



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

LIDIANE PINTO BORGES

**DIMETIL FUMARATO EXERCE EFEITO NEUROPROTETOR CONTRA DANO
OXIDATIVO E COMPORTAMENTAL EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
AUTISMO INDUZIDO POR LPS NO DG9,5.**

TUBARÃO

2015

LIDIANE PINTO BORGES

**DIMETIL FUMARATO EXERCE EFEITO NEUROPROTETOR CONTRA DANO
OXIDATIVO E COMPORTAMENTAL EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
AUTISMO INDUZIDO POR LPS NO DG9,5.**

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

Orientador: Profa. Jucélia Jeremias Fortunato, Dra.

TUBARÃO
2015

Borges, Lidianne Pinto, 1985-
B73 Dimetil fumarato exerce efeito neuroprotetor contra dano
oxidativo em um modelo experimental de autismo / Lidianne
Pinto Borges; -- 2015.
65 f. il. color. ; 30 cm

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

1. Autismo. 2. Estresse oxidativo. 3. Sistema nervoso –
doenças. I. Fortunato, Jucélia Jeremias. II. Universidade
do Sul de Santa Catarina – Mestrado em Ciências da Saúde.
III. Título.

CDD (21. ed.) 616.8982

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul



UNISUL

UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

“Dimetil fumarato exerce efeito neuroprotetor contra dano oxidativo em um modelo experimental de autismo”.

LIDIANE PINTO BORGES

AUTORA

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 25 de setembro de 2015.

Doutora Jucélia Jeremias Fortunato (orientador)

Jucélia

Doutora Talita Tuon (avaliador externo – UNESC)

Talita Tuon

Doutora Gislaire Tezza Rezin (avaliador interno)

Gislaire Tezza Rezin

Prof. Dr. Jefferson Traebert

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

Dedico este trabalho as pessoas que inspiram a minha vida. Minha filha amada, meu amor e minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais Jorge e Agedira e meus irmãos Patricia, Edson e Clairton pela vida, pelo amor e por toda nossa trajetória em família.

Ao meu marido Gilnei grande amor da minha vida (especialmente agora com a chegada da nossa princesa Sophia). Por estar do meu lado, meu companheiro, atencioso, obrigado por me dizer que tudo ia dar certo. Sem você não seria possível.

A Prof^a. Dra. Jucélia Jeremias Fortunato, pela orientação durante todo o mestrado, pelo amparo no decorrer de toda a caminhada desde a iniciação científica, pelo carinho, pela amizade, enfim, por todo o apoio que tive durante a vida acadêmica.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL pelo apoio financeiro.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNISUL, pelos ensinamentos, dedicação e auxílio.

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

As colaboradoras da UNISUL, responsáveis pela secretaria do PPG-CS Silvana e Francieli, pelo profissionalismo, comprometimento e carinho.

Aos meus colegas de trabalho e parceiros de experimentos por toda a colaboração, dedicação e paciência, em especial a Diego Anacleto e Ana Olívia.

Aos meus colegas de turma que tornaram tão agradáveis os dois semestres que estivemos juntos. Alexandre, Rodrigo, Jaime, Drielly, Aline e em especial a Naiana amiga querida sempre me apoiando nos momentos difíceis.

Ao Núcleo de Autismo e Núcleo de Sepse por realizar a parte experimental e análises de dados bioquímicos.

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

A todos vocês...

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um conjunto de condições heterogêneas do desenvolvimento neurológico que se caracteriza por apresentar dificuldades em comunicação social e restrita, como também comportamentos repetitivos e sem interesses. Nos últimos anos a prevalência do TEA tem aumentado em todo o mundo, estima-se que haja 1 caso para cada 68 crianças nascidas. Existem hipóteses de que o TEA seja causado por alterações neuroimunes que possam estar relacionadas com as diferentes manifestações clínicas apresentadas por este transtorno. A proposta deste estudo é considerar a neuroinflamação como hipótese etiológica do TEA e a partir daí, sugerir uma terapia que envolva o bloqueio da liberação das citocinas pró-inflamatórias através do controle da infecção materna ou a diminuição da ativação da micróglia por meio do tratamento com Dimetil Fumarato (DMF). O estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes doses de DMF sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais de ratos Wistar submetidos à um modelo experimental de TEA. Os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais, de acordo com a exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo (LPS) e à dose administrada de DMF iniciou-se em (PND) 30, e seguiu por 14 dias consecutivos, administrado duas vezes ao dia, intraperitonealmente, nas doses de 5 e 15 mg/kg, conforme grupo experimental. Os resultados deste estudo sugerem que a ativação imune materna causou na prole alterações comportamentais e neuroquímicas condizentes com o TEA, e o tratamento com DMF proporcionou resultados positivos, tanto comportamentais como neuroquímicos.

Descritores: Autismo. Neuroinflamação. Dimetil Fumarato.

ABSTRACT

The Autism Spectrum Disorder (ASD) is a set of heterogeneous neurodevelopmental conditions characterized by presenting difficulties in social and restricted communication, as well as repetitive and without interest behaviors. In recent years, the prevalence of ASD has increased worldwide, it is estimated there is 1 case per 68 children born. There are chances that the ASD is caused by neuroimmune changes that might be related to the different clinical manifestations of this disorder. The purpose of this study is to consider the neuroinflammation as an etiological hypothesis of the ASD and from there, suggest a therapy that involves blocking the release of proinflammatory cytokines by controlling the maternal infection or decrease the activation of microglia by treating with Dimethyl Fumarate (DMF). The study aimed to evaluate the effects of different doses of DMF on biochemical and behavioral parameters of Wistar rats submitted to an experimental model of ASD. The animals were distributed in six experimental groups, according to prenatal exposure to lipopolysaccharide (LPS) and administered dose of DMF began in (PND) 30, and continued for 14 consecutive days, administered twice daily, intraperitoneally at doses of 5 and 15 mg/kg, according to experimental group. The results of this study suggest that maternal immune activation caused behavioral and neurochemical changes in the offspring consistent with the ASD, and treatment with DMF yielded positive results, both behavioral and neurochemical.

Key words: Autism. Neuroinflammation. Dimethyl Fumarate.

LISTAS

Lista de abreviaturas

ABA - Análise Comportamental Aplicada

AMA - Associação de Amigos Autistas

APA - Academia Americana de Pediatria

APAE - Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais

ARE - Elemento Responsivo Antioxidante

CAT - Catalase

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CHMP - Comitê da Agência dos Medicamentos para Uso Humano

DMF - Dimetil Fumarato

DNA - Ácido Desoxirribonucléico (Do Inglês Deoxyribonucleic acid)

DSM - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

EUA - Estados Unidos da América

FCEE - Fundação Catarinense de Educação

FMRI - Ressonância Magnética Funcional (Do Inglês Functional Magnetic resonance)

EROs - Espécie Reativas de Oxigênio

GA - Grupo Autista

GnA - Grupo não Autista

GD - Dia Gestacional

GPx - Glutathione Peroxidase

HO-1 - Heme Oxygenase – 1

IL- β 1 - Interleucina 1 beta

IL - 6 - Interleucina 6

Ip - Intraperitoneal

LPS - Lipopolissacarídeo

MCP -1 – Proteína Quimiotática de Monócitos 1 (Do Inglês Monocyte chemotactic protein-1)

MDA - Malondialdeído

NaCl - Cloreto de sódio

NO - Óxido Nítrico

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B (Do Inglês Nuclear factor kappa B)

Nrf2 - Fator Nuclear Derivado Eritróide – 2 (Do Inglês Nuclear Derived Factor Erythroid - 2)

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

PN - Pós-Natal

SOD - Superóxido Dismutase

SNC - Sistema Nervoso Central

SPSS - Statistical Package for the Sciences

TEA - Transtorno do Espectro Autista

TBA - Ácido Tiobarbitúrico (Do Inglês acid Thiobarbituric)

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

Th1 - Linfócitos Auxiliares T1 (Do Inglês Auxiliary lymphocytes T1)

Th2 - Linfócitos Auxiliares T2 (Do Inglês Auxiliary lymphocytes T2)

TIDs - Transtornos Invasivos do Desenvolvimento

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral (Do Inglês Tumor Necrosis Factor)

UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática de como a estimulação de mastócitos e micróglia poderia conduzir a vários efeitos que contribuem para a neuroinflamação, patogênese e sintomas do TEA.	20
Figura 2: Desenho experimental do acasalamento e diagnóstico de prenhes.	29
Figura 3: Desenho experimental da exposição pré-natal ao LPS e padronização da ninhada.	31
Figura 4: Desenho experimental do tratamento com DMF.	32
Figura 5: Imagens do teste de estereotipia.	33
Figura 6: Desenho experimental do teste de interação social.	34
Figura 7: Número de episódios de movimentos estereotipados (<i>grooming</i>) mensurados durante 5 min.	37

Figura 8: Número de episódios (A) e tempo (B) de movimentos estereotipados (grooming) mensurados durante 5 min e avaliados após tratamento com DMF (doses de 5 e 15 mg/kg) durante 14 dias consecutivos..	38
Figura 9: Parâmetros de Interação Social Recíproca mensurados durante 5 min em PND30.....	39
Figura 10: Parâmetros de Interação Social Recíproca realizados após o tratamento com Dimetil Fumarato nas doses de 5 e 15 mg/kg mensurados durante 5 min em PND45.....	40
Figura 11: Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no tecido nervoso de animais após tratamento com DMF, nas doses de 5 e 15mg/kg, durante 14 dias consecutivos..	41
Figura 12: Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido nervoso de animais após tratamento com DMF, nas doses de 5 e 15mg/kg, durante 14 dias consecutivos.....	42
Figura 13: Atividade da enzima antioxidante catalase no tecido nervoso de animais após tratamento com DMF, nas doses de 5 e 15mg/kg, durante 14 dias consecutivos.....	43
Figura 14: Atividade da enzima superóxido dismutase no tecido nervoso de animais após tratamento com DMF, nas doses de 5 e 15mg/kg, durante 14 dias consecutivos.....	44

Lista de tabelas

Tabela 1 - Níveis de gravidade para o Transtorno do Espectro Autista	16
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA.....	14
1.1.1 Fisiopatologia do transtorno do espectro autista	17
1.1.2 Micróglia e Transtorno do Espectro Autista	18
1.1.3 Neuroinflamação e Transtorno do Espectro Autista.....	20
1.1.4 Estresse oxidativo e TEA.....	21
1.1.5 Tratamento Farmacológico do TEA	24
1.2 DIMETIL FUMARATO.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. METODOLOGIA	28
3.1. TIPO DE ESTUDO.....	28
3.2. ASPECTOS ÉTICOS	28
3.3 ANIMAIS	28
3.4 ACASALAMENTO	28
3.5 EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO LPS	29
3.6 PADRONIZAÇÃO DA NINHADA	30
3.8 PROTOCOLOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS.....	32
3.8.1 Teste de Estereotipia	32
3.8.2 Teste de Interação Social	33
3.9 PROCEDIMENTO DE EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS.....	34
3.10 PROTOCOLOS DE ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	34
3.10.1 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil	34
3.10.2 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	35
3.10.3 Atividade da Catalase (CAT).....	35
3.10.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	36
3.10.5 Determinação de proteínas totais	36
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS	37

4.1.1 Teste de estereotipia.....	37
4.1.2 Teste de interação social.....	39
4.1.3 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil.....	40
4.1.4 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	41
4.1.5 Atividade da Catalase (CAT).....	42
4.1.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	43
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO	64
ANEXO A- PARECER APROVAÇÃO DO COMISSÃO DE ÉTICA.....	65

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um conjunto de condições heterogêneas do desenvolvimento neurológico o qual se caracteriza por apresentar dificuldades em comunicação social e restrita, como também comportamentos repetitivos e sem interesses¹. Estes sintomas estão presentes desde a infância até a idade adulta. Existem hipóteses de que o TEA seja causado por alterações neuroimunes que podem estar relacionadas com as diferentes manifestações clínicas apresentadas por este transtorno².

Nos últimos anos prevalência do TEA tem aumentado em todo o mundo. Nos Estados Unidos, a frequência de nascimentos em 1998 foi em média de 1/250 crianças, já no ano de 2007 essa prevalência aumentou para 1/150 crianças nascidas³. No entanto, este aumento pode estar relacionado, principalmente, pela observação precoce dos sintomas por parte dos profissionais de saúde, pais e professores^{4,5}.

A fisiopatologia do TEA permanece desconhecida até o momento, mas várias teorias neurobiológicas apontam alterações em sistemas encefálicos, incluindo córtex, sistema límbico, cerebelo, corpo caloso, núcleos da base e do tronco encefálico⁶. Além disso, alguns processos iniciais do desenvolvimento alterado do encéfalo podem ser relacionados com a fisiopatologia do TEA, como por exemplo, a migração neuronal^{7,8}, a redução da maturação sináptica^{9,10}, a redução da maturação dendrítica^{11,12} e o metabolismo anormal do transporte da serotonina¹³, sendo estes mais visíveis na infância do que na idade adulta¹².

A heterogeneidade do transtorno sugere uma gama de alternativas terapêuticas, muitas vezes, sem qualquer evidência científica. O tratamento farmacológico é mais focado em sintomas nucleares do TEA, tais como ansiedade, convulsões, hiperatividade, comportamento agressivo, auto-mutilação e estereotipia, e não são direcionados para os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na fisiopatologia desse transtorno, isto porque eles não estão totalmente esclarecidos¹⁴.

A proposta deste estudo é considerar a neuroinflamação como hipótese etiológica do TEA e desta forma, sugerir uma terapia que envolva o bloqueio da liberação das citocinas pró-inflamatórias através do controle da infecção materna ou

a diminuição da ativação da micróglia através do tratamento com Dimetil Fumarato (DMF).

O DMF possui um efeito neuroprotetor, imunomodulador e antiinflamatório, ou seja, reduz o estresse oxidativo, a inflamação no tecido nervoso e a ativação da micróglia, assim reduzindo a neurodestruição causada pela inflamação crônica, podendo desta forma, contribuir na melhoria do desenvolvimento e possivelmente atenuando os sintomas do TEA¹⁵.

Sendo assim, o estudo sobre o efeito neuroprotetor do DMF em um modelo pré-clínico a partir da administração pré-natal de lipopolissacarídeo (LPS), poderá auxiliar na tentativa de explicar questões referentes às alterações neuroquímicas e comportamentais observadas no TEA.

1.1 TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Em 1943, Leo Kanner apresentou 11 casos de um distúrbio, que o mesmo denominou como distúrbios autísticos do contato afetivo, sendo observadas características como os movimentos repetitivos e estereotipados, comportamentos obsessivos e algumas crianças com distúrbios de desenvolvimento da linguagem¹⁶. Ele pensou que a patologia era provavelmente rara e a mesma era confundida com debilidade mental ou esquizofrenia. Segundo Andanson e colaboradores¹⁷, Hans Asperger no ano de 1944 descreveu 4 casos de “psicopatia autista da infância”, resumindo como características desse transtorno mental, habilidades extraordinárias como gênios da matemática ou ciências naturais, com diferentes modos de pensar e com uma auto avaliação bem objetiva.

As teorias e conceitualizações sobre o autismo até a década de 1980 foram marcadas por uma visão em que o autismo era considerado como um distúrbio básico dos processos cognitivos e da linguagem, ignorando os sintomas sociais e afetivos que a síndrome apresentava¹⁶. Em 1987 o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-III-R) formulou critérios de diagnóstico com uma perspectiva de desenvolvimento, classificando assim o autismo como um Transtorno Invasivo de Desenvolvimento (TID)¹⁸. Na prática clínica o TID foi usado, até 2013, para diagnosticar indivíduos com déficit de interação social, déficit de linguagem e comunicação e padrões repetitivos de comportamento, já os critérios

DSM-IV para autismo tiveram um grau mais elevado de especificidade e sensibilidade para os grupos de diversas faixas etárias e entre indivíduos com habilidades cognitivas e linguagem distinta^{17,18}.

