



LUNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA



Potencial terapêutico dos neuropeptídeos NeuroVAL e Protonectina-F,
bioinspirados da peçonha de vespas sociais, no tratamento do
Transtorno do Espectro Autista

Aluna: Letícia Germino Veras

Orientadora: Dr^a Márcia Renata Mortari

Co-orientador: Dr. Gabriel Avohay Alves Campos

Brasília - DF, 2023.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA



Potencial terapêutico dos neuropeptídeos NeuroVAL e Protonectina-F, bioinspirados da
peçonha de vespas sociais, no tratamento do Transtorno do Espectro Autista

Trabalho de conclusão de curso
Apresentado como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Farmácia da
Universidade de Brasília

Letícia Germino Veras
Orientadora: Dr^a Márcia Renata Mortari
Co-orientador: Dr. Gabriel Avohay Alves Campos

Brasília - DF, 2023.

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DOS NEUROPEPTÍDEOS NEUROVAL E
PROTONECTINA-F, BIOINSPIRADOS DA PEÇONHA DE VESPAS SOCIAIS, NO
TRATAMENTO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA**

LETÍCIA GERMINO VERAS

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Márcia Renata Mortari (Orientador)

CFS/IB/UnB

Dr. Gabriel Avohay Alves Campos (Co-Orientador)

CFS/IB/UnB

Prof. Dr. Renato José Rodrigues Malcher Lopes (Membro Titular da Banca)

CFS/IB/UnB

Dedicatória

Dedico esse trabalho à Deus, meus pais Ricardo e Flávia,
todos os cientistas que lutam por alguma causa
e todos os pacientes acometidos com TEA.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por manter firme e esperançosa na ciência e na educação.

Agradeço a minha orientadora Márcia que me acolheu no laboratório mesmo sem os requisitos obrigatórios e mais do que eu, acreditou em mim, me ensinou e me tornou uma pesquisadora. Que se faz exemplo na vida acadêmica e pessoal cada vez mais, é uma honra tê-la como orientadora.

Agradeço meu orientador Gabriel pela sua calma e paciência para ensinar, por garantir os medos e risadas do cotidiano e por me dar a oportunidade de dividir com ele a execução desse projeto tão lindo.

À Bruna por sonhar e começar o projeto no NeuropharmaLab, por me ensinar a colocar a mão na massa, permitir ser sua parceira de bancada e por participar das análises.

Aos meus pais que sempre me incentivaram a dar valor a minha educação e hoje voltam a estudar me enchendo de orgulho. As minhas irmãs que já me acompanharam em experimentos no final de semana e minha irmã Julia que foi cobaia de coleta de sangue. Obrigada por acreditarem na carreira que eu estou trilhando e serem tão paciente com todo o processo de estudos, estágios e pesquisa.

Ao meu namorado que sempre me colocou para cima e me acompanhou de perto em toda essa jornada acadêmica. Esteve em todos os momentos bons e ruins como meu melhor amigo e nunca me deixou desistir. Obrigada por tanta parceria e amor. Assim como sua família que sempre me apoiou e me motivou, principalmente meus sogros.

A melhor equipe com que eu pude trabalhar Jéssica, Caio, Letícia, Samantha e Bruna. Sem vocês nenhum desses resultados seriam possíveis, com vocês eu pude crescer como pessoa e como pesquisadora. Obrigada por compartilhar comigo algo tão especial na minha vida.

Minhas grandes amigas que a pesquisa me deu Isabela, Rayane, Maria, Juliana, a vida com vocês é mais leve e divertida. Em especial a Isabela que foi minha parceira em tudo, compartilhou os piores e melhores momentos, que também é minha professora e torna o aprendizado algo mais alegre e me ajudou a superar muitas barreiras pessoais.

Minhas amigas de curso que me acompanharam e torceram por mim, Rebekah, Gabriela, Maju, Jessica, Bruna. Minha amiga Beatriz que se fez presente nos momentos finais da graduação e que se tornou uma parceira da vida pessoal e acadêmica.

Meus colegas de laboratório por toda ajuda, todos os cafês e conversas. Em especial Luana, Gabriela, Valéria e Larissa.

Obrigada aos queridos técnicos Danilo e Adolfo, que sempre estão disponíveis para ajudar.

Agradeço a todos os professores do curso de farmácia, em especial a professora e coordenadora Fabiana, que encanta os alunos com sua paixão por ensinar e lutou por cada aluno.

Pela equipe do biotério, Juliana, James e Jivago, por me ajudarem em um modelo tão complicado e por sempre zelarem pelo bem-estar dos animais.

Agradecimento ao Diogo que imprimiu em impressora 3D as gaiolas do teste de sociabilidade.

Aos meus preceptores e colegas de estágio que participaram do meu crescimento profissional.

Por todos os animais envolvidos nesse projeto, a ciência de desenvolvimentos de fármacos precisa deles.

À FAP/DF que financiou todo o projeto.

Resumo

Transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits cognitivos e sociais que impactam as relações pessoais dos pacientes, normalmente diagnosticado na infância. As causas não são bem definidas, porém estão relacionadas com genética de causa idiopática, o que classifica como um transtorno hereditário e com condições ambientais em que a genitora pode ser exposta e afetar a prole, como exposição a substâncias químicas ou infecções. Tratamentos específicos ainda não existem, os tratamentos disponíveis estão associados as comorbidades relacionadas, como depressão, ansiedade, transtorno de humor, TDAH e epilepsia. Porém esses tratamentos estão associados a efeitos adversos. As peçonhas de vespa são importantes fontes de peptídeos neuroativos, o NeuroVAL e a Protonectina-F foram testados para o tratamento da dor e comprovado potencial neuroativo por suas estruturas, ambos com melhor atividade antinociceptiva. A presente pesquisa se propõe a avaliar o modelo animal de exposição ao VPA e o tratamento com os neuropeptídeos para testar o efeito no comportamento repetitivo, ansiedade e comportamento social relacionados ao TEA. O modelo de exposição ao VPA aconteceu no 12º dia de gestação dos camundongos, após acompanhamento do período gestacional. O tratamento da prole foi feito por via intranasal, dos peptídeos NeuroVAL e Protonectina-F durante 15 dias. Foi observado redução dos sinais induzidos pela administração de VPA com o tratamento do NeuroVAL, além disso o peptídeo foi bem tolerado, porém com o tratamento de Protonectina-F os animais não apresentaram melhora no comportamento relacionado a exposição do VPA.

Palavras-chave: Transtorno do espectro autista; TEA; NeuroVAL; Protonectina-F; peptídeo. Modelo VPA

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by cognitive and social deficits that impact the personal relationships of affected patients, usually diagnosed in childhood. The causes are not well defined but are related to idiopathic genetics, which classifies it as a hereditary disorder, and to environmental conditions in which the mother can be exposed and affect her offspring, such as exposure to chemical substances or infections. Specific treatments do not yet exist; the available treatments are associated with related comorbidities, such as depression, anxiety, mood disorders, ADHD, and epilepsy. However, these treatments are associated with adverse effects. Wasp venoms are important sources of neuroactive peptides, NeuroVAL and Protonection-F have been tested for the treatment of pain and their structures have proven to have neuroactive potential, both with improved antinociceptive activity. The present research aims to evaluate the animal model of exposure to VPA and treatment with neuropeptides to test the effect on repetitive behavior, anxiety, and social behavior related to ASD. After monitoring the gestational period, the VPA exposure model took place on the 12th day of the mice's gestation. The offspring were treated intranasally with NeuroVAL and Protonection-F peptides for 15 days. A reduction in the signs induced by VPA administration was observed with NeuroVAL treatment, and the peptide was well tolerated. Still, with Protonection-F treatment the animals did not show any improvement in behavior related to VPA exposure.

Keywords: Autism spectrum disorder; ASD; NeuroVAL; Protonection-F; peptide. VPA model

Sumário

Lista de figuras.....	9
Lista de tabelas.....	11
Lista de Abreviaturas.....	12
INTRODUÇÃO	13
Epidemiologia.....	13
Etiologia	16
Exposição ao ácido valpróico na gestação	16
Tratamentos farmacológicos	17
Peptídeos neuroativos de peçonhas de vespas sociais.....	18
OBJETIVOS	21
Objetivo Geral	21
Objetivos específicos	21
METODOLOGIA.....	22
Peptídeos.....	22
Modelo de TEA induzido pelo VPA.....	22
Animais Experimentais.....	23
Protocolo Pré-natal.....	25
Testes Comportamentais	26
Teste de Sociabilidade.....	26
Teste de Comportamento Repetitivo.....	27
Teste do campo aberto (<i>Open Field</i>)	29
Análise estatística	30
RESULTADOS	30
Avaliação do comportamento social	30
Avaliação do comportamento repetitivo (<i>marble burying</i>)	34
Avaliação do comportamento ansioso (teste labirinto em cruz elevado).....	37
Avaliação da atividade locomotora (<i>Open field</i>).....	43
DISCUSSÃO	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
REFERÊNCIAS.....	50

Lista de figuras

- Figura 1: Esquema metodológico dos experimentos. Começando pela análise citológica e determinação da fase do ciclo estral (DG0), pós cruzamento é feita injeção de VPA (DG12), após nascimento (DG21/PN1) os animais são separados até o dia PN30 onde inicia-se o tratamento, ao longo do tratamento são feitos os testes LCE, OF, MB e avaliação do efeito social, após os testes os animais são eutanasiados.23
- Figura 2: Representação esquemática da administração intranasal, após anestesia inalatória administração do volume total da seringa em uma das narinas.24
- Figura 3: Fotomicrografia de lâminas de lavado vaginal e duração, em ordem de cada etapa do ciclo em escala 100x. *: Fases propícias para o acasalamento.26
- Figura 4: A: Representação esquemática do teste STC. B: Imagem do teste pelo campo de visão em que ele é analisado.27
- Figura 5: A: Representação esquemática do teste de enterramento. B: Imagem do teste com as bolas e posição em que são analisadas.28
- Figura 6: A: Representação esquemática do LCE. B: Imagem do teste pelo campo de visão que é analisado.28
- Figura 7: A: Representação esquemática do OF. B: Imagem do OF pelo campo de visão em que é analisado.29
- Figura 8: Tempo de interação de machos e fêmeas comparando controle e VPA no teste STC.30
- Figura 9: Tempo de interação dos machos no teste STC tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).30
- Figura 10: Tempo de interação das fêmeas no teste STC tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).32
- Figura 11: Tempo de interação dos machos no teste STC tratados com Protonectina-F sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).33

Figura 12: Tempo de interação das fêmeas no teste STC tratados com Protonectina-F sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	33
Figura 13: Porcentagem de bolas enterradas por machos e fêmeas comparando controle e VPA no teste do MB.	34
Figura 14: Porcentagem de bolas enterradas dos machos no teste do MB tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	35
Figura 15: Porcentagem de bolas enterradas das fêmeas no teste do MB tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	35
Figura 16: Porcentagem de bolas enterradas dos machos no teste do MB tratados com Protonectina-F sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	36
Figura 17: Porcentagem de bolas enterradas das fêmeas no teste do MB tratados com Protonectina-F sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	36
Figura 18: Tempo de permanência nos braços do LCE de machos e fêmeas, comparando os grupos controle negativo e grupo VPA no LCE, (A) nos braços abertos e (B) nos braços fechados.	37
Figura 19: Tempo gasto dos machos nos braços abertos do LCE tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	38
Figura 20: Tempo gasto das fêmeas nos braços abertos do LCE tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	38
Figura 21: Tempo gasto dos machos nos braços fechados do LCE tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	39
Figura 22: Tempo gasto das fêmeas nos braços fechados do LCE tratados NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	40
Figura 23: Tempo gasto dos machos nos braços abertos do LCE tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	41

Figura 24: Tempo gasto das fêmeas nos braços abertos do LCE tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	41
Figura 25: Tempo gasto dos machos nos braços fechados do LCE tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	42
Figura 26: Tempo gasto das fêmeas nos braços fechados do LCE tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	42
Figura 27: Distância percorrida por machos e fêmeas comparando controle e VPA no teste do OF.	43
Figura 28: Distâncias percorrida dos animais machos tratados no teste do OF com NeuroVAL, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	44
Figura 29: Distância percorrida das fêmeas no teste do OF tratados com NeuroVAL, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	44
Figura 30: Distâncias percorrida dos animais machos tratados no teste do OF com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	45
Figura 31: Distância percorrida das fêmeas no teste do OF tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B).	45

Lista de tabelas

Tabela 1: Critérios diagnósticos do TEA descritos no DSM-5 e no CID.	13
Tabela 2: Representação esquemática dos grupos de tratamento com o peptídeo NeuroVAL, com n experimental de indivíduos.	24
Tabela 3: Representação esquemática dos grupos de tratamento com o peptídeo Protonectina-F com n experimental de indivíduos.	25

Lista de Abreviaturas

ANOVA: Teste de análise de variância

BA: Braços abertos

BF: Braços fechados

CBD: Canabidiol

CEUA: Comissão de ética em uso de animal

CID: Classificação internacional das doenças

CONCEUA: Conselho nacional de controle de experimentação animal

DG: Dia gestacional

DI: deficiência intelectual

DMSO: Dimetil sulfóxido

DSM: Manual diagnóstico e estatístico de Transtornos Mentais

GABA: Ácido gama-aminobutírico

i.c.v: Intracerebroventricular

i.n: Intranasal

LCE: Labirinto em cruz elevado

MB: *Marble burying*

MP: Mastoparano

OF: *Open field*

OMS: Organização mundial da saúde

PN: Pós-natal

STC: Sociabilidade de três câmaras

SUS: Sistema Único de Saúde

TDHA: Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TEA: Transtorno do Espectro Autista

THC: Delta9-tetrahydrocanabidiol

VPA: Ácido valpróico

INTRODUÇÃO

Epidemiologia

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um distúrbio do neurodesenvolvimento caracterizado por déficits cognitivos e sociais, que impactam diretamente a interação social, a comunicação, por padrões repetitivos de comportamento e interesses anormais e fixos. Além de resultar em déficits no desenvolvimento, na compreensão e na manutenção de relacionamentos (DSM 5, 2013). Os pacientes com TEA comumente têm ocorrência de outras comorbidades psiquiátricas, como depressão, ansiedade, transtornos de humor, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e epilepsia (Genovese e Allerbeck, 2022; Keller *et al.*, 2017).

