolamento social, comportamentos obsessivos, ecolalia, denominando tal apresentação clínica de “distúrbios autistas do contato afetivo”<sup>7,22</sup>. Kanner publicou este trabalho em 1943, intitulado “Distúrbios Autísticos do contato afetivo” e foi considerado como pioneiro nesta área<sup>22</sup>.

Na mesma década, em 1944, o também austríaco e psiquiatra Hans Asperger descreveu uma “psicopatia autista”, em seu artigo “A psicopatia autista na infância”, que caracterizava pacientes com desenvolvimento normal da linguagem, mas com marcada dificuldade de socialização, padrões restritos e alta inteligência, posteriormente chamada de síndrome de Asperger<sup>7,23</sup>.

Em 1952, a Associação Americana de Psiquiatria (do inglês, APA – *American Association of Psychiatric*) publicou a primeira edição do DSM. Nesta publicação, o autismo não foi classificado como transtorno separadamente, mas considerado como parte do capítulo de esquizofrenia (as crianças com características compatíveis com autismo eram classificadas como portadoras de uma forma infantil de esquizofrenia). Em 1968, no DSM-2, apesar da maior ênfase às doenças da infância, a classificação de autismo ainda fazia parte dos transtornos psicóticos.

Em 1978, Michael Rutter classificou o autismo e o definiu com base em quatro critérios: atraso do desenvolvimento, problemas de comunicação não relacionados à deficiência intelectual, presença de comportamentos incomuns, que poderiam ser estereótipias e maneirismos, e início dos sinais e sintomas antes do 30 meses de idade<sup>24</sup>.

Em 1980, na terceira edição do DSM, o autismo foi classificado como Transtorno Invasivo do Desenvolvimento (TID) e, na versão seguinte, em 1994, o agora DSM-4 incluiu novos critérios para a classificação do autismo, com três manifestações características principais: prejuízo comunicativo e padrões de comportamento repetitivos e estereótipias<sup>3</sup>. Ainda, novas categorias foram adicionadas aos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento, entre elas a Síndrome de Asperger<sup>7,15</sup>.

A última atualização realizada pela APA foi em 2013. O DSM-5 apresenta mudanças na classificação do autismo, agora então chamado de Transtorno do Espectro Autista. Passou a ser considerado uma doença do neurodesenvolvimento. A nova classificação baseia-se em dois pontos chave, comunicação social e comportamentos restritivos e repetitivos<sup>1,7</sup>. Ainda, o DSM-5 descreve a existência de diferenças entre indivíduos diagnosticados, com variabilidade de graus nos sintomas e habilidades intelectuais, além de padrões de evolução clínica divergentes e da possibilidade de associação com comorbidades<sup>1,7</sup>. A mudança dos critérios diagnósticos pode estar relacionada ao maior número de casos diagnosticados e também ao aumento significativo da incidência nos últimos anos<sup>5,13,25</sup>.

### **1.1.2 Dados epidemiológicos**

Nas últimas décadas houve um aumento significativo do número de casos diagnosticados com TEA<sup>5,26</sup>. Um trabalho publicado por Graf e colaboradores, sugere que 25% do aumento do diagnóstico deste transtorno está relacionado com a diminuição do diagnóstico de deficiência mental<sup>21</sup>. Estudos conduzidos no final da década de 1990 sugerem que a prevalência de TEA varia de 30 a 60 por 10.000<sup>5</sup>.

O CDC publicou um estudo que verificou um aumento significativo do diagnóstico nos últimos anos: 0,9% em 2006 e 1,47% em 2012, nos Estados Unidos<sup>27</sup>.

No México, um estudo publicado em 2016 reportou uma prevalência anual de 0,87%, sendo 80% do sexo masculino<sup>28</sup>. No Brasil, foi descrita uma prevalência anual de 0,3% em um estudo de 2011<sup>29</sup>. Recentemente, em 2018, foi publicado um estudo americano realizado pela *National Survey of Children's Health*, baseado na resposta dos pais a um questionário, que avaliou 50.212 crianças, de 3-17anos, e verificou a prevalência de 2,5% ou seja, 1 em cada 40 crianças tem diagnóstico de TEA<sup>4</sup>.

Em um estudo de coorte na Dinamarca, avaliou 667.915 crianças nascidas entre 1980 e 1991 e acompanhadas até o ano de 2011. Foram diagnosticadas 3.956 crianças com autismo com base nos critérios da CID – Classificação Internacional de Doenças. Desses, 192 pacientes foram diagnosticados antes do ano de 1994, 100 pacientes entre 1994 e 1995 e 3.664 pacientes após o ano de 1995. Este estudo revelou um aumento de mais de 60% na prevalência do TEA nas crianças que nasceram entre os anos de 1980 e 1991, além do predomínio do diagnóstico no sexo masculino<sup>26</sup>.

A prevalência do TEA pode variar conforme a população estudada, da região geográfica e grupo étnico<sup>5,21</sup>, o que sugere que diferentes culturas, padrões socioeconômicos e de estilo de vida podem ter um papel influenciador na etiologia<sup>2,6,21,26</sup>. O aumento do número de casos de TEA pode estar associada ao aumento de pacientes diagnosticados, devido reclassificação pelo DSM-5, e pelo maior número de exclusão de outras doenças de diagnóstico diferencial, como por exemplo, retardo mental<sup>1,26</sup>. Além disso, o efeito de vincular determinados programas especializados ao atendimento dessas crianças que obtêm diagnóstico de TEA, também propicia maior número de casos confirmados<sup>5,21</sup>.

### **1.1.3 Fatores etiológicos**

A definição de espectro para os casos de TEA se deve à grande heterogeneidade, diferenças entre graus de gravidade e de padrões fenotípicos<sup>21</sup>. Nas últimas décadas, pesquisadores vêm investigando as bases biológicas do TEA<sup>5,9,20</sup>. Estudos sobre neurofisiologia, genética, exames laboratoriais, testes neuropsicológicos e exames de neuroimagem, cada vez

mais contribuem para corroborar e esclarecer a biologia do transtorno, além de caracterizar os diferentes perfis clínicos dos pacientes<sup>7,30</sup>.

Há uma grande discussão se a origem etiológica seria genética, ambiental ou resultado de uma interação entre as duas, o que seria mais provável<sup>21,30</sup>. Além de fatores ambientais, como uso de medicações, agrotóxicos ou agentes infecciosos, fatores genéticos e, idade gestacional e idade parental podem contribuir para o aumento do risco de TEA<sup>21,26,31</sup>. Alguns desses fatores são estudados e comprovados através de ensaios pré-clínicos com uso de modelo animal de autismo<sup>10,32</sup>.

### *1.1.3.1 TEA e modelo animal*

Infecções maternas durante a gestação estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de TEA nos descendentes<sup>33,34</sup>. Ensaios pré-clínicos são capazes de provocar alterações comportamentais em prole cuja mãe foi exposta a determinados produtos durante a gestação, incluindo agrotóxicos<sup>35</sup>, anti-epiléticos como o valproato de sódio<sup>8</sup> e outras substâncias, como LPS<sup>32,36</sup> e Poly C (ácido policitídílico)<sup>37</sup>, os quais mimetizam quadros infecciosos, como aqueles resultantes de infecção por bactérias gram negativas e infecção viral, respectivamente<sup>8</sup>. Tais alterações seriam explicadas pela ativação do sistema imune materno, que causaria uma desregulação e ativação de fatores inflamatórios e de estresse oxidativo, especialmente quando esta agressão ocorre no início da embriogênese<sup>8,10,32,34</sup>. Clinicamente são percebidos efeitos comportamentais como déficits na interação social e aprendizagem e alterações na atividade exploratória<sup>38,39</sup>.

Estudos epidemiológicos associam a ativação imune materna a danos neurológicos e doenças do neurodesenvolvimento como TEA, além de esquizofrenia e outras doenças neuropsiquiátricas<sup>8,10,40</sup>. Há um padrão muito bem estabelecido de indução de comportamentos do tipo autismo após aplicação de substâncias como LPS e Poly C em modelos animais<sup>8,10</sup>. Tais substâncias são capazes de provocar um processo inflamatório sistêmico materno e atravessam a barreira hematoencefálica (BHE), provocando inflamação local<sup>8</sup> através de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina IL-6, ativação de células Th17 e aumentando a IL-17.

O LPS pode gerar aumento da proteína ácida fibrilar glial, diminuir a proteína básica de mielina e alterar a coloração microglial<sup>39</sup>. A desregulação dos autoanticorpos maternos são cada vez mais associados aos déficits comportamentais e cognitivos encontrados no TEA<sup>10</sup> e os modelos animais têm sido utilizados para reforçar estes achados. Figura 1.

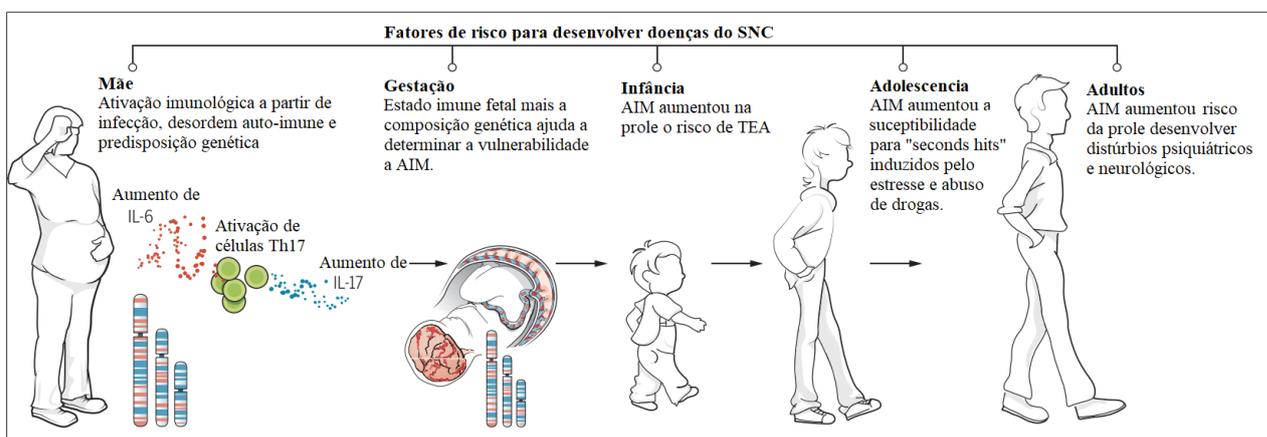


Figura 1. Ativação Imune Materna, por Estes e colaboradores<sup>8</sup>.

### 1.1.3.2 Neuroinflamação no TEA

A imunidade apresenta um papel fundamental no desenvolvimento neurológico do SNC e sistema nervoso periférico<sup>9</sup>. O sistema imune participa de diversas atividades neurológicas, regula a proliferação neuronal, a formação de sinapses e a plasticidade cerebral, tudo isso em conjunto com a remoção de neurônios apoptóticos<sup>9</sup>. Existem gatilhos ambientais que, quando associados à susceptibilidade genética, podem ativar o sistema imune<sup>8,41</sup>. As citocinas pró-inflamatórias, como TNF (fator de necrose tumoral) e interleucinas (IL-6), são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica e, assim, proliferar mastócitos e micróglia<sup>8,9,41</sup>.

As microglias são células neuronais gliais muito pequenas, assemelham-se aos macrófagos periféricos e são as principais células imunes do SNC, cuja principal função é a vigilância e ativação ambiental durante insultos, como danos, infecção ou doença<sup>42</sup>. Uma de suas principais funções é realizar a fagocitose de detritos celulares e neurônios mortos no SNC<sup>43,44</sup>. Acredita-se que os progenitores microgliais chegam e ocupam o cérebro fetal em desenvolvimento,

precedendo a conclusão da BHE. A ativação da microglia é um dos principais indicadores de neuroinflamação no TEA<sup>44</sup>. A microglia ativada produz citocinas inflamatórias, que contribuem para o funcionamento dopaminérgico prejudicado nas regiões mesencéflica e corticoestriatal<sup>45</sup>. Assim, além do papel inflamatório da microglia implicada na ativação microglial disfuncional e na patogênese do TEA, a disfunção no processo de poda sináptica mediado pela microglia durante o desenvolvimento neural na prole tem sido associada a distúrbios do neurodesenvolvimento, como o próprio TEA<sup>9,42,46</sup>.

Já foram identificados marcadores inflamatórios no cérebro e líquido em pacientes com distúrbios neuropsiquiátricos, como TEA. Entre eles estão TNF e interleucinas (IL-6, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), sendo que essas interleucinas, por sua vez, são quimiotáticas para os mastócitos<sup>9,41,42</sup>. Citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF-alfa estão aumentadas na inflamação cerebral e podem estar associadas a dano cerebral em áreas específicas como o hipocampo<sup>41</sup>, com consequentes efeitos sobre comportamento e linguagem. Outra região afetada é o cerebelo, onde são encontradas alterações histológicas, como diminuição do número das células de Purkinje e de células granulares, além de ativação microglial no TEA<sup>9</sup>.

A neuroinflamação no TEA está relacionada a reações gliais que podem causar danos ao SNC através do aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias. É possível que, neste contexto, o estresse oxidativo seja o fator de maior influência e a principal causa de lesões no cérebro<sup>41,47</sup>.

### *1.1.3.3 Estresse oxidativo e TEA*

O estresse oxidativo é uma condição biológica resultante do desequilíbrio entre os compostos oxidantes. Ou seja, entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, que agem através de desintoxicação<sup>48,49</sup>. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os prejuízos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou das espécies reativas não-radicaais ao nosso organismo<sup>48,50,51</sup>.

O sistema de defesa antioxidante é dividido em enzimático e não-enzimático<sup>49</sup>. O primeiro é composto por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Já o segundo, inclui a glutathione (GSH),

vitaminas lipossolúveis (vitamina A, E, beta-caroteno), hidrossolúveis (vitamina C, vitaminas do complexo B) e oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio)<sup>48,52</sup>. As enzimas SOD, CAT e GPx agem contra os agentes pró-oxidantes e estão diretamente envolvidas na eliminação das EROs, também evitam a produção excessiva de radicais livres<sup>43,49</sup>. Com isso há diminuição do EO, inclusive no SNC<sup>49</sup>.

O cérebro é uma das estruturas do corpo humano mais vulneráveis ao EO, isso acontece principalmente devido alto consumo de oxigênio<sup>44</sup>. A função neuronal é quase inteiramente dependente do metabolismo do oxigênio<sup>53</sup>. O cérebro tem uma capacidade limitada de eliminar fatores pró-oxidantes, dessa maneira os neurônios geralmente são as primeiras células a serem afetadas pelo estresse oxidativo<sup>49</sup>. Os agentes oxidantes estão relacionados às doenças associadas ao SNC e podem desempenhar um papel importante nos distúrbios neuropsiquiátricos<sup>54</sup>. É provável que a interação entre fatores ambientais, genéticos e também fatores imunológicos estejam envolvidas na fisiopatologia do TEA, e o EO seria o mecanismo de ligação entre tais fatores<sup>49,55</sup>.