No entanto, a complexidade dos casos avaliados nem sempre foram suficientes para preencher os critérios para diagnóstico do TEA¹⁹. Por esse motivo, a Associação Americana de Psiquiatria discutiu novos critérios clínicos e a criação de uma nova categoria de diagnóstico para incluir o TEA. A associação propôs, em 2013, uma nova versão do DSM, que excluiu o Transtorno Desintegrativo da Infância e a Síndrome de Rett e criou uma categoria única – Transtorno do Espectro Autista – envolvendo as demais condições e em substituição aos TIDs^{20,21}.

Atualmente, o DSM-V²⁰ caracteriza o TEA por prejuízos persistentes na comunicação social recíproca e interação social, como também por padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e/ou atividades. Esses sintomas estão presentes desde a infância e limitam e/ou prejudicam a vida diária²⁰. Além dos déficits de comunicação e interação social, a criança deve apresentar uma concentração intensa durante um conjunto de interesses e/ou comportamentos estereotipados que incluem hiper ou hipo-reatividade a excitações sensoriais². Apesar disso, as manifestações do transtorno também variam muito dependendo da gravidade da condição autista, do nível de desenvolvimento e da idade cronológica; justificando o uso do termo *espectro*²⁰. A Tabela 1 apresenta os diferentes níveis de gravidade do TEA.

Tabela 1 - Níveis de gravidade para o Transtorno do Espectro Autista

Nível 3 “Exigindo apoio muito substancial”	Déficits graves nas habilidades de comunicação social verbal e não verbal causam prejuízos graves de funcionamento, grande limitação em dar início a interações sociais e respostas mínimas abertura sociais que parte de outros. Por exemplo, uma pessoa com fala inteligível de poucas palavras que raramente inicia as interações e, quando o faz, tem abordagens incomuns apenas para satisfazer a necessidades e reage somente a abordagens sociais muito diretas.	Inflexibilidade de comportamentos, extrema dificuldade em lidar com a mudança ou outros comportamentos restritivos/repetitivos interferem acentuadamente no funcionamento em todas as esferas. Grande sofrimento e/ou dificuldade para mudar o foco ou a ações.
Nível 2 “Exigindo apoio substancial”	Déficits graves nas habilidades de comunicação social verbal e não verbal; prejuízos sociais aparentes mesmo na presença de apoio; limitação em dar início a interações sociais e resposta reduzida ou anormal a aberturas sociais que partem de outros. Por exemplo, uma pessoa que fala frases simples, cuja a interação se limita a interesses especiais reduzidas e que apresenta comunicação não verbal acentuadamente estranha.	Inflexibilidade de comportamentos, dificuldade de lidar com a mudança ou outros comportamentos restritos/repetitivos aparecem com frequência suficientes para serem óbvios ao observador casual e interferem no funcionamento em uma variedade de contextos. Sofrimento e/ou dificuldade de mudar o foco ou a ações.
Nível 1 “Exigindo apoio”	Na ausência de apoio, déficits na comunicação social causam prejuízos notáveis. Dificuldade para iniciar interações sociais e exemplos claros de respostas atípicas ou sem sucesso a aberturas sociais dos outros. Pode aparecer apresentar interesse reduzido por interações sociais. Por exemplo, uma pessoa que consegue falar frases completas e envolver-se na comunicação, embora apresente falhas na conversação com os outros e cujas tentativas de fazer amizades são estranhas e comumente malsucedidas.	Inflexibilidade de comportamentos causa interferência significativa no funcionamento em um ou mais contextos. Dificuldade em trocar de atividade. Problemas para organização e planejamento são obstáculos à independência.

Fonte: American Psychiatric Association²⁰

Atualmente a prevalência do TEA tem aumentado em todo o mundo²², estima-se que haja 1 caso para cada 68 crianças⁵. Nos Estados Unidos (EUA), o

diagnóstico de TEA teve um aumento de 26,66% em 2007 quando comparado ao ano de 1998³ e, entre os anos de 2011 e 2012, esse número aumentou para 1 caso para cada 50 crianças entre 6-17 anos de idade^{4,5}. No Brasil, em 2011, um estudo demonstrou a presença de 27,2/10.000, ou seja, 0,3% de casos de TEA em crianças com idade entre 7 e 12 anos²³. Segundo a Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE), da Associação de Amigos Autistas (AMA) e da Fundação Catarinense de Educação Especial (FCEE), a prevalência de TEA na população do Estado de Santa Catarina é de 1,31 para cada 10.000 habitantes²⁴.

A mudança nos critérios diagnósticos não representam o principal fator envolvido no aumento da prevalência de TEA observado nos últimos anos. Segundo Cannel⁴ e Blumberg e colaboradores⁵, este aumento está relacionado, principalmente, pela melhor observação precoce dos sintomas do transtorno por parte dos profissionais de saúde, pais e professores.

1.1.1 Fisiopatologia do transtorno do espectro autista

Os sintomas do TEA, em alguns casos, podem ser identificados em crianças a partir dos 18 meses de idade, por isso, a Academia Americana de Pediatria (APA) sugere realizar o acompanhamento do desenvolvimento de todas as crianças até 24 meses de vida, pois é a partir deste período que os comportamentos mais característicos do TEA surgem. Estudos sobre a base neurológica do TEA antes dos três anos de idade são decisivos para o diagnóstico, pois é nessa fase que ocorrem os cuidados primários da infância e é nesse período que se pode melhorar os resultados do tratamento²⁵.

Em relação ao sexo, o TEA tem demonstrado que as pessoas do sexo masculino apresentam cerca de três a quatro vezes mais chances de serem afetados do que as pessoas do sexo feminino³. Uma das hipóteses para a menor prevalência no sexo feminino é devido ao hormônio estradiol agir como um neuroprotetor, pelo fato de reduzir a expressão de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, desta forma, atenuando os sintomas do TEA²⁶. Do mesmo modo, irmãos de crianças com TEA também apresentam maior chance de desenvolverem o transtorno, visto que a taxa de frequência é cerca de 2 a 8% dos casos^{27,28}.

As alterações morfológicas do TEA causam confusão para a compreensão de sua fisiopatologia²⁹. Um estudo realizado por Parellada e

colaboradores³¹, demonstrou perímetro cefálico aumentado em crianças autistas, especialmente no cerebelo. Evidências apontam, um aumento brusco do encéfalo a partir do primeiro ano de vida, incluindo alterações no córtex cerebral, amígdala e hipocampo³⁰. Essas anormalidades volumétricas e morfométricas podem estar relacionadas com as características principais do TEA³¹.

A causa do TEA até o momento continua indefinida, mas pode ser considerado um transtorno multifatorial que é influenciado pela genética, epigenética, fatores ambientais e/ou imunológicos³². Segundo Chauchan e colaboradores³³, há evidências sugerindo que o aumento na exposição ao estresse oxidativo juntamente com a disfunção mitocondrial possa contribuir com a etiologia multifatorial do TEA relacionada com a inflamação pelas alterações imunológicas. Benjamin e colaboradores³⁴, associam o TEA com fatores de risco pré-natal, como a idade avançada de ambos os pais, uso de substâncias psiquiátricas e doenças auto-imunes nos familiares ou condições imunes como a diabetes, doença celíaca, alergias e asma durante a gestação.

A ressonância magnética funcional (fMRI) tem sido utilizada para evidenciar alterações nos padrões de ativação e sincronização dos circuitos corticais³⁵. A técnica de fMRI utiliza o fluxo sanguíneo para quantificar a atividade neural. Estudo de Parellada e colaboradores³¹ apresentou conectividade funcional diminuída no que diz respeito à linguagem, memória, mecanismos de resolução de problemas e processamento social na atividade do encéfalo de crianças com TEA.

1.1.2 Micróglia e Transtorno do Espectro Autista

Nos últimos anos, as alterações na microestrutura celular que fundamentam anormalidades macroestruturais e funcionais no TEA estão começando a ser caracterizadas³⁶. Estudos neuropatológicos têm demonstrado aumento da densidade neuronal e presença de neurônios menores que o normal no hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e giro do cíngulo³⁷. Além disso, o aumento do volume microglial de paciente autistas³⁰ tem sido relacionada à disfunção sináptica⁵⁶ e desequilíbrio na neurotransmissão excitatória e inibitória durante períodos cruciais do desenvolvimento do sistema nervoso³⁹.

A micróglia é representada por um conjunto de células que possuem corpo celular pequeno e alongado com muitos prolongamentos curtos e altamente

ramificados, eles são equipados com receptores imunológicos clássicos e receptores neuronais, portanto podem ser sensíveis aos estímulos imunológicos e neuronais³⁹. Essas células vêm sendo reconhecidas como células de respostas rápidas a lesões e doenças, exercendo função em uma extensa série de processos, tais como a inflamação do tecido e liberação de fragmentos celulares⁴⁰. As ramificações da micróglia contribuem para a plasticidade estrutural através da eliminação de sinapses por mecanismo de fagocitose, que é necessário para a realização dos processos cognitivos normais³⁸.

Ativação da micróglia e alterações no número de neurônios são relatadas no TEA³⁰. A ativação da micróglia no TEA tem a possibilidade de refletir ou resultar de uma resposta anormal do funcionamento dos neurônios, seja por uma ação protetora, deletéria ou uma tentativa de corrigir o funcionamento anormal dos neurônios. Outra hipótese está relacionada a possíveis alterações no sistema imune inato ou barreira hemato-encefálica, ou ainda, anormalidades imunológicas genéticas, que assim produzem a ativação moderada da micróglia, sem ser uma resposta neurônio-dirigida³⁶, conforme a figura 1.

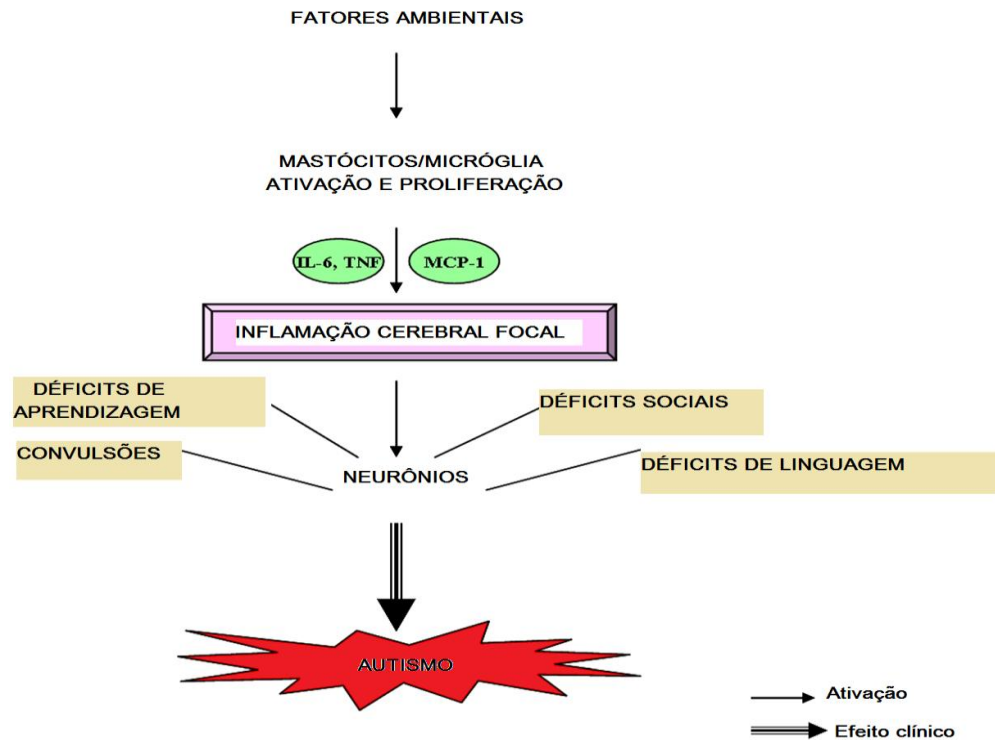


Figura 1: Representação esquemática de como a estimulação de mastócitos e micróglia poderia conduzir a vários efeitos que contribuem para a neuroinflamação, patogênese e sintomas do TEA.

Adaptado de Theoharides, Asadi, Patel⁴¹.

O processo de inflamação materna atravessa a placenta, entra na circulação fetal e penetra na barreira hemato-encefálica provocando o crescimento anormal e a alterações na plasticidade neuronal do feto, facilitando o desenvolvimento de ambientes inflamatórios crônicos que predisõem doenças neurológicas e psiquiátricas, sistêmicas e comorbidades ao longo da vida. Esse mecanismo pode ser responsável por muitos dos sintomas apresentados por autistas, como a hiper-sensibilidade aos estímulos do ambiente, fixação a objetos, comportamentos repetitivos e enterocolite crônica³⁷.

1.1.3 Neuroinflamação e Transtorno do Espectro Autista

A ativação da micróglia pode liberar um número aumentado de substâncias neurotóxicas, como as EROs, NO e as várias citocinas pró-inflamatórias, implicando na neuroinflamação e contribuindo assim para

fisiopatologia de doenças neurodegenerativas crônicas⁴². Os níveis de citocinas pró-inflamatórias e a ativação dos monócitos também foram associados aos comportamentos mais graves do TEA⁴³.

Os monócitos são os primeiros a responder durante a inflamação, promovendo a tempestade de citocinas, criando um ambiente que influencia profundamente na atividade das células do sistema imunológico vizinho. Os mesmos ainda são precursores de células de linhagem como os macrófagos^{44,45}.

Os macrófagos estão relacionados com o processo de neuroinflamação no SNC de pacientes autistas. Eles são fontes de citocinas que mantêm atividade imuno-inflamatórias⁴⁶. Além dos macrófagos foi encontrado em quantidade elevada no SNC dos autistas a citocina IL-1 β , IL-6, TNF- α e de EROs sendo utilizada como indicativo de neuroinflamação crônica⁴⁷.

Rodriguez e Kern⁴⁸ demonstram uma expressão elevada de TNF- α e IL-1 β no SNC dos fetos de fêmeas expostas ao LPS em período pré-natal. A resposta imunológica fetal para a infecção materna é a produção da “tempestade de citocinas”, através da ativação da micróglia e assim causando a neuroinflamação. A administração de LPS intraperitoneal induz um processo inflamatório sistêmico, que cria uma inflamação no SNC através de citocinas pró-inflamatórias e do estresse oxidativo, interferindo no desenvolvimento e crescimento neuronal. Animais submetidos à exposição pré-natal de LPS apresentam sintomas típicos do TEA, incluindo déficits de comunicação e de interação social prejudicada³⁷. A interferência no desenvolvimento do sistema nervoso no início do período gestacional (entre o nono e décimo dia gestacional) compromete o processo de organogênese, especificamente a formação da placa neuronal^{49,50} e representa um modelo experimental adequado para o estudo do TEA.

1.1.4 Estresse oxidativo e TEA

Sob condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante das células⁵¹. Quando este equilíbrio é afetado em favor a EROs, gera danos ao organismo, desta forma caracterizando o fenômeno "estresse oxidativo". Este estado leva a várias doenças neurológicas e psiquiátricas, incluindo depressão, ansiedade, esquizofrenia e TEA⁵².

Os EROs são considerados reações catabólicas provindas da destruição do oxigênio, entre eles podemos citar o superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico (NO) e os radicais hidroxilas⁵³. Em condições normais o próprio organismo se encarrega de neutralizar estas substâncias, através da capacidade antioxidante de células existentes no corpo, que possuem a função específica de remover ou inativar as EROs logo após a sua formação, bem como, reparar os danos causados por elas^{53,54}.