O TEA é descrito no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5ª edição (DSM-5, 2013) como um dos transtornos do neurodesenvolvimento, sendo que essa última edição atualizou os critérios usados para a realização do diagnóstico do TEA, ampliando a identificação dos sinais e sintomas e focando em observações do desenvolvimento da interação social, do comportamento e da comunicação de crianças, observados inicialmente na primeira infância (tabela 1; DSM 5, 2013). Um meio de facilitar o diagnóstico pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e o acesso aos serviços de saúde é o uso da Classificação Internacional das Doenças 11ª edição (CID-11) que classifica o TEA no código 6A02, como detalhado na tabela 1.

Tabela 1: Critérios diagnósticos do TEA descritos no DSM-5 e no CID.

Critérios	Descrição	Níveis DSM e CID
A	Déficits persistentes na comunicação e interação social como: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Limitação na reciprocidade socioemocional; ▪ Limitação nos comportamentos de comunicação não verbal usados para interação social; ▪ Limitação em desenvolver, manter e entender relacionamentos. 	<p>Nível 1: exigindo apoio – Leve</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 6A02.0: TEA sem deficiência intelectual (DI) e com comprometimento leve ou ausente da linguagem funcional; ▪ 6A02.1: TEA com DI e com leve ou nenhum prejuízo de linguagem funcional

B	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Padrões restritos e repetitivos de comportamento como: ▪ Movimentos motores com objetos; ▪ Insistência nas mesmas coisas como rotina ou ritual de comportamento; ▪ Interesses fixos e altamente restritos que são anormais ▪ Hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais 	<p>Nível 2: Exigindo apoio substancial – moderado</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 6A02.4: TEA sem DI e com ausência de linguagem funcional ▪ 6A02.5: TEA com DI e com ausência de linguagem funcional
C	<p>Os sintomas devem estar presentes precocemente no período do desenvolvimento (de acordo com a manifestação de demandas sociais).</p>	<p>Nível 3: Exigindo muito apoio substancial – Severo</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 6A02.4: TEA sem DI e com ausência de linguagem funcional ▪ 6A02.5: TEA com DI e com ausência de linguagem funcional
D	<p>Prejuízos causados dos sintomas em diferentes áreas da vida do indivíduo.</p>	<p>6A02.Y: Outro Transtorno do Espectro do Autismo especificado;</p>
E	<p>Essas perturbações não são bem explicadas por deficiência cognitiva e intelectual ou pelo atraso do desenvolvimento.</p>	<p>6A02.Z – Transtorno do Espectro do Autismo, não especificado.</p>

Fonte: DSM 5, 2013; OMS, 2021.

Além dos sinais e sintomas comportamentais descritos, as alterações desencadeadas pelo TEA podem incluir alterações nas catecolaminas. Destaca-se a desregulação do sistema serotoninérgico, considerado como um possível mecanismo na fisiopatologia do transtorno. Indivíduos com TEA apresentam níveis elevados de serotonina na corrente sanguínea (Anderson *et al.*, 1989) e alterações no sistema canabinoide (Sandman, 1991; Sandman, 1992, Tordjman *et al.*, 1997). Em modelos animais de TEA induzido por ácido valpróico também foram encontradas alterações no sistema monoaminérgico, como elevados níveis de

monoaminas no encéfalo e corrente sanguínea e diminuição nos níveis de serotonina na formação hipocampal (Narita *et al.*, 2002; Miyazaki *et al.*, 2005).

A prevalência do TEA aumentou ao decorrer dos últimos anos. Zeidan e colaboradores (2022) estimaram que a média de casos mundial é de 1 em cada 100 indivíduos, com ocorrência de casos de quatro a cinco vezes maior em homens do que em mulheres. Nos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças relatou que 1 em cada 36 crianças, de 8 anos, se enquadra nos critérios de diagnóstico do TEA (Maenner *et al.*, 2023). Os critérios de diagnóstico (tabela 1) podem ser associados ou não, o que caracteriza o TEA como um espectro, devendo os sinais serem observados no período do desenvolvimento dos 12 aos 24 meses (DSM-5, 2013).

Os dados de prevalência provavelmente aumentaram devido à melhor classificação e descrição do TEA nos últimos anos. As características diagnósticas são evidentes no período de desenvolvimento, porém dependem da gravidade da condição, de estímulos de comunicação e interação social e da idade (Lord *et al.*, 2023; DSM-5, 2013). No Brasil, de 2013 a 2019, houve um aumento nos diagnósticos nos Centros de Atenção Psicossocial Infantil e Adolescente do Sistema Único de Saúde (SUS). Quando comparado com dados mundiais, o Brasil tem um diagnóstico tardio (16 a 204 meses) e relacionado com o nível socioeconômico dos pacientes, quanto menor esse nível, mais tarde se dá o diagnóstico (Girianelli *et al.*, 2023). Segundo esses dados, o Brasil apresenta maior número de casos no Nordeste e Sudeste e apenas 30% dos diagnósticos são feitos em idade indicada pela OMS (Girianelli *et al.*, 2023).

O diagnóstico na infância é de suma importância por poder minimizar qualquer potencial deficiência associada ou condição concomitante, maximizar a independência no processo de aprendizagem e aquisição de habilidades adaptativas e minimizar comportamentos problemáticos que possam interferir nas habilidades funcionais (Hyman *et al.*, 2020). Com isso, as intervenções de práticas educacionais, terapias de desenvolvimento e intervenções comportamentais podem ser implementadas em pacientes na primeira infância. Para adultos e jovens que tiveram o diagnóstico tardio, o Programa para Educação e Enriquecimento de Habilidades Relacionais e a terapia cognitivo-comportamental são métodos eficazes para melhoria nas habilidades sociais, bem-estar emocional e autorregulação relacionados a ansiedade e depressão (Genovese e Ellereck, 2022).

Etiologia

A etiologia do TEA é diversa e sem uma causa única, em parte ainda desconhecida, podendo ser resultado de interações genéticas e ambientais, assim como do uso de substâncias tóxicas (Lord *et al.*, 2023). O componente genético foi amplamente estudado no TEA, sendo um dos transtornos de neurodesenvolvimento com maior participação hereditária (Landrigan, 2010; Wang *et al.*, 2023), com um padrão complexo de herança resultado da mutação de diferentes genes. Com isso os genes envolvidos no transtorno podem ser diferentes em cada indivíduo (Vijayakumar e Judy, 2016; Ornoy, 2017). A influência dos fatores genéticos é mais clara quando associados com esclerose tuberosa, síndrome do X frágil e síndrome de Rett, porém estão presentes em menos de 10% dos casos (Waye e Cheng, 2018). As influências ambientais podem desencadear alterações em indivíduos geneticamente sensíveis, além disso, fatores estressores durante a gestação e distúrbios metabólicos como a disfunção mitocondrial são relatados em 10 a 20% dos casos (Genovese e Butler, 2020).

Diversos fatores já foram relacionados ao processo de programação fetal, tais como ambiente pré-natal, genética, desequilíbrios de neurotransmissores, exposição a xenobióticos, infecção materna e agentes teratogênicos e podem influenciar a etiologia do transtorno (Ornoy *et al.*, 2015; Taleb *et al.*, 2021). Cabe ressaltar que a relação com a imunização vacinal foi uma tentativa errônea de explicar o aumento da incidência do TEA, entretanto diversos estudos refutaram essa hipótese na última década, fortalecendo as evidências da melhora diagnóstica como explicação mais apropriada (para revisão ver Gabis *et al.*, 2022). As causas pré-natais mais comuns podem ser divididas em: 1. exposição a substâncias químicas ambientais como o ácido valpróico, talidomida, misoprosol, álcool, cocaína e metais tóxicos usados pela mãe durante a gravidez, e 2. infecções maternas, como rubéola, inflamação materna e fetal e doenças como diabetes mellitus (Ornoy *et al.*, 2015; Lord *et al.*, 2020).

Exposição ao ácido valpróico na gestação

Como relatado anteriormente, na etiologia do TEA, por mais que algumas mutações genéticas sejam conhecidas, é tipicamente idiopática, na qual uma causa genética não é estabelecida, podendo também ser influenciada por fatores ambientais (Sandin *et al.*, 2014), incluindo toxinas, pesticidas, infecções e o uso pré-natal de ácido valpróico (VPA) (Nicolini e Fahnestock, 2018). O VPA é um fármaco antiepiléptico, usado na terapia da epilepsia, episódios maníacos e no transtorno bipolar. Seu mecanismo de ação é multialvo, sendo capaz de alterar a neurotransmissão por meio de modulação nos canais de cálcio (Bolanos e Medina, 1997),

regular a expressão gênica através do remodelamento da cromatina pela inibição da atividade da enzima histona desacetilase, influenciar a transcrição de genes ligados à plasticidade neuronal, transmissão sináptica e neurogênese (Ghodke-Puranik *et al.*, 2013), inibir os canais de sódio e aumentar os níveis do ácido gama-aminobutírico (GABA), além de melhorar a síntese de GABA (Rahman *et al.*, 2023).

A exposição de gestantes ao VPA durante o primeiro trimestre da gravidez tem um potencial teratogênico bem conhecido e ocasiona defeitos no tubo neural, malformações congênitas, defeito no septo atrial e na fenda palatina (Nau *et al.*, 1991; Werler *et al.*, 2011). Essa exposição é um fator de risco para o TEA e originalmente foi associada à síndrome do valproato fetal (Clayton-Smith e Donnai, 1995, DiLiberti *et al.*, 1984). Pacientes com essa síndrome estão fortemente relacionados a pacientes com o TEA comparando-se anomalias craniofaciais, malformações nos órgãos, atraso no desenvolvimento neurológico e déficits sociais (Christianson *et al.*, 1994, Williams e Hersh, 1997, Williams *et al.*, 2001). Posteriormente, Christensen e colaboradores (2013) concluíram que o uso materno de VPA durante a gravidez é associado a um risco aumentado de TEA na prole.

Em relação às alterações anatômicas induzidas pelo VPA na gestação, foram observadas redução do número de células de Purkinje no cerebelo, dano nos nervos cranianos (Rodier *et al.*, 1997; Ingram *et al.*, 2000), aumento da plasticidade sináptica no córtex pré-frontal (Sui & Chen, 2012), alterações em estruturas neurais e encefálicas, na conectividade e no balanço excitatório-inibitório (Banerjee *et al.*, 2013; Christensen *et al.*, 2013; Bristot *et al.*, 2013).

Tratamentos farmacológicos

Os tratamentos disponíveis que apresentam benefícios parciais tratam apenas os sinais e sintomas associados, sendo incapazes de reverter ou prevenir o surgimento do TEA. Os sinais comportamentais que influenciam na qualidade de vida das pessoas no espectro desafiam o tratamento devido à grande heterogeneidade do TEA (Lord *et al.*, 2020). Os sinais associados como irritabilidade e agitação, agressão, automutilação e acessos de raiva são comumente tratados com antipsicóticos atípicos, porém, é um tratamento com efeitos adversos como sedação, ganho de peso e risco de distúrbios motores (Stepanova *et al.*, 2011). Outros tratamentos como administração de antidepressivos e estimulantes não demonstram benefício clínico significativo no TEA (Genovese e Butler, 2020).