Estudos demonstram relação entre EO e doenças neuropsiquiátricas, entre elas, ansiedade<sup>54</sup>, depressão<sup>33,56</sup>, doença de Alzheimer<sup>8,33</sup>, esquizofrenia<sup>8,57</sup> e TEA<sup>43,44,48,58</sup>. Os agentes antioxidantes estão alterados no sangue e no cérebro de indivíduos com TEA, como por exemplo a glutathione e a vitamina E, que estão depletados<sup>49,58</sup>. A avaliação da SOD, CAT e GPx como marcadores de ação antioxidante no TEA, está relacionada com a redução do nível dessas substâncias<sup>43,49</sup>.

O EO também pode desencadear ou aumentar a ativação de mastócitos, o que induz à secreção de numerosas moléculas vasoativas, neurosensibilizantes e pró-inflamatórias (bradicinina, histamina, IL-6, nitróxido, triptase, fator de crescimento vascular endotelial) que são relevantes para o mecanismo fisiopatológico do TEA<sup>52</sup>. Estas moléculas são capazes de atravessar a BHE e, como consequência, gerar neuroinflamação<sup>51,52</sup>.

Áreas como hipocampo e córtex pré-frontal, são regiões que podem sofrer danos pelo EO<sup>48,59-61</sup>. Tais regiões encefálicas estão correlacionadas a alterações comportamentais existentes nos pacientes com TEA, bem como com a função de memória que também pode estar prejudicada<sup>62-64</sup>.

#### 1.1.4 Memória e TEA

A formação da memória envolve inúmeros processos, que são caracterizados pela aquisição, formação, conservação e recrutação de informações. O somatório desses fatores resulta em lembranças conscientes e inconscientes, fazendo assim que cada indivíduo seja único, considerando suas experiências pregressas<sup>65-67</sup>.

As principais regiões anatômicas associadas à memória e às redes neurais subjacentes foram bem estabelecidas e investigadas há décadas, e incluem estruturas como lobo temporal, amígdala, córtex pré-frontal e hipocampo<sup>68</sup>. Estas estruturas cerebrais são críticas para a memória se sobrepor com redes importantes para o processamento emocional e resposta corporal ao estresse<sup>68</sup>.

O hipocampo é uma estrutura cerebral complexa, bilateral, que ocupa a porção medial do assoalho do corno temporal, formando um arco ao redor do mesencéfalo. Está localizado na base do lobo temporal. Denomina-se formação hipocampal o subículo, o hipocampo (*cornu ammonis*) e o giro dentado<sup>69</sup>.

O hipocampo – Cornu Ammonis (CA) é dividido em três subcampos, com base na morfologia celular e nas entradas sinápticas, são eles CA1, CA2 e CA3<sup>70</sup>. Cada parte tem características funcionais particulares, sendo que cada área difere na forma como a informação é representada em relação ao conjunto neural. Esses subcampos estão ligados por conexões excitatórias através da via trisináptica, que durante décadas foi considerada a principal via de transmissão de informações no hipocampo<sup>70</sup>. A área CA1 representa uma série de outras características do ambiente, como textura do chão, odores, cor ou formas de configurações experimentais, passagem de tempo ou estados motivacionais. Nos ratos a região CA1 é grande, abrange aproximadamente 3,2 mm x 3,5 mm do plano antero-posterior e lateral-medial e cerca de 6,0 mm do eixo dorso-ventral<sup>70</sup>. Pode ser subdividida em CA1 proximal (perto de CA3) e do CA1 distal (perto do subículo), alguns autores sugerem que o CA1 proximal tem um papel mais importante do que o CA1 distal em distinguir ambientes espaciais e manter tais distinções na memória<sup>70,71</sup>. Figura 3.

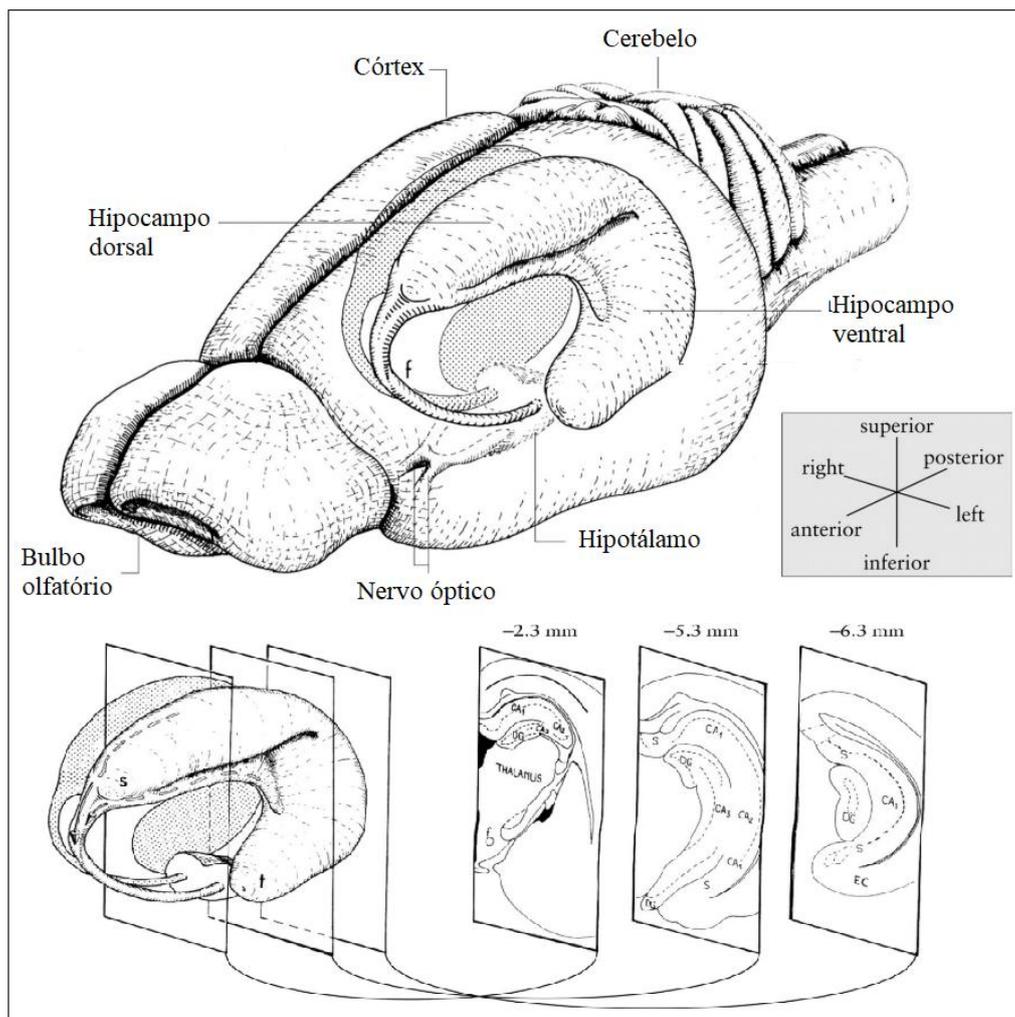


Figura 2. Anatomia do hipocampo em rato<sup>72</sup>.

Um papel fundamental é desempenhado pelo hipocampo na aquisição de memórias de curto e longo prazo<sup>73</sup>. No entanto, diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com esta estrutura para regular a aquisição e o armazenamento de novas informações, entre elas os córtex ento, perirrinal e pré-frontal<sup>74</sup>. A formação hipocampal está intimamente relacionada à memória explícita, também chamada de memória declarativa. Pacientes com danos específicos na região hipocampal são capazes de lembrar procedimentos e ações não complexas, preservando a memória implícita ou não-declarativa, o que permite uma forma simples de aprendizado e memorização<sup>68</sup>.

A memória pode ser dividida quanto ao seu conteúdo em memória declarativa (explícita), que é aquela adquirida com intervenção da consciência, que armazena fatos ou eventos que podem ser relatados pelos indivíduos<sup>65</sup>. Esse tipo de memória pode ser subdividido em episódica ou semântica, sendo

as episódicas aquelas que foram vivenciadas pelos indivíduos e as semânticas aquelas informações de conhecimento geral da população. Ainda em relação ao conteúdo, a memória pode ser não-declarativa (implícita) que se refere-se às capacidades especialmente motoras, ou seja, aquelas que são difíceis de serem relatadas<sup>65,75</sup>.

O hipocampo pode armazenar a memória de longo prazo durante horas ou dias, transferindo-a gradativamente para regiões específicas do córtex cerebral. Qualquer lesão parcial, desde que bilateral, no hipocampo, é capaz de produzir amnésia. Porém, memórias mais antigas permanecem inalteradas, corroborando com a hipótese que o local final de armazenamento das memórias se desloca do hipocampo para outras estruturas. As lesões no hipocampo ou de suas conexões extrínsecas podem repercutir em prejuízo em tarefas de memória espacial<sup>70,76</sup>.

O córtex pré-frontal está localizado na porção anterior do encéfalo, no lobo frontal. Recebe fibras aferentes de estruturas de diencéfalo, mesencéfalo e sistema límbico, assim como, de aferências corticais de origem visual, auditivas e somáticas<sup>77</sup>. Comunica-se com o hipocampo, tálamo e com o córtex parietal posterior<sup>78</sup>. Anatomicamente e funcionalmente o papel do hipocampo e córtex pré-frontal está bem estabelecido quando relacionado ao TEA<sup>63</sup>.

O córtex pré-frontal é responsável pela função executiva, caracterizada pelo controle de planejamento, capacidade em tomar decisões e memória operacional. A presença de comportamentos anti-sociais pode estar associada a alterações estruturais pré-frontais e relacionadas com mau funcionamento das funções executivas, principalmente das capacidades de organização temporal, comportamento e flexibilidade cognitiva<sup>63,79</sup>. Desta maneira podemos observar os prejuízos encontrados nos pacientes com TEA<sup>80</sup>.

Desempenho inferior nas tarefas de memória, especialmente em relação à memória episódica<sup>59</sup> e memória de trabalho<sup>81</sup> podem ser observadas nos pacientes com TEA. No entanto, áreas preservadas de processamento de memória também foram encontradas, incluindo memória de habilidades especiais<sup>59</sup>, as quais podem estar correlacionadas à capacidade intelectual nas crianças com TEA e inteligência superior<sup>81</sup>. As alterações ocorridas no SNC dos pacientes de TEA, podem ser responsáveis por determinados comportamentos

que compõem o quadro clínico e são necessários para o diagnóstico do transtorno.

### 1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico de TEA até o presente momento é feito com base em critérios clínicos, visto que não existem marcadores biológicos. De acordo com o DSM-5, o diagnóstico é habitualmente feito entre 12 e 36 meses, mas pode variar conforme o grau de comprometimento<sup>1,20</sup>. Dentre os critérios diagnósticos, dois são os mais importantes. São estes:

(i) O critério A, o qual se refere a déficits persistentes na comunicação social e na interação social em múltiplos contextos, como déficits da reciprocidade socio-emocional, compartilhamento reduzido de interesses, afeto ou emoções, além de dificuldade para iniciar ou responder a interações sociais<sup>1</sup>. Ou ainda, déficits nos comportamentos comunicativos não-verbais usados para interação social, como por exemplo ausência de expressões faciais, anormalidades na linguagem corporal ou déficits de compreensão de uso de gestos. E também déficits para desenvolver, manter e compreender relacionamentos, por exemplo dificuldade em manter amizades e ausência de interesse por pares<sup>1</sup>.

(ii) O critério B, que inclui os padrões restritos e repetitivos de comportamentos, interesses ou atividades, em que pelo menos dois dos seguintes critérios devem estar presentes<sup>1</sup>:

- Presença de movimentos motores, uso de objetos ou fala estereotipada ou repetitiva como, por exemplo, alinhar brinquedos, ecolalia e estereotipias manuais<sup>1</sup>.

- Insistência nas mesmas coisas, adesão inflexível às rotinas ou padrões ritualizados de comportamento verbal e não-verbal, exemplificados pelos padrões rígidos de pensamento, rituais de saudação, necessidade de fazer o mesmo caminho ou mesma alimentação<sup>1</sup>.

- Interesses fixos e altamente restritos que são anormais em intensidade e foco.

- Hipo ou hiperreatividade a estímulos sensoriais ou interesse incomum por aspectos sensoriais do ambiente, como por exemplo indiferença à dor e cheirar ou tocar objetos de forma excessiva<sup>1</sup>.

As estereotipias são um padrão repetitivo de comportamento motor sem funcionalidade<sup>82</sup>, habitualmente rítmicos, bilaterais, com padrão fixo e que cessam com distração<sup>83</sup>. Estes movimentos podem interferir na qualidade da interação social, acadêmica e outras atividades. São alguns exemplos, agitar mãos e braços, acenar, rotação de mãos e balançar de dedos e/ou tronco, rotação em torno de si, pulos no mesmo local e correr na ponta dos pés. Por vezes, estão associados a vocalizações. Podem aparecer em qualquer horário e sua duração é variável de segundos, minutos e até horas. Podem ser desencadeados ou piorar com estresse, emoção e ansiedade. Também estão presentes em outras doenças como a Síndrome de Rett e nos casos de deficiência intelectual grave. Os pacientes mais comprometidos e com graus maiores de retardo mental podem apresentar estereotipias de intensidade elevada<sup>82</sup>.

Para completar os critérios diagnósticos, os sintomas devem estar presentes precocemente no período de desenvolvimento, causar prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, profissional ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo<sup>1</sup>. Além disso, essas perturbações não podem ser melhor explicadas por deficiência intelectual ou atraso global do desenvolvimento<sup>1</sup>.

É preciso especificar se há ou não comprometimento intelectual e comprometimento da linguagem concomitante<sup>1</sup>. Pode-se definir o grau como nível 1, no qual há exigência de apoio; nível 2, com exigência de apoio substancial e nível 3, com exigência de muito apoio substancial, sempre em relação à comunicação social e padrões restritivos e repetitivos<sup>1</sup>. Testes neuropsicológicos podem classificar de maneira mais adequada os diferentes graus de deficiência intelectual e seus prejuízos adaptativos sociais e de comunicação. Os diferentes graus de deficiência têm impacto direto em problemas comportamentais<sup>1,7</sup>. O conjunto de sintomas, o grau de comprometimento e prejuízos pessoais e sociais causados pelo TEA são indicativos da necessidade de terapia medicamentosa.

### 1.1.6 Tratamento

Para o tratamento do TEA, sempre individualizado, é importante estabelecer um diagnóstico correto e preciso, após ampla investigação clínica, visando um tratamento específico e com objetivo de causar o menor número possível de efeitos colaterais. Além disso, a abordagem terapêutica deve ser multiprofissional, incluindo intervenções medicamentosas e não medicamentosas, tanto das alterações comportamentais associadas ao TEA quanto a possíveis comorbidades<sup>11,17,20</sup>.