As enzimas como a glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são antioxidantes e atuam de forma integrada na defesa contra os agentes pró-oxidantes, protegendo o organismo da produção excessiva de radicais livres e EROs. Em processos patológicos, a relação entre os agentes pró-oxidantes e antioxidantes pode estar desequilibrada e, conseqüentemente, agir na disfunção e morte celular^{55,56}. Estas enzimas antioxidantes requerem de micronutrientes como co-fatores, tais como o ferro, zinco, cobre e manganês para exercer um mecanismo de defesa antioxidante eficaz⁵⁷.

A ceruloplasmina (proteína que transporta cobre) e a Transferrina (proteína que transporta ferro) são proteínas antioxidantes importantes e que são sintetizadas em vários tecidos, incluindo o encéfalo^{58,59,60}. A Ceruloplasmina inibe a peroxidação lipídica da membrana por meio de catalização de íons metálicos como ferro e cobre⁶¹, a mesma também atua como ferroxidase e superóxido dismutase, protegendo as membranas das células vermelhas do sangue a partir de radicais de oxigênio ativos⁶⁰. Já a transferrina atua como um antioxidante, por meio da redução da concentração de íons de ferro livre⁵⁹, os íons de ferro contribuem para o estresse oxidativo, catalisando a conversão de peróxido de hidrogênio para radicais de hidroxila que são altamente tóxicos pela reação de Fenton⁶². Os níveis dessas proteínas, são diminuídos em crianças com TEA, e existe uma correlação positiva entre os níveis reduzidos destas proteínas e a perda das competências lingüísticas adquiridas anteriormente em crianças autistas. As alterações nos níveis de ceruloplasmina e transferrina podem levar ao metabolismo anormal do ferro e do cobre no autismo⁶³.

Um dos sistemas mais vulneráveis ao estresse oxidativo é o sistema nervoso central (SNC)⁶³. A grande demanda de energia que o encéfalo, em especial, necessita torna-o responsável pelo consumo de 20% do oxigênio no organismo⁶⁴.

Além disso, o encéfalo possui uma menor concentração de enzimas antioxidantes^{52,65}.

As enzimas antioxidantes são necessárias nos primeiros momentos de desenvolvimento do sistema nervoso para a sobrevivência neuronal. Sabe-se que as crianças são mais vulneráveis que os adultos ao estresse oxidativo, por terem níveis baixos de antioxidantes desde sua concepção até a infância⁶⁶. O risco obtido por este déficit natural na capacidade antioxidante em lactantes é aumentada por fatores ambientais que levam ao estresse oxidativo e que são encontrados mais elevados em suas mães, acumulando-se na placenta⁶³.

No TEA, o estresse oxidativo está aumentado e os níveis das defesas antioxidantes estão diminuídas⁶⁷. Um estudo realizado por Chauhan e colaboradores⁶⁸, demonstrou que a peroxidação lipídica é elevada no plasma de indivíduos com TEA, quando comparados com seus irmãos com desenvolvimento típico, numa relação de 13 dos 15 (87%) indivíduos autistas⁶⁹. Dados semelhantes foram apresentados por Kaur e colaboradores⁷⁰, relatando aumento da peroxidação lipídica em cerebelo e córtex temporal de pessoas com autismo quando comparadas ao grupo controle. Além disso, o metabolismo energético anormal também tem sido descrito em estudos clínicos⁷¹ e pré-clínicos⁷² de TEA. Níveis elevados de hidroperóxidos lipídicos e diminuição dos níveis de complexo de transporte de elétrons mitocondrial em cerebelo e estruturas corticais de indivíduos autistas⁷¹.

Somados aos danos oxidativo e ao metabolismo energético anormal, estudos recentes têm demonstrado alterações nos níveis de atividades antioxidantes ao TEA. A glutathione peroxidase (GPx) está reduzida no plasma, da mesma forma que a diminuição da atividade da catalase e da SOD em eritrócitos e plasma de autistas^{73,74}.

Sabe-se que a resposta inflamatória materna estimula a ativação da micróglia⁷⁵. Quando esta ativação é anormal, provoca a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além de substâncias tóxicas ao encéfalo ainda em desenvolvimento, como as EROs, ocasionando a neurodestruição e, conseqüentemente, um processo inflamatório do SNC¹. Um estudo pré-clínico conduzido com fêmeas prenhes, expostas ao LPS no nono dia gestacional (DG), gerou uma prole com crescimento anormal do encéfalo, aumento do número de micróglias no córtex-anterior e aumento de EROs, além do desenvolvimento de comportamentos típicos do TEA⁷⁶. Esses dados reforçam a hipótese de que a

aproximação entre estresse oxidativo e processos inflamatórios no SNC possam estar envolvidos na fisiopatologia do TEA⁷⁰.

1.1.5 Tratamento Farmacológico do TEA

A grande maioria dos tratamentos utilizados para o TEA não são direcionados para os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na fisiopatologia desse transtorno, isto porque eles ainda não estão totalmente esclarecidos. Os tratamentos psicológicos são realizados sob medida para as necessidades de cada paciente autista, e incluem intervenções comportamentais, educação precoce e apoio para os familiares. Em crianças, são utilizados terapias comportamentais para ensinar o auto-cuidado e habilidades sociais, tais como a Análise Comportamental Aplicada (ABA) que ajuda a melhorar a função global dessas crianças na fase pré-escolar⁷⁷.

Nos EUA 50% das crianças com autismo são tratadas farmacologicamente, com terapias incluindo o uso de anticonvulsivantes, antidepressivos e antipsicóticos, no entanto, há baixa adesão dos pacientes ao medicamento, devido principalmente a demora da resposta terapêutica e aos efeitos colaterais que têm se mostrado um dos grandes problemas enfrentados pela terapia farmacológica³⁴. Em função deste problema e do espectro de apresentações do TEA, na prática clínica, a terapia farmacológica é mais focada nos sintomas comportamentais que interferem na vida cotidiana, tais como, ansiedade, convulsões, hiperatividade, comportamento agressivo, auto-mutilação e estereotipia¹⁴. As recentes mudanças nos critérios de diagnóstico afetaram, inclusive, as abordagens terapêuticas. Atualmente medicamentos como a acetilcolina e glutamato; tratamento com aminoácidos, medicamentos com base em quelantes, vitaminas e ômega-3 e os fármacos relacionados com a farmacogenética e o sistema imunológico estão sendo estudados e citados como uma proposta promissora para o tratamento do TEA⁷⁸. No entanto, a busca por alternativas farmacológicas e não farmacológicas para o tratamento do TEA, que sejam capazes de atrasar o início e a progressão dos sintomas e de suas complicações ainda é um desafio.

1.2 DIMETIL FUMARATO

O Dimetil Fumarato (DMF) é caracterizado por um cristal branco amplamente utilizado como anti-séptico e antimfo para alimentos, móveis e sapatos. Farmacologicamente, o DMF desempenha efeitos neuroprotetores e anti-inflamatórios no SNC¹⁵. Essa substância é comercializada como Tecfidera 120mg cápsulas gastrorresistentes (verde e branca, com a gravação 'BG-12 120 mg'), seu fabricante é o laboratório Biogen Idec Ltda da Dinamarca. Em 21 de março de 2013, o Comitê da Agência dos Medicamentos para Uso Humano (CHMP) emitiu parecer positivo recomendando a concessão de uma autorização de comercialização para o medicamento Tecfidera 120 mg e 240 mg para o tratamento da esclerose múltipla. Em janeiro de 2014, o CHMP autorizou a comercialização do Tecfidera 120mg para toda a União Européia sob o número de autorização EU/1/13/837/001 e EU/1/13/837/002, no Brasil o Tecfidera foi aprovado pela ANVISA em 06/04/2015^{79,80}.

Devido a sua propriedade anti-inflamatória e antioxidante, o DMF tem sido utilizado no tratamento de psoríase. Além disso, sua capacidade em induzir apoptose das células T e modificar a polaridade de Linfócitos Auxiliares T1 (Th1) para Linfócitos Auxiliares T2 (Th2), o fármaco é utilizado para o tratamento de esclerose múltipla e recentemente demonstrou em ensaios clínicos de fase III sua eficácia no tratamento da esclerose múltipla recidivante-remitente⁸¹.

A ação do DMF está na capacidade de ativação do fator nuclear Nrf2, uma proteína responsável por reconhecer especificamente xenobióticos e coordenar a transcrição genética. O Nrf2, quando ativado, aciona a transcrição de genes como heme-oxigenase (HO-1), superóxido dismutase e catalase, esses genes antioxidantes atuam na defesa do organismo contra agentes pró-oxidantes, desta forma protegendo o SNC da morte neuronal e de danos aos lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA)⁸². Além disso, o DMF também inibi translocação do fator nuclear kappa B (NF-kB) eliminando a sua transcrição. Esta proteína desempenha papel importante na resposta imunitária a infecção através da redução de citocinas pró-inflamatórias, redução de moléculas de adesão e indução de apoptose⁸³.

No TEA, há um aumento da transcrição de NF-kB no SNC e essa exacerbação de fator nuclear pode ser devido a uma resposta imunitária exagerada,

que ocasiona a neuroinflamação⁸². É possível que a concentração de NF-kB seria elevada principalmente pela ativação microglial e que essa elevação, em algumas regiões do encéfalo, estaria ligada aos sintomas comportamentais e clínicos do TEA⁸⁴.

Conceitualmente a neuroproteção é uma condição que resulta no salvamento, recuperação e/ou regeneração do SNC, suas células, estrutura e funções⁸⁵. Considerando que os efeitos neuroprotetores promovidos pelo DMF estão relacionados a ativação do Nrf2 é possível que a inibição de NF-kB através do tratamento com DMF possa diminuir o processo de neuroinflamação, reparar os danos oxidativo relacionados com a ativação da micróglia e, conseqüentemente, melhorar as manifestações comportamentais do TEA.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de diferentes doses de DMF sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais de ratos Wistar submetidos à um modelo experimental de TEA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do DMF, em diferentes doses, sobre as alterações comportamentais induzidas pelo modelo experimental de TEA.
- Avaliar a formação de danos oxidativos no córtex pré-frontal, cerebelo e hipocampo após tratamento crônico com DMF no modelo experimental TEA.
- Avaliar os efeitos do tratamento crônico com DMF na atividade de enzimas antioxidantes no córtex pré-frontal, cerebelo e hipocampo no modelo experimental de TEA.

3. METODOLOGIA

3.1. TIPO DE ESTUDO

É um estudo experimental utilizando modelo animal de TEA.

3.2. ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Sul de Santa Catarina – UNISUL com o número de protocolo 14.002.201.V.

3.3 ANIMAIS

Foram utilizadas 12 fêmeas de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas (60 dias), virgens, pesando entre 250 e 300g, provenientes do biotério da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, sendo acasaladas com 6 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), recebendo ração comercial padronizada para ratos de laboratório e água *ad libitum*.

3.4 ACASALAMENTO

Para o acasalamento, as fêmeas foram 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 espermatozóides junto ao material biológico do animal⁸⁶. Se verificada a presença de espermatozóides, considera-se dia gestacional zero (DG 0) daquela fêmea⁸⁷, conforme Figura 2. As fêmeas prenhes foram alocadas individualmente em sua gaiola moradia, ficando na mesma durante toda a gestação.

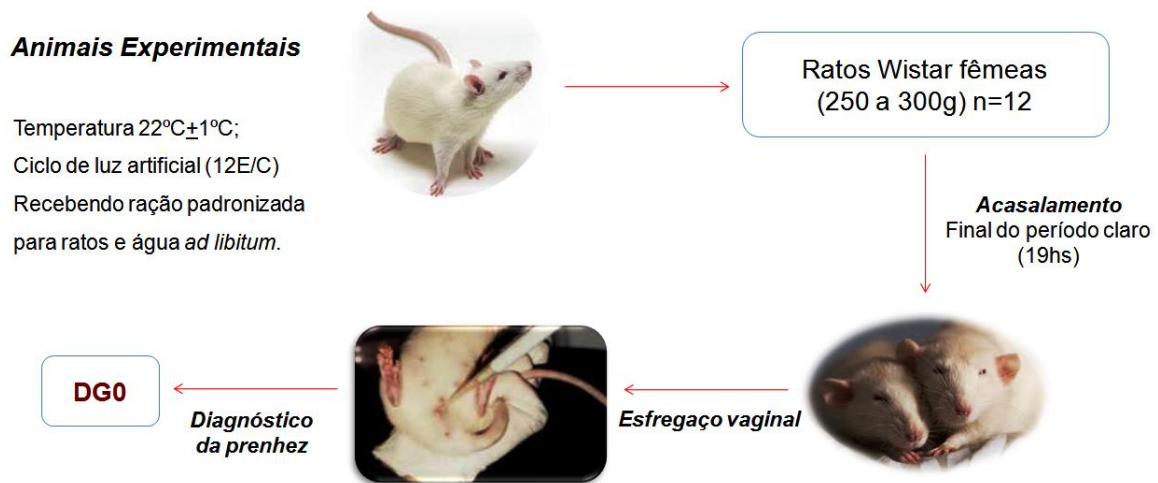


Figura 2: Desenho experimental do acasalamento e diagnóstico de prenhes.

3.5 EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO LPS

As fêmeas prenhes, agora consideradas matrizes, foram 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, obtido através da extração fenólica da *Escherichia coli*, sorotipo 0127: B8 (Sigma®), na dose de 100 µg/kg no dia gestacional 9,5 (nove dias mais doze horas)^{88,89} sempre no período vespertino (15h – 17h), diluída em 50 µg/mL de solução aquosa de NaCl 0,9% estéril. As matrizes do grupo Salina-tratadas receberam somente solução aquosa de NaCl 0,9% estéril no volume equivalente ao grupo LPS-tratadas. (Figura 3).

A pesquisa sobre o TEA vem ganhando mais atenção no mundo científico e existe vários estudos publicados sobre diferentes aspectos do TEA, principalmente sobre sua etiologia que ainda é desconhecida⁶¹. Desta forma necessita-se do uso de modelos animais para ajudar a expandir o conhecimento atual em torno da etiologia desse distúrbio. Devido a existir uma ampla variedade de sintomas e possíveis causas do TEA têm se como resultado uma ampla variedade de modelos animais deste transtorno⁹⁰

Na década de 1970, foi demonstrado pela primeira vez que a injeção de Lipopossacarídeo (LPS) em gatas prenhes causou inflamação sistêmica na substância branca do encéfalo de felinos⁹¹. A injeção intraperitoneal de LPS em

fêmeas prenhes resulta em várias lesões cerebrais, incluindo morte celular, atraso da mielinização, microgliose e também o aumento significativo de resposta de citocinas como: IL- β 1, IL-6 e TNF- α nos astrócitos e micróglia a partir de ratos machos, não sendo encontrado esse mesmo resultado em fêmeas^{26,91}.

A administração de LPS intraperitoneal induz um processo inflamatório sistêmico, que cria uma inflamação no SNC através de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas atravessam a barreira hemato-encefálica, desta forma entrando no encéfalo dos fetos e regulando o crescimento e desenvolvimento a nível neuronal, assim apresentando sintomas do tipo autístico incluindo déficits de comunicação, problemas de memória e déficits de interação social³⁷.

Kirsten e colaboradores⁵⁰, concluíram em seu estudo que a exposição pré-natal com LPS no dia gestacional (GD) 9,5 prejudica a comunicação dos filhotes em aprendizagem e memória e em ratos adultos induziu a comportamentos repetitivos e restritos. Além disso, as interações sociais na infância e na vida adulta foram afetadas em ratos machos.

3.6 PADRONIZAÇÃO DA NINHADA

Os partos aconteceram de forma natural e no dia pós-natal (PND) 1 e PND2 não ocorreu nenhuma manipulação para evitar a possibilidade de rejeição da mãe em relação a prole. Em PND3 foi realizada a sexagem. A distinção entre os gêneros foi atingida através da verificação da diferença visual relacionada a distância ano-genital, sendo maior em machos⁹². A prole composta pelas fêmeas de ambos os grupos foram encaminhadas para a morte indolor assistida e os machos foram mantidos com a mãe até PND21, quando foram desmamados, conforme Figura 3.