Explorando novas alternativa terapêuticas, extratos da *Cannabis*, que já têm o uso medicinal caracterizado para dor e convulsões, se tornaram uma possibilidade também para

sinais de ansiedade patológica e fobia social (Riesgo *et al.*, 2013; da Silva Junior *et al.*, 2022). Contendo mais de 540 compostos naturais, mais de 100 foram identificados como fitocanabinóides, até o momento. O componente psicotrópico predominante é o delta9-tetrahydrocannabinol (THC), enquanto o principal componente não psicoativo é o canabidiol (CBD). Esses compostos agem no sistema endocanabinoide composto dos receptores CB1 e CB2, como agonistas ou antagonistas parciais. O THC e o CBD têm ação terapêutica como analgésicos, agentes antiinflamatórios, antiepilépticos e como protetor da neurodegeneração (Amin e Ali, 2019). Interessantemente, estudos realizados com alguns indivíduos com TEA indicam alterações de opioides endógenos como a beta-endorfina, sendo assim há interesse no uso dos canabinoide como opção de tratamento (Sandman, 1991; Sandman, 1992, Tordjman *et al.*, 1997; Gillberg *et al.*, 1990, Tordjman *et al.*, 2009). Apesar do CBD ter um potencial terapêutico com dados clínicos e pré-clínicos sobre segurança e eficácia, ainda não existem estudos clínicos randomizados que possam incluir a terapia com *Cannabis* medicinal para o TEA (da Silva Junior *et al.*, 2022).

Peptídeos neuroativos de peçonhas de vespas sociais

Os estudos sobre peçonhas de animais têm crescido vertiginosamente com o objetivo de controlar várias doenças, inclusive as neurológicas (Pemberton, 1999; Adewole *et al.*, 2013; Bogdanov, 2015; Silva *et al.*, 2015). As peçonhas são ricas em compostos, contendo de 100 a 150 substâncias bioativas (Mortari e Cunha, 2013; Silva *et al.*, 2015). Os compostos bioativos despertaram interesse medicinal devido às suas potências, suas especificidades e diversidades de propriedades, podendo ter diversos efeitos terapêuticos, como analgésicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antineoplásicos (von Reumont *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2015).

A peçonha de vespas sociais contém diversas classes de moléculas, em especial moléculas neuroativas, com relevante potencial para o desenvolvimento de novos fármacos e possíveis tratamentos farmacológicos, auxiliando no estudo das funções normais e patológicas do sistema nervoso (Mortari *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2015). Na peçonha bruta seca extraída de vespas sociais, 70% das moléculas neuroativas são peptídeos responsáveis por diversas funções biológicas (Dohtsu *et al.*, 1993; Dias *et al.*, 2014).

O primeiro peptídeo bioativo bem descrito de vespas sociais foi o Mastoparano (MP), descoberto da peçonha da vespa oriental *Vespula lewisii*, apresenta grande capacidade de degranulação de mastócitos (Hirai *et al.*, 1979). Posteriormente, foram descobertos peptídeos com as mesmas características em outras espécies de vespas, o que tornou os mastoparanos uma

classe importante nas peçonhas de vespas sociais (Nakajima *et al.*, 1986; Mizoguchi *et al.*, 2011). Moser (2018) desenvolveu uma nova molécula bioinspirada de mastoparanos (Agelaia-MP) com propriedades antinociceptivas, denominada NeuroVAL, administrado por via intracerebro-ventricular (i.c.v) foi capaz de produzir um efeito antinociceptico duas vezes mais potente que a morfina.

Ensaio revelaram que o NeuroVAL é um potente peptídeo neuroativo com capacidade de bloquear correntes de canais de sódio voltagem dependentes do tipo 1.7, não possui atividade hemolítica ou citolítica, além de ser um ativador de receptores acoplados à proteína G. Ao ser injetado i.c.v é capaz de ativar receptores metabotrópicos ligados ao sistema opioide endógeno, levando a um efeito antinociceptivo. Esse estudo contribui com dados que comprovam a importância da síntese bioinspirada para o desenvolvimento de novos fármacos (Moser, 2018).

Outra classe de peptídeos identificada na peçonha de vespas sociais é a formada por peptídeo quimiotáticos, como o peptídeo denominado Protonectina encontrado na vespa *Parachatergus fraternus*. Galante (2014) desenvolveu o peptídeo Protonectina-F, composto sintético bioinspirado a partir da Protonectina e que promoveu melhores atividades antinociceptivas que o peptídeo natural e ancestral. Galante (2019) testou a capacidade antinociceptiva comparada ao sulfato de morfina e resultou em um menor efeito adverso, como o déficit motor (teste de ataxia) quando administrado via i.c.v. Além disso, no teste realizado com o antagonista de receptor canabinoide CB1, AM251, foi observado uma ação inibitória do índice antinociceptivo provavelmente causada por uma interação no sistema canabinoide. Na avaliação do peptídeo após múltiplas administrações, a Protonectina-F preservou atividade antinociceptiva, comprovando que sua ação não causa tolerância (Galante *et al.*, 2023).

Modelos animais de estudos pré-clínicos demonstraram que a modulação do sistema endocanabinoide melhora certas deficiências sociais e cognitivas associadas ao TEA, que podem ser explicadas por neurotransmissões excitatória e inibitória desequilibradas (Zamberletti *et al.*, 2017). O sistema endocanabinoide está associado a diversas funções biológicas tais como recompensa social, desenvolvimento neural, ritmos circadianos e controle de sinais da ansiedade (Chakrabarti *et al.*, 2015). Um estudo, utilizando um agonista do receptor canabinoide (WIN55,212-2), observou uma redução no comportamento agressivo após sua administração (Hosie *et al.*, 2018). A administração de THC também pode levar a uma redução da interação social, entretanto a coadministração com CBD parece atenuar esse efeito (Malone *et al.*, 2009). Estudos recentes mostraram que o CBD tem uma influência positiva sobre o comportamento social, e assim pode ser considerado um tratamento farmacológico opcional

para o TEA. Adicionalmente, o tratamento com CBD em um modelo animal para a síndrome de Dravet (transtorno de epilepsia infantil grave) demonstrou-se eficaz, reduzindo as convulsões e também comportamentos associados ao TEA (Kaplan *et al.*, 2017). Em outro estudo utilizando um modelo animal para esquizofrenia, a administração crônica de CBD atenuou os déficits na interação social e cognição (Osborne *et al.*, 2017). Desta forma, o sistema canabinoide tem sido estudado como um potencial alvo farmacológico para o tratamento dos principais comportamentos relacionados ao TEA.

Com base na dificuldade do tratamento, a hipótese da pesquisa é de que o tratamento com os neuropeptídeos NeuroVAL e Protonectina-F em animais expostos ao ácido valpróico é capaz de atenuar as alterações de comportamento social, comportamento repetitivo e ansiedade relacionados ao TEA.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Como já indicado, atualmente não existe tratamento específico e eficaz para os comportamentos associados ao TEA. Além disso, os medicamentos utilizados podem apresentar efeitos colaterais, podendo afetar funções neurológicas que não são necessariamente acometidas pelo TEA. Neste sentido, a presente pesquisa tem como objetivo avaliar a eficácia de dois neuropeptídeos bioinspirados da peçonha de vespas sociais, NeuroVAL e Protonectina-F, como uma alternativa promissora para a elaboração de um composto que atue no tratamento dos sintomas comportamentais relacionados ao espectro autista. Essa pesquisa foi realizada em um modelo experimental de exposição ao ácido valpróico durante o 12º dia da gestação em camundongos. Além disso, foi feita uma avaliação dos três parâmetros comportamentais mais frequentemente observados em pacientes com TEA, o comportamento social, o comportamento repetitivo e a ansiedade patológica.

Objetivos específicos

- Induzir alterações sociais e comportamentais em camundongos com uma administração de VPA durante a gestação (padronização do modelo de TEA induzido por VPA).
- Avaliar o efeito social, utilizando o teste de Sociabilidade de Três Câmaras (STC), dos animais que receberam os neuropeptídeos NeuroVAL e Protonectina-F administrados por via intranasal no modelo de TEA induzido por VPA.
- Avaliar as alterações motoras, utilizando o teste do *Open Field* (OF), dos animais que receberam os neuropeptídeos NeuroVAL e Protonectina-F administrados por via intranasal no modelo de TEA induzido por VPA.
- Avaliar sinais de comportamentos ansiosos, utilizando o teste do Labirinto em cruz Elevado (LCE), dos animais que receberam os neuropeptídeos NeuroVAL e Protonectina-F administrados por via intranasal no modelo de TEA induzido por VPA.
- Avaliar comportamentos repetitivos, utilizando o teste de Enterramento de Bolinhas (em inglês, *Marble Burying*) (MB) dos animais que receberam os neuropeptídeos NeuroVAL e Protonectina-F administrados por via intranasal no modelo de TEA induzido por VPA.

METODOLOGIA

O manuseio dos animais experimentais foi de acordo com a Lei nº 11.749/2008, conhecida como Lei Arouca, que regulamenta o uso de animais na pesquisa. De acordo também com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) seguindo rigorosamente seus princípios. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da UnB, processo número 23106.147095/2018-89. Além disso foi obtido cadastro com finalidade de pesquisa no Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, de cadastro nº ACB5875 e nº AE7A93D.

Neste estudo utilizou-se camundongos *Swiss (Mus musculus)* de ambos os sexos obtidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, respeitando o número máximo de seis animais por gaiola. Todos foram submetidos ao ciclo claro e escuro de 12 hora cada, a temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de 55% controladas. Foram ofertadas água e alimentação a vontade durante todo o ciclo de vida do animal.

Peptídeos

O peptídeo Neuroval, com a sequência inédita IFWLFRGKADVAL-NH₂ e O peptídeo Protonectina-F, com a sequência IFGTILGFLKGL-NH₂ foram sintetizados pela empresa Biontech Soluções em Biotecnologia LTDA. A confirmação do grau de pureza, a inspeção da massa e a confirmação da sequência do peptídeo foram realizadas pela empresa responsável pela síntese antes do início dos experimentos e após a entrega do peptídeo por espectrometria de massas (MALDI/TOF) com massa de 1534,84 g/mol e 1277,60 g/mol, respectivamente. Para a utilização nos ensaios experimentais, os peptídeos foram solubilizados em solução fisiológica 0,9% com adição de 20% de dimetilsulfóxido (DMSO – Dinâmica®).

Modelo de TEA induzido pelo VPA

O modelo de TEA induzido pela exposição ao VPA durante o período pré-natal foi utilizado na presente pesquisa. O VPA foi administrado em dose única no dia 12º dia gestacional (DG) na dose de 600 mg/kg, conforme pode ser observado no esquema da figura 1. O VPA foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology Inc., com pureza de >97%. Pesado no dia anterior a administração e solubilizado em solução salina NaCl 0,9%.

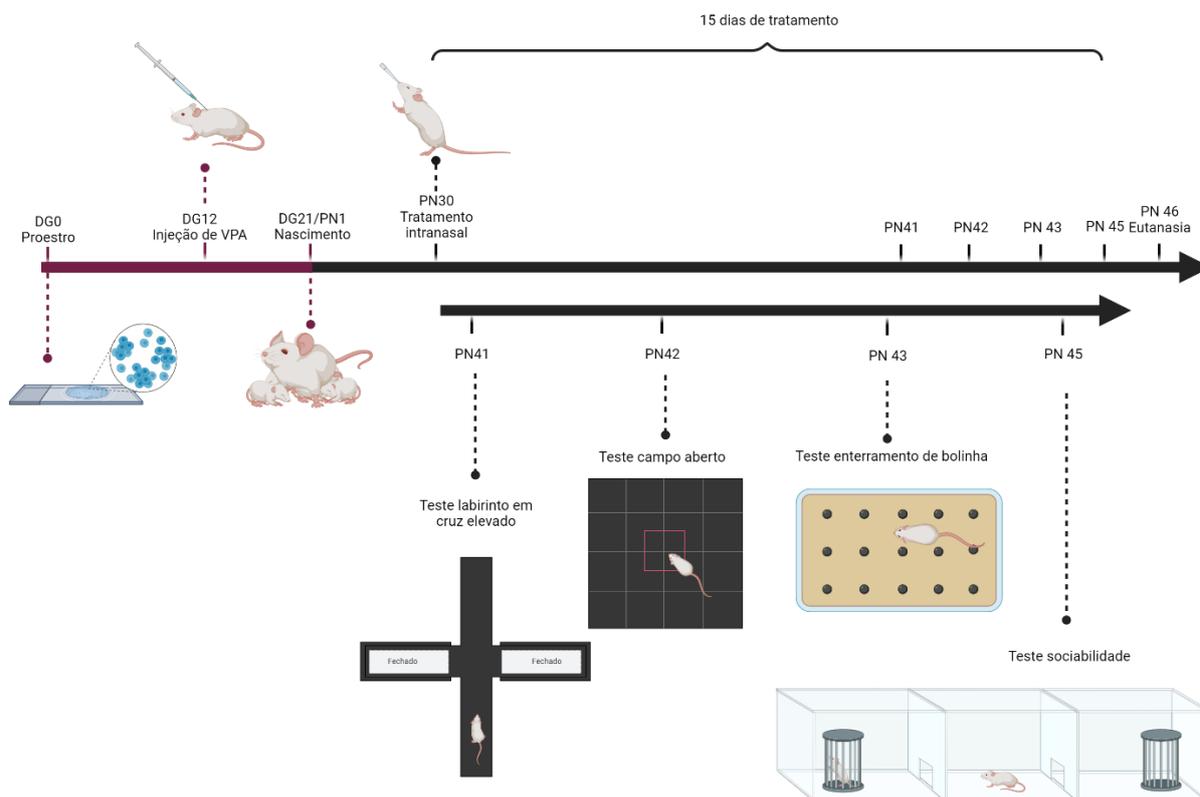


Figura 1: Esquema metodológico dos experimentos. O protocolo se inicia pela análise citológica e determinação da fase do ciclo estral (DG0), pós cruzamento é feita a injeção de VPA (DG12), após nascimento (DG21/PN1) os animais são separados até o dia PN30 onde inicia-se o tratamento, ao longo do tratamento são feitos os testes LCE, OF, MB e avaliação do efeito social e finalmente, após os testes os animais são eutanasiados. Feito no Biorender.