O tratamento não medicamentoso pode resultar em melhora significativa dos prejuízos apresentados pela criança, com resultados comparáveis ou mesmo de eficácia superior ao tratamento medicamentoso<sup>7,11</sup>. O tratamento medicamentoso pode ajudar a manejar alterações comportamentais, como a irritabilidade e outros sintomas psiquiátricos<sup>13,14</sup>. A irritabilidade é um sintoma frequente e muitas vezes dificulta a participação do paciente em atividades escolares e centros de reabilitação, além de estar associada a alto índice de estresse nos cuidadores<sup>84</sup>.

O uso de psicofármacos em indivíduos com TEA, associado a terapias complementares, pode apresentar boa resposta, principalmente no manejo de sintomas de hetero ou auto-agressividade e irritabilidade<sup>13,14,16</sup>. O cuidado deve também ser direcionado aos familiares, principalmente dos cuidadores, muitas vezes submetidos a altos graus de estresse, mas que com o tratamento adequado pode apresentar uma melhora na qualidade de vida, também refletida nos pacientes com TEA<sup>11,12</sup>.

Mais de um terço dos pacientes com TEA são medicados e, dentre os medicamentos mais utilizados, estão os antipsicóticos e os antidepressivos<sup>30</sup>. No caso dos antipsicóticos, a risperidona e o aripiprazol são os que têm indicação mais efetiva para tratamento dos sintomas comportamentais nos pacientes com TEA<sup>14,16</sup>. Além do mais, são as únicas medicações liberadas pelo FDA, sendo as que apresentam maior eficácia estabelecida, especialmente para problemas comportamentais, irritabilidade, padrões repetitivos e dificuldade de interação social<sup>11,13,16,85</sup>. Em 2006, o FDA aprovou a risperidona para tratamento de irritabilidade, agressão e autoagressão para crianças com TEA entre 5-16

anos<sup>13,85</sup>. Enquanto o aripiprazol teve sua liberação em 2009, com semelhante eficácia para mesma indicação, com idade entre 6-17anos<sup>15,16</sup>.

Os efeitos colaterais mais comuns aos antipsicóticos são sonolência, lentidão psicomotora, náuseas, ganho de peso, aumento de níveis séricos de prolactina, além de diabetes melito e distúrbios do movimento, como movimentos involuntários e discinesia, que também são descritos com bastante frequência<sup>14,16,18,30</sup>.

Variações de farmacogenética podem ser responsáveis por diferentes respostas, com diferentes doses das medicações<sup>30</sup>. O ganho de peso é o efeito adverso mais comum, secundário aos antipsicóticos, especialmente os típicos<sup>84,86</sup>. O aumento da prolactina sérica é um efeito colateral bem estabelecido, principalmente consequente ao uso da risperidona que, muitas vezes, impede a continuidade do tratamento<sup>18</sup>. Em meninas, os achados comuns associados ao aumento da prolactina são galactorreia e amenorreia, enquanto em meninos principalmente ginecomastia<sup>30</sup>.

Um estudo de coorte realizado no Reino Unido, no período de 1992-2008, demonstrou que menos de um terço dos pacientes com TEA já recebeu tratamento medicamentoso com pelo menos uma droga psicotrópica, variando entre estimulantes, anti-epilépticos, estabilizadores do humor e antipsicóticos. E destes, um quinto foi tratado com risperidona e pelo menos um terço recebeu mais de uma medicação<sup>14</sup>.

Ao longo dos anos, outras possibilidade terapêuticas foram estudadas e técnicas complementares estão sendo aplicadas com objetivo de propor um tratamento com menos efeitos adversos<sup>11,17,87</sup>. Algumas das novas pesquisas sugerem resultados positivos com uso de N-acetilcisteína<sup>17,88,89</sup>, vitaminas B6, B12 e C<sup>55</sup>, zinco<sup>90</sup> e ômega-3<sup>89,91</sup>, provavelmente pela sua atuação como fatores antioxidantes<sup>11,49,87,91</sup>.

Em modelos animais, verificou-se que os tratamentos com risperidona e aripiprazol são capazes de melhorar comportamentos semelhantes aos apresentados pelos pacientes portadores de TEA<sup>17,44,92</sup>. Também ocorreu em estudos com roedores frente a sintomas de esquizofrenia<sup>57,93</sup>, ansiedade<sup>44,94</sup> e depressão<sup>44</sup>. Em alguns trabalhos também ficou evidenciado a associação entre medicações e potencial antioxidantes e consequente efeito sobre o EO<sup>44,57,93,95</sup>.

### 1.1.6.1 Antipsicóticos atípicos e estresse oxidativo

Existem evidências que os EROS exercem um papel importante na patogênese de doenças neurológicas e psiquiátricas, especialmente, pela vulnerabilidade do SNC<sup>56</sup>. Os antipsicóticos atípicos, como aripiprazol e risperidona, podem alterar níveis de radicais livres. Um estudo publicado em 2005 por Kropp e colaboradores, verificou que estas medicações podem aumentar os níveis plasmáticos de produtos da peroxidação lipídica e, assim, causar dano celular neuronal<sup>50</sup>.

O aripiprazol é um inibidor duplo da recaptção da serotonina e da noradrenalina com fraco efeito na recaptção da dopamina, assim teria um efeito protetor sobre o EO, inibindo a recaptção da serotonina e os mecanismos da noradrenalina<sup>56</sup>. Conforme estudo publicado por Eren e colaboradores em 2007, em modelo animal de depressão houve efeito benéfico do aripiprazol sobre a glutathione e sistemas antioxidantes não enzimáticos, ainda elevação das atividades da enzima GPx, e níveis de vitamina C no córtex do cérebro dos ratos<sup>56</sup>. Outro estudo, em modelo animal de esquizofrenia, demonstrou que o aripiprazol não induziu a peroxidação lipídica e a formação da carbonilação proteica no cérebro dos ratos e ainda houve aumento da produção de SOD no córtex pré-frontal e no estriado<sup>96</sup>.

A risperidona também pode apresentar um papel modulador no estresse oxidativo, diminuindo níveis de peroxidação lipídica e aumentando níveis de substâncias antioxidantes com paraoxonase 1<sup>93</sup>. Um estudo realizado em 2012, usando modelo animal de esquizofrenia, após uso crônico de risperidona foi observado que houve normalização dos níveis de glutathione, e de outras enzimas envolvidas no seu metabolismo, assim como diminuição dos níveis de peroxidação lipídica no cortex e de SOD no cortex, hipocampo, tálamo e núcleo caudado<sup>57</sup>. Entretanto, um artigo publicado em 2016 por Eftekhari e colaboradores, demonstrou que a risperidona pode causar dano hepático e com isso aumentar peroxidação lipídica, reduzir níveis de glutathione e produzir danos à membrana lisossomal, resultando em estresse oxidativo<sup>88</sup>. No entanto, este último autor, realizou a pesquisa em hepatócitos, e não em células do SNC, o que pode justificar resultados divergentes.

O EO pode prejudicar regiões específicas no SNC<sup>59,78,97-100</sup> envolvidas no processamento de memórias e respostas comportamentais, entre elas, córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo. Pacientes com TEA e outros transtornos neuropsiquiátricos podem apresentar alterações nessas regiões encefálicas e consequente prejuízo funcional. O tratamento com psicofármacos, como antipsicóticos, pode modificar níveis de substâncias antioxidantes e como resultado melhora da sintomatologia<sup>48,49</sup>.

Ao longo das últimas décadas muitas mudanças ocorreram em relação à epidemiologia, diagnóstico e tratamento dos sintomas no TEA. Suas consequências clínicas e impacto à sociedade despertaram interesse de vários grupos de pesquisa com intuito de avaliar os mecanismos neurais envolvidos na etiologia do transtorno. Da mesma forma, novas perspectivas de tratamentos têm sido propostas com o objetivo de estabelecer a melhor possibilidade terapêutica.

Em consideração aos dados expostos, é relevante a avaliação dos efeitos dos medicamentos antipsicóticos, como a risperidona e especialmente o aripiprazol, por ser uma medicação mais nova, em relação aos seus efeitos sobre as alterações comportamentais e de memória, além de suas possíveis consequências sobre o estresse oxidativo no SNC, em um modelo animal de autismo.

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da risperidona e do aripiprazol sobre o comportamento tipo-autista e parâmetros oxidativos em ratos jovens.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Como objetivos específicos, foram avaliados os efeitos do tratamento com risperidona e aripiprazol em animais jovens expostos ao LPS em período pré-natal, sob os seguintes parâmetros:

- Prejuízo cognitivo no teste de reconhecimento de objetos;
- Comportamento estereotipado e interação social recíproca;
- Ganho de peso;
- Dano oxidativo em hipocampo e córtex pré-frontal através da avaliação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e carbonilação proteica;
- Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em hipocampo e córtex pré-frontal.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo experimental utilizando modelo animal de TEA a partir da ativação imune materna com uso de LPS.

#### 3.2. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Lipopolissacarídeo (LPS) obtido por extração fenólica a partir de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma®).

Risperidona solução 1mg/ml (Laboratório Supera®).

Aripiprazol 10mg diluído em solução salina 0,9% (Laboratório Ache®)

Aparato de campo aberto (caixa de 60 x 60 x 30 cm).

Webcam 2.0 megapixels, tripé e notebook.

Microscópio panfocal (objetiva 60x).

Tivemos como parceiros o Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos (NEUROIMet, Unisul) – Núcleo Sepse, para auxílio nas análises bioquímicas de EO.

#### 3.3 ANIMAIS

Foram utilizadas 16 fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas (60 dias), virgens, pesando entre 250 e 300g, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Catarina, que foram acasaladas com 8 machos da mesma linhagem. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em temperatura controlada (22°C +/-1) e ciclos de luz artificial (12 horas claro/escuro), receberam ração comercial padronizada para ratos de laboratório e água *ad libitum*.

### 3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

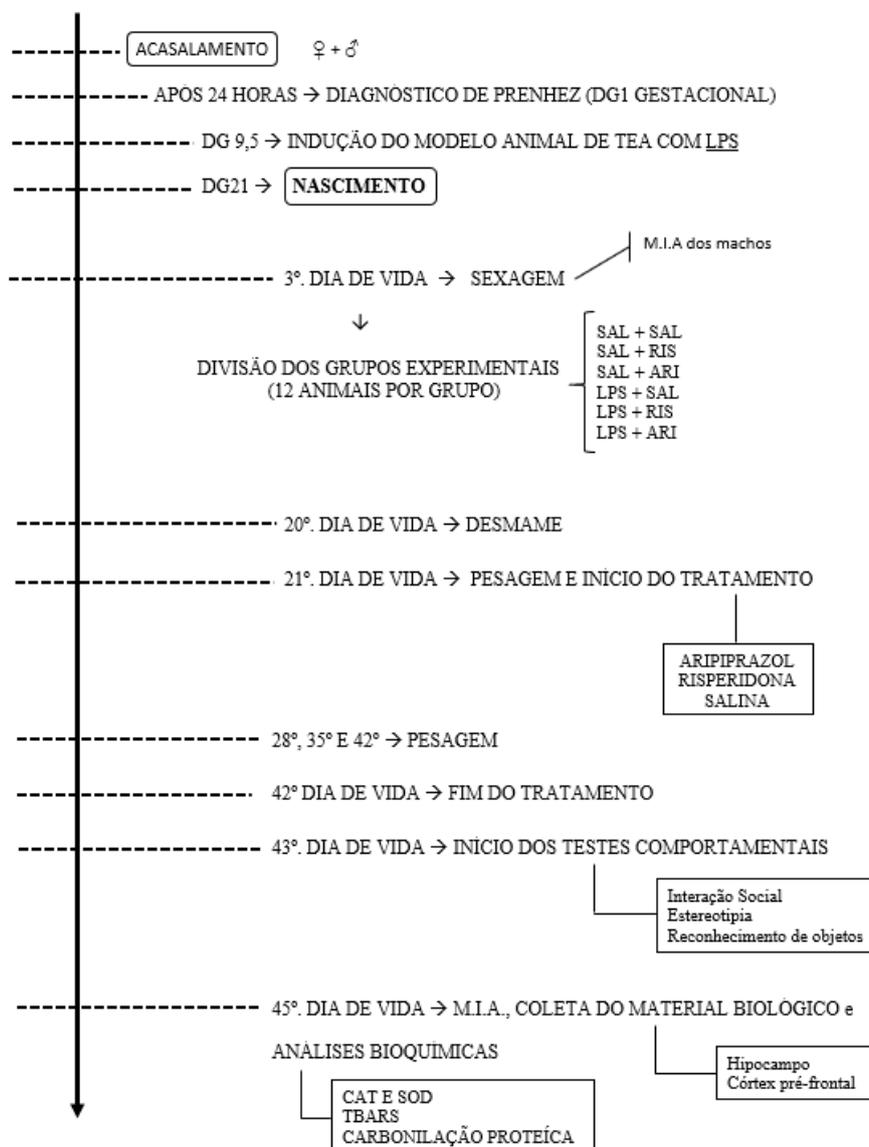


Figura 3. Diagrama esquemático das etapas do delineamento experimental realizado no estudo.

#### 3.4.1 Acasalamento

Para o acasalamento, este estudo seguiu o proposto por Held e colaboradores<sup>101</sup>, onde as fêmeas são colocadas, ao final do período de luz (19h), nas gaiolas dos machos, sempre utilizando duas fêmeas para cada macho. Às 7 horas da manhã do dia posterior, a prenhez foi constatada por meio

do lavado vaginal, que incide na introdução de cloreto de sódio (NaCl) através de uma pipeta plástica na vagina da fêmea, obtendo secreção para análise em microscópio óptico a procura de espermatozoides junto ao material biológico do animal. Ao se verificar a presença de espermatozoides, considerou-se então dia gestacional zero (DG 0) daquela fêmea<sup>102</sup>. As fêmeas prenhes foram alocadas individualmente em sua gaiola moradia, ficando na mesma durante toda a gestação.

#### 3.4.2 Exposição pré-natal ao LPS

As fêmeas prenhes foram consideradas matrizes e divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais: (1) Grupo LPS-tratadas e (2) Grupo Salina-tratadas. As matrizes do grupo LPS-tratadas receberam a administração intraperitoneal (ip) de uma única injeção de LPS, na dose de 100 µg/kg no dia gestacional 9,5 (nove dias mais doze horas), no período vespertino (15h – 17h), diluída em 50 µg/mL de solução aquosa de NaCl 0,9% estéril<sup>103,104</sup>. As matrizes do grupo Salina-tratadas receberam somente solução aquosa de NaCl 0,9% estéril no volume equivalente ao grupo LPS-tratadas.

#### 3.4.3 Padronização da ninhada

Os partos ocorreram de forma natural e nos dias pós-natal (PND) 1 ao PND3 a prole não foi manipulada para evitar a possibilidade de rejeição materna. No PND 4 as ninhadas foram ajustadas em 4 fêmeas e 4 machos, totalizando 8 animais por ninhada. A distinção entre os gêneros foi realizada através da identificação da diferença visual relacionada à distância ano-genital, sendo maior em machos. Em PND 8-15 foi confirmada a distinção entre os gêneros a partir da presença de testículos nos machos e de mamas nas machos<sup>105</sup>. Em PND 20 foi realizado o desmame e foram selecionadas para este estudo as fêmeas. Os machos foram submetidos a MIA.