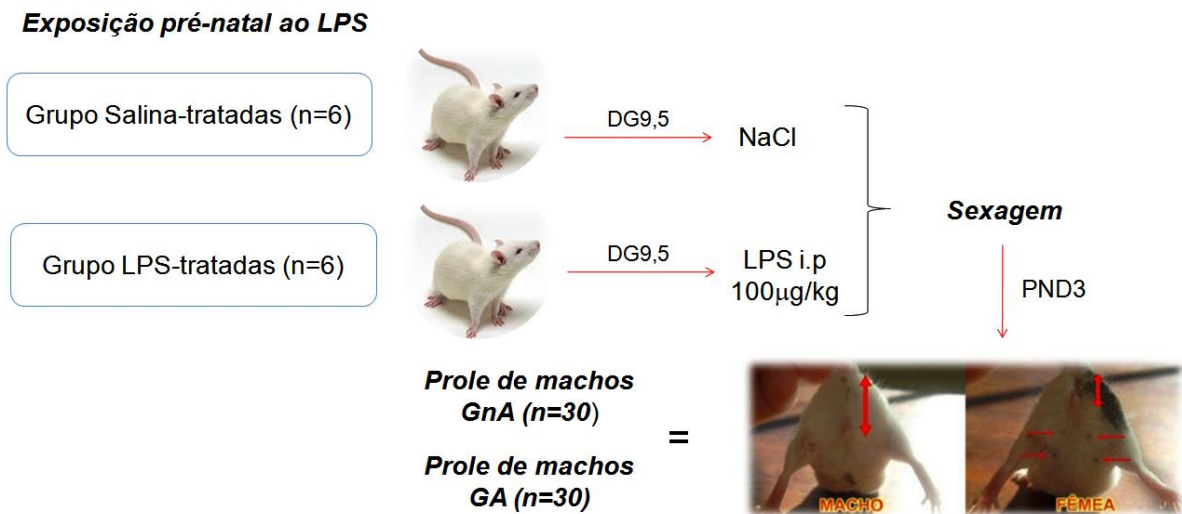


Figura 3: Desenho experimental da exposição pré-natal ao LPS e padronização da ninhada.

3.7 TRATAMENTO COM DMF

No PND30 foi realizada a confirmação do comportamento autista através dos testes comportamentais, e logo após os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais ($n= 10$ por grupo), de acordo com a exposição pré-natal ao LPS e à dose de administração de DMF, conforme apresentado na Figura 4. A seguir iniciou o tratamento com DMF ou solução salina por 14 dias consecutivos, administrado duas vezes ao dia, intraperitonealmente (i.p.), nas doses de 5 e 15 mg/kg, conforme grupo experimental. As doses e o período de tratamento seguiram as descrições de Milenković e colaboradores⁹³ e Schilling e colaboradores⁹⁴. Após 24hs a última administração de DMF no PND45 foi realizada novamente os testes comportamentais para verificar se o DMF reverteu os parâmetros comportamentais encontrados no modelo animal de TEA, em seguida os animais foram mortos e retirados as estruturas encefálicas para a realização das análises bioquímicas (Figura 4).

Tratamento com DMF

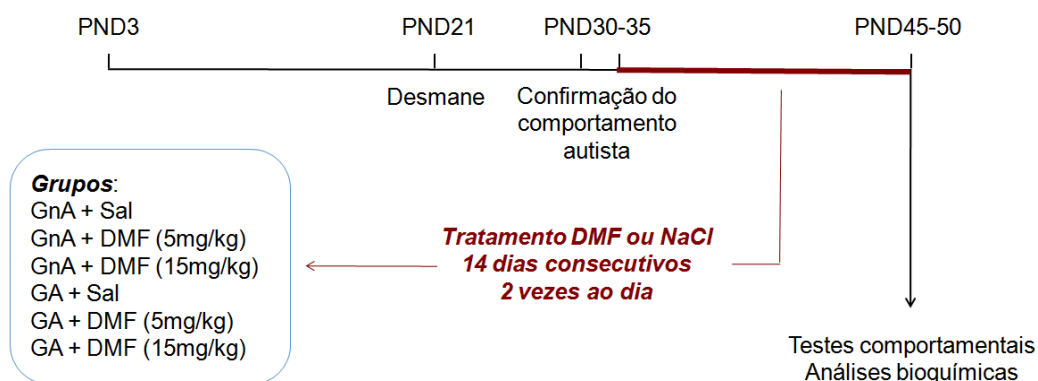


Figura 4: Desenho experimental do tratamento com DMF.

3.8 PROTOCOLOS DOS TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais foram realizados em PN30 e com o objetivo de validar o modelo experimental proposto e em PND45, com o objetivo de avaliar o efeito da substância no comportamento estereotipado e na interação social recíproca dos animais. Todos os testes foram conduzidos entre o período das 9:00 às 13:00 horas, em baixa iluminação e monitorados com câmera de vídeo. O pesquisador não permaneceu na sala de experimentação para evitar qualquer interferência na resposta comportamental dos animais. Antes de qualquer um dos procedimentos de avaliação comportamental os animais eram levados em suas gaiolas-moradia à sala de experimentação com 1 hora de antecedência – representando o período de habituação. Todos os equipamentos foram limpos com álcool 70% após o teste de cada animal, impedindo a permanência de odores.

3.8.1 Teste de Estereotipia

O teste de estereotipia seguiu as descrições de Battisti e colaboradores⁹⁵, sendo este definido pela permanência do animal em posição estacionária exibindo movimentos rápidos, repetidos da cabeça e membros dianteiros, essa é 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.

Normalmente 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^{6,96}. Usando sessões gravadas de vídeos, os investigadores analisam o tempo em segundos e o número de movimentos repetitivos de *grooming*, durante 5 min⁹⁷. Estes episódios prolongados parecem ser particularmente dependentes de contextos sociais, destacando semelhanças ao comportamento social prejudicado no TEA⁹⁶. (Figura 5).



Figura 5: Imagens do teste de estereotipia.

3.8.2 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 consistiu em uma caixa de madeira (60 x 60 x 30 cm) com 3 paredes laterais de madeira e uma parede de vidro transparente que permitisse a visualização do comportamento do animal.

A análise realizada no teste de interação social recíproca seguiu as descrições de Moreira e colaboradores⁹⁸ e compreendeu a quantificação do tempo de episódios de *grooming*, que representam movimentos de autolimpeza, tempos de cheirar, seguir, chutar, socar, montar ou permitir a monta do animal intruso, conforme Figura 6.

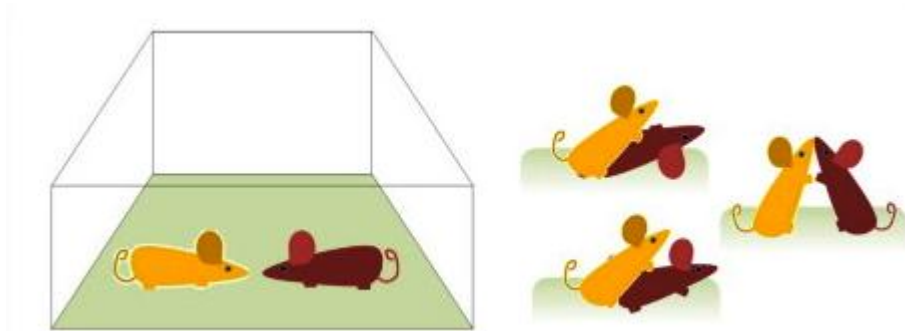


Figura 6: Desenho experimental do teste de interação social. Adaptado de Sungur, Vorckel, Uretsky, Wallace⁹⁶.

3.9 PROCEDIMENTO DE EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Imediatamente após os testes comportamentais realizados em PND45, os animais foram mortos, o encéfalo foi dissecado e as estruturas de interesse (córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo) foram isoladas e armazenadas a -80°C para as análises bioquímicas que seguem:

3.10 PROTOCOLOS DE ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.10.1 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil

O dano oxidativo as proteínas por carbonilação foi determinado de acordo com o método proposto por Levine e colaboradores⁹⁹. As amostras do tecido nervoso 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 forão 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 5000g 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 14.000 g. Após secagem das paredes dos tubos com o

auxílio de um bastonete de algodão, os precipitados foram dissolvidos em 600 µL 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 2 M. As absorbâncias máximas em 360 nm foram determinadas e os valores finais das proteínas carboniladas foram calculadas utilizando o coeficiente de extinção molar.

3.10.2 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio de TBARS para avaliação de peroxidação lipídica foi baseado no método de espectrofotométrico proposto por Ohkawa e colaboradores¹⁰⁰, onde o principal produto analisado é o malondialdeído (MDA).

Foram utilizados duas sequências de reações, preparadas em tubos de vidro: a sequência contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico 20% e 200 µL da amostra do plasma, e a segunda sequência B com 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,86% e 200 µL de amostra do plasma. Todos os tubos foram agitados por cerca de 30 minutos no vórtex e logo em seguida, colocados em banho maria a 100°C por 20 minutos. a seguir os tubos foram transferidos para um banho de gelo por mais 20 minutos. Após estes banhos as amostras foram agitadas novamente no vórtex e transferidas para microtubos, os quais foram centrifugados a 14000rpm/10min a 22°C. O sobrenadante foi transferido para cubetas de vidro e absorvância medida no espectrofotométrico em 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol MDA/mL.

3.10.3 Atividade da Catalase (CAT)

O princípio deste método baseia-se no decaimento da absorvância ocasionado pela redução de H₂O₂ a água, pela CAT presente na amostra, medido espectrofotometricamente a 240 nm, durante tempo pre determinado¹⁰¹. Para esse ensaio, foi utilizada a solução de peróxido de hidrogênio (10 mM) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) preparada e titulada no dia da análise.

Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 2 mL da solução de H₂O₂ e 20 µL de amostra. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do H₂O₂ foi medida durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata, e os

valores foram expressos em mmol de H_2O_2 consumido por minuto e por grama ($\text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

3.10.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente em 480 nm¹⁰² mediante a oxidação da epinefrina (mudança de pH 2,0 para pH 10,0) que gera o ânion superóxido e um cromóforo róseo, o adrenocromo, cuja formação foi retardada pela enzima presente na amostra. Em uma cubeta contendo 1,95 mL de glicina 50 mM, pH 10,0 foram adicionados 50 μL de epinefrina 60 mM (mantida em gelo, frasco âmbar e pH em torno de 2,0 para evitar a oxidação).

A velocidade de formação do adrenocromo foi acompanhada durante cerca de 90 segundos antes do início da reação, para então ser adicionada a alíquota da amostra (em torno de 20 a 70 μL , dependendo da concentração e atividade da enzima presente na amostra). O tempo total de monitoramento da reação foi de 3 minutos. Curvas de 4 a 7 pontos permitiram avaliar indiretamente a atividade enzimática da SOD em tais condições.

Os valores da SOD foram expressos em U SOD g^{-1} , ou seja, em termos de atividade da enzima, onde uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir à metade a velocidade espontânea de formação do adrenocromo.

3.10.5 Determinação de proteínas totais

Todas as mensurações bioquímicas foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas com albumina bovina como padrão¹⁰³, sendo expressas em mg/ml.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do programa estatístico *Statistical Package for the Sciences* (SPSS) versão 20.0. Os dados foram avaliados pela análise de variância de uma via, seguido pelo *post hoc* de Tukey e os parâmetros comportamentais foram avaliados entre si pelo teste de T student. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.1.1 Teste de estereotipia

O aumento do número de episódios de *grooming* em roedores se assemelha e está associado com o comportamento repetitivo apresentado por indivíduos com TEA^{104,6}. Quando avaliados em PND30, a prole de ratos machos expostos ao LPS em período pré-natal apresentou um número significativamente maior de episódios de *grooming* [(F = 11,426; P= 0,001)] quando comparado aos machos do grupo controle (Figura 7). Estes resultados sugerem que a ativação imune materna foi capaz de induzir comportamento autista, pelo menos para este parâmetro.

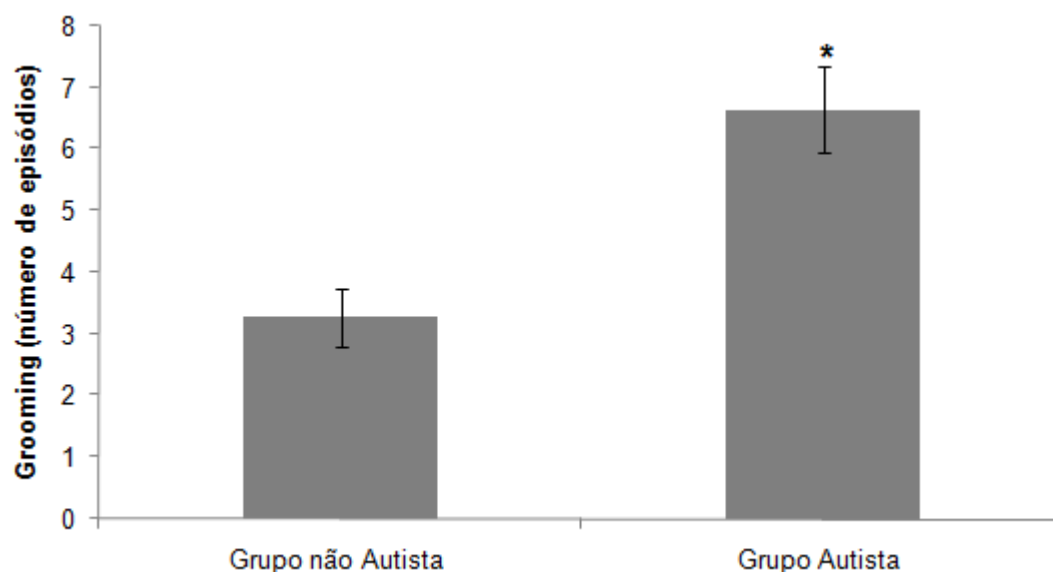


Figura 7: Número de episódios de movimentos estereotipados (*grooming*) mensurados durante 5 min. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, n= 10 para cada grupo. *Diferença significativa entre o Grupo não Autista (GnA) e Grupo Autista (GA). $P < 0,05$ (Teste T. Student).

Para avaliação do efeito do tratamento crônico com DMF neste mesmo parâmetro, os animais foram avaliados em PND45. Os resultados apresentados na

Figura 8 mostraram que o DMF na dose de 5mg/kg foi capaz de diminuir significativamente o número de episódios de *grooming* quando comparados os grupo expostos ao LPS em período pré-natal e que receberam solução salina [(F = 8,635; P= 0,012)] (Figura 8A) e, da mesma forma, quando comparado com seu respectivo controle (Sal x DMF 5 mg/kg), ou seja, animais que receberam solução salina em período pré-natal e tratamento com DMF na mesma dose [(F = 8,054; P= 0,016)]. Na comparação entre as doses administradas, os resultados mostraram que a dose de 5 mg/kg indicou uma melhor eficácia para este parâmetro avaliado [(F = 5,748; P= 0,031)].

Na avaliação do tempo de *grooming*, os resultados não mostraram diferença significativa em nenhuma das comparações (Figura 8B).