Animais Experimentais

Os animais testados foram obtidos por meio de acasalamento após análise do lavado vaginal (metodologia explicada a seguir), o dia seguinte foi nomeado como DG1. Isso se deu devido à importância de monitorar a gestação para injeção subcutânea de VPA exatamente no DG12. Nesse dia, as fêmeas foram alojadas em caixas separadas e então divididas em dois grupos experimentais: 1) Grupo VPA - injeção de dose 600 mg/kg de valproato de sódio diluído em NaCl 0,9% por via subcutânea; 2) Grupo controle - injeção subcutânea de NaCl 0,9% (salina) em volume equivalente (200 μ L).

O dia do nascimento da prole é considerado como dia 1 pós-natal (PN1). O desmame foi realizado no dia PN21, o momento em que cada ninhada foi separada da respectiva progenitora e, então, identificadas e categorizadas por sexo, sendo organizado de 2 a 4 animais por caixa. As opções de tratamento por via intranasal (i.n) (PN30 a PN45) foram: 1) Uso de 0,5

mg/kg de NeuroVAL (diluído em solução Salina + 20% Dimetil sulfóxido - DMSO); 2) Uso de 2 mg/kg de NeuroVAL (diluído em solução Salina + 20% DMSO); 3) Uso de 4 mg/kg de NeuroVAL (diluído em solução Salina + 20% DMSO); 4) Uso de 0,5 mg/kg de Protonectina-F (diluído em solução Salina + 20% DMSO); 5) Uso de 4 mg/kg de Protonectina-F (diluído em solução Salina + 20% DMSO); 7) Uso de solução cloreto de sódio 0,9% com 20% de DMSO, em volume equivalente ($5 \mu\text{L}$), que podem ser observadas nas tabelas 2 e 3.

Para a administração por via i.n foi usada uma bomba de anestesia inalatória (Bonther®) contendo Isoflurano (Cristália®) com vazão de 2,0 L/min de ar e taxa de 4,0% de isofluroano, durante um tempo entre 20 e 40 segundos para conter o animal tempo suficiente do tratamento, a fim de evitar que o animal o rejeitasse. Após indução de anestesia leve, foi usada uma seringa de precisão (Hamilton®) associada a um fio de polietileno para injetar o volume adequado de $5 \mu\text{L}$. As administrações foram feitas em narinas intercaladas durante os 15 dias (figura 2).

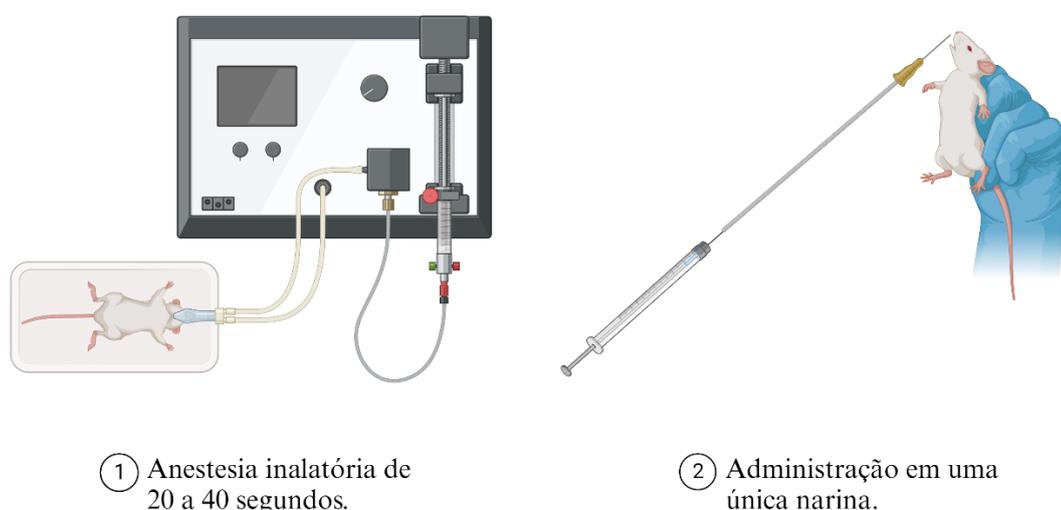


Figura 2: Representação esquemática da administração intranasal, após anestesia inalatória administração do volume total da seringa em uma das narinas. Feito no Biorender.

Tabela 2: Representação esquemática dos grupos de tratamento com o peptídeo NeuroVAL, com n experimental de indivíduos.

Injeção DG12	Tratamento		Tratamento Machos	
	Fêmeas	n		n
Veículo	Veículo	13	Veículo	13
	0,5 mg/kg	8	0,5 mg/kg	8
	2,00 mg/kg	6	2,00 mg/kg	3
	4,00 mg/kg	7	4,00 mg/kg	6

	Veículo	12	Veículo	14
VPA	0,5 mg/kg	8	0,5 mg/kg	7
	2,00 mg/kg	6	2,00 mg/kg	3
	4,00 mg/kg	8	4,00 mg/kg	12

Tabela 3: Representação esquemática dos grupos de tratamento com o peptídeo Protonectina-F com n experimental de indivíduos.

Injeção DG12	Tratamento		Tratamento Machos	
	Fêmeas	n		n
Veículo	Veículo	13	Veículo	13
	0,5 mg/kg	4	0,5 mg/kg	8
	4,00 mg/kg	7	4,00 mg/kg	8
VPA	Veículo	12	Veículo	14
	0,5 mg/kg	2	0,5 mg/kg	4
	4,00 mg/kg	9	4,00 mg/kg	9

Protocolo Pré-natal

O protocolo consiste na análise do lavado vaginal adaptado de MCLean e colaboradores (2012). O processo consiste na inserção de 20 μ L de solução salina na vagina do animal, repetido a lavagem por 3 vezes e análise microscópica após secagem e coloração. O acompanhamento do ciclo foi necessário para controle das etapas de cruzamento, injeção do VPA e nascimento da prole, permitindo conseguir um grupo mais homogêneo (Vilela e colaboradores, 2007).

O ciclo estral é composto por 4 fases, estro, metaestro, diestro e pro-estro (figura 3). O ciclo tem duração de 4-6 dias (MCLean *et al.*, 2012). Após o lavado vaginal a amostra é colocada na lâmina e quando seca, corada com Panótico, um fixador hematológico, e Cresil violeta 1%. Na análise microscópica é definida a fase do ciclo, observado no aumento de 100x através do sistema de captura de imagens de um microscópio óptico (Leica DM2000, Leica Microsystems, São Paulo) com uma câmera de vídeo digital (Leica DFC 310 FX, Leica Microsystems, São Paulo), conectados a um computador equipado com o software (Leica, Las V4.1.0, Leica Microsystems, São Paulo).

As fêmeas em estro, período com queda de estradiol, ovulação e formação do corpo lúteo (Vilela *et al.*, 2007) foram colocadas 1:1 até 1:3 com um macho durante 24 horas. No dia seguinte, ainda é possível a análise de plug vaginal que é indicativo de copulação, ainda que

não indique a concepção. As fêmeas pós cruzamento têm a massa corporal analisada nos dias DG5, DG10 e DG12 e em caso de aumento da massa corporal de 2 a 5 g houve injeção do VPA no dia DG 12. A prole nasceu entre os DG 19-21.

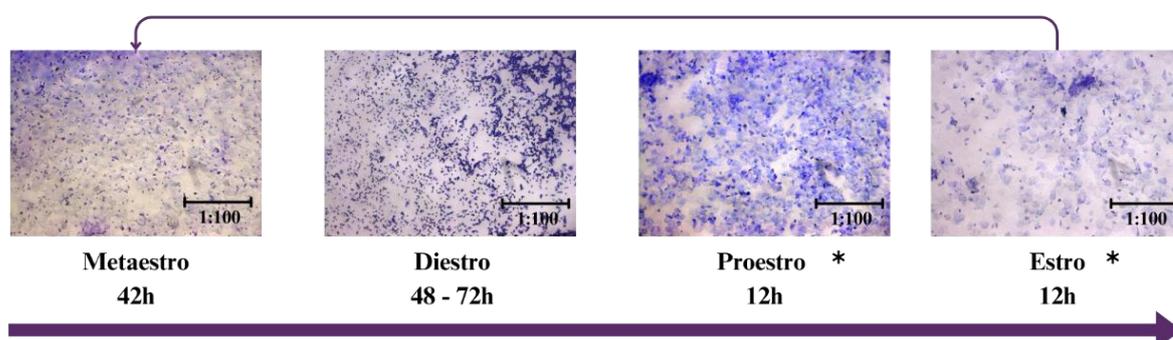


Figura 3: Fotomicrografia de lâminas de lavado vaginal e duração, em ordem de cada etapa do ciclo. *: Fases propícias para o acasalamento. Escala 1:100.

Testes Comportamentais

Para a execução de todos os testes houve um período de habituação da iluminação e dos ambientes da sala de testes, durante 30 minutos após o tratamento administrado, expostos a uma luminosidade média de 400 lúmens. Os seguintes testes foram realizados com um total de 185 animais, sendo 90 fêmeas e 95 machos de acordo com o esquema metodológico explicado na figura 1. Após os ensaios comportamentais os animais foram eutanasiados.

Teste de Sociabilidade

O Teste Sociabilidade em Três Câmaras (Crawley, 2004) foi realizado com a livre escolha do roedor em passar o tempo em qualquer um dos três compartimentos da caixa durante a sessão experimental. A caixa é dividida em compartimentos, onde em um dos compartimentos laterais, este pode realizar contato indireto com um animal não-familiar em um cilindro de contenção, um compartimento de transição e um deles com o mesmo cilindro sem nenhum animal para interagir (figura 4) (Kaidanovich-Beilin *et al.*, 2011). O teste foi realizado no dia PN45, após uma sessão de habituação no aparato no dia PN44 simulando o teste.

O aparato do STC consiste em uma caixa de acrílico transparente (20 cm x 22,5 cm x 40 cm), dividida em três câmaras de tamanhos iguais, separadas por duas portas de correr. Em ambas as câmaras laterais, são posicionadas grades (raio = 8,0 cm, altura = 20,0 cm) confeccionadas para a contenção de camundongos. No momento do teste, uma das câmaras têm o cilindro de contenção vazios enquanto a outra contém um camundongo, previamente

habituação de mesmo sexo do camundongo testado. Após 5 minutos de permanência na câmara central, as portas de correr foram puxadas e o camundongo teve livre acesso às câmaras laterais por um período de 10 minutos. As imagens foram gravadas por uma câmera de vídeo posicionada acima do aparelho para análise posterior. As variáveis quantificadas foram: tempo de permanência na câmara vazia, e tempo de permanência na câmara contendo o animal não-familiar e tempo interagindo diretamente com o animal não-familiar.

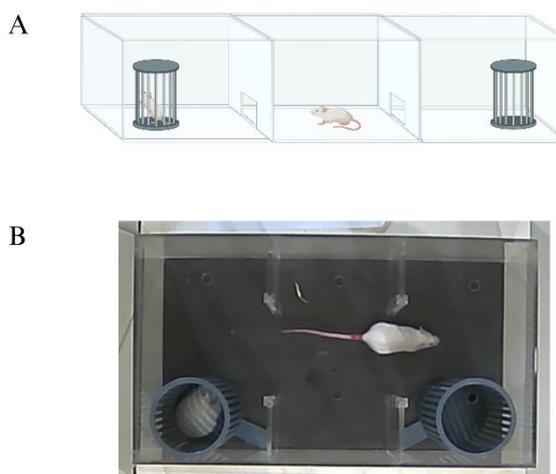


Figura 4: A: Representação esquemática do teste STC. B: Imagem do teste pelo campo de visão em que ele é analisado.