#### 3.4.4 Tratamento com risperidona e aripiprazol

No PND20 os animais foram divididos em seis grupos experimentais (n= 10 – 12 por grupo), de acordo com a exposição pré-natal ao LPS e os tratamentos:

- 1) Grupo não-autista + Salina
- 2) Grupo não-autista + Risperidona
- 3) Grupo não-autista + Aripiprazol
- 4) Grupo autista + Salina
- 5) Grupo autista + Risperidona
- 6) Grupo autista + Aripiprazol

Foi realizado o tratamento com as substâncias de estudo por 21 dias consecutivos, administradas 1 vez ao dia, ip, nas doses 1mg/kg de risperidona<sup>106</sup> e 2mg/kg de aripiprazol<sup>96</sup> e solução salina no mesmo volume no grupo controle. Após 24hs da última administração foram realizados os testes comportamentais. Os animais foram pesados no início do tratamento e semanalmente para ajustes de dose e avaliação de ganho de peso.

Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram submetidos ao protocolo de morte indolor assistida (MIA), realizada com tiopental e lidocaína, por profissional responsável para tal função. Para a realização das análises bioquímicas foram retiradas as estruturas cerebrais córtex pré-frontal e hipocampo.

#### 3.4.5 Protocolo de testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados em PND43, com o objetivo de avaliar o efeito das substâncias de estudo.

##### 3.4.5.1 Teste de Estereotipia

O teste de estereotipia seguiu as descrições de Battisti e colaboradores<sup>107</sup>, sendo este definido pela permanência do animal em posição estacionária exibindo movimentos rápidos, repetidos da cabeça e membros

dianteiros, sendo esta uma característica bem definida de estereotipia. Foi observado o comportamento de subidas e/ou descidas da gaiola durante 5 minutos conforme os vários graus de estereotipia.

A estereotipia pode ser medida em modelos animais de TEA ao marcar a repetição de procedimentos espontâneos, isto é, com o comportamento de *grooming* que persistem por um longo período de tempo e número. Usando sessões gravadas de vídeos, os investigadores analisaram o tempo em segundos e o número de movimentos repetitivos de grooming, durante 5 minutos<sup>108</sup>. Estes episódios prolongados parecem ser particularmente dependentes de contextos sociais, destacando semelhanças ao comportamento social prejudicado no TEA.

#### 3.4.5.2 Teste de Interação Social

No teste de interação social os animais foram submetidos a interagir, individualmente, por 10 minutos, com um outro animal desconhecido do mesmo sexo e da mesma faixa etária. O aparato utilizado foi uma caixa de madeira (60 x 60 x 30cm) com 3 paredes laterais de madeira e uma parede de vidro transparente que permitiu a visualização do comportamento do animal. A análise realizada no teste de interação social recíproca seguiu as descrições de Schneider e Przewlocki<sup>98</sup> e compreende a quantificação do tempos de cheirar, seguir, chutar, socar, montar ou permitir a monta do animal intruso.

#### 3.4.5.3 Reconhecimento de objetos

Os testes de reconhecimento de objetos foram realizados na mesma arena que o campo aberto, utilizando o protocolo proposto por Barichleo et al<sup>109</sup>. A tarefa ocorreu em um campo aberto de 40 x 50 cm, cercado por paredes de 50 cm de altura, feitas de madeira compensada com uma parede de vidro frontal. O piso do campo aberto é dividido em 12 retângulos iguais por linhas pretas. Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação onde estavam autorizados a explorar livremente o campo aberto por 5 min. Nenhum objeto foi colocado na caixa durante a habituação. Os cruzamentos das linhas negras e criações realizadas nesta sessão foram avaliados como atividade locomotora e

exploratória, respectivamente. Vinte e quatro horas após a habituação, o teste foi realizado colocando ratos individuais por 5 minutos no campo, em que dois objetos idênticos (objetos A1 e A2, ambos sendo cubos) foram posicionados em dois cantos adjacentes, a 10 cm das paredes.

Em um teste de memória de reconhecimento de curto prazo, dado 90 minutos após o treino, os ratos exploraram o campo aberto durante 5 minutos na presença de um objeto familiar (A) e um desconhecido (B, uma pirâmide com base quadrada). Todos os objetos apresentaram texturas semelhantes (lisas), cores (azul) e tamanhos (peso 150-200 g), mas formas distintas. Para análise dos resultados, foram comparados os tempos exploratório referentes à somatoria dos dois objetos A1 e A2, e do tempo total de exploração do objeto B, considerando assim treino e teste. Entre os ensaios, os objetos foram lavados com solução de etanol a 10%.

Os mesmos ratos foram autorizados a explorar o campo durante 5 minutos na presença do objeto familiar A e um novo objeto C (uma esfera com uma base quadrada), em um teste de memória de reconhecimento de longo prazo administrado 24 h após o treinamento. A memória de reconhecimento foi avaliada através do somatório do tempo exploratório dos objetos A1+A2 em comparação ao tempo gasto explorando o novo objeto C. A exploração foi definida como cheirar (explorar o objeto a 3 a 5 cm de distância) ou tocar o objeto com o nariz e / ou as patas dianteiras.

#### 3.4.6 Procedimento de eutanásia e coleta de tecidos

Imediatamente após os testes comportamentais realizados em PND43 – 45, os animais foram encaminhados para eutásia (MIA com tiopental e lidocaína), o encéfalo dissecado e as estruturas de interesse (hipocampo e córtex pré-frontal) foram isoladas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises bioquímicas.

#### 3.4.7 Análises bioquímicas

##### 3.4.7.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como indício de peroxidação lipídica nas diferentes áreas encefálicas dos animais experimentais foi mensurada a concentração de TBARS conforme descrito por Draper e Hadley<sup>110</sup>. Os ácidos graxos presentes na membrana lipídica, após sofrerem dano oxidativo, geram o MDA que reage com duas moléculas de TBAR 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 homogenizado 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 rpm 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 TBARS (nmol/g) foi calculada utilizando o coeficiente de extinção de 156 mM TBARS (nmol.g<sup>-1</sup>) e fervidos por 15 minutos. Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

#### *3.4.7.2 Medida do dano oxidativo em proteínas*

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme descrito por Levine e colaboradores<sup>111</sup>. 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  $\mu$ L de guanidina 6M, submetidos à agitação e incubados por 10 min a 37°C, para dissolução. Os brancos foram preparados substituindo-se DNPH por HCl 2M. As absorvâncias 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: Proteína Carbonilada (nmol/mg) =  $(\text{Abs}_{360} \times 45,45) / [\text{Proteínas Totais}]$ .

#### 3.4.7.3 Atividade de superóxido dismutase e catalase

A atividade da enzima antioxidante SOD foi determinada pela inibição da autooxidação da adrenalina, conforme previamente descrito por Bannister e Calabrese (1987)<sup>112</sup>. 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  $\mu$ L 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 à alíquota da amostra (em torno de 20 a 70  $\mu$ L, 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 USOD/md de proteína, 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.

A atividade da CAT foi determinada conforme descrito por Abebi<sup>113</sup>. O princípio deste método baseia-se no decaimento da absorvância ocasionado pela redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 µL de amostra. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata, e os valores foram expressos em mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto e por grama (UCAT/mg proteína).

#### 3.4.7.4 Dosagem de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry, Rosebrough e Randal<sup>114</sup>, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mg/ml.

### 3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão da média. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via e os grupos foram comparados entre si com *pos-hoc de Tukey ou Duncan* quando apropriado. Os dados não paramétricos foram analisados por meio do teste de *Kruskai-Wallis* seguido do teste U de Mann-Whitney para múltiplas comparações. A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ . O número de animais em cada grupo foi baseado em estudos prévios, para uma diferença de até 20% nos parâmetros a serem analisados entre os grupos, com uma variância de no máximo 10% entre as médias calculou-se um tamanho de amostra, para um erro alfa de 0,05 e um poder de 80%.

### 3.6 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A utilização de animais neste estudo seguiu os Princípios de Cuidados de Animais de Laboratório (Principles of Laboratory Animal Care, Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América, NHI, publicação número 80-23, revisada em 1996), bem como a Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos, elaborado pelo CONCEA<sup>115</sup>.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Utilização de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina, em 13/09/2017, sob o protocolo de número 17.017 .4.01.IV. Anexo 1.

## 4.RESULTADOS

### 4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 4.1.1 Teste de Estereotipia

Os comportamentos estereotipados foram avaliados através dos movimentos de *grooming* (auto-limpeza), tanto em tempo (quantificados em segundos) quando em frequência, ou seja, o número que ocorreram. Este trabalho verificou que nenhum dos grupos experimentais apresentou alterações significativas para este parâmetro, tanto na fase de treino quanto no teste (Figura 4).

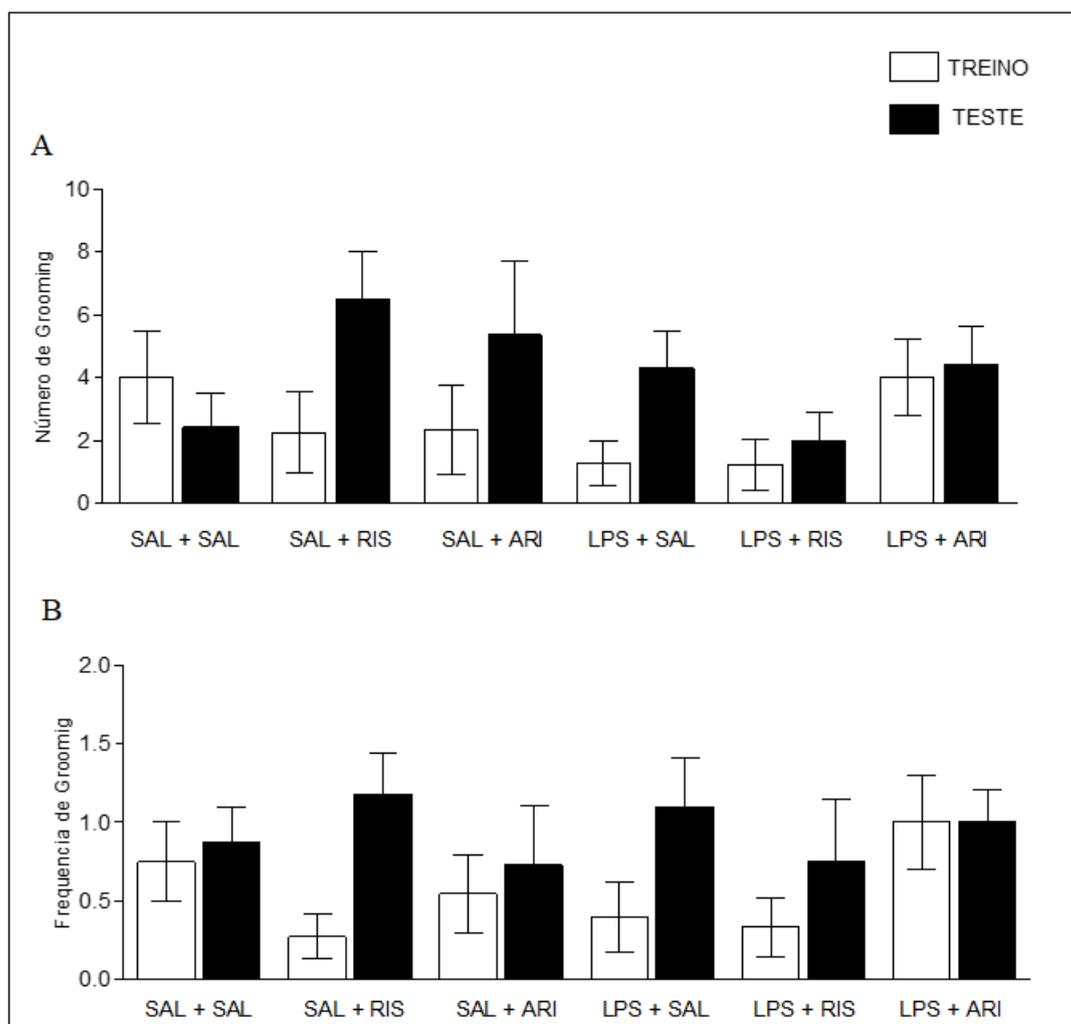


Figura 4. Número (4A) e frequência (4B) de episódios de *grooming* realizados pelos grupos experimentais (n:10-12). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Não houve diferença significativa pelo post-hoc no Teste de Tukey's.

#### 4.1.2 Teste de Interação Social

A interação social faz parte dos critérios diagnósticos para o TEA, é uma das características mais significativas deste transtorno. Este teste comportamental é dividido em quatro diferentes parâmetros avaliativos: cheirar, seguir, montar e permitir a monta. Este estudo obteve resultados com diferenças significativas nos parâmetros de cheirar, de montar e permitir a monta.

No comportamento de cheirar foi possível observar com significância estatística ( $p < 0,05$ ) a ativação imune materna. Além disso, os resultados mostraram que no grupo não-autista o tratamento com aripiprazol foi capaz de aumentar significativamente este parâmetro quando comparado ao grupo salina que não recebeu nenhum tipo de tratamento ( $p < 0,0001$ ). Os animais com comportamento tipo-autista e tratados com aripiprazol foram capazes de cheirar mais vezes o animal intruso quando comparados aos tratados com risperidona ( $p < 0,01$ ) e aos não tratados ( $p < 0,0001$ ). Neste mesmo grupo observou-se que o tratamento com risperidona aumentou o número desse comportamento em relação ao uso de salina, com significância estatística ( $p < 0,01$ ) (Figura 5A).

Foi possível observar uma tendência a menor tempo de interação social recíproca, no parâmetro seguir, entre os animais expostos ao LPS quando comparados aos animais do grupo salina, e as medicações apresentaram uma tendência a melhorar este comportamento, embora os valores não se apresentaram significativos (Figura 5B).

Em relação ao comportamento de montar, os animais não-autistas que receberam tratamento com aripiprazol montaram mais vezes no animal intruso que aqueles tratados com risperidona ( $p < 0,05$ ). O mesmo comportamento foi observado nos animais do grupo tipo-autista, tratados com aripiprazol e comparados com os tratados com risperidona ( $p < 0,0001$ ) ou salina ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5C).

Quando avaliado o parâmetro de permitir a monta, os resultados mostraram que os animais do grupo não-autista tratados com aripiprazol tiveram um aumento significativo deste comportamento quando comparados aos animais tratados com risperidona ( $p < 0,01$ ) ou salina ( $p < 0,5$ ) (Figura 5D).