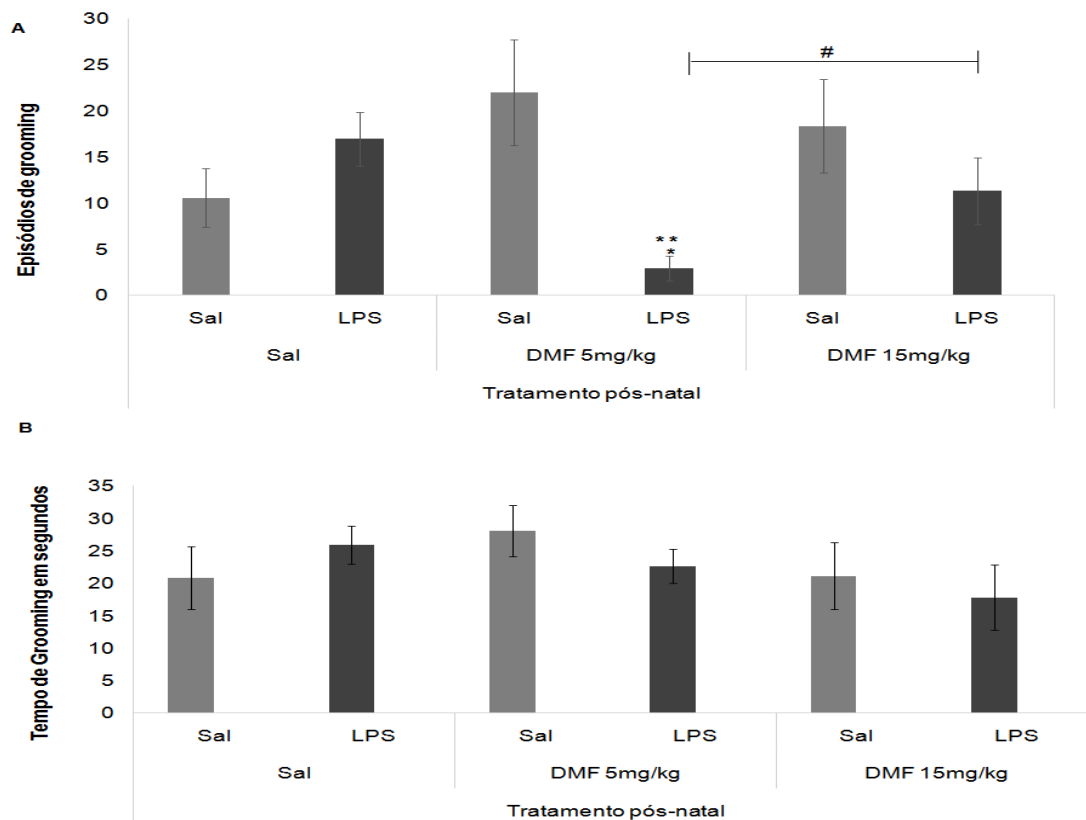


Figura 8: Número de episódios (A) e tempo (B) de movimentos estereotipados (*grooming*) mensurados durante 5 min e avaliados após tratamento com DMF (doses de 5 e 15 mg/kg) durante 14 dias consecutivos. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, n= 10 para cada grupo. *Diferença significativa entre o Sal x 5 mg/kg e LPS x 5 mg/kg. P< 0,05. **Diferença significativa entre o LPS x Sal e LPS x 5 mg/kg. P< 0,05. #Diferença significativa entre o LPS x 5 mg/kg e LPS x 15 mg/kg. P< 0,05 (Teste T. Student).

4.1.2 Teste de interação social

A deficiência na interação social e comunicação é um dos sintomas mais relevantes do TEA^{105,106}. No teste de interação social recíproca com a participação de um animal intruso, realizado em PND30, os resultados mostraram que a exposição pré-natal ao LPS provocou diminuição significativa [(F= 4,593; P= 0,036)] no parâmetro “permitir a monta” quando comparados os grupos experimental e controle (Figura 9).

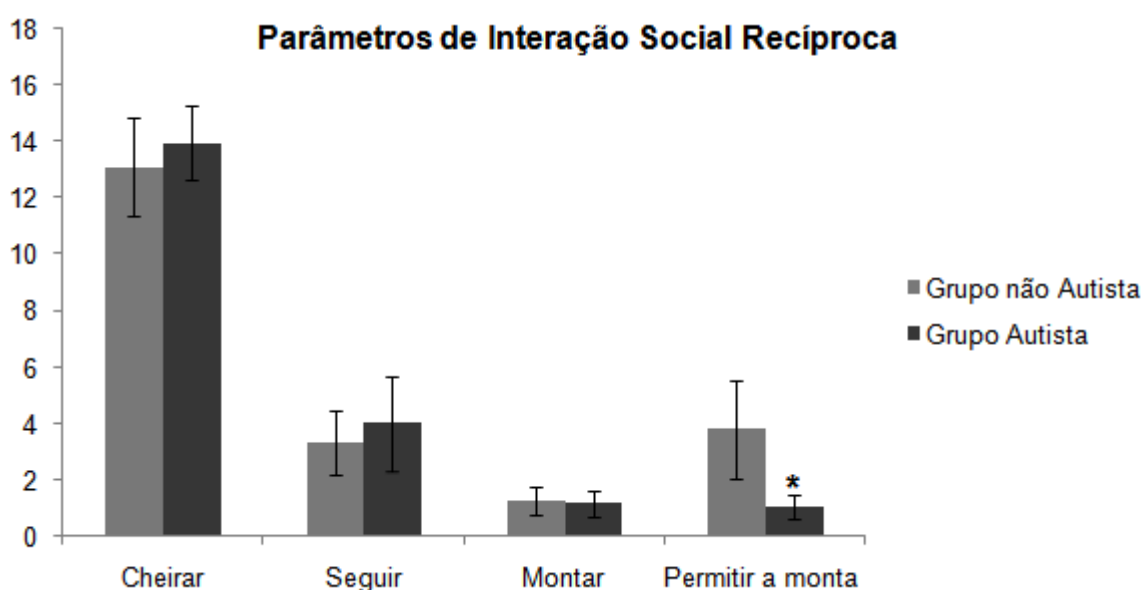


Figura 9: Parâmetros de Interação Social Recíproca mensurados durante 5 min em PND30. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, n= 10 para cada grupo. *Diferença significativa entre o GnA e GA. P< 0,05 (Teste T. Student).

Os mesmos parâmetros foram avaliados após o tratamento com DMF. Os resultados mostraram que em PND45 os animais tiveram menor interação social recíproca do que em PND30 [comparação entre os grupos Sal x Sal e LPS x Sal, (F= 6,177; P= 0,029)] e que o DMF foi eficaz no parâmetro “seguir”, em ambas as doses administradas [(F= 9,508; P= 0,007); (F= 13,091; P= 0,002) respectivamente], sugerindo uma melhora do comportamento autista, pelo menos para este parâmetro de referência (Figura 10).

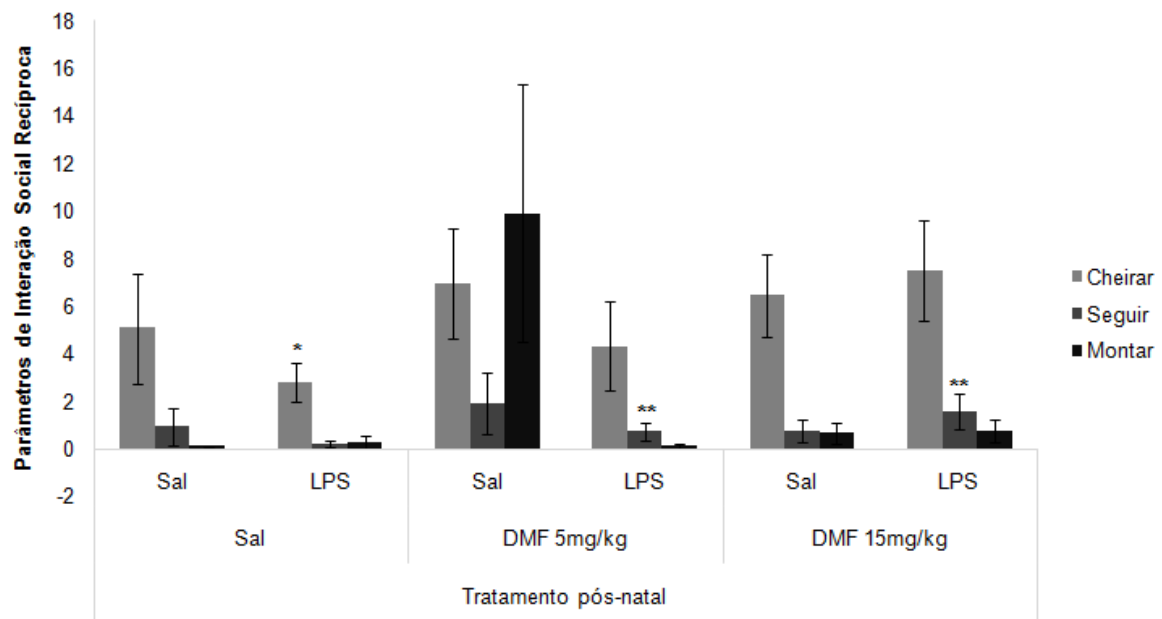


Figura 10: Parâmetros de Interação Social Recíproca realizados após o tratamento com Dimetil Fumarato nas doses de 5 e 15 mg/kg mensurados durante 5 min em PND45. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão, $n=10$ para cada grupo. *Diferença significativa entre o Sal x Sal e LPS x Sal. $P < 0,05$. **Diferença significativa entre o LPS x Sal e LPS x 5 mg/kg e LPS x Sal e LPS x 15 mg/kg. $P < 0,05$ (Teste T. Student).

4.1.3 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil

O dano oxidativo em proteínas do grupamento carbonil foi significativamente maior em cerebelo [($P=0,006$)], córtex pré-frontal [($P=0,009$)] e hipocampo [($P=0,033$)] de ratos jovens expostos ao LPS em período pré-natal quando comparados aos animais que receberam apenas solução salina no mesmo período (Figura 11), sugerindo que a exposição pré-natal ao LPS foi capaz de induzir dano oxidativo as proteínas do grupo carbonil. No entanto, o tratamento crônico com DMF não foi capaz de alterar nenhuma resposta deste parâmetro de estresse oxidativo.

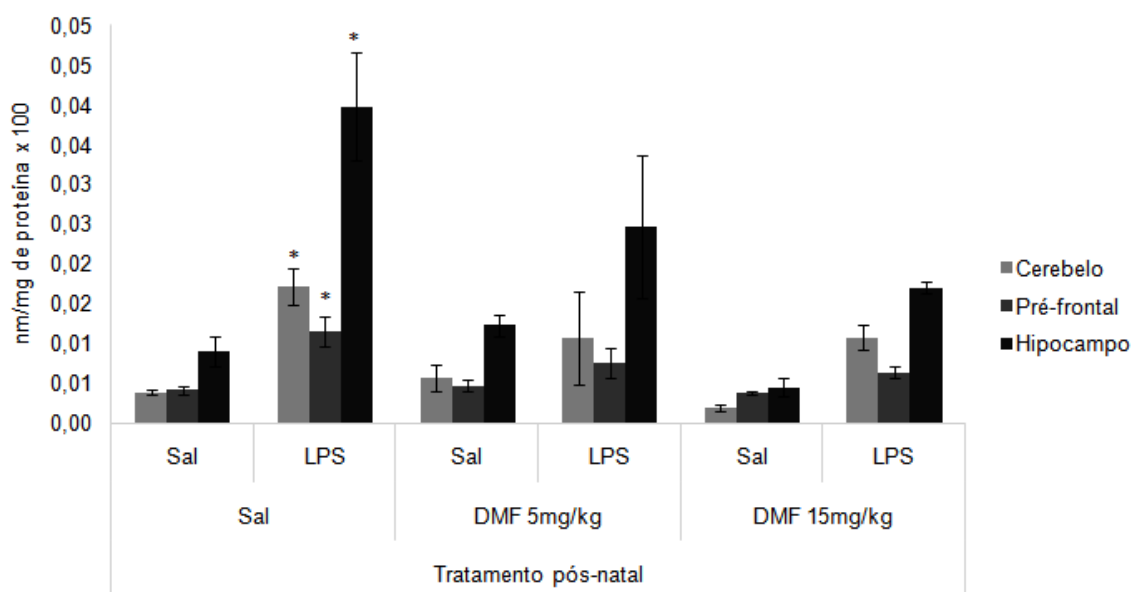


Figura 11: Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil no tecido nervoso de animais após tratamento com DMF, nas doses de 5 e 15mg/kg, durante 14 dias consecutivos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n= 05$ para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo LPS x Sal e Sal x Sal. $P < 0,05$ (Teste ANOVA + *post hoc* de Tukey).

4.1.4 Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A Figura 12 mostra aumento significativo na medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no cerebelo [($P= 0, 012$)] e hipocampo [($P= 0, 047$)] do ratos do grupo LPS x Sal quando comparados ao grupo Sal x Sal. Após o tratamento com DMF foi demonstrado uma diminuição significativa nos níveis de TBARS no hipocampo [($P= 0, 014$)] dos animais do grupo LPS x DMF 15 mg/kg quando comparados com o grupo LPS x Sal. No entanto, o cerebelo [($P= 0,049$)] e o hipocampo [($P= 0, 036$)] dos animais expostos ao LPS em período pré-natal tiveram valores aumentados de TBARS após tratamento com DMF na dose de 5mg/kg quando comparados aos animais que receberam solução salina e o mesmo tratamento em PND30-44.

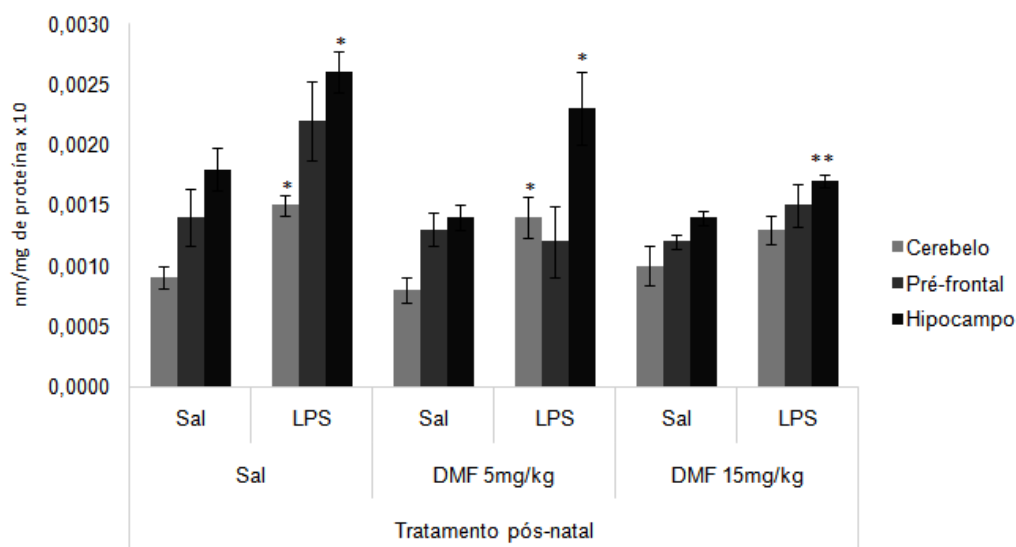


Figura 12: Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido nervoso de animais após tratamento com DMF, nas doses de 5 e 15mg/kg, durante 14 dias consecutivos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n = 05$ para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo LPS x Sal e Sal x Sal e LPS x 5 mg/kg e Sal x 5 mg/kg. $P < 0,05$. **Diferença significativa entre o grupo LPS x Sal e LPS x 15 mg/kg. $P < 0,05$ (Teste ANOVA + *post hoc* de Tukey).

4.1.5 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi significativamente menor em cerebelo [($P = 0,007$)] e hipocampo [($P = 0,005$)] de ratos jovens expostos ao LPS em período pré-natal (Figura 13), indicando que a exposição pré-natal ao LPS diminui a atividade da enzima antioxidante catalase e este parâmetro se assemelha ao perfil fisiopatológico encontrado no TEA. Em relação ao tratamento crônico com DMF não foi demonstrada reverção desta condição em nenhuma das doses.