Teste de Comportamento Repetitivo

O Teste de enterramento de bolas (bolas plásticas de 2,5 cm de diâmetro) é utilizado para avaliação do comportamento repetitivo no dia PN43. O aparato consiste em uma caixa de polipropileno (41x34x16cm – comprimento x largura x altura) (figura 5), semelhante a caixa em que vivem contendo 5 cm de profundidade de maravalha. Os camundongos foram colocados no dia anterior ao teste na caixa em que foram testados, com a quantidade de maravalha do teste, esse foi considerado o período de habituação ao aparato. Após esse período, 12 bolas pretas foram arranjadas na superfície da caixa. E então, os animais foram colocados no equipamento contendo as bolas por um período de 20 minutos (Thomas *et al.*, 2009). Os camundongos foram removidos do equipamento e o número de bolas cobertas pela maravalha até mais de 60% foi contabilizado.

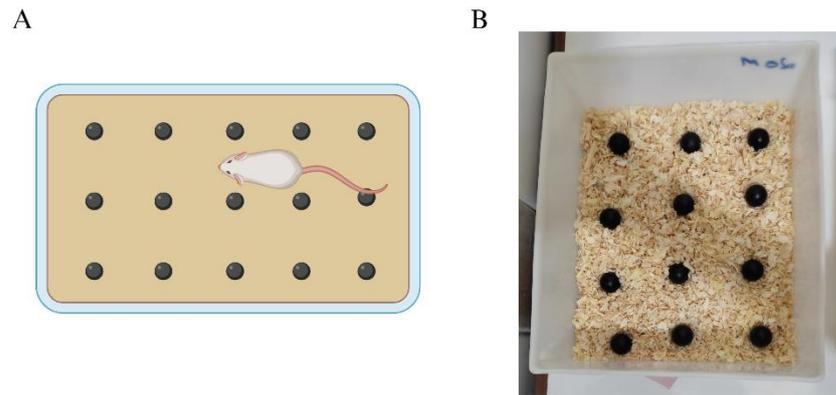


Figura 5: A: Representação esquemática do teste de enterramento. B: Imagem do teste com as bolas e posição em que são analisadas.

Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em cruz elevado é considerado um dos melhores testes para análise de comportamentos ansiosos em modelos experimentais, sendo frequentemente utilizado para a avaliação do efeito de fármacos ansiolíticos (File, 1987). O equipamento tem formato em cruz e consiste em dois braços abertos (sem paredes) e dois braços fechados (com paredes) perpendiculares entre si, conectados por uma plataforma central e elevados 50 cm do chão, como na figura 7. No dia PN41, os camundongos foram colocados individualmente no centro do equipamento, voltado para um dos braços abertos. O animal pode explorar o labirinto por 5 min (Sala-Roca *et al.*, 2002; Carobrez e Bertoglio, 2005). Os testes foram gravados para análise posterior. A comparação dos tempos passados nos braços abertos (BA) e nos braços fechados (BF) foram usados como índices de ansiedade, considerando o tempo no braço fechado como comportamento ansiogênico. Após cada sessão, o aparato foi higienizado com solução etanol 70% para remoção de pistas olfativas, bem como resíduos orgânicos de cada animal.

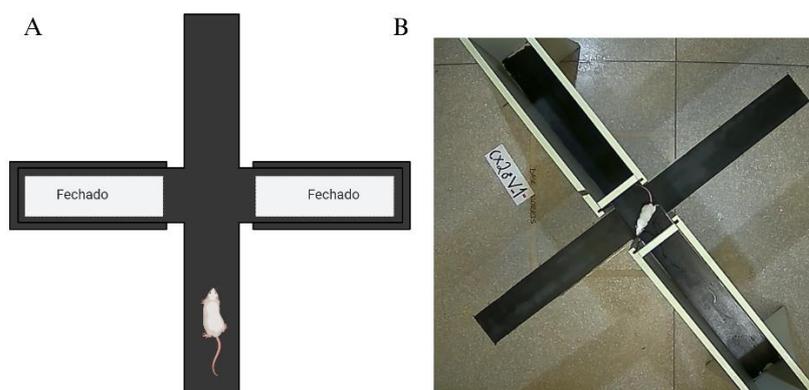


Figura 6: A: Representação esquemática do LCE. B: Imagem do teste pelo campo de visão em que é analisado.

Teste do campo aberto (*Open Field*)

O teste do campo aberto (em inglês *Open Field*) foi realizado para determinação da atividade locomotora (Prut e Belzung, 2003). Ele consiste em uma arena circular de diâmetro 61,5 cm, dividida entre zona interna e externa, cercada por uma parede de forma que o animal não consiga fugir, como na figura 6. O animal foi colocado no círculo da zona central da arena no dia PN42 durante 20 minutos. Para avaliar a atividade locomotora, foi analisada a distância percorrida nos 15 minutos finais, considerando os 5 primeiros minutos como tempo de ambientação.

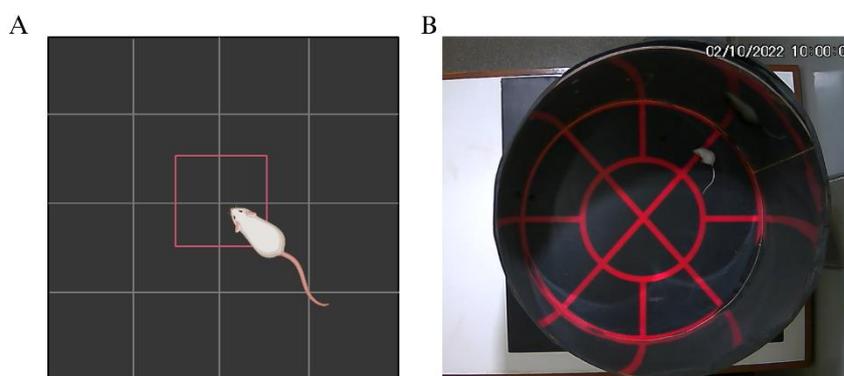


Figura 7: A: Representação esquemática do OF. B: Imagem do OF pelo campo de visão que é analisado.

Análise estatística

Os resultados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism®10.0 (Massachusetts Institute of Technology, MIT, EUA). Os resultados obtidos das análises dos softwares Anymaze e Boris Behaviour, foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey ou teste de hipótese T de Student e foram considerados significantes, valores com $p < 0,05$. O teste de sociabilidade foi analisado pelo software Boris Behaviour, os testes LCE e OF foram analisados pelo Anymaze e o teste MB por contagem cega de fotos.

RESULTADOS

Os animais gerados durante o processo foram resultantes de um total de 28 fêmeas grávidas a partir de 89 cruzamentos, resultando em uma taxa de sucesso de aproximadamente 31%, todas as gestações foram após análise do lavado vaginal iniciados em 19/05/2022 e concluídos em 14/11/2023.

Para o início dos experimentos, a pureza dos peptídeos foi testada e foi constatada um alto grau de pureza, com valor de $>98\%$ (dados não mostrados).

Avaliação do comportamento social

Os dados dos animais no modelo VPA de exposição pré-natal foram avaliados comparando o tempo de interação do animal testado com o animal não-familiar no cilindro de contenção. Os dados obtidos mostraram que os animais expostos ao VPA, de ambos os sexos, tiveram um tempo de interação menor que os animais não expostos ao VPA. A análise de teste T da interação mostrou que entre os machos [T=2,233] houve uma diferença significativa ($p=0,036$) e as fêmeas [T=2,751] também tiveram diferença ($p=0,0111$), comparando controle e VPA, como observado na figura 8.

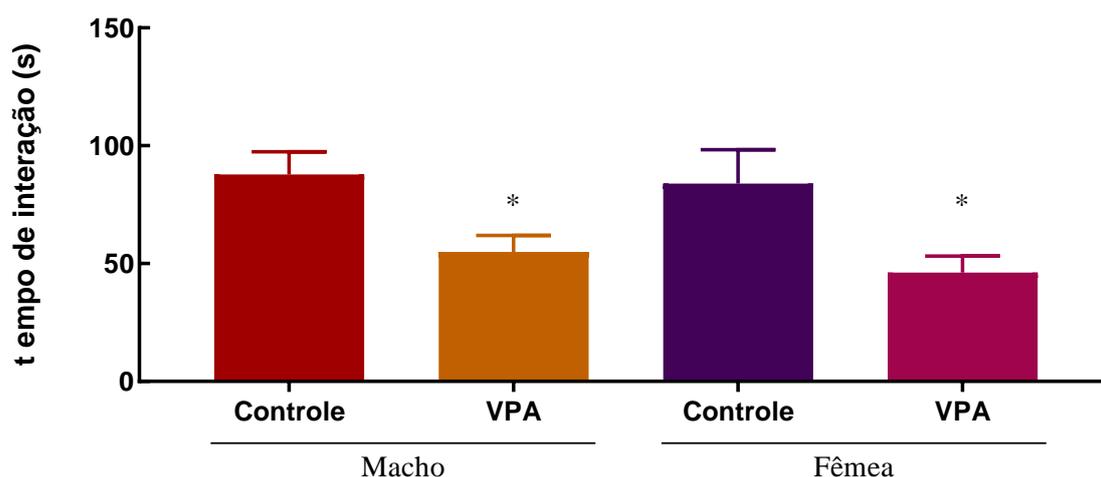


Figura 8: Tempo de interação de machos e fêmeas comparando controle e VPA no teste STC. Os dados foram submetidos à teste T. Histogramas representam as médias, com barra de erro denominada erro padrão da média. Diferença significativa ($p < 0,05$) com o respectivo grupo controle de cada sexo (*) estão indicados acima.

As alterações sociais analisadas por meio do tempo de interação com o animal não familiar no teste STC dos animais tratados com o peptídeo NeuroVAL, nas doses de 4,0, 2,0 e 0,5 mg/kg administrados por via i.n. Em relação aos machos não expostos, não houve alteração de comportamento e no grupo exposto ao VPA, o comportamento foi alterado na menor dose do tratamento, aumentando a interação comparada ao VPA. Na figura 9 A, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os machos que não foram estimulados com VPA [$F(3, 26) = 0,9644$, $p > 0,05$], diferente do que houve com os machos expostos ao VPA (figura 9 B) com diferença significativa [$F(3, 31) = 3,430$, $p = 0,029$], identificada no pós-teste Tukey entre o VPA e a dose de 0,5 mg/kg.

Em relação as fêmeas não expostas ao VPA o teste mostrou um aumento da interação com as maiores doses do tratamento e as fêmeas no grupo exposto ao VPA, o comportamento foi alterado na menor dose do tratamento, aumentando a interação comparada ao VPA. Na figura 10 A, ANOVA de uma via mostrou diferença significativa nas fêmeas que não foram estimulados com VPA [$F(3, 30) = 6,417$, $p = 0,0017$], o pós-teste Tukey identificou a diferença entre o veículo e as duas maiores doses do tratamento. Na figura 10 B as fêmeas expostas ao VPA, o pós-teste Tukey identificou que o tratamento da dose de 0,5 mg/kg obteve diferença significativa em relação ao VPA.

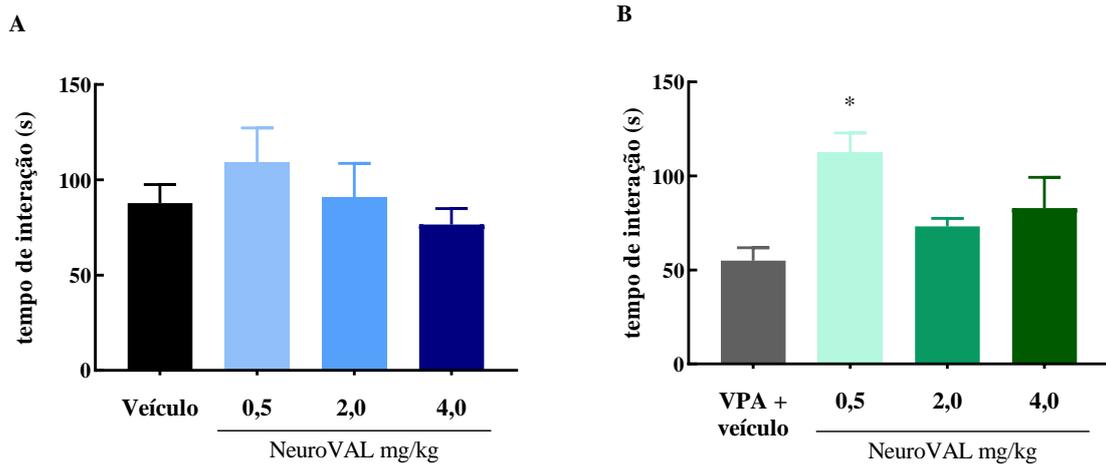


Figura 9: Tempo de interação dos machos no teste STC tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com barra de erro padrão da média. Diferença significativa ($p < 0,05$) com o VPA (*) indicado acima.