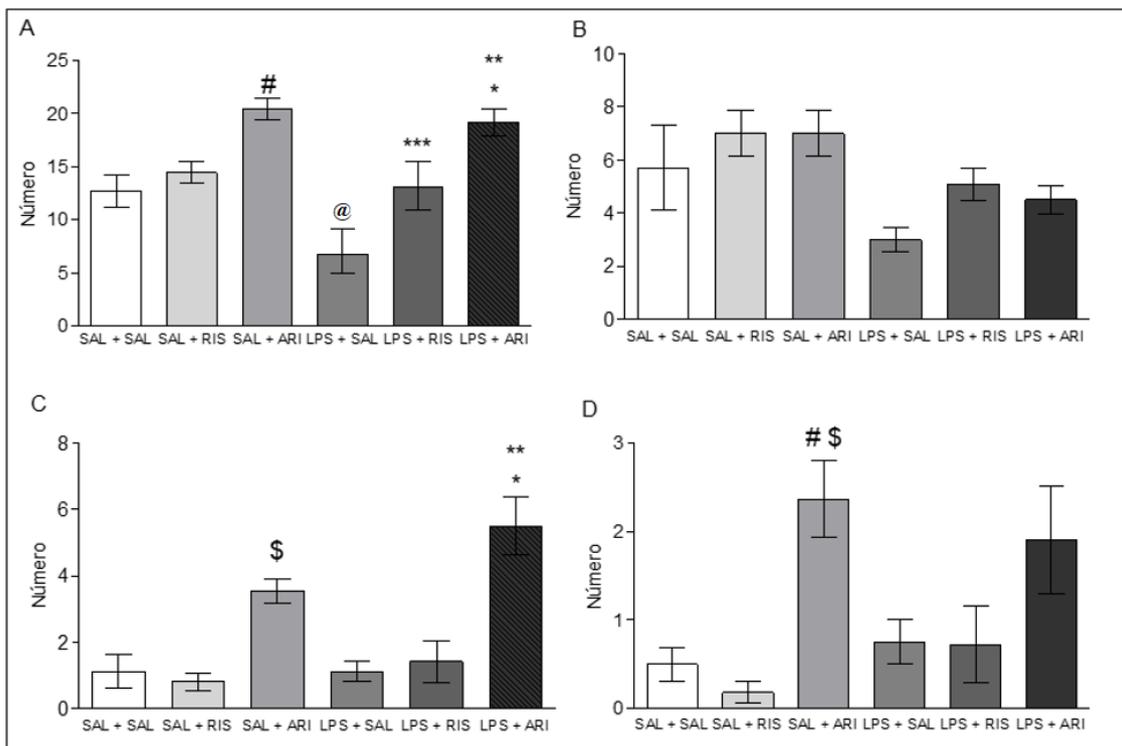


Figura 5. Parâmetros avaliados no teste de Interação Social: cheirar (5A), seguir (Figura 5B), montar (Figura 5C) e permitir a monta (Figura 5D) realizados pelos grupos experimentais (n:10-12). @Diferença significativa entre os grupos SAL+SAL e LPS+SAL. \*Diferença significativa entre os grupos LPS+ARI e LPS+RIS. \*\*Diferença significativa entre os grupos LPS+SAL e LPS+ARI. \*\*\*Diferença significativa entre os grupos LPS+SAL e LPS+RIS. #Diferença significativa entre os grupos SAL+SAL e SAL+ARI. \$Diferença significativa entre os grupos SAL+ARI e SAL+RIS. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$  –  $p < 0,0001$ ) pelo *post-hoc* no Teste de Tukey's.

#### 4.1.3 Reconhecimento de Objetos

Os animais foram avaliados quanto à memória declarativa, tanto de curta quanto longa duração, sendo realizado o primeiro teste 90 minutos após o treino e, o segundo, após 24 horas. Para avaliação dos resultados foram somados os tempos exploratórios dos objetos A + A1 na fase de treino, e posteriormente comparados ao tempo exploratório do objeto B (MCD) e objeto C (MLD). Os animais do grupo LPS, quando tratados com aripiprazol e risperidona, exploraram mais o novo objeto, na fase de teste, na avaliação de memória de curta duração, quando comparados ao grupo que recebeu salina ( $p < 0,01$ ).

Quando avaliada memória de longa duração, os resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 6).

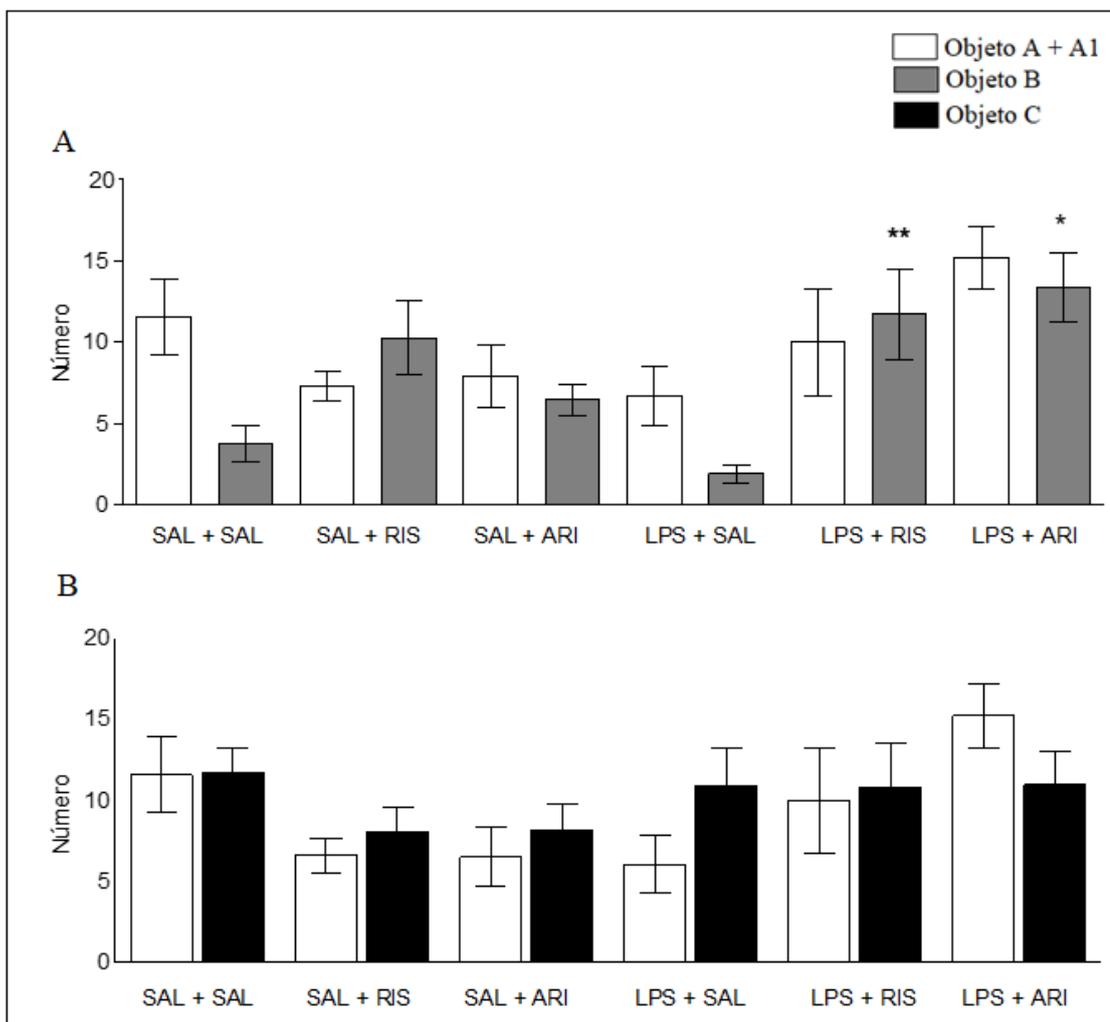


Figura 6 – Avaliação da MCD (6A) e MLD (6B) na fase de treino e teste nos grupos experimentais (n:10-12). \*Diferença significativa entre os grupos LPS+SAL e LPS+ARI e \*\*os grupos LPS+SAL e LPS+RISP quando avaliada MCD na fase de teste. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) pelo post-hoc no Teste de Tukey's.

## 4.2 Ganho de Peso

Todos os animais foram pesados nos dias 0, 7, 14 e 21 do tratamento. Os resultados mostraram que os animais tiveram aumento de peso de maneira homogênea, portanto sem diferença estatística, independentemente do tratamento ao qual foram submetidos (Figura 7).

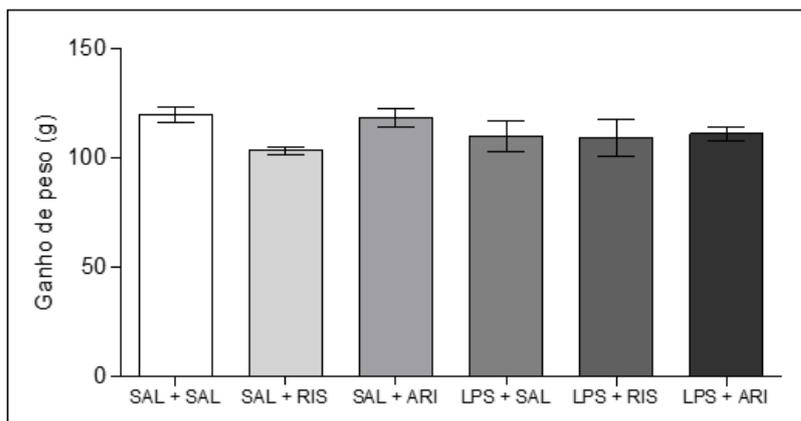


Figura 7. Avaliação da média de ganho de peso, entre o início e o fim do tratamento, observados nos grupos experimentais (n:10-12). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Não houve diferença significativa pelo post-hoc no Teste de Tukey's.

## 4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

### 4.3.1 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Na avaliação do dano lipídico, no córtex pré-frontal, foi observado uma diminuição dessa condição nos animais não-autistas que receberam risperidona quando comparados ao grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento, ( $P < 0,05$ ). No hipocampo, a dosagem dessa substância não foi significativa para este marcador de dano neuronal. (Figura 8).

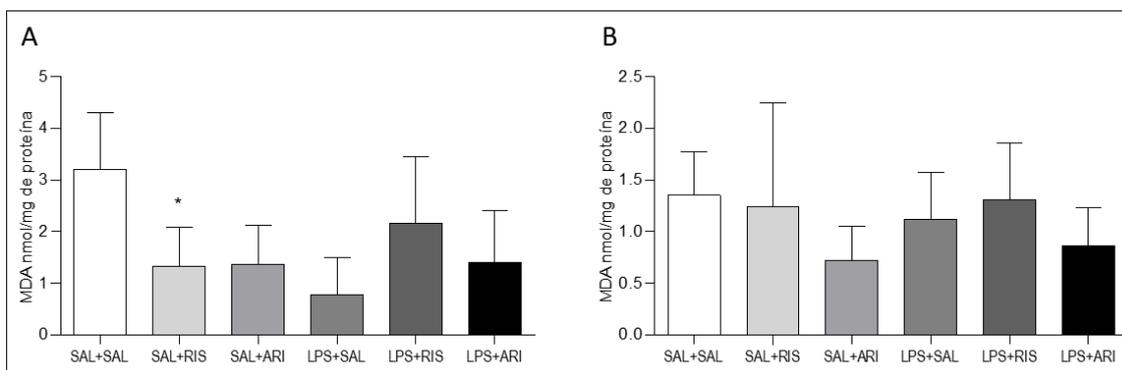


Figura 8. Medida de substâncias reativas ao TBARS no córtex pré-frontal (Figura 8A) e hipocampo (Figura 8B) realizadas nos grupos experimentais (n=6). \*Diferença significativa entre o grupo SAL-RIS e SAL-SAL. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo post-hoc no Teste de Tukey's.

#### 4.3.2 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil

No córtex pré-frontal, observou-se que os tratamentos realizados não foram capazes de alterar o dano oxidativo em proteínas. Enquanto, no hipocampo, o grupo de animais não-autistas que receberam tratamento com aripiprazol tiveram menor dano em comparação aos não-autistas que não receberam tratamento ( $p < 0,01$ ) (Figura 9).

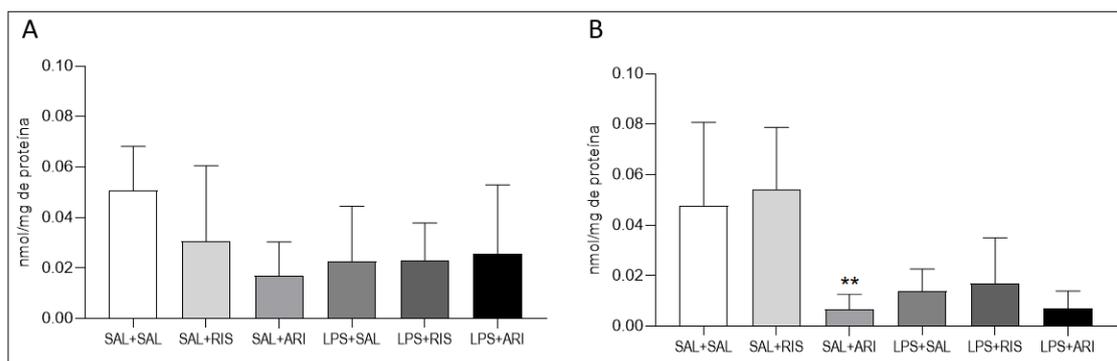


Figura 9. Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no córtex pré-frontal (Figura 9A) e hipocampo (Figura 9B) realizadas nos grupos experimentais (n=6). \*\*Diferença significativa entre o grupo SAL+ARI e SAL+SAL. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) pelo post-hoc no Teste de Tukey's.

### 4.3.3 Atividade da Catalase e Superóxido Dismutase

A avaliação do estresse oxidativo através das enzimas antioxidantes catalase e SOD evidenciou resultados homogêneos entre os grupos. Tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo as medicações não foram capazes de alterar os níveis dessas substâncias de maneira significativa (Figura 10).

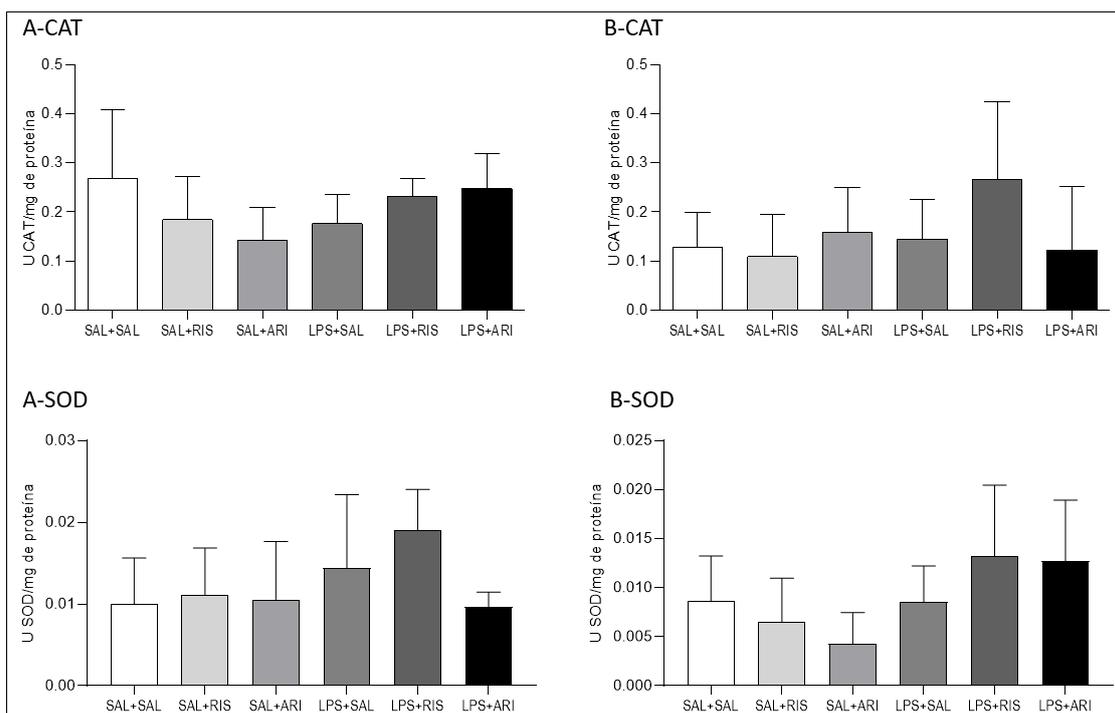


Figura 10. Avaliação da atividade da CAT e SOD no córtex pré-frontal (A-CAT e A-SOD) e hipocampo (B-CAT e B-SOD) realizadas nos grupos experimentais (n=6). Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Não houve diferença significativa pelo post-hoc no Teste de Tukey's.