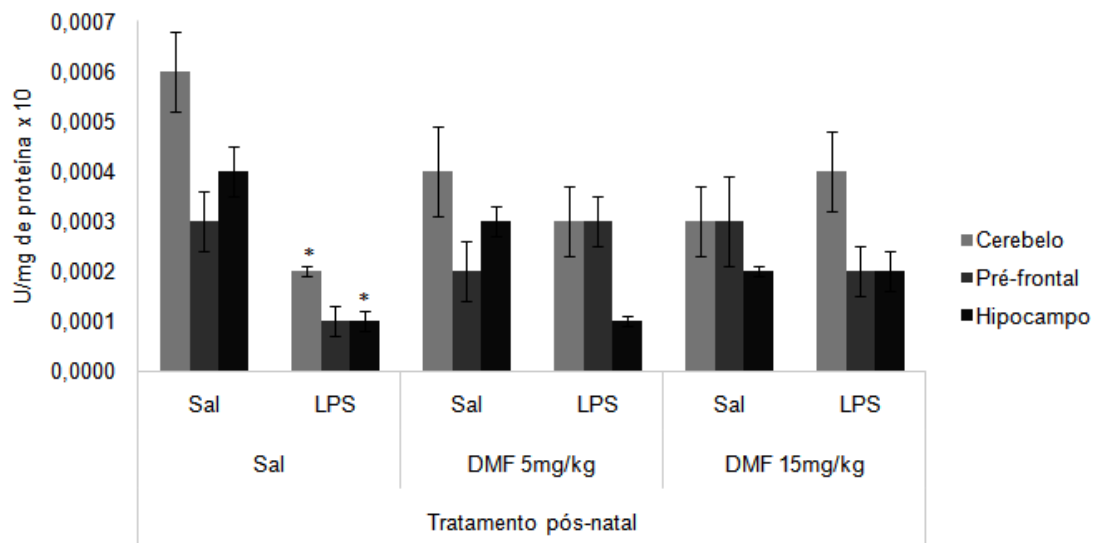


Figura 13: Atividade da enzima antioxidante catalase no tecido nervoso de animais após tratamento com DMF, nas doses de 5 e 15mg/kg, durante 14 dias consecutivos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n = 05$ para cada grupo. *Diferença significativa entre o grupo LPS x Sal e Sal x Sal. $P < 0,05$ (Teste ANOVA + *post hoc* de Tukey).

4.1.6 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A exposição pré-natal ao LPS foi capaz de diminuir significativamente a atividade da SOD no cerebelo [($P = 0,003$)] e hipocampo [($P = 0,004$)] e essa condição foi revertida pelo tratamento crônico com DMF na dose de 15 mg/kg [($P = 0,026$)] (Figura 14).

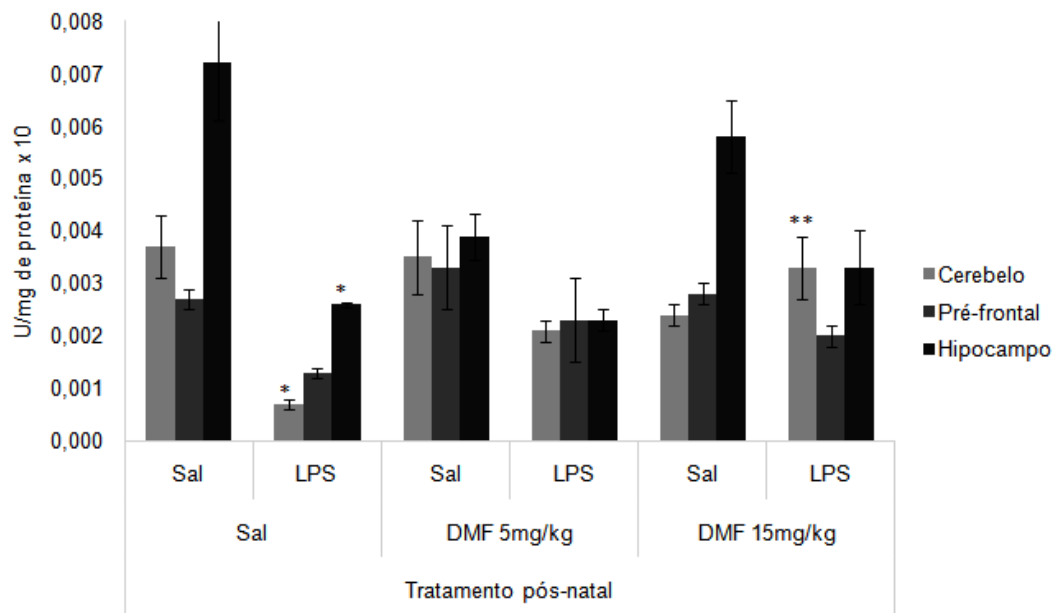


Figura 14: Atividade da enzima superóxido dismutase no tecido nervoso de animais após tratamento com DMF, nas doses de 5 e 15mg/kg, durante 14 dias consecutivos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, $n = 05$ para cada grupo.

*Diferença significativa entre o grupo LPS x Sal e Sal x Sal. $P < 0,05$. **Diferença significativa entre o grupo LPS x Sal e LPS x 15 mg/kg. $P < 0,05$ (Teste ANOVA + *post hoc* de Tukey).

5 DISCUSSÃO

As pesquisas sobre o TEA vêm ganhando mais atenção no mundo científico nos últimos anos, especialmente pela busca por fatores que confirmem sua etiologia⁴³. Em função da ampla variedade de sintomas e indisponibilidade de marcadores específicos, têm-se como resultado, a falta de tratamentos eficazes para esse transtorno^{107,108}.

A indução do modelo animal de TEA a partir da administração de LPS no DG9,5, tem sido apresentado como um modelo pré-clínico válido e que mimetiza as alterações comportamentais mais comuns e utilizadas como critério diagnóstico para o TEA^{89,49}. A exposição pré-natal de LPS prejudica a organogênese encefálica, especificamente durante a formação da placa neuronal, ocasionando modificações na proliferação das células nervosas, alterações no processo de diferenciação e migração celular e na maturação das sinapses⁵⁰. Além disso, a ativação imune materna por LPS mimetiza uma infecção bacteriana capaz de ativar o sistema imunitário e liberar citocinas pró-inflamatórias induzindo mudanças de curto e a longo prazo no comportamento e atividade neuronal¹⁰⁸.

O aumento do número de comportamentos estereotipados e prejuízo na interação social em animais com PND30 expostos ao LPS em período pré-natal, mostrados neste estudo, foram semelhantes aos resultados de Specer e colaboradores⁸⁹ e replicados por Kirsten e colaboradores⁴⁹. A ativação imune materna por LPS induz a ativação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, que neste caso, agem como mediadores essenciais na inflamação do SNC e trazem como consequência alterações comportamentais na prole, incluindo diminuição da exploração ambiental e social, prejuízo na memória e alterações na atividade motora^{109,110}. A ação do LPS no SNC inicia com a ligação a uma glicoproteína do hospedeiro que gera, por sua vez, uma reação em cascata, fazendo ativação do macrófago e da micróglia e estimulando a produção e expressão de genes responsáveis pela síntese de fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), que estão ligadas diretamente ao processo inflamatório¹¹¹.

A idade dos animais, quando avaliados em PND45, não interferiu de forma significativa nas respostas comportamentais nos testes de estereotipia e interação social recíproca. O desenvolvimento do sistema nervoso é um processo que se inicia com o nascimento das células progenitoras, diferenciação e migração

para os seus locais finais, os axônios e ramos dendríticos formam importantes conexões sinápticas que preparam codificações de informações para o resto da vida^{112,113}. No encéfalo de mamíferos, os receptores e as sinapses na maioria das regiões encefálicas são produzidos e eliminados em até 50% durante duas fases da vida: períodos antes do nascimento e durante as transições de infância, adolescência, até a idade adulta¹¹⁴.

Este processo resulta em estágios críticos e sensíveis durante o desenvolvimento do sistema nervoso, pois o encéfalo imaturo está acessível para possíveis períodos de vulnerabilidade, correspondendo a necessidades do ambiente e desta forma se postula, que exposições a elementos positivos ou negativos antes da adolescência podem intervir na idade adulta¹¹⁴. Os animais com idade PND45 são considerados ratos jovens, ou seja, pré-adolescentes e desta forma, não apresentaram interferências significativas em seu desenvolvimento encefálico que pudessem interferir de forma positiva ou negativa nos parâmetros comportamentais.

O espectro de apresentações sugere uma heterogeneidade neurobiológica para o TEA e os diversos mecanismos associados parecem ser responsáveis pelo aumento da suscetibilidade destes pacientes para certas doenças. Considerando que as evidências sugerem ativação da micróglia e consequente resposta neuroinflamatória como hipótese etiológica para o desenvolvimento do TEA¹¹⁵, o objetivo deste estudo foi propor que a ativação (ou restauração) do Nrf2, a partir do tratamento com diferentes doses de DMF, pudesse contribuir para a melhora das manifestações clínicas desta síndrome.

Recentemente o DMF foi aprovado para o tratamento de esclerose múltipla por demonstrar múltiplos efeitos imunomoduladores e neuroprotetores, incluindo a modulação do fenótipo microglial¹¹⁶, por meio da redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da redução da produção de EROs através da ativação da via Nrf2^{94,117,118,120}.

Os resultados encontrados neste estudo mostraram que o tratamento crônico com DMF, especialmente na dose de 5mg/kg, foi capaz de reverter parâmetros comportamentais de estereotipia e interação social recíproca provocados pela exposição pré-natal de LPS. Em um estudo realizado por Ellrichmann e colaboradores¹²⁰, a partir de um modelo pré-clínico de doença de Huntington, o tratamento com DMF apresentou melhora nas funções

comportamentais comprometidas nesta doença. Esses resultados somados aos encontrados neste estudo, sugerem que os efeitos neuroprotetores de DMF possam ser mediados a partir da ativação de uma cascata dependente de Nrf2 à jusante de vias citoprotetoras e antioxidantes¹²¹, visto que ambas as doenças mencionadas tem participação de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial associado às suas fisiopatologias.

O papel do estresse oxidativo no TEA não está completamente esclarecido, no entanto, um número crescente de publicação vêm considerando-o como um fator importante na etiologia da doença^{122,123,71,33,124,63,125,74,126}. Alguns dos marcadores biológicos utilizados para medir os danos causados pela oxidação são o TBARS e o conteúdo de proteínas carboniladas, ambos avaliados neste estudo. Os resultados mostraram que a ativação imune materna foi capaz de produzir dano oxidativo a lipídios e a proteínas especialmente no cerebelo e hipocampo de ratos Wistar. Este efeito já havia sido demonstrado anteriormente^{125,71} e está relacionado, possivelmente, ao acúmulo de peróxido de hidrogênio nas estruturas encefálicas analisadas. Além de modelos pré-clínicos, uma série de ensaios clínicos revelaram que pacientes autistas mostraram níveis aumentados de malondialdeído – um marcador de lipoperoxidação, no plasma de pacientes autistas^{127,128,129}.

Wilms e colaboradores¹²⁷, demonstraram que o pré-tratamento com DMF, em um modelo *in vitro*, foi capaz de inibir a ativação induzida por LPS em células microgliais, reduzindo assim a expressão de EROs e de citocinas pró-inflamatórias. Não há como não relacionar, pelo menos na teoria, os dados obtidos neste estudo com os resultados positivos que agentes com potencialidade antioxidante apresentam, especificamente o DMF. Estudos recentes têm apontado o DMF como substância capaz de diminuir dano oxidativo sobre os neurônios, astrócitos e células gliais^{118,120,94,130}. A diminuição da peroxidação de lipídios após o tratamento com DMF na dose de 15mg/kg, sugere que a ativação do Nrf2 pode estar ligada a neutralização de compostos reativos e, desta forma, mantendo uma relação direta com a homeostase redox. É possível que o mecanismo de proteção contra a lipoperoxidação a partir do DMF esteja associado a sua capacidade de modular a expressão de enzimas antioxidantes¹³¹ e diminuir o dano oxidativo.

Vários estudos têm sugerido que alterações na enzimas antioxidantes desempenham um papel fundamental no mecanismo de defesa contra os danos oxidativo no TEA. Pacientes com diagnóstico de TEA mostraram diminuição da

atividade da glutathione peroxidase no plasma¹³² e em eritrócitos^{132,133}, além de diminuição nos níveis de CAT^{134,135} e SOD em eritrócitos^{132,135}. A relação entre a peroxidação e o TEA ainda não são totalmente compreendidos, no entanto, alguns estudos têm demonstrado níveis diminuídos de ceruloplasmina e transferrina no sangue de crianças autistas quando comparados aos seus controles^{67,63}. A ceruloplasmina é uma proteína sérica que atua como antioxidante com propriedade de oxidar o Fe^{2+} à Fe^{3+} , assim através da manutenção do ferro em estado oxidado, a ceruloplasmina pode impedi-lo de participar da reação Haber-Weiss e outras reações dependentes de ferro que iniciam a peroxidação lipídica¹³⁶. O ferro é transportado no plasma na sua forma férrica pela transferrina. A transferrina é uma glicoproteína sintetizada no fígado que possui alta afinidade pelo ferro, podendo se ligar em até dois íons ferro ao mesmo tempo. Porém, em condições fisiológicas apenas 30% de toda a transferrina plasmática está saturada. Esta proteína tem papel importante. Sem a transferrina, o ferro seria muito facilmente internalizado pelas células e induzir uma superprodução de peróxido de hidrogênio e radicais livres, danificando inúmeras organelas citoplasmáticas¹³⁷. Neste sentido, é possível que alterações no metabolismo do ferro possa ter uma relação com lipoperoxidação no TEA.

O modelo experimental de TEA proposto neste estudo confirmou os dados encontrados na literatura quando mostrou níveis diminuídos de defesas antioxidantes no cerebelo e hipocampo de animais expostos ao LPS em período pré-natal. A redução das enzimas antioxidantes, em especial a SOD, pode afetar o crescimento e a migração neuronal¹³⁵, resultando em alterações estruturais e funcionais características do TEA.

O Nrf2 controla a transcrição de enzimas antioxidantes e enzimas responsáveis pela produção de antioxidantes mediante ligação ao elemento responsivo a antioxidante (ARE)^{138,139}. A partir da interação do Nrf2 com o ARE, são expressas enzimas antioxidantes e de detoxificação em diferentes tecidos, incluindo o tecido encefálico^{82,131}. A participação da sinalização por Nrf2 na resposta inflamatória foi demonstrada em uma variedade de modelos experimentais que indicaram uma atenuação efetiva no estímulo pró-inflamatório, com diminuição tanto do processo inflamatório quanto do dano decorrente deste, pela ação do Nrf2 via ARE¹⁴⁰⁻¹⁴².

O Nrf2 é o principal fator de transcrições de genes envolvidos em respostas antioxidantes, Chen e colaboradores¹⁴³, demonstraram que o DMF se liga a KEAP-1 permitindo a translocação do Nrf2, resultando na transcrição de genes antioxidantes, tais como heme-oxigenase-1 (HO-1), SOD, CAT, nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato (NADPH), oxidorreductase quinolina-1 (NQO1) entre outros, que atuam na defesa do organismo contra agentes pró-oxidantes, desta forma protegendo o SNC da morte neuronal e de danos aos lipídios, proteínas e DNA^{82,143}. Alguns estudos também demonstram que a ativação do Nrf2 pelo DMF permitiu à diminuição das células imunitárias e subsequente a ativação da micróglia que diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias e resposta a estímulos inflamatórios, assim colaborando com a melhora da neuroinflamação do SNC^{142,144,145, 146,147}.

A via Nrf2 também tem sido estudada por RK Chaturvedi e colaboradores¹⁴⁸, como uma molécula chave na proteção contra a disfunção mitocondrial. As mitocôndrias atuam como “usinas celulares”, na geração de trifosfato de adenosina (ATP) para as células, que são usados como fonte de energia química para vários processos bioquímicos. A deficiência do funcionamento das mitocôndrias do encéfalo podem produzir insuficiência grave de energia, da mesma forma que o aumento de geração de EROs nos neurônios, ocasionando a morte celular¹⁴⁸.