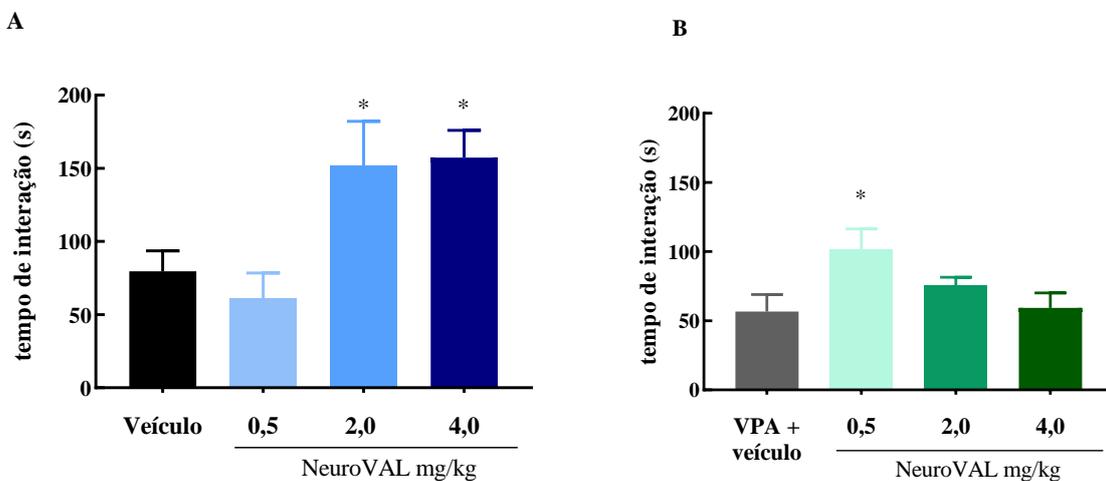


Figura 10: Tempo de interação das fêmeas no teste STC tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com barra de erro padrão da média. Diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo controle (*) de cada gráfico.

As alterações sociais analisadas por meio do tempo de interação com o animal não familiar no teste STC dos animais tratados com o peptídeo Protonectina-F, nas doses de 4,0 e 0,5 mg/kg administrados por via i.n. Em relação aos machos não expostos e os expostos ao VPA tratados com Protonectina-F não mostraram efeito em alterar o tempo de interação. Na figura 11 A e B, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os

machos que não foram estimulados com VPA [$F(2, 26) = 1,222, p > 0,05$], semelhante aos machos expostos ao VPA para o tempo de interação [$F(2, 21) = 0,8635, p > 0,05$].

Em relação as fêmeas não expostas e os expostas ao VPA tratados com Protonectina-F não verificou-se alteração no tempo de interação. Na figura 12 A e B, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os machos que não foram estimulados com VPA [$F(2, 22) = 0,3348, p > 0,05$], semelhante aos machos expostos ao VPA para o tempo de interação [$F(2, 20) = 1,621, p > 0,05$].

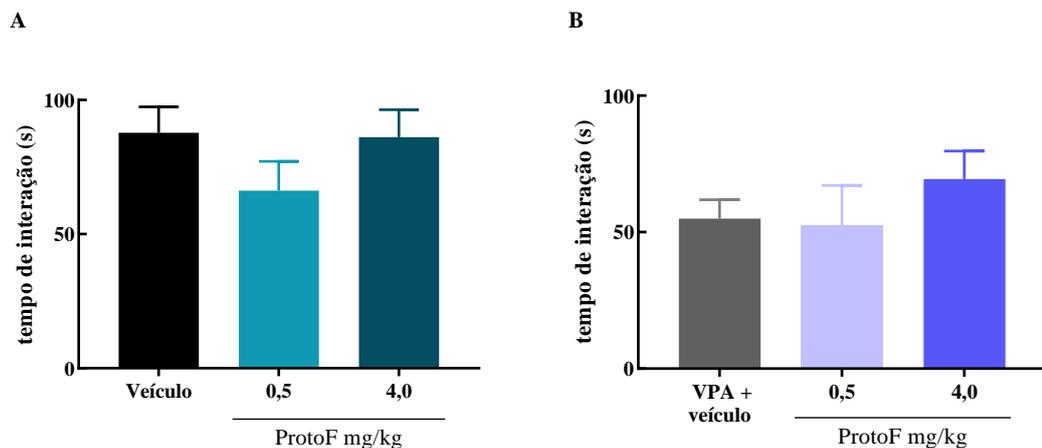


Figura 11: Tempo de interação dos machos no teste STC tratados com Protonectina-F sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com barra de erro padrão da média.

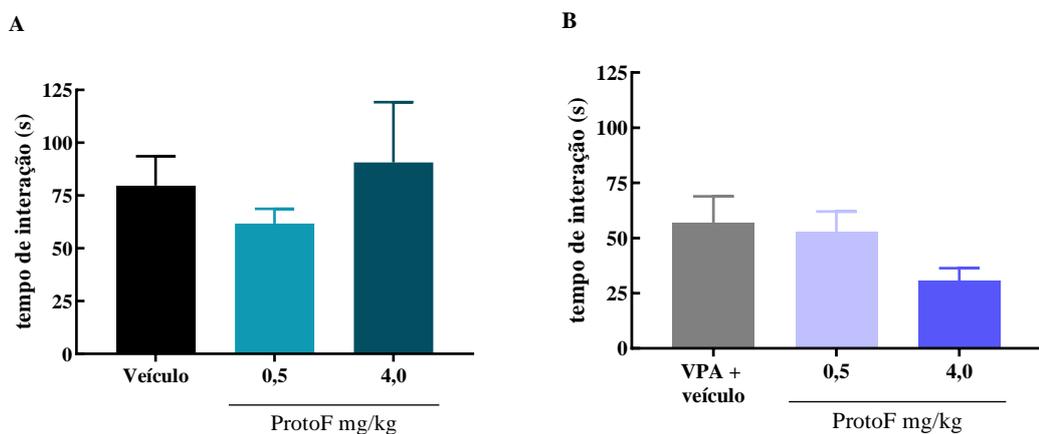


Figura 12: Tempo de interação das fêmeas no teste STC tratados com Protonectina-F sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com barra de erro padrão da média.

Avaliação do comportamento repetitivo (*marble burying*)

Os dados dos animais no modelo VPA de exposição pré-natal foram avaliados comparando a porcentagem de bolas enterradas no teste MB, mostraram que os animais expostos ao VPA apresentaram uma redução no número de bolas enterradas. A análise estatística dos dados por meio do teste T [$T=2,083$] de bolas enterradas mostrou que entre os machos houve uma diferença significativa ($p=0,0477$) entre os grupos controle e VPA. Similarmente, as fêmeas também tiveram diferença ($p<0,0001$) entre os dois grupos [$T=5,586$], como observado na figura 13.

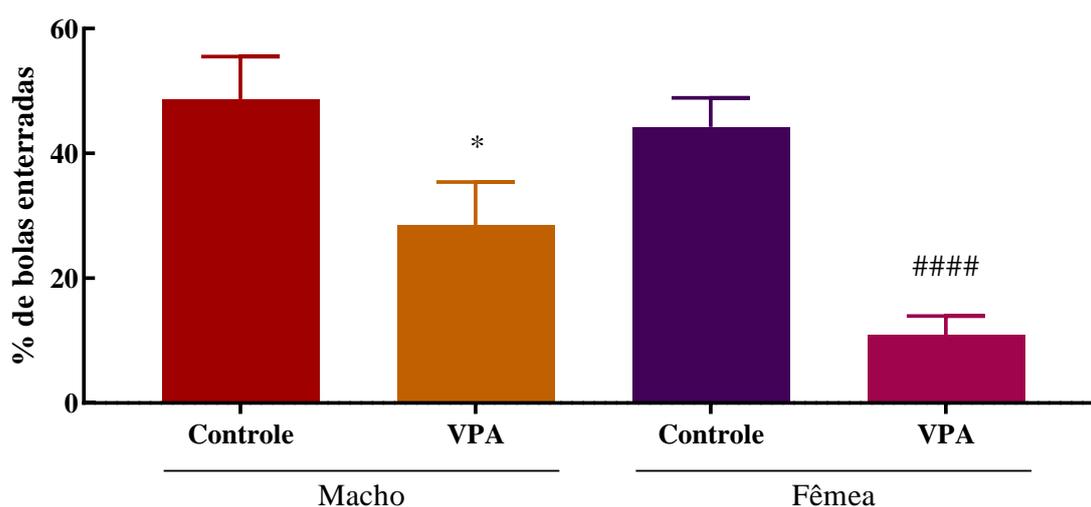


Figura 13: Porcentagem de bolas enterradas por machos e fêmeas comparando controle e VPA no teste do MB. Os dados foram submetidos ao teste T. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média. Diferença significativa ($p<0,05$) com o grupo controle macho (*) de cada gráfico e diferença significativa ($p<0,001$) com o grupo controle fêmea (#####) estão indicados acima.

Os dados dos comportamentos repetitivos no teste MB de animais tratados com NeuroVAL nas doses 4,0, 2,0 e 0,5 mg/kg administrados por via i.n foram analisados. Na figura 14 A, a ANOVA de uma via mostrou que houve diferença significativas no ensaio sem exposição [$F(3, 24) = 3,418$, $p=0,0334$], o pós-teste Tukey mostrou diferença entre o grupo veículo e a maior dose de tratamento. O ensaio com exposição ao VPA não apresentou diferença significativa de dados de bolas enterradas entre os tratamentos [$F(3,31) = 0,257$, $p>0,05$] (figura 14 B).

Os dados de comportamento repetitivo das fêmeas que não foram expostas ao VPA não tiveram diferença em relação ao veículo e as fêmeas que foram expostas ao VPA quando tratadas com as doses maior e menor de NeuroVAL aumentaram esse comportamento. Na

figura 15 A, ANOVA mostrou que não houve diferença significativa entre as fêmeas no ensaio sem exposição ao VPA [$F(3, 29) = 1,923$, $p > 0,05$]. No ensaio com exposição ao VPA (figura 15 B) houve diferenças significativas [$F(3, 26) = 6,2991$, $p = 0,0023$], identificado no pós-teste Tukey a diferença foi entre o grupo VPA e a menor dose ($p = 0,0084$) e o grupo VPA e a maior dose de tratamento ($p = 0,0016$).

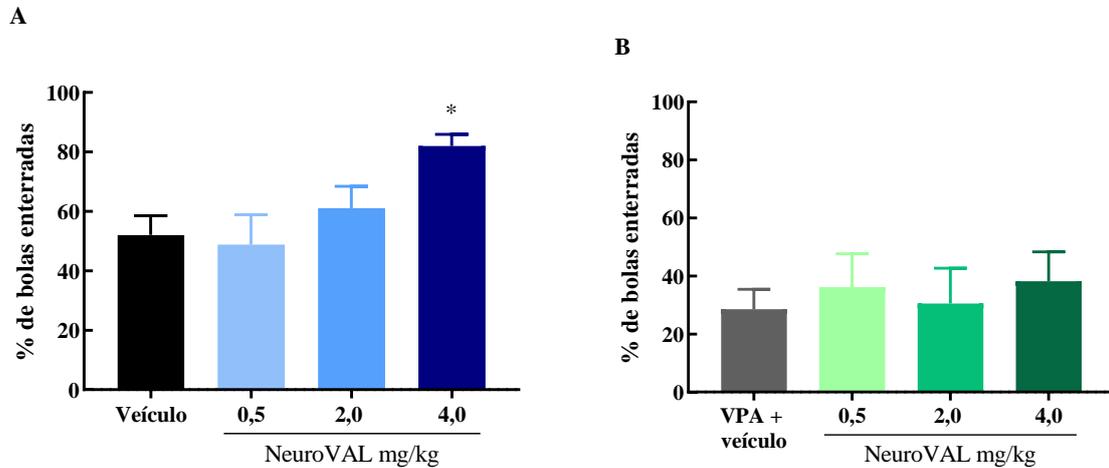


Figura 14: Porcentagem de bolas enterradas dos machos no teste do MB tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Tukey. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média. Diferença significativa com ($p < 0,05$) com veículo (*) está indicada acima.