## 5.DISSCUSSÃO

Este trabalho teve como principal hipótese a existência de uma medicação antipsicótica mais nova, o aripiprazol, que quando comparada a outra mais antiga, a risperidona, bem como ao uso de salina, que fosse capaz de melhorar alterações comportamentais e de memória em animais em um modelo de autismo. Além de modificar fatores envolvidos no estresse oxidativo no SNC desses roedores. Para este propósito foi realizado o modelo experimental de indução de TEA, através da AIM com LPS no DG9,5, tratamento com aripiprazol, risperidona e salina, testes comportamentais, bem como análises bioquímicas que envolveram TBARs, carbonilação protéica, CAT e SOD. Os resultados obtidos a partir destas abordagens reafirmam os achados da literatura compatíveis com AIM, mas não verificaram alterações em relação ao EO. Foi possível observar as medicações foram capazes de melhorar alguns comportamentos, mesmo quando não houve significância entre o grupo autista e não autista. Estes achados, que serão discutidos a seguir, foram evidenciados tanto pelos resultados oriundos dos procedimentos comportamentais como também pelos resultados obtidos através das análises bioquímicas.

Nesse estudo, as manifestações comportamentais referentes às estereotipias foram avaliadas através de movimentos de grooming, onde foram observados o tempo e o número desse evento. Quando comparados todos os grupos, após serem submetidos ao tratamento medicamentoso, verificou-se que não houve diferença significativa entre os grupos tratados e não-tratados. Na prática clínica, sabe-se que os movimentos de estereotipia são encontrados em grande parte dos pacientes com TEA, no entanto, não é critério obrigatório para o diagnóstico. Alguns pacientes apresentam estereotipias mais precocemente no desenvolvimento, enquanto outros mais tardiamente<sup>12,83</sup>.

Estudos semelhantes, também realizados em roedores, avaliaram a presença de movimentos de grooming em animais com PND60 e submetidos à ativação imune materna por exposição ao LPS<sup>91,116</sup>. Este estudo avaliou os movimentos de auto-limpeza dos animais em PND45, sendo possível que a diferença na resposta comportamental esteja relacionada com o período de avaliação, considerando que os animais jovens não tenham completado o desenvolvimento neuronal<sup>61</sup>. Xuan *et al.*, em um estudo para avaliar alterações

comportamentais em um modelo animal de autismo, sobre a diferença entre gêneros, também não observaram diferença nesse parâmetro comportamental<sup>34</sup>.

Em comparação ao que já foi estudado em seres humanos, Ghanizadeh e colaboradores, em 2013, compararam uso de risperidona e aripiprazol em crianças e adolescentes com TEA e não observaram alterações significativas no comportamento de estereotipia após tratamento por 2 meses<sup>85</sup>. Outro estudo de 2017, publicado por Nikvarz, em crianças com TEA, não evidenciou melhora das estereotipias após uso de risperidona por 8 semanas<sup>117</sup>.

Outro fator importante envolvido no diagnóstico e presente nos pacientes com TEA são as deficiências sociais e de comunicação<sup>1</sup>, que também são características comuns dos transtornos psiquiátricos<sup>118</sup>. Podemos citar entre elas a pobreza de interação social e de relacionamentos interpessoais, dificuldade em compartilhar e atraso no desenvolvimento da linguagem verbal<sup>1</sup>. Neste estudo, os prejuízos de interação social recíproca foram avaliados através de testes comportamentais e confirmado especialmente nos parâmetros de cheirar.

Observou-se melhora em alguns desses comportamentos quando realizados tratamentos tanto com aripiprazol quanto com risperidona. O aripiprazol melhorou, especialmente, os comportamentos de cheirar e montar nos animais tipo-autista, em relação ao grupo tratado com risperidona e ao grupo que recebeu salina. No grupo não-autista o aripiprazol também foi capaz de melhorar esses parâmetros de interação social. Enquanto a risperidona melhorou apenas o comportamento de cheirar no grupo de comportamento tipo-autista.

Um estudo também pré-clínico em modelo animal, mas de esquizofrenia, no qual os animais foram tratados com aripiprazol, apresentou resultados nos quais esta medicação pode ser eficaz no tratamento dos sintomas da doença e pode melhorar as funções de memória, que também estão prejudicadas no TEA<sup>119</sup>. Hara e colaboradores, em um estudo com modelo animal de TEA, induzido por valproato de sódio, observaram que houve melhora da interação social após uso de risperidona por duas semanas<sup>120</sup>. Em 2011 Chadman e colaboradores<sup>121</sup>, em um estudo com modelo animal de autismo, descreveram que a risperidona não foi capaz de melhorar a sociabilidade dos animais, sendo que tal fato foi justificado pela dose baixa desta medicação (0,3mg/kg). A

variabilidade nas respostas comportamentais encontradas nos estudos utilizando modelo animal de TEA podem estar relacionadas com a heterogeneidade do transtorno<sup>122</sup>.

O aripiprazol e a risperidona são medicações aprovadas e seguras para uso em crianças com sintomas exacerbados do TEA, especialmente irritabilidade e alteração comportamental<sup>94</sup>. Um estudo feito por 12 semanas com crianças com TEA, entre 6 e 17anos, teve como resultado melhora comportamental, socialização e irritabilidade nos pacientes que receberam aripiprazol<sup>123</sup>. Resultado semelhante foi descrito por Valicenti et al<sup>124</sup> em um estudo com crianças de 5 a 19 anos que receberam aripiprazol por 15 meses.

É comprovado que a memória executiva, bem como a não aversiva, estão prejudicadas nos pacientes com TEA<sup>63,125,126</sup>. Outro teste comportamental realizado para avaliar memória de curto e longo prazo foi de reconhecimento de objetos. Neste estudo, observou-se ao avaliar a memória de curta duração, onde tanto o aripiprazol quanto a risperidona melhoraram o comprometimento de memória de curta duração destes animais, quando avaliados na fase de teste, e em relação ao grupo tipo-autista que recebeu salina. As medicações não foram capazes de alterar a memória de longa duração.

Resultado semelhante também foi descrito por Hara et al., em estudo com animais, em modelo de autismo, onde a administração crônica de risperidona e aripiprazol aliviaram o comprometimento da memória de reconhecimento, nos camundongos<sup>120</sup>. Outro estudo que realizou uma comparação entre uso de aripiprazol isolado ou associado a antidepressivo, também em modelo animal, verificou que após tratamento crônico (21 dias) os animais que receberam aripiprazol apresentaram melhores resultados em testes de memória<sup>127</sup>. Ratajczak e colaboradores, descreveram em um modelo animal de esquizofrenia, realizado com animais jovens, que o uso de aripiprazol e olanzapina podem melhorar as funções de memória que estão afetadas nessa doença<sup>119</sup>.

Já em seres-humanos, um estudo realizado com 42 crianças autistas, com idade de 4 a 14anos, verificou que a risperidona, em comparação ao placebo, foi capaz de melhorar a memória de curta duração, avaliada através de testes, das crianças em estudo<sup>128</sup>. Outro estudo publicado por Riedel e colaboradores, evidenciou que o tratamento com aripiprazol em pacientes

adultos com esquizofrenia foi capaz de melhorar respostas em testes de memória verbal, atenção e resultado cognitivo final após 8 semanas de uso da medicação<sup>129</sup>.

As medicações anti-psicóticas, além de seus benefícios referentes ao comportamento, podem apresentar efeitos colaterais como sonolência e aumento de peso. O peso também foi objetivo de avaliação e neste estudo, os resultados mostraram que houve aumento de peso de maneira homogênea entre todos os animais, autistas ou não, bem como indiferentemente do tratamento que receberam. O mesmo foi observado em outros estudos publicados por Kirsten e Xuan, que descreveram não haver diferença de ganho de peso entre animais expostos ou não ao LPS<sup>34,103</sup>.

Uma hipótese para os resultados encontrados poderia ser justificada pelo tempo de tratamento, pois é possível que para ocorrer aumento significativo de peso seja necessário fazer um tratamento por longo período, ou ainda, um período maior que o deste estudo, como outros trabalhos que trataram animais até PND60. Outro fato importante é que este trabalho foi realizado com animais jovens. Sabe-se que a taxa de metabolismo basal é inversamente proporcional à idade, ou seja, quando mais jovem o indivíduo for, mais rápido será seu metabolismo<sup>130,131</sup>. Assim, outra hipótese seria que animais jovens teriam menor ganho de peso.

Em estudo realizado com crianças e adolescentes diagnosticadas com TEA, Ghanizadeh et al., em 2013, compararam os efeitos do uso de aripiprazol e risperidona e não observaram diferença significativa para o ganho de peso entre as duas medicações<sup>85</sup>. Outro estudo realizado em 2016, comparando o uso de antipsicóticos em pacientes com TEA, notou aumento de peso significativo após uso das medicações antipsicóticas, mas não observou diferença quando comparadas as medicações aripiprazol e risperidona entre si. Dentre todos os antipsicóticos usados no estudo, o que apresentou maior ganho de peso foi a olanzapina<sup>19</sup>. Outro estudo realizado para avaliar ganho de peso nos pacientes com TEA observou que houve aumento significativo de peso após uso de risperidona e aripiprazol, mas não houve diferença quando comparadas as medicações entre si<sup>84</sup>. Os dois primeiros estudos citados acima apresentaram metodologia semelhante entre si. Outro dado relevante desses estudos é o tempo de tratamento, o trabalho realizado por Yoon e colaboradores avaliou

pacientes com TEA entre 2 e 20 anos de idade, com tempo médio de tratamento de 1ano<sup>19</sup>. Enquanto no trabalho de Wink, o tempo médio de tratamento de risperidona foi de 2,3 anos e de aripiprazol 1,5 anos<sup>84</sup>.

A segunda etapa deste estudo teve objetivo de avaliar parâmetros de EO, considerando medidas de dano oxidativo em lipídios e em proteínas e atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, em amostras encefálicas do córtex pré-frontal e hipocampo de animais expostos ao LPS em período pré-natal. Em estudos pré-clínicos, vários modelos animais de autismo mostraram o efeito do EO no SNC<sup>44,48,49,58</sup>. O EO ocorre quando os mecanismos de defesa antioxidantes não são capazes de manter um equilíbrio contra as EROs. Estudos apontam para aumento nos níveis de EO em regiões encefálicas de indivíduos autistas<sup>48,49,116</sup>.

Em relação ao dano em lipídios, avaliados através de TBARs e nas proteínas, avaliadas através de carbonilação proteica, as medicações não foram capazes de realizar alterações significativas, em relação ao objetivo deste estudo. Observou-se que no córtex pré-frontal a risperidona foi capaz de reduzir níveis de peroxidação lipídica, no grupo não-autista, quando comparado àqueles tratados com salina. Em relação ao dano oxidativo nas proteínas, no hipocampo, o aripiprazol foi capaz de reduzir os níveis de carbonilação proteica nos animais não-autistas, quando comparados aqueles que receberam salina

Por se tratar de estudo único a avaliar padrões comportamentais e de EO em ratos jovens, em um estudo pré-clínico de autismo, é possível que os resultados nas análises bioquímicas não se mostraram de maneira tão significativa pelo curto tempo de tratamento, e também deve-se considerar a idade dos animais deste estudo. É possível também, que as doses administradas das medicações tenham sido baixas e não suficientes para alterar tais substâncias no SNC. Outra hipótese é que aripiprazol e risperidona não apresentaram efeito sobre o estresse oxidativo pelo fato que neste estudo o LPS não pode induzir o estresse oxidativo no SNC dos animais.

Martins e colaboradores, mostraram que o tratamento com altas doses de aripiprazol (10 e 20mg/kg) foi capaz de diminuir os níveis de TBARS no córtex pré-frontal, no entanto, essa resposta não foi observada no hipocampo<sup>96</sup>. Erem e colaboradores, em um modelo animal de depressão, verificaram que o aripiprazol foi capaz de reduzir níveis de peroxidação lipídica no córtex cerebral,

após 4 semanas de uso da medicação recebida por gavagem e em animais adultos<sup>56</sup>. O estudo de Stojkovic et al., evidenciou redução nos níveis de peroxidação lipídica, avaliados através de malondialdeído, no córtex e hipocampo, em modelo animal de esquizofrenia, após tratamento com risperidona, de PND35 a PND100<sup>57</sup>. Os estudos referidos acima, reforçam a diferença de resultados entre o descrito neste trabalho, é importante ressaltar a diferença entre doses e tempo de administração dos fármacos.

Nos seres-humanos existem algumas limitações quanto a mensuração destas substâncias, foi realizado um estudo para avaliar o efeitos de antipsicóticos em pacientes com transtornos psiquiátricos, com idade adulta, em amostras de sangue periférico, como resultado os autores desceveram que a risperidona não foi capaz de alterar níveis de peroxidação lipídica, que foram avaliados através de malondialdeído<sup>50</sup>.

Ainda em relação ao dano protéico, quando avaliaram à carbonilação proteica, Martins e colaboradores descreveram não haver diferença após tratamento com aripiprazol, independente da dose, nem no hipocampo bem como como no córtex pre-frontal<sup>96</sup>. Outro estudo com animais jovens e uso de aripiprazol, não evidenciou alteração dos níveis de peroxidação lipídica, bem como de carbonilação proteica, independente da dose utilizada<sup>132</sup>.

Este estudo evidenciou que quanto a avaliação das substâncias antioxidantes, as medicações aripiprazol e risperidona não reduziram os valores de SOD e CAT no SNC. Há pouca descrição de resultados publicados referentes à dosagem de catalase no SNC.

Assim como este trabalho, El-ansay e colaboradores não evideram alterações nos níveis de CAT<sup>43</sup>. Tal estudo avaliou amostras de sangue periférico em crianças com diagnóstico de TEA e observou que quando comparados ao grupo controle houve apresentavam aumento nos níveis de peroxidação lipídica e aumento dos valores de SOD e GPX com significância, e para catalase os valores não foram significantes<sup>43</sup>. É importante destacar que tais avaliações foram realizadas em sangue periférico, amostra bastante diferente da utilizada em nosso trabalho.