Estudos demonstram que a administração de fármacos que ativem a via Nrf2, atenua significativamente a inibição da respiração mitocondrial alterada por complexo I e reduz a quantidade de 4 -HNE unidos as proteínas mitocôndrias, demonstrando que a ativação do Nrf2 pode proteger as mitocôndrias do dano oxidativo causado por 4 - HNE¹⁴⁹, visto que o autismo apresenta disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, podemos sugerir que a administração de DMF possa exercer os efeitos neuroprotetores a partir da ativação da via de Nrf2 e assim reverter os parâmetros comportamentais e bioquímicos apresentados neste estudo.

Considerando que o DMF ativa a Nrf2, foram avaliados os níveis de defesas antioxidantes enzimáticas para verificar a propriedade neuroprotetora desta substância após ativação imune materna. Apesar de a atividade da CAT parece não ter sido influenciada pelo tratamento com DMF, a SOD, em especial, teve sua expressão aumentada tanto no cerebelo quanto no hipocampo dos animais expostos ao LPS em período pré-natal.

Um estudo *postmortem* conduzido por Tang e colaboradores¹²⁶, a partir da avaliação da atividade de enzimas antioxidantes na região do córtex temporal de indivíduos autistas mostrou diminuição nos níveis de SOD e nenhuma alteração de CAT, sugerindo que o estresse oxidativo, no TEA, pode ser originário de peroxidação lipídica e não de danos a proteínas¹²⁶. É possível que esta relação explique a manutenção dos níveis de CAT após tratamento com DMF.

Por fim, desde os achados comportamentais iniciais que mostraram alterações significativas nos testes de estereotipia e interação social recíproca até a presença de uma relação, possivelmente, causal entre estresse oxidativo e TEA, os resultados deste estudo reforçam a hipótese de que a ativação imune materna tem uma participação importante na fisiopatologia desta síndrome. Além disso, sabe-se que a inflamação e o estresse oxidativo são dois fatores intimamente relacionados e que os astrócitos e a micróglia são células-chave em ambos os processos. Embora haja uma sobreposição de vias de sinalização que medeiam as cascatas de eventos intracelulares, a ativação de fatores de transcrição como o Nrf2, são importantes reguladores do estado redox. Somando-se estes dados com os achados deste estudo, é possível considerar o DMF, especialmente a dose de 15mg/kg, com um potencial mecanismo de ação neuroprotetora em relação à lipoperoxidação e capacidade de restaurar a atividade da SOD. No entanto, mais estudos são necessários para definir claramente os mecanismos pelos quais o DMF exerce seus efeitos nas respostas comportamentais e no estado redox e para confirmar seus benefícios clínicos como uma nova abordagem terapêutica para o TEA.

6 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, alterações comportamentais e neuroquímicas condicente com TEA, sendo eles:

- Aumento de movimentos estereotipados e redução no comportamento social recíproco;
- Aumento nos níveis de dano oxidativo a lipídios e proteínas no cerebelo, hipocampo e córtex pré-frontal de ratos expostos ao LPS pré-natalmente.
- Diminuição nos níveis de enzimas antioxidantes, SOD e CAT no cerebelo e hipocampo de ratos expostos ao LPS pré-natalmente.

Tomados em conjunto, os nossos resultados mostram que o tratamento com DMF, proporcionou o regresso do comportamento autista e exerceu efeito neuroprotetor, especificamente:

- Diminuição de movimentos estereotipados e aumento no comportamento social recíproco.
- Diminuição nos níveis de marcador de dano oxidativo (TBARS) e aumento da expressão da enzima antioxidante (SOD) no cerebelo e hipocampo de ratos expostos ao LPS pré-natalmente.

Apesar de o DMF apresentar resultados positivos, tanto comportamentais como neuroquímicos, no modelo experimental de TEA, estudos adicionais são necessários para explorar ainda mais os efeitos deste composto e identificar suas contribuições como uma potencial alternativa terapêutica para o tratamento desse transtorno. E a partir desses resultados sugerir que o DMF representa uma abordagem terapêutica alternativa e que possa ser transferido para a prática clínica em um futuro próximo.

REFERÊNCIAS

1. Takano T. Role of Microglia in Autism: Recent Advances. *Dev Neurosci*. 2015; 37(3):195-202.
2. Schaafsma SM, Pfaff DW. Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. *Front Neuroendocrinol*. 2014 Aug; 35(3):255-71.
3. Kawicka A, Regulska-Ilow B. How nutritional status, diet and dietary supplements can affect autism. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2013; 64(1):1-12.
4. Cannell JJ. Autism, will vitamin D treat core symptoms? *Medical Hypotheses*. 2013 Aug; 81(2):195-98.
5. Blumberg SJ, Bramlett MD, Kogan MD, Schieve LA, Jones JR. Changes in Prevalence of Parent-reported Autism Spectrum Disorder in School-aged U.S. Children: 2007 to 2011–2012. *National Health Statistics Reports*. 2013 Marc; 65:1-12.
6. Pasciuto E, Borrie SC, Kanellopoulos AK, Santos AR, Cappuyns E, D'Andrea L, et al. Autism Spectrum Disorders: Translating human deficits into mouse behavior. *Neurobiol Learn Mem*. 2015 Oct; 124:71-87.
7. Frye CA, Llaneza DC. Corticosteroid and neurosteroid dysregulation in an animal model of autism, BTBR mice. *Physiol Behav*. 2010 Jun; 100(3):264-7.
8. Bolz J, Uziel D, Mühlfriedel S, Güllmar A, Peuckert C, Zarbalis K, et al. Multiple roles of ephrins during the formation of thalamocortical projections: maps and more. *J Neurobiol*. 2004 Apr; 59(1):82-94.
9. Akaneya Y, Sohya K, Kitamura A, Kimura F, Washburn C, Zhou R, et al. Ephrin-A5 and EphA5 interaction induces synaptogenesis during early hippocampal development. *PLoS One*. 2010 Aug; 5(8):e12486.
10. Betancur C, Sakurai T, Buxbaum JD. The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends Neurosci*. 2009 Jul; 32(7):402-12.
11. Gesundheit B, Rosenzweig JP, Naor D, Lerer B, Zachor DA, Procházka V, et al. Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. *J Autoimmun*. 2013 Aug; 44:1-7.
12. Levy SE, Mandell DS, Schultz RT. Autism. *Lancet*. 2009 Nov; 374(9701):1627-38.

13. Mostofsky SH, Powell SK, Simmonds DJ, Goldberg MC, Caffo B, Pekar JJ. Decreased connectivity and cerebellar activity in autism during motor task performance. *Brain*. 2009 Sep; 132(Pt 9):2413-25.
14. Currenti SA. Understanding and determining the etiology of autism. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30:161-71.
15. Killestein J, Rudick RA, Polman CH. Oral treatment for multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2011 Nov; 10(11):1026-34.
16. Timo ALR, Maia NVR, Ribeiro PC. Déficit de imitação e autismo: uma revisão. *Psicol*. 2011; 22(4):833-50.
17. Andanson J, Pourre F, Maffre T, Raynaud JP. Social skills training groups for children and adolescents with Asperger syndrome: A review. *Arch Pediatr*. 2011 May;18(5):589-96.
18. Araújo RR, Silva JRS, Antino MEF. Breve discussão sobre o impacto de se ter um irmão com transtorno do espectro do autismo. *Cad. Pós-Graduação em Distúrbios do Desenv.*, São Paulo. 2012; 12(1):9-15.
19. Mecca TP, Bravo RB, Velloso RL, Schwartzman JS, Brunoni D, Teixeira MCTV, Rastreamento de sinais e sintomas de transtornos do espectro do autismo em irmãos. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul, Porto Alegre*. 2011; 33(2):116-20.
20. American Psychiatric Association. Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM - V). 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
21. First, MB. Autism and Other Pervasive Developmental Disorders Conference (February 3-5, 2008). Arlington: American Psychiatric Association. *Int J Tryptophan Res*. 2013; 6(1):15-28.
22. Zaroff CM, Uhm SY. Prevalence of autism spectrum disorders and influence of country of measurement and ethnicity. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 2012 Mar; 47(3):395-8.
23. 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.
24. Teixeira MCTV, Mecca TP, Velloso RI, Bravo RB, Ribeiro SHB, Mercadante MT, et al. Literatura científica brasileira sobre transtornos do espectro autista. *Rev Assoc Med Bras*. 2010; 56(5):607-14.
25. Schieve LA, Rice C, Yeargin-Allsopp M, Boyle CA, Kogan MD, Drews C, Devine O. Parent-reported prevalence of autism spectrum disorders in US-born children: An assessment of changes within birth cohorts from the 2003 to the 2007 National Survey of Children's Health. *Matern Child Health J*. 2012; 16(Suppl 1):151-7.

26. Schwarz JM, Bilbo SD. Sex, glia, and development: Interactions in health and disease. *Hormones and Behavior*. 2012 Aug; 62(3):243-53.
27. Rivet TT, Matson JL. Review of gender differences in core symptomatology in autism spectrum disorders. *Rese. in Aut. Spec. Dis.* 2011 jul; 5(3):957-76.
28. Walsh P, Elsabbagh M, Bolton P, Singh I. In search of biomarkers for autism: scientific, social and ethical challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12(10):603-12.
29. Román GC. Autism: transient in utero hypothyroxinemia related to maternal flavonoid ingestion during pregnancy and to other environmental antithyroid agents. *J Neurol Sci*. 2007 Nov; 262(1-2):15-26.
30. Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, et al. Microglial Activation and Increased Microglial Density Observed in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Autism. *Biological Psychiatry*. 2010 Aug; 68(4):368-76.
31. Parellada M, Penzol MJ, Pina L, Moreno C, Gonzáles EV, Zalsman G, Arango C. The neurobiology of autism spectrum disorders. *European Psychiatry*. 2013 Jan; 29(1):11-19.
32. Hegazy HG, Ali EH, Elgoly AH. Interplay between pro-inflammatory cytokines and brain oxidative stress biomarkers: evidence of parallels between butyl paraben intoxication and the valproic acid brain physiopathology in autism rat model. *Cytokine*. 2015 Feb; 71(2):173-80.
33. Chauhan A, Gu F, Chauhan V. Review Article Mitochondrial respiratory chain defects in autism and other neurodevelopmental disorders. *Journal of Pediatric Biochemistry* 2012; 2(2012) 213–23.
34. Gesundheit B, Rosenzweig JP, Naor D, Lerer B, Zachor DA, Procházka V, et al. Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. *J Autoimmun*. 2013 Aug; 44:1-7.
35. Jiang L, Hou XH, Yang N, Yang Z, Zuo XN. Examination of Local Functional Homogeneity in Autism. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:174371.
36. Morgan JT, Chana G, Abramson I, Semendeferi K, Courchesne E, Everall IP. Abnormal microglial-neuronal spatial organization in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Brain Res*. 2012 May; 1456:72-81.
37. Buehler MR. A proposed mechanism for autism: an aberrant neuroimmune response manifested as a psychiatric disorder. *Med Hypotheses*. 2011 Jun; 76(6):863-70.
38. Morris GP, Clark IA, Zinn R, Vissel B. Microglia: A new frontier for synaptic plasticity, learning and memory, and neurodegenerative disease research. *Neurobiol Learn Mem*. 2013 Oct; 105:40-53

39. Maezwa I, Calafiore M, Wulff H, Jin LW. Does microglial dysfunction play a role in autism and Rett syndrome? *Neuron Glia Biology*. 2011 Feb; 7(1):85-97.
40. Jurgens HA, Johnson RW. Dysregulated Neuronal-Microglial Cross-Talk during Aging, Stress and Inflammation. *Exp Neurol*. 2012; 233(1):40-8.
41. Theoharides TC, Asadi S, Patel AB. Focal brain inflammation and autism. *Journal of Neuroinflammation* 2013; 10(46):2-7.
42. Xing B, Bachstetter AD, Eldik LJ. Microglial p38 α MAPK is critical for LPS-induced neuron degeneration, through a mechanism involving TNF α . *Mol Neurodegener*. 2011; 6(84):6-12.
43. Onore C, Careaga M, Ashwood P. The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain Behav Immun*. 2012 Mar; 26(3):383-92.
44. Breece E, Paciotti B, Nordahl CW, Ozonoff S, Water JAV, Rogers SJ et al. Myeloid dendritic cells frequencies are increased in children with autism spectrum disorder and associated with amygdala volume and repetitive behaviors. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2013 Jul; 31:69-75
45. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010 Feb; 327(5966):656-61.
46. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol*. 2005; 57:67-81.
47. Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, Nakamura K, Futatsubashi M, Takebayashi K, et al. Microglial activation in young adults with Autism Spectrum Disorder. *JAMA Psychiatry*. 2013; 70(1):49-58.
48. Rodriguez JI, Kern JK. Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *Neuron Glia Biology*. 2011; 7(2-4):205-2.
49. Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17:240-51
50. Kirsten TB, Kirsten Chaves GP, Chaible LM, Silva AC, Martins DO, Britto LRG. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. *Journal of Neuroscience Research*. 2012 Oct; 90(10):1903-12.
51. Granot E, Kohen R. Oxidative stress in childhood--in health and disease states. *Clin Nutr*. 2004 Feb; 23(1):3-11.
52. Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przeglasiński 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 Rep.* 2015 Jun;67(3):569-80.

53. Aqawal A, Virk G, Ong C, Du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health.* 2014 Apr; 32(1):1-17.

54. Sree SL, Sethupathy S. Evaluation of the efficacy of taurine as an antioxidant in the management of patients with chronic periodontitis. *Dental Research Journal.* 2014; 11(2):228-33.

55. Andreazza AC. Combining redox-proteomics and epigenomics to explain the involvement of oxidative stress in psychiatric disorders. *Mol Biosyst.* 2012 Oct; 8(10):2503-12.

56. Chulia FZ, Salmina AB, Malinovskaya NA, Noda M, Verkhatsky A, Moreira JCF. The glial perspective of autism spectrum disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 2014;38:160-72.

57. Halliwell, B. e Gutteridge, JMC papel dos radicais livres e íons metálicos catalíticos na doença humana e uma visão geral. *Cérebro Inj.* 1992; 6: 203-212

58. Erden-Inal, M., Sunal, E., e Kanbak, G. Idade relacionada com alterações no sistema redox da glutatona. *Cell.Biochem. Funct.* 2002; 20: 61-66

59. Loeffler, DA, Connor, JR, Juneau, PL, Snyder, BOS, Kanaley, L., DeMaggio, AJ, Nguyen, H., Brickman, CM, e Lewitt, PA da transferrina e de ferro em condições normais, a doença de Alzheimer, e doença de Parkinson regiões do cérebro. *J. Neurochem.* 1995; 65: 710-724

60. Arnaud, P., Gianazza, E., e Miribel, L. ceruloplasmina. *Methods Enzymol.* 1988; 163: 441-452

61. Gutteridge, JMC, Richmond, R., e Halliwell, B. oxigênio radicais livres e peroxidação lipídica. A inibição pela proteína de ceruloplasmina. *FEBS Lett.* 1980; 112: 269-272

62. McCord, JM e Dia, ED Superoxide produção dependente de radical hidroxila catalisada por complexo ferro-EDTA. *FEBS Lett.* 1978; 86: 139-142

63. Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology.* 2006 ago; 13(3):171–81

64. Shulman RG, Rothman DL, Behar KL, Hyder F. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci.* 2004 Aug; 27(8):489-95.

65. Bitanirwe BK, Woo TU. Oxidative stress in schizophrenia: an integrated approach. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011 Jan; 35(3):878-93

66. Perry SW, Norman JP, Litzburg A, Gelbard HA. Antioxidants are required during the early critical period, but not later, for neuronal survival. *J Neurosci Res.* 2004 Nov; 78(4):485-92.