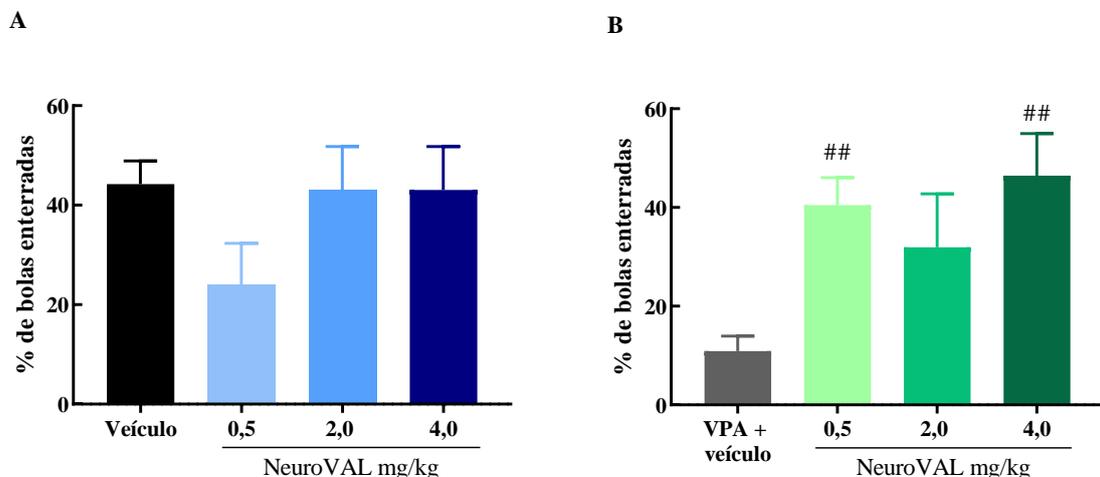


Figura 15: Porcentagem de bolas enterradas das fêmeas no teste do MB tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Tukey. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média. Diferenças significativas ($p < 0,01$) com o VPA (##) estão indicadas acima.

Os dados dos comportamentos repetitivos no teste MB de animais tratados com Protonectina-F nas doses 4,0, e 0,5 mg/kg administrados por via i.n foram analisados, não houve alteração no comportamento por machos. Na figura 16 A e B, a ANOVA de uma via mostrou não houve diferença significativas no ensaio sem exposição [F (2, 26) = 1,682, $p>0,05$], assim como no ensaio com exposição ao VPA não apresentou diferença significativa de dados de bolas enterradas entre os tratamentos [F (2, 24) = 0,8845, $p>0,05$].

As fêmeas expostas ao VPA aumentaram significativamente o efeito do comportamento repetitivo nas duas doses do tratamento. Na figura 17 A, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre as fêmeas no ensaio sem exposição ao VPA [F (2,21) = 1,049, $p>0,05$]. No ensaio com exposição ao VPA (figura 17 B) houve diferenças significativas [F (2,18) = 6,396, $p=0,008$], identificado no pós-teste Tukey identificou a diferença entre o grupo VPA com a menor dose ($p=0,0296$) e a maior dose ($p=0,0241$).

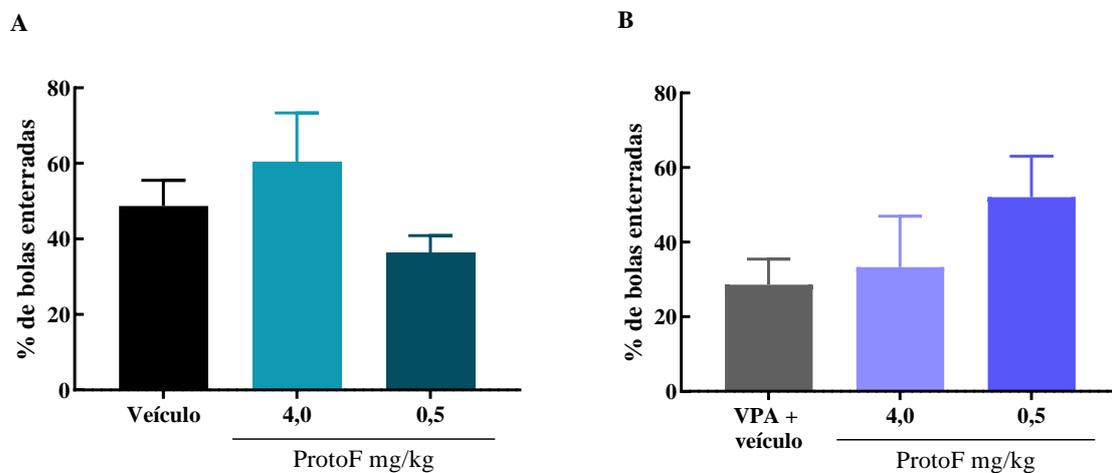


Figura 16: Porcentagem de bolas enterradas dos machos no teste do MB tratados com Protonectina-F sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com barra de erro padrão da média.

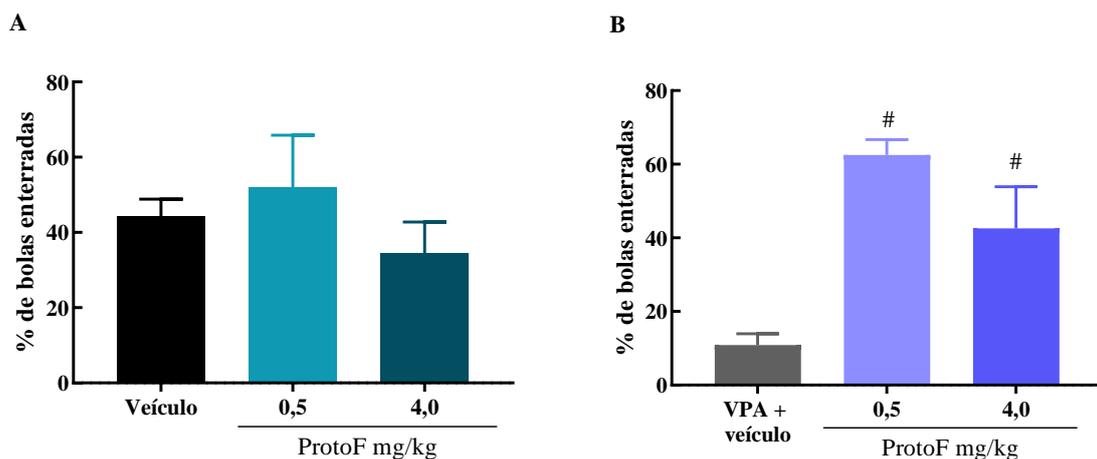


Figura 17: Porcentagem de bolas enterradas das fêmeas no teste do MB tratados com Protonectina-F sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com barra de erro padrão da média. Diferença significativa ($p < 0,05$) com o VPA (#) está indicado acima.

Avaliação do comportamento ansioso (teste labirinto em cruz elevado)

Os comportamentos ansiosos induzidos pelo modelo VPA de exposição pré-natal foram testados comparando os grupos que houve exposição de VPA e que não houve. Os dados mostraram que apenas as fêmeas apresentaram um efeito ansiolítico após a exposição por VPA pré-natal. As análises estatísticas (teste T) em relação ao tempo de permanência dos braços abertos mostrou que entre os machos [$T=0,3224$] controle e VPA, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). As fêmeas [$T=6,366$] que receberam a exposição ao VPA apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo de fêmeas sem o estímulo do VPA ($p < 0,0001$) nos braços abertos. Nos braços fechados, observou-se que não houve diferença significativa entre os machos [$T=0,3224$] ($p > 0,05$) e nas fêmeas, a análise [$T=3,669$] demonstrou uma redução do tempo no braço fechado significativo ($p = 0,0014$). Os dados estão demonstrados na figura 18.

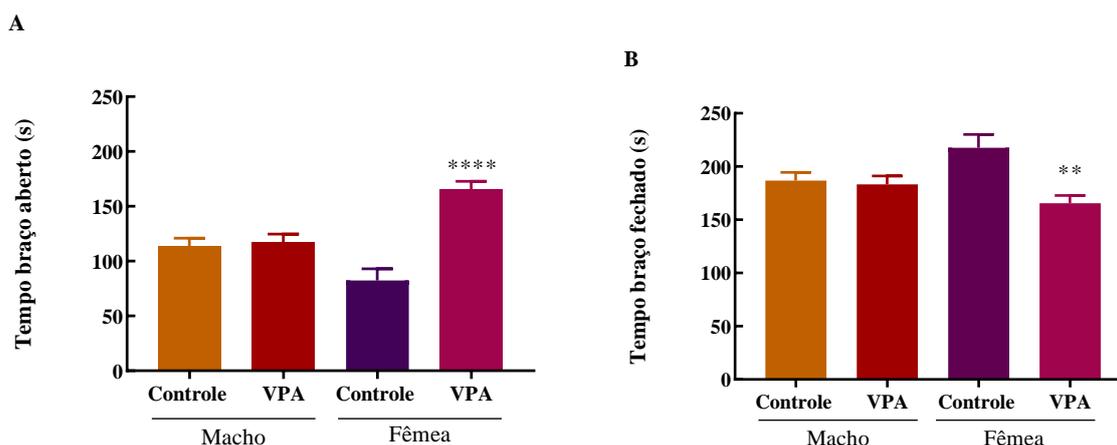


Figura 18: Tempo de permanência nos braços do LCE de machos e fêmeas, comparando os grupos controle negativo e grupo VPA no LCE, (A) nos braços abertos e (B) nos braços fechados. Os dados foram submetidos ao teste T. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média. Diferenças significativas com ($p < 0,01$) no braço fechado em relação a fêmea controle (**) e diferença significativa com ($p < 0,0001$) no braço aberto com fêmea controle (****) estão indicadas acima.

O efeito do comportamento ansioso foi avaliado com base no tempo de permanência nos braços abertos no teste do LCE dos animais tratados com o peptídeo NeuroVAL, nas doses de 4,0, 2,0 e 0,5 mg/kg administrados por via i.n. Em relação aos machos, os dados obtidos dos

grupos não expostos e dos expostos ao VPA tratados com o NeuroVAL não mostraram efeitos em alterar o tempo de permanência no braço aberto. Na figura 19 A, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os machos que não foram estimulados com VPA [$F(3, 36) = 0,6446, p > 0,05$], similar ao observado nos machos estimulados com VPA para o tempo de permanência no BA [$F(3, 31) = 0,8831, p > 0,05$] na figura 19 B.

Em relação as fêmeas, foi observado efeito ansiolítico na dose mais alta nos ensaios sem exposição de VPA. Na figura 20 A, ANOVA mostrou diferenças significativas nas fêmeas não expostas ao VPA [$F(3, 30) = 4,221, p = 0,0133$], o pós-teste Tukey identificou a diferença entre o veículo e o a maior dose ($p = 0,010$). Nos ensaios expostas ao VPA, as fêmeas (figura 20 B) no teste ANOVA de uma via não demonstra diferença significativa [$F(3, 30) = 0,4186, p > 0,05$].

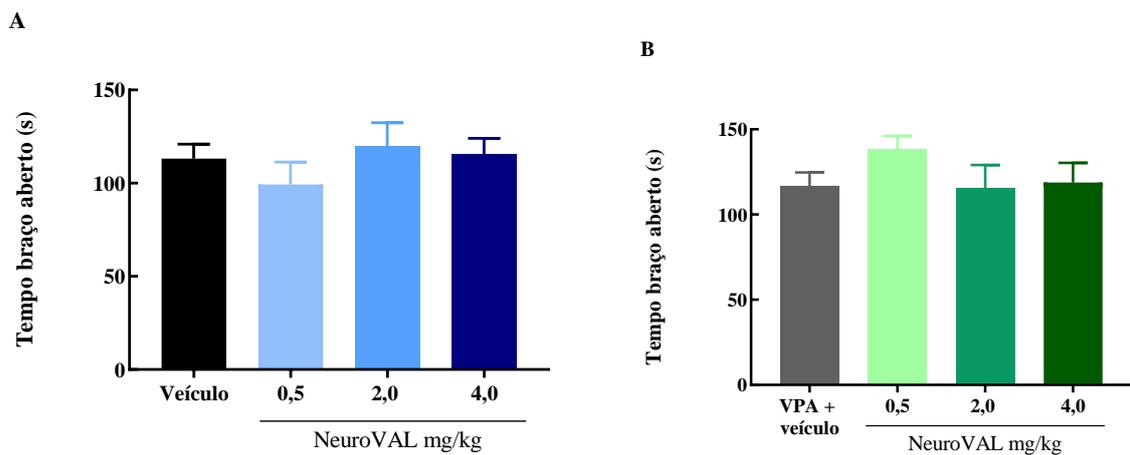


Figura 19: Tempo gasto dos machos nos braços abertos do LCE tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média.