Eren et al, em um estudo já citado anteriormente, observaram que o aripiprazol em modelo pré-clínico de depressão foi capaz de alterar positivamente níveis de glutathione, glutathione peroxidase e vitamina C<sup>56</sup>. Foi

observado em outro estudo, já referido anteriormente, que o aripiprazol, mesmo em diferentes dosagens, não foi capaz de modificar os níveis de superóxido mitocondrial no hipocampo e cortex, em estudo com ratos, tratados por 4 semanas<sup>96</sup>. Em um modelo animal de esquizofrenia realizado por Stojkovic et al., a risperidona normalizou níveis de glutathione e elevou os níveis de SOD no hipocampo e córtex. Diferentemente do que foi observado neste estudo, que foi realizado em animais em PND35, que foram tratados por 9 semanas e por via oral<sup>57</sup>.

Os resultados encontrados neste estudo podem ter apresentado variações referentes ao descrito na literatura, o que pode ser justificado pela idade dos animais selecionados para este estudo, pelo tempo de tratamento realizado, pela dose das medicações aplicadas e pela via de administração das mesmas. Em relação ao EO, é possível que as medicações não puderam exercer seu potencial terapêutico pelo fato do LPS não ter causado dano no SNC. Por fim, não foi possível observar grandes diferenças entre os resultados alcançados após tratamento entre as duas medicações. Visto o grande aumento da prevalência do TEA nas últimas décadas e o prejuízo que esta condição clínica causa ao paciente e seus familiares. São necessários novos estudos em busca da etiologia dessa doença, bem como, em relação às novas possibilidades terapêuticas tanto curativas quanto para alívio dos sintomas.

## CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo sugerem que a ativação imune materna gerada pela exposição pré-natal ao LPS no DG 9,5 originou na prole, a seguinte alteração comportamental que é condizente com TEA, sendo ela:

- Redução no comportamento social recíproco, quando avaliado o parâmetro de cheirar.

Além disso, nossos resultados mostram que o tratamento com aripiprazol e risperidona, foi capaz de melhorar o comportamento tipo-autista, especificamente:

- Aumento no comportamento social recíproco.

A ativação imune materna não foi capaz de provocar alterações nos parâmetros de EO avaliados neste estudo, e desta forma, não foi observado os possíveis efeitos associados ao tratamento com aripiprazol ou risperidona.

Este estudo não verificou discreta distinção entre as respostas terapêuticas após os tratamentos realizados com aripiprazol e risperidona, com tendência a melhores resultados com uso de aripiprazol. As duas medicações demonstraram resultados positivos, especialmente em relação aos parâmetros comportamentais. Assim, estudos adicionais são necessários para verificar a dose ideal e tempo de tratamento adequados. Desta forma, será possível alcançar, com maior precisão, os benefícios esperados com o tratamento medicamentoso.

## REFERÊNCIAS

1. American Psychiatric Association. DSM-5 Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais. 5a edição. Porto Alegre: ARTMED; 2014.
2. Blumberg SJ, Bramlett MD, Kogan MD, Schieve LA, Jones JR, Lu MC. Changes in Prevalence of Parent-reported Autism Spectrum Disorder in School-aged U . S . Children : 2007 to 2011 – 2012. Natl Health Stat Report. 2013;65(65):1–12.
3. Tsai LY. Impact of DSM-5 on epidemiology of Autism Spectrum Disorder. Res Autism Spectr Disord. 2014;8(11):1454–70.
4. Kogan M D, Vladitiu C J, Schieve L A, Ghandour r M, Blumberg S J, Zablostsky B, PErrin J M, Shattuck P, Kuhlthau K A HRL and LMG. The Prevalence of Parent- Reported Autism Spectrum Disorder Among US Children. Pediatrics. 2018;142(6).
5. Atladottir HO, Gyllenberg D, Langridge A, Sandin S, Hansen SN, Leonard H, et al. The increasing prevalence of reported diagnoses of childhood psychiatric disorders: a descriptive multinational comparison. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2014;24(2):173–83.
6. Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JG. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. Psychol Med. 2015;45(03):601–13.
7. Mintz M. Evolution in the Understanding of Autism Spectrum Disorder : Historical Perspective. Indian J Pediatr. 2016;1–10.
8. Estes ML, Mcallister AK. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. Neuroimmunology. 2016;353(6301).
9. Bjorkland G, Saad K, Chirumbolo S, Kern JK, Geier DA, Geier MR, et al. Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. Acta Neurobiol Exp. 2016;76:257–68.
10. Meltzer A, Water J Van De. The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. Neuropsychopharmacology. 2016;1–15.
11. Bent S, Hendren RL. Complementary and Alternative Treatments for Autism Part 1: Evidence-Suported Treatments. AMA J Ethics. 2015;17(4):369–74.

12. Murphy CM, Wilson CE, Robertson DM, Ecker C, Daly EM, Hammond N, et al. Autism spectrum disorder in adults : diagnosis , management , and health services development. *Neuropsychiatric Dis Treat.* 2016;12:1669–86.
13. Young N, Findling RL. An update on pharmacotherapy for autism spectrum disorder in children and adolescents. *Curr Opin Psychiatry.* 2015;28(2):91–101.
14. Murray ML, Hsia Y, Glaser K, Simonoff E, Murphy DGM, Asherson PJ, et al. Pharmacological treatments prescribed to people with autism spectrum disorder (ASD) in primary health care. *Psychopharmacology (Berl).* 2014;231(6):1011–21.
15. Hirsh L, Pringsheim T. Aripiprazole for autism spectrum disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;(5).
16. Doyle C a, McDougle CJ. Pharmacotherapy to control behavioral symptoms in children with autism. *Expert Opin Pharmacother.* 2012;13(11):1615–29.
17. Chadman KK, Guariglia SR, Yoo JH. New directions in the treatment of autism spectrum disorders from animal model research. *Drug Discov.* 2012;407–16.
18. Orsolini L, Tomasetti C, Valchera A, Vecchiotti R, Matarazzo I, Vellante F, et al. An update of safety of clinically used atypical antipsychotics. *Expert Opin Drug Saf.* 2016;15(10):1329–47.
19. Yoon Y, Wink LK, Pedapati E V., Horn PS, Erickson CA. Weight Gain Effects of Second-Generation Antipsychotic Treatment in Autism Spectrum Disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2016;1–6.
20. Koegel LK, Koegel RL, Ashbaugh K, Bradshaw J, Kern L, Koegel RL, et al. The importance of early identification and intervention for children with or at risk for autism spectrum disorders. *Int J Speech Lang Pathol.* 2014;16(1):50–6.
21. Graf WD, Miller G, Epstein LG. The autism “ epidemic ” Ethical , legal , and social issues in a developmental spectrum disorder. *Neurology.* 2017;88:1–10.
22. Kanner L. Autistic Disturbances of Affective Contact. *Pathology.* 1943;217–50.
23. Dias S. Asperger e sua síndrome em 1944 e na atualidade. *Rev Latinoam*

- Psicopatol Fundam. 2015;18(2):307–13.
24. Rutter M. Diagnosis and Definition of Autism. *J Autism Child Schizophr.* 1978;139–61.
  25. Menezes Y, Elder K, Dale B. Link Between Increased Prevalence of Autism Spectrum Disorder Syndromes and Oxidative Stress, DNA Methylation, and Imprinting: The Impact of the Environment. *JAMA Pediatr.* 2015;169(11):5–6.
  26. Hansen SN, Schendel DE, Parner ET. Explaining the Increase in the Prevalence of Autism Spectrum Disorders The Proportion Attributable to Changes in Reporting Practices. *JAMA Pediatr.* 2015;169(1):56–62.
  27. Christensen DL, Baio J, Braun KVN, Bilder D, Charles J, Constantino JN, et al. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years. *MMWR Surveill Summ.* 2016 Apr 1;65(3):1–23.
  28. Fombonne E, Marcin C, Manero AC, Bruno R, Diaz C, Villalobos M, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorders in Guanajuato, Mexico: The Leon survey. *J Autism Dev Disord.* 2016;46(5):1669–85.
  29. 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.
  30. Brown JT, Eum S. Pharmacogenomics of autism spectrum. *Pharmacogenomics.* 2017;18:403–14.
  31. Atladóttir H, Schendel D, Henriksen T, Hjort L, Parner E. Gestational age and autism spectrum disorder: Trends in risk over time. *Autism Res.* 2016;9:224–31.
  32. Baharnoori M, Bhardwaj SK, Srivastava LK. Neonatal Behavioral Changes in Rats With Gestational Exposure to Lipopolysaccharide : A Prenatal Infection Model for Developmental Neuropsychiatric Disorders. *Schizophrenia Bull.* 2012;38(3):444–56.
  33. Flinkkilä E, Mauri K. Prenatal Inflammation , Infections and. *Psychopathology.* 2016;1–17.
  34. Xuan ICY, Hampson DR. Gender-Dependent Effects of Maternal Immune Activation on the Behavior of Mouse Offspring. *PLoS One.* 2014;9(8):1–9.
  35. Abreu-Villaça Y, Levin ED. Developmental neurotoxicity of succeeding

- generations of insecticides. *Environ Int.* 2017;99:55–77.
36. Baharnoori M, Bhardwaj SK, Srivastava LK. Effect of Maternal Lipopolysaccharide Administration on the Development of Dopaminergic Receptors and Transporter in the Rat Offspring. *PLoS One.* 2013;8(1):18–23.
  37. Oh-nishi A, Koga K, Maeda T, Suhara T. A possible serologic biomarker for maternal immune activation-associated neurodevelopmental disorders found in the rat models. *Neurosci Res.* 2016;113:63–70.
  38. Kirsten TB, Chaves-kirsten GP, Bernardes S. Lipopolysaccharide Exposure Induces Maternal Hypozincemia , and Prenatal Zinc Treatment Prevents Autistic-Like Behaviors and Disturbances in the Striatal Dopaminergic and mTOR Systems of Offspring. *PLoS One.* 2015;1–18.
  39. Patterson PH. Immune involvement in schizophrenia and autism : Etiology , pathology and animal models. 2009;204:313–21.
  40. Pendyala G, Chou S, Jung Y, Coiro P, Spartz E, Padmashri R, et al. Maternal Immune Activation Causes Behavioral Impairments and Altered Cerebellar Cytokine and Synaptic Protein Expression. *Neuropsychopharmacology.* 2017;1–12.
  41. Theoharides TC, Asadi S, Patel AB. Focal brain inflammation and autism. *J Neuroinflammation.* 2013;10(1):815.
  42. Kern JK, Geier DA, Sykes LK, Geier MR. Relevance of Neuroinflammation and Encephalitis in Autism. *Front Cell Neurosci.* 2016;9(January):1–10.
  43. El-Ansary A, Bjørklund G, Chirumbolo S, Alnakhli OM. Predictive value of selected biomarkers related to metabolism and oxidative stress in children with autism spectrum disorder. *Metab Brain Dis.* 2017;
  44. Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przegaliński E, et al. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Reports.* 2015;67(3):569–80.
  45. Greene RK, Walsh E, Mosner MG, Dichter GS. A Potential Mechanistic Role for Neuroinflammation in Reward Processing Impairments in Autism Spectrum Disorder Authors: *Biol Psychol.* 2018;
  46. Mitchell RHB, Goldstein BI. Inflammation in children and adolescents with

- neuropsychiatric disorders: A systematic review. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014;53(3):274–96.
47. McDougle CJ, Landino SM, Vahabzadeh A, O'Rourke J, Zurcher NR, Finger BC, et al. Toward an immune-mediated subtype of autism spectrum disorder. *Brain Res*. 2015;1617:72–92.
  48. Rossignol DA, Frye RE. Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism. *Front Physiol*. 2014;5(April):1–15.
  49. Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*. 2006;13(3):171–81.
  50. Kropp S, Kern V, Lange K, Degner D, Hajak G, Kornhuber J, et al. Oxidative Stress During Treatment With First- and Second-Generation Antipsychotics. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2005;17(2):227–31.
  51. Barbosa KBF, Costa NMB, De Cássia Gonçalves Alfenas R, De Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*. 2010;23(4):629–43.
  52. Frustaci A, Neri M, Cesario A, Adams JB, Domenici E, Dalla B, et al. Free Radical Biology and Medicine Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2012;52(10):2128–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.011>
  53. Kanarik M, Harro J. Sociability trait and regional cerebral oxidative metabolism in rats: Predominantly nonlinear relations. *Behav Brain Res*. 2017;30(337):186–92.
  54. Kizilgun M, Guney E, Ozturk O, Senses Dinc G, Alisik M, Erel O, et al. Oxidative stress in children and adolescents with anxiety disorders. *J Affect Disord* [Internet]. 2013;156:62–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2013.11.016>
  55. Al-Gadani Y, El-Ansary A, Attas O, Al-Ayadhi L. Metabolic biomarkers related to oxidative stress and antioxidant status in Saudi autistic children. *Clin Biochem* [Internet]. 2009;42(10–11):1032–40.
  56. Eren I, Naziroğlu M, Demirdaş A. Protective effects of lamotrigine, aripiprazole and escitalopram on depression-induced oxidative stress in rat brain. *Neurochem Res*. 2007;32(7):1188–95.