67. Frustaci A, Neri M, Cesario A, Adams JB, Domenici E, Dalla Bernardina B, Bonassi S. Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses. *Free Radic Biol Med*. 2012 May; 52(10):2128-41.
68. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I. Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin--the antioxidant proteins. *Life Sci*. 2004 Oct ; 75(21):2539-49.
69. Chauhan A, Chauhan V, Brown WT, Cohen I. Oxidative stress in autism: increased lipid peroxidation and reduced serum levels of ceruloplasmin and transferrin--the antioxidant proteins. *Life Sci*. 2004 Oct; 75(21):2539-49.
70. Kaur K, Chauhan V, Gu F, Chauhan A. Bisphenol A induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphoblasts from children with autism and unaffected siblings. *Free Radic Biol Med*. 2014 Nov; 76:25-33.
71. Chauhan A, Gu F, Essa MM, Wegiel J, Kaur K, Brown WT, Chauhan V. Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. *J Neurochem*. 2011 Apr; 117(2):209-20.
72. Giulivi C, Napoli E, Schwartz J, Careaga M, Ashwood P. Gestational exposure to a viral mimetic poly(I:C) results in long-lasting changes in mitochondrial function by leucocytes in the adult offspring. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:609602.
73. Yorbik O, Sayal A, Akay C, Akbiyik DI, Sohmen T. Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002 Nov; 67(5):341-3.
74. Gu F, Chauhan V, Chauhan A. Impaired synthesis and antioxidant defense of glutathione in the cerebellum of autistic subjects: alterations in the activities and protein expression of glutathione-related enzymes. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec; 65:488-96.
75. Depino AM. Peripheral and central inflammation in autism spectrum disorders. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Mar; 53:69-76.
76. Antony JM, Paquin A, Nutt SL, Kaplan DR, Miller FD. Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells. *J Neurosci Res*. 2011 Mar; 89(3):286-98.
77. Eikeseth S. Outcome of comprehensive psycho-educational interventions for young children with autism. *Res Dev Disabil*. 2009 Jan-Feb; 30(1):158-78.
78. Lee YJ, Oh SH, Park C, Hong M, Lee AR, Yoo HJ, et al. Advanced Pharmacotherapy Evidenced by Pathogenesis of Autism Spectrum Disorder. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2014 apr; 12(1):19-30.
79. European Medicines Agency. Tecfidera: Dimetil Fumarato [Internet]. Reino Unido; 2014. [acesso em: 08 jun 2014]. Disponível em:

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002601/human_med_001657.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

80. Biogen. Tecfidera TM (fumarato de dimetila) [Internet]. Brasil; 2015. [acesso em: 28 ago 2015]. Disponível em: <http://www.biogenidec.com.br/produtos.aspx?ID=14070>.

81. Kalinin S, Polak PE, Lin SX, Braun D, Guizzetti M, Zhang X, et al. Dimethyl fumarate regulates histone deacetylase expression in astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*. 2013 Oct; 263(1-2):13-19.

82. Reick C, Ellrichmann G, Thöne J, Scannevin RH, Saft C, Linker RA, Ouro R. Neuroprotetorfumaratodimetilsynergizes with imunomoduladoresinterferon beta to provide better protection of the axon in autoimmune neuroinflammation. *Exp Neurol*. 2014 Jul; 257:50-6.

83. Salmen A, Ouro R. Mode of action and clinical studies with fumarates in multiple sclerosis. *Exp Neurol*. 2014 Dec; 262 Pt A:52-6.

84. Rodriguez JI, Kern JK. Evidence of microglial activation in autism and its possible role in brain underconnectivity. *Neuron Glia Biology*. 2011; 7(2-4):205-2.

85. Vajda FJE. Neuroproteção e doenças neurodegenerativas. *Journal of Neuroscience Clínica*. 2002 Jan; 9(1):4-8.

86. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002 Nov; 62(4):609-1.

87. Leite LG, Riet-Correa F, Medeiros RMT, Piacent A, Aragão M, Schons SV. Susceptibilidade de animais de laboratório à intoxicação por Ateleia glazioviana. *Pesquisa veterinária brasileira*. 2002; 22(2):73-8.

88. Bernardi MM, Spinosa HS, Górnaiak SL. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal: Farmacologia aplicada à medicina veterinária. Guanabara Koogan. 2006; 807-16.

89. Spencer SJ, Mouihate A, Galic MA, Ellis SL, Pittman QJ. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Aug; 293(2):R581-9.

90. Olexová L, Talarovicová A, Evans BL, Borbélvová V, Krsková L. Animal models of autism with a particular focus on the neural basis of changes in social behaviour: An update article. *Neuroscience Research*. 2012 Dec; 74(3-4):184-194.

91. Chhor V, Schang AL, Favrais G, Fleiss B, Gressens P. Conséquences cérébrales à long terme de l'inflammation périnatale. *Archives of Pediatrics*. 2012;19(9):946-952.

92. Holson J F, Memec MD, Stump DG, Kaufman IE, Lindstöm P, Varsho J. Significance, reliability, and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. 2002; 22:185- 221.
93. Milenković M, Arsenović-Ranin N, Vucićeović D, Bufan B, Jancić I, Stojić-Vukanić Z. Beneficial effects of dimethyl fumarate on experimental autoimmune myocarditis. Arch Med Res. 2008 Oct; 39(7):639-46
94. Schilling S, Goelz S, Linker R, Luehder F, Gold R. Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. Clin Exp Immunol. 2006 Jul; 145(1):101-7.
95. Battisti JJ, Shreffler CB, Uretsky NJ, Wallace LJ. NMDA antagonists block expression of sensitization of amphetamine and apomorphine induced stereotypy. Pharmacol Biochem Behav. 2000 Oct; 67(2):241-6.
96. Sungur AÖ, Vörckel KJ, Schwarting RK, Wöhr M. Repetitive behaviors in the Shank1 knockout mouse model for autism spectrum disorder: developmental aspects and effects of social context. J Neurosci Methods. 2014 Aug; 234:92-100.
97. Spencer CM, Alekseyenko O, Hamilton SM, Thomas AM, Serysheva E, Yuva-Paylor LA, et al. Modifying behavioral phenotypes in Fmr1KO mice: genetic background differences reveal autistic-like responses. Autism Res. 2011 Feb; 4(1):40-56.
98. Moreira RM. Depleção cerebral de serotonina durante o período neonatal programa homeostase metabólica energética e a expressão comportamental de ratos adultos [Dissertação]. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Veterinária, 2008.
99. Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990; 186:464-78.
100. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979 Jun; 95(2):351-8.
101. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 105:121-6.
102. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 1972 May; 247(10):3170-5
103. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov; 193(1):265-75
104. Wurzman R, Forcelli PA, Griffey CJ, Kromer LF. Repetitive grooming and sensorimotor abnormalities in an ephrin-A knockout model for Autism Spectrum Disorders. Behav Brain Res. 2015 Feb; 278:115-28

105. Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet.* 2008 May; 9(5):341-55.
106. Volkmar FR, McPartland JC. From Kanner to DSM-5: autism as an evolving diagnostic concept. *Annu Rev Clin Psychol.* 2014; 10:193-212
107. Olexová L, Talarovicová A, Evans BL, Borbélová V, Krsková L. Animal models of autism with a particular focus on the neural basis of changes in social behaviour: An update article. *Neuroscience Research.* 2012 Dec; 74(3-4):184-94.
108. Soto AM, Kirsten TB, Reis-Silva TM, Martins MF, Teodorov E, Flório JC, et al. Single early prenatal lipopolysaccharide exposure impairs striatal monoamines and maternal care in female rats. *Life Sci.* 2013 May; 92(14-16):852-8.
109. Quan N, Herkenham M. Connecting cytokines and brain: a review of current issue. *Histol Histopathol,* 2002; 17: 273-78.
110. Lin CY, Lee CH, Chang YW, Wang HM, Chen CY, Chen YH. Pheophytin a inhibits inflammation via suppression of LPS-induced nitric oxide synthase-2, prostaglandin E2, and interleukin-1 β of macrophages. *Int J Mol Sci.* 2014 Dec; 15(12):22819-34.
111. Kinoshita D, Cohn DW, Costa-Pinto FA, de Sá-Rocha LC. Behavioral effects of LPS in adult, middle-aged and aged mice. *Physiol Behav.* 2009 Feb; 96(2):328-32
112. Keverne EB, Fundele R, Narasimha M, Barton SC, Surani MA. Genomic imprinting and the differential roles of parental genomes in brain development. *Brain Res Dev Brain Res.* 1996 Mar; 92(1):91-100.
113. Jones LS, Gauger LL, Davis JN, Slotkin TA, Bartolome JV. Postnatal development of brain alpha1-adrenergic receptors: In vitro autoradiography with [125i]HEAT in normal rats and rats treated with alpha-difluoromethylornithine, a specific, irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase. *Neuroscience,* 1985; 15(4):1195–1202
114. Andersen SL. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2003; 27:3-18.
115. Oskvig DB, Elkahloun AG, Johnson KR, Phillips TM, Herkenham M. Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav Immun.* 2012 May; 26(4):623-34.
116. Giunti D, Parodi B, Cordano C, Uccelli A, Kerlero de Rosbo N. Can we switch microglia's phenotype to foster neuroprotection? Focus on multiple sclerosis. *Immunology.* 2014 Mar; 141(3):328-39.
117. Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. Dimethylfumarate inhibits microglial and astrocytic inflammation by suppressing the

synthesis of nitric oxide, IL-1 β , TNF- α and IL-6 in an in-vitro model of brain inflammation. *J Neuroinflammation*. 2010 May; 7:30.

118. Linker RA, Lee DH, Ryan S, Van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*. 2011 Mar; 134(Pt 3):678-92.

119. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 2004 Nov; 10(11):549-57.

120. Ellrichmann G, Petrasch-Parwez E, Lee DH, Reick C, Arning L, Saft C, et al. Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease. *PLoS One*. 2011 Jan; 6(1):e16172.

121. Yang Y, Jiang S, Yan J, Li Y, Xin Z, Lin Y, Qu Y. An overview of the molecular mechanisms and novel roles of Nrf2 in neurodegenerative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015 Feb; 26(1):47-57.

122. Pragnya B, Kameshwari JS, Veeresh B. Ameliorating effect of piperine on behavioral abnormalities and oxidative markers in sodium valproate induced autism in BALB/C mice. *Behav Brain Res*. 2014 Aug; 270:86-94

123. Palmieri L, Papaleo V, Porcelli V, Scarcia P, Gaita L, Sacco R, et al. Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1. *Mol Psychiatry*. 2010 Jan; 15(1):38-52.

124. Sajdel-Sulkowska EM, Lipinski B, Windom H, Audhya T, McGinnis W. Oxidative Stress in Autism: Elevated Cerebellar 3-nitrotyrosine Levels. *American Journal of Biochemistry & Biotechnology*, 2008; 4(2) 73.

125. Rose S, Melnyk S, Pavliv O, Bai S, Nick TG, Frye RE, James SJ. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. *Transl Psychiatry*. 2012 Jul; 2:e134

126. Tang G, Gutierrez RP, Kuo SH, Akman HO, Rosoklija G, Tanji K, et al. Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. *Neurobiol Dis*. 2013 Jun; 54:349-61.

127. Ciccoli L, De Felice C, Paccagnini E, Leoncini S, Pecorelli A, Signorini C, et al. Erythrocyte shape abnormalities, membrane oxidative damage, and β -actin alterations: an unrecognized triad in classical autism. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013:432616.

128. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. Lipid mediators in plasma of autism spectrum disorders. *Lipids Health Dis*. 2012 Nov 21;11:160.

129. 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 Oct; 143(1):58-65.

130. Lin SX, Lisi L, Dello Russo C, Polak PE, Sharp A, Weinberg G, et al. The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. *ASN Neuro*. 2011 Apr; 3(2). pii: e00055.
131. Albrecht P, Bouchachia I, Goebels N, Henke N, Hofstetter HH, Issberner A, et al. Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *J Neuroinflammation*. 2012 Jul; 9:163.
132. Yorbik O, Sayal A, Akay C, Akbiyik DI, Sohmen T. Investigation of antioxidant enzymes in children with autistic disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2002 Nov; 67(5):341-3.
133. Paşca SP, Nemeş B, Vlase L, Gagyí CE, Dronca E, Miu AC, Dronca M. High levels of homocysteine and low serum paraoxonase 1 arylesterase activity in children with autism. *Life Sci*. 2006 Apr; 78(19):2244-8.
134. Zoroglu SS, Armutcu F, Ozen S, Gurel A, Sivasli E, Yetkin O, Meram I. Increased oxidative stress and altered activities of erythrocyte free radical scavenging enzymes in autism. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2004 Jun; 254(3):143-7.
135. Essa MM, Braidý N, Waly MI, Al-Farsi YM, Al-Sharbati M, Subash S, et al. Impaired antioxidant status and reduced energy metabolism in autistic children. *Research in Autism Spectrum Disorders*, 2013 May; 7(5):557-65.
136. Levi S, Finazzi D. Neurodegeneration with brain iron accumulation: update on pathogenic mechanisms. *Front Pharmacol*. 2014 May; 5:99.
137. Codazzi F, Pelizzoni I, Zacchetti D, Grohovaz F. Iron entry in neurons and astrocytes: a link with synaptic activity. *Front Mol Neurosci*. 2015 Jun; 8:18.
138. Lee DF, Kuo HP, Liu M, Chou CK, Xia W, Du Y, et al. KEAP1 E3 ligase-mediated downregulation of NF-kappaB signaling by targeting IKKbeta. *Mol Cell*. 2009 Oct; 36(1):131-40
139. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem*. 2009 May; 284(20):13291-5.
140. Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem*. 2000 May; 275(21):16023-9.
141. Rangasamy T, Guo J, Mitzner WA, Roman J, Singh A, Fryer AD, et al. Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med*. 2005 Jul 4; 202(1):47-59.

142. Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, Kong AN. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF-kappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2008 Dec 1;76(11):1485-9.
143. Chen H, Assmann JC, Krenz A, Rahman M, Grimm M, et al. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. *J Clin Invest*. 2014 May;124(5):2188-92. Epub 2014 Apr 1.
144. Stoof TJ, Flier J, Sampat S, Nieboer C, Tensen CP, Boorsma DM. The antipsoriatic drug dimethylfumarate strongly suppresses chemokine production in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Br J Dermatol*. 2001; 144:1114-1120.
145. Loewe R, Holnthoner W, Gröger M, Pillinger M, Gruber F, Mechtcheriakova D, et al. Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol*. 2002 May; 168(9):4781-7.
146. Seidel P, Merfort I, Hughes JM, Oliver BG, Tamm M, Roth M. Dimethylfumarate inhibits NF-{kappa}B function at multiple levels to limit airway smooth muscle cell cytokine secretion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009; 297:326-339.
147. Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet*. 2008 Oct; 372(9648):1463-72.
148. RK Chaturvedi, M. Flint Beal. As doenças mitocondriais do cérebro. *Radic Biol Med*. 2013; 63: 1-29.
149. DM Miller, IN Singh, JA Wang, ED Salão. Administração do Nrf2-sulforafano são activadores e de ácido carnósico atenua 4-hidroxi-2-nonenal-induzida disfunção mitocondrial ex vivo. *Radic Biol Med*. 2013; 57:1-9.

ANEXO

ANEXO A- Parecer Aprovação do Comissão de Ética



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

Tubarão, 03 de abril de 2014.

Registro na CEUA (código): 14.002.2.01.IV

Ao pesquisador: Jucéilia Jeremias Fortunato
Lidiane Pinto Borges

Curso de Biologia - Campus Universitário Tubarão

Prezado(a) Pesquisador(a),

Vimos, através deste, informar que o projeto de pesquisa **"Efeito do tratamento com dimetil fumarato sobre a ativação microglial e neuroproteção em um modelo experimental de autismo"**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da UNISUL.

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

Atenciosamente,

Peter Johann Bürger

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

Unisul - Universidade do Sul de Santa Catarina

☎ (48) 3279-1036

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



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