57. Stojković T, Radonjić N V., Velimirović M, Jevtić G, Popović V, Doknić M, et al. Risperidone reverses phencyclidine induced decrease in glutathione levels and alterations of antioxidant defense in rat brain. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2012;39(1):192–9.
58. Nadeem A, Ahmad SF, Attia SM, Bakheet SA, Al-harbi NO, Al-ayadhi LY. Activation of IL-17 receptor leads to increased oxidative inflammation in peripheral monocytes of autistic children. *Brain Behav Immun [Internet]*. 2017.
59. Trontel HG, Duffield TC, Bigler ED, Abildskov TJ, Froehlich A, Prigge MBD, et al. Mesial temporal lobe and memory function in autism spectrum disorder: an exploration of volumetric findings. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2015;37(2):178–92.
60. Nowakowska E, Kus K, Ratajczak P, Cichocki M, Woźniak A. The influence of aripiprazole, olanzapine and enriched environment on depressant-like behavior, spatial memory dysfunction and hippocampal level of BDNF in prenatally stressed rats. *Pharmacol Reports*. 2014;66(3):404–11.
61. Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett*. 2002;328(3):261–4.
62. Konishi K, Mckenzie S, Roy S, Bohbot VD. Hippocampus-dependent spatial learning is associated with higher global cognition among healthy older adults. *Neuropsychologia*. 2017;
63. Shalom D Ben. The medial prefrontal cortex and integration in autism. *Neuroscientist*. 2009;15(6):589–98.
64. Aman MG, Hollway JA, McDougle CJ, Scahill L, Tierney E, McCracken JT, et al. Cognitive Effects of Risperidone in Children with Autism and Irritable Behavior. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2008;18(3):227–36.
65. Izquierdo IA. *Memória*. Porto Alegre: ARTMED; 2002.
66. Squire LR. *KER. Memória: Da mente às moléculas*. Porto Alegre: ARTMED; 2003.
67. Izquierdo IA, Myskiw JDC, Benetti F, Furini CRG. *Memória: tipos e mecanismos – achados recentes*. *Rev USP*. 2014;0(98):9.
68. Martin JH. *NEUROANATOMIA - Texto e atlas*. 4a. Edição. Porto Alegre:

- ARTMED; 2013. Cap 16.
69. Isolan GR, Azambuja N, Neto EP, Paglioli E. Anatomina microcirurgica do hipocampo na amígdalo-hipocampectomia seletiva sob a perspectiva da técnica de Niemeyer e método pré-operatório para maximizar a corticotomia. *Arq Neuropsiquiatr.* 2007;65(4-A):1062–9.
  70. Salar S, Lapilover E, Müller J, Hollnagel J, Lippmann K, Friedman A, et al. Neurobiology of Disease Synaptic plasticity in area CA1 of rat hippocampal slices following intraventricular application of albumin. *Neurobiol Dis.* 2016;91:155–65.
  71. Colgin LL, Moser EI, Moser MB. Understanding memory through hippocampal remapping. *Trends Neurosci.* 2008;31(9):469–77.
  72. Cheung TH, Cardinal RN. Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neurosci [Internet].* 2005;6(1):36.
  73. Vianna MR, Izquierdo L a, Barros DM, Walz R, Medina JH, Izquierdo I. Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An Acad Bras Cienc.* 2000;72:353–64.
  74. Izquierdo, I.; Izquierdo, L.A.; Barros, D.M.; Mello e Souza, T.; De Souza, M.M.; Qquevedo, J.; Rodrigues, C.; Santa’anna, M.K.; Madruga, M.; Medina JH. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol.* 9:421-7.
  75. McGaugh JL, Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(6):208–10.
  76. Igarashi KM, Ito HT, Moser EI, Moser M. Functional diversity along the transverse axis of hippocampal area CA1. *FEBS Lett.* 2014;588(15):2470–6.
  77. Sallet J, Mars RB, Noonan MP, Neubert F-X, Jbabdi S, O’Reilly JX, et al. The Organization of Dorsal Frontal Cortex in Humans and Macaques. *J Neurosci [Internet].* 2013;33(30):12255–74.
  78. Klein JC, Rushworth MFS, Behrens TEJ, Mackay CE, de Crespigny AJ, D’Arceuil H, et al. Topography of connections between human prefrontal cortex and mediodorsal thalamus studied with diffusion tractography.

- Neuroimage [Internet]. 2010;51(2):555–64. Available from:
79. de Almeida RMM, Cabral JCC, Narvaes R. Behavioural, hormonal and neurobiological mechanisms of aggressive behaviour in human and nonhuman primates. *Physiol Behav* [Internet]. 2015;143:121–35.
  80. Funahashi S, Andreau JM. Prefrontal cortex and neural mechanisms of executive function. *J Physiol Paris* [Internet]. 2013;107(6):471–82.
  81. Urbain CM, Pang EW, Taylor MJ. Atypical spatiotemporal signatures of working memory brain processes in autism. *Transl Psychiatry*. 2015;5(8):1–9.
  82. Freeman RD. Developmental Profile and Diagnoses in children Presenting with Motor stereotypies. *Front Pediatr*. 2016;4(November):1–6.
  83. Péter Z, Oliphant ME, Fernandez T V. Motor Stereotypies : A Pathophysiological Review. *Front Neurosci*. 2017;11(March):1–6.
  84. Wink LK, Early M, Schaefer T, Pottenger A, Horn P, McDougale CJ, et al. Body mass index change in autism spectrum disorders: Comparison of treatment with risperidone and aripiprazole. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2014;24(2):78–82.
  85. Ghanizadeh A, Sahraeizadeh A, Berk M. A head-to-head comparison of aripiprazole and risperidone for safety and treating autistic disorders, a randomized double blind clinical trial. *Child Psychiatry Hum Dev*. 2013;45(2):185–92.
  86. Matera E, Margari L, Palmieri VO, Zagaria G, Palumbi R, Margari F. Risperidone and Cardiometabolic Risk in Children and Adolescents. *J Clin Psychopharmacol*. 2017;37(3):302–9.
  87. Singer A, Ravi R. Complementary and Alternative Treatments for Autism Part 2: Identifying and Avoiding Non-Evidence-Based Treatments. *AMA J Ethics*. 2015;17(4):375–80.
  88. Eftekhari A, Ahmadian E, Azarmi Y, Parvizpur A, Hamishehkar H, Eghbal MA. In vitro/vivo studies towards mechanisms of risperidone-induced oxidative stress and the protective role of coenzyme Q10 and N-acetylcysteine. *Toxicol Mech Methods*. 2016;26(7):520–8.
  89. Marchezan J, Winkler Dos Santos EGA, Deckmann I, Riesgo RDS. Immunological dysfunction in autism spectrum disorder: A potential target

- for therapy. *Neuroimmunomodulation*. 2019;25(5–6):300–19.
90. Kirsten TB, Queiroz-hazarbassanov N, Bernardi MM, Felicio LF. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. *Life Sci*. 2015;130:12–7.
  91. Fortunato JJ, da Rosa N, Martins Laurentino AO, Goulart M, Michalak C, Borges LP, et al. Effects of  $\omega$ -3 fatty acids on stereotypical behavior and social interactions in Wistar rats prenatally exposed to lipopolysaccharides. *Nutrition*. 2017;35:119–27.
  92. Dionisio A, Amodeoa, Joshua H. Jonesa, John A. Sweeneyb and MER. Risperidone and the 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, M100907 improve probabilistic reversal learning in BTBR T+ tf/J mice. 2013;71(2):233–6.
  93. Noto C, Ota VK, Gadelha A, Noto MN, Barbosa DS, Bonifacio KL, et al. Oxidative stress in drug nave first episode psychosis and antioxidant effects of risperidone. *J Psychiatr Res*. 2015;68:210–6.
  94. Stepanova E, Dowling S, Phelps M, Findling RL. Pharmacotherapy of emotional and behavioral symptoms associated with autism spectrum disorder in children and adolescents. *Dialogues Clin Neurosci*. 2017;19(4):395–402.
  95. Meguid NA, Dardir AA, Abdel-Raouf ER, Hashish A. Evaluation of oxidative stress in autism: Defective antioxidant enzymes and increased lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res*. 2011;143(1):58–65.
  96. Martins MR, Petronilho FC, Gomes KM, Dal-pizzol F. Antipsychotic-induced Oxidative Stress in Rat Brain. *Animals*. 2008;13(1):63–9.
  97. Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2005;84(3):214–21.
  98. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(1):80–9.
  99. Chen H, Uddin LQ, Zhang Y, Duan X, Chen H. Atypical effective connectivity of thalamo-cortical circuits in autism spectrum disorder. *Autism Res*. 2016;9(11):1183–90.
  100. Long Z, Duan X, Mantini D, Chen H. Alteration of functional connectivity in

- autism spectrum disorder: effect of age and anatomical distance. *Sci Rep*. 2016;6(1):1–8.
101. Held HE, Pilla R, Ciarlone GE, Landon CS, Dean JB. Female rats are more susceptible to central nervous system oxygen toxicity than male rats. *Physiol Rep*. 2014;2(4):e00282.
  102. Marcondes FK, Bianchi F., Tanno A. Determination of The Estrous Cycle Phases of Rats: Some Helpful Considerations. *Brazilian J Biol*. 2002;62(4):609–14.
  103. Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(4):240–51.
  104. Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *AJP Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2007;293(2):R581–9. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpregu.00262.2007>
  105. Holson JF, Memec MD, Stump DG, Kaufman IE, Lindstöm P VJ. Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. 2002;22:185-221.
  106. Gannon MA, Brown CJ, Stevens RM, Grif MS, Marczynski CA, Bardgett ME. Early-life risperidone administration alters maternal – offspring interactions and juvenile play fighting. *Pharmacol , Biochem Behav*. 2015;130:90–6.
  107. Battisti JJ, Shreffler CB, Uretsky NJ, Wallace LJ. NMDA antagonists block expression of sensitization of amphetamine- and apomorphine-induced stereotypy. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000;67(2):241–6.
  108. Peter Cook, Meredith Wallace GS. A Reinterpretation of Schedule-induced behaviors based on a systematic analysis of behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 1983;7:97–104.
  109. Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, et al. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Brazilian J Med Biol Res*. 2007;40(6):831–7.
  110. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186(C):421–31.

111. Levine BRL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz A, et al. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* 1990;186(1983):464–78.
112. Bannister JV, Bannister WH RG. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Crit Rev Biochem.* 1987;22:111–80.
113. H A. Catalase in vitro. *Metab Enzym.* 1984;105:121.
114. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL RR. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Anal Biochem.* 1994;217(2):220–30.
115. CONCEA. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos. 2013;1–50.
116. Kirsten TB, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. *Behav Brain Res [Internet].* 2017;331:25–9. Available from:
117. Nikvarz N, Alaghband-Rad J, Tehrani-Doost M, Alimadadi A, Ghaeli P. Comparing efficacy and side effects of memantine vs. risperidone in the treatment of autistic disorder. *Pharmacopsychiatry.* 2017;50(1):19–25.
118. Faure A, Nosjean A, Pittaras E, Duchêne A, Andrieux A, Gory-Fauré S, et al. Dissociated features of social cognition altered in mouse models of schizophrenia: Focus on social dominance and acoustic communication. *Neuropharmacology [Internet].* 2018.
119. Ratajczak P, Kus K, Jarmuszkiewicz Z, Woźniak A, Cichocki M, Nowakowska E. Influence of aripiprazole and olanzapine on behavioral dysfunctions of adolescent rats exposed to stress in perinatal period. *Pharmacol Reports.* 2013;65(1):30–43.
120. Hara Y, Ago Y, Taruta A, Hasebe S, Kawase H. Risperidone and aripiprazole alleviate prenatal valproic acid-induced abnormalities in behaviors and dendritic spine density in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2017;
121. Chadman KK. Fluoxetine but not risperidone increases sociability in the BTBR mouse model of autism. *Pharmacol Biochem Behav [Internet].* 2011;97(3):586–94. Available from:
122. Valerie J. Bolivar, Samantha R. Walters and JLP. Assessing Autism-like

- Behavior in Mice: Variations in Social Interactions Among Inbred Strains. *Behav Brain Res*. 2007;176(1):21–6.
123. Kim H-W, Park E-J, Kim J-H, Boon-Yasidhi V, Tarugsa J, Reyes A, et al. Aripiprazole for Irritability in Asian Children and Adolescents with Autistic Disorder: A 12-Week, Multinational, Multicenter, Prospective Open-Label Study. *J Child Adolesc Psychopharmacol [Internet]*. 2018;28(6):402–8.
124. Valicenti-mcdermott MR, Demb H. Clinical Effects and Adverse Reactions of Off-Label Use of Aripiprazole in Children and Adolescents with Developmental Disabilities. 2006;16(5):549–60.
125. Omizzolo C, Thompson DK, Scratch SE, Stargatt R, Lee KJ, Cheong J, et al. Hippocampal Volume and Memory and Learning Outcomes at 7 Years in Children Born Very Preterm. *J Int Neuropsychol Soc*. 2013;19(10):1065–75.
126. Boucher J, Mayes A, Bigham S. Memory in autistic spectrum disorder. *Psychol Bull*. 2012;138(3):458–96.
127. Kus K, Ratajczak P, Czaja N, Zaprutko T, Nowakowska E. Effect of combined administration of aripiprazole and fluoxetine on cognitive functions in female rats exposed to ethyl alcohol. *Acta Neurobiol Exp*. 2017;77:86–93.
128. Aman MG, Hollway JA, Leone S, Masty J, Lindsay R, Nash P, et al. Effects of risperidone on cognitive-motor performance and motor movements in chronically medicated children. *Res Dev Disabil*. 2009;30(2):386–96.
129. Riedel M, Spellmann I, Schennach-Wolff R, Musil R, Dehning S, Cerovecki A, et al. Effect of aripiprazole on cognition in the treatment of patients with schizophrenia. *Pharmacopsychiatry*. 2010;43(2):50–7.
130. Filozof C, Gonzalez C. Predictors of weight gain: the biological-behavioural debate. *Pima*. 2000;21–6.
131. Klausen BTSAA. Age and sex effects on energy expenditure. 1997;65:895–907.
132. Picada JN, Dos Santos BDJN, Celso F, Monteiro JD, Da Rosa KM, Camacho LR, et al. Neurobehavioral and genotoxic parameters of antipsychotic agent aripiprazole in mice. *Acta Pharmacol Sin [Internet]*. 2011;32(10):1225–32.



**ANEXO**

**ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**



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

Palhoça, 17 de agosto de 2017  
Registro na CEUA (código): 17.017.4.01.IV

Ao Pesquisador/Professor(a): Jucélia Fortunato

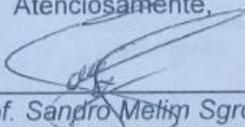
Prezado(a),

Vimos por meio deste, certificar que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Avaliação do efeito da risperidona e do aripiprazol sobre o comportamento tipo-autista e parâmetros oxidativos em ratos jovens", registrada com o nº 17.017.4.01.IV, sob a responsabilidade de Jucélia Fortunato - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) desta Instituição, em reunião de 13/09.

A CEUA/UNISUL tem por finalidade cumprir e fazer cumprir, no âmbito da UNISUL e nos limites de suas atribuições, os dispostos na legislação Federal aplicável à criação, manutenção 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 - Ético; II - Legal: enquadramento na legislação vigente.

Gostaríamos de salientar que, embora aprovado, qualquer alteração dos procedimentos e metodologias que houver durante a realização do projeto em questão, deverá ser informada imediatamente à Comissão.

Atenciosamente,

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Sandro Melqui Sgrott  
Coordenador da Comissão



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

Palhoça, 17 de agosto de 2017

### CERTIFICADO

Em consonância à Orientação Técnica nº 08, de 16 de março de 2016, do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), certificamos que a proposta de estudo e/ou projeto de pesquisa intitulada "Jucélia Fortunato", registrada com o no 17.017.4.01.IV, sob a responsabilidade de Avaliação do efeito da risperidona e do aripirazol sobre o comportamento tipo-autista e parâmetros oxidativos em ratos jovens - que envolve a manutenção ou utilização de modelos animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo CONCEA, e foi **aprovado** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), desta Instituição, em reunião de 13/09.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Setembro de 2017 a julho d 2018
Espécie/linhagem/raça	<u>Rattus norvegicus</u> , ratos Wister
No de animais	84
Peso/Idade	23-30 dias/80-300g
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Biotério Universidade Federal de Fanta Catarina

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Sandro Melim Sgrott  
Coordenador da Comissão

Campus Florianópolis - Unidade Pedra Branca - Avenida Pedra Branca, 25 - Cidade Universitária Pedra Branca - CEP 88137-270 - Palhoça - SC - Fone 55-48-3279-1036 - ceua@unisul.br