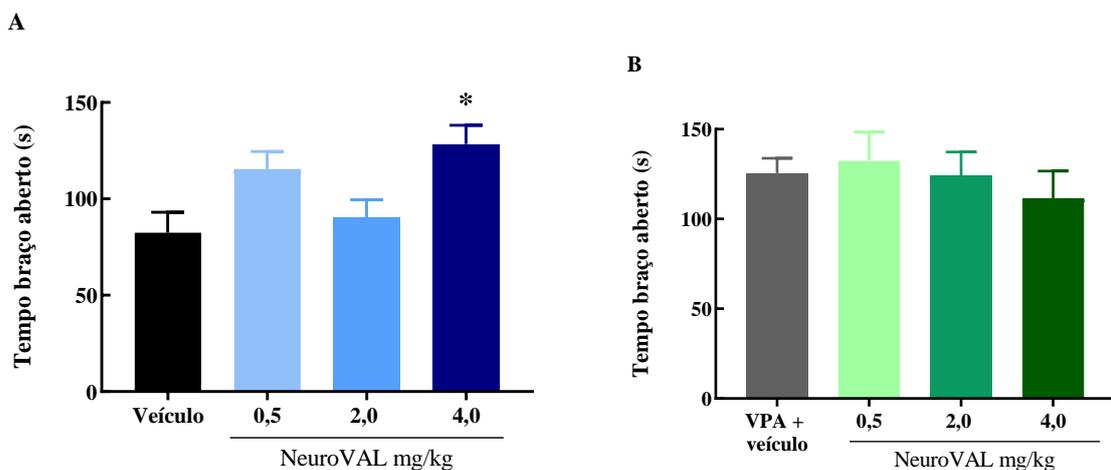


Figura 20: Tempo gasto das fêmeas nos braços abertos do LCE tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Tukey.

Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média. Diferença significativa com ($p < 0,05$) com o veículo (*) está indicada acima.

O efeito do comportamento ansioso foi avaliado com base no tempo de permanência nos braços fechados no teste do LCE dos animais tratados com o peptídeo NeuroVAL, nas doses de 4,0, 2,0 e 0,5 mg/kg administrados por via i.n. Em relação aos machos, os dados obtidos dos ensaios não expostos e dos expostos ao VPA tratados com o NeuroVAL não mostraram efeitos em alterar o tempo de permanência no braço fechado. Na figura 20 A, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os machos que não foram estimulados com VPA [$F(3, 36) = 0,8759, p > 0,05$], similar ao observado nos machos estimulados com VPA para o tempo de permanência no BF [$F(3, 32) = 0,7329, p > 0,05$] na figura 20 B.

Em relação as fêmeas, os dados obtidos dos ensaios não expostos e dos expostos ao VPA tratados com o NeuroVAL não mostraram efeitos em alterar o tempo de permanência no braço fechado. Na figura 22 A, ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas nas fêmeas não expostas ao VPA [$F(3, 28) = 2,667, p > 0,05$], os ensaios expostos ao VPA, as fêmeas (figura 22 B) no teste ANOVA de uma via não demonstra diferença significativa [$F(2, 19) = 1,512, p > 0,05$].

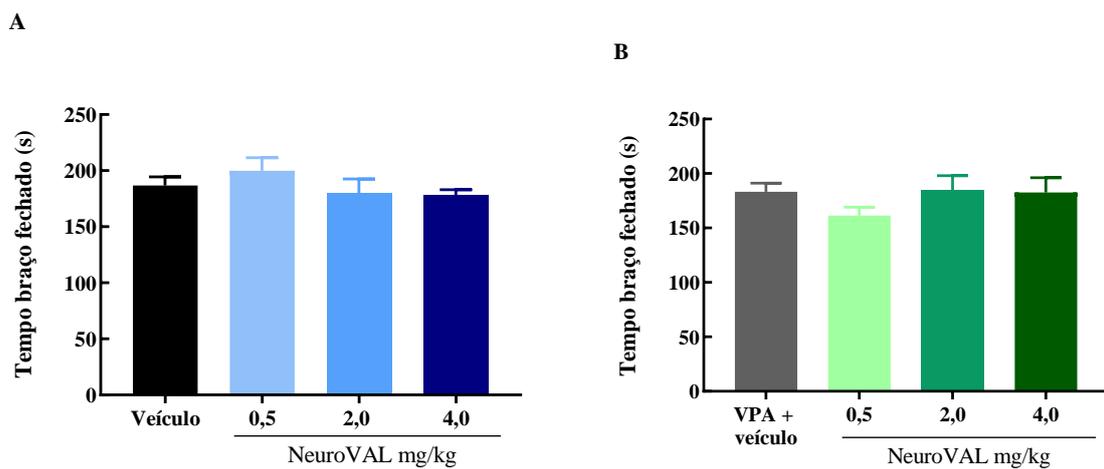


Figura 21: Tempo gasto dos machos nos braços fechados do LCE tratados com NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média.

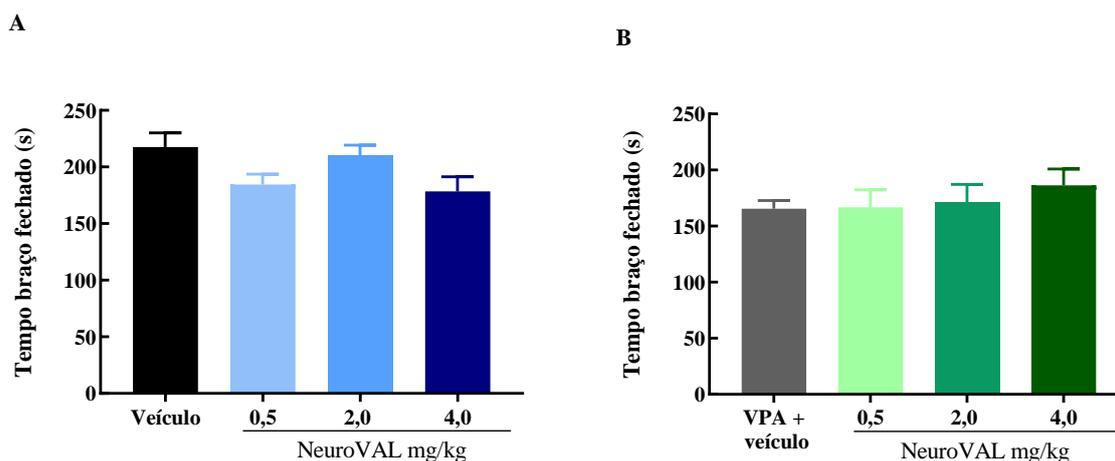


Figura 22: Tempo gasto das fêmeas nos braços fechados do LCE tratados NeuroVAL sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média.

O efeito do comportamento ansioso foi avaliado com base no tempo de permanência nos braços abertos no teste do LCE dos animais tratados com o peptídeo Protonectina-F, nas doses de 4,0 e 0,5 mg/kg administrados por via i.n. Em relação aos machos, os dados obtidos dos grupos não expostos e dos expostos ao VPA tratados com o Protonectina-F não mostraram efeitos em alterar o tempo de permanência no braço aberto. Na figura 23 A, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os machos que não foram estimulados com VPA [$F(2, 26) = 0,5536, p > 0,05$], similar ao observado nos machos estimulados com VPA para o tempo de permanência no BA [$F(2, 23) = 0,9312, p > 0,05$] na figura 23 B.

Em relação as fêmeas, foi observado efeito ansiolítico nas duas doses nos ensaios sem exposição de VPA. Na figura 24 A, ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas nas fêmeas não expostas ao VPA [$F(2, 21) = 8,96, p = 0,0015$], o pós-teste Tukey identificou a diferença do veículo com a dose de 0,5 mg/kg ($p = 0,0272$) e com a dose de 4,0 mg/kg ($p = 0,0026$). Nos ensaios expostas ao VPA, as fêmeas (figura 24 B) no teste ANOVA de uma via não demonstra diferença significativa [$F(2, 19) = 1,512, p > 0,05$].

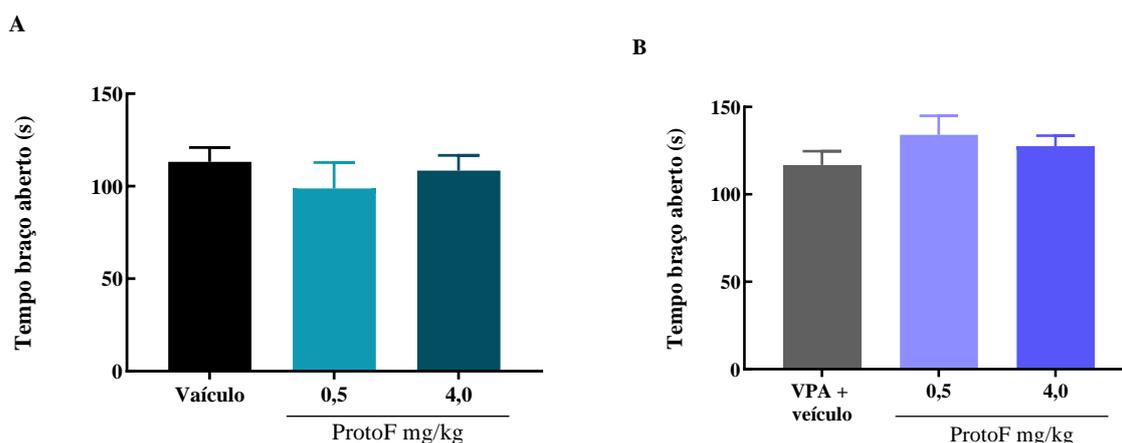


Figura 23: Tempo gasto dos machos nos braços abertos do LCE tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média.

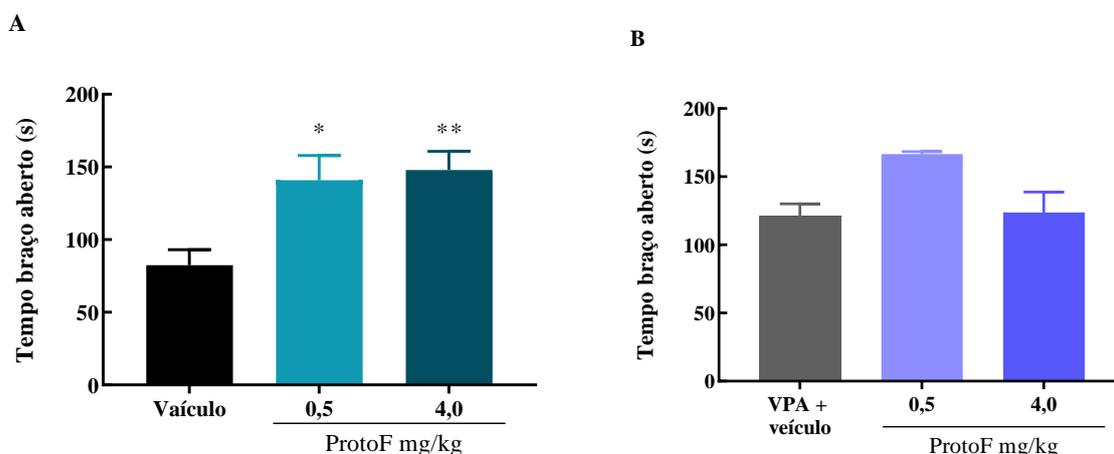


Figura 24: Tempo gasto das fêmeas nos braços abertos do LCE tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Tukey. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média. Diferença significativa com ($p < 0,05$) com o veículo (*) e diferença significativa com ($p < 0,01$) com o veículo (**) estão indicadas acima.

O efeito do comportamento ansioso foi avaliado com base no tempo de permanência nos braços fechados no teste do LCE dos animais tratados com o peptídeo Protonectina-F, nas doses de 4,0, e 0,5 mg/kg administrados por via i.n. Em relação aos machos, os dados obtidos dos ensaios não expostos e dos expostos ao VPA tratados com o NeuroVAL não mostraram efeitos em alterar o tempo de permanência no braço fechado. Na figura 25 A, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os machos que não foram estimulados com VPA [$F(2, 26) = 0,5536, p > 0,05$], similar ao observado nos machos estimulados com VPA para o tempo de permanência no BF [$F(2, 23) = 0,9316, p > 0,05$] na figura 25 B.

Em relação as fêmeas, os dados obtidos dos ensaios não expostos e dos expostos ao VPA tratados com o NeuroVAL não mostraram efeitos em alterar o tempo de permanência no braço fechado. Na figura 26 A, ANOVA de uma via mostrou diferenças significativas nas fêmeas não expostas ao VPA [$F(2, 19) = 7,536, p=0,0039$], o pós-teste Tukey identificou essas diferenças comparando o veículo com a dose de 0,5 mg/kg ($p=0,0442$) e a dose de 4,0 mg/kg ($p=0,0055$). Os ensaios expostos ao VPA, as fêmeas (figura 26 B) no teste ANOVA de uma via não demonstra diferença significativa [$F(2, 19) = 1,425, p>0,05$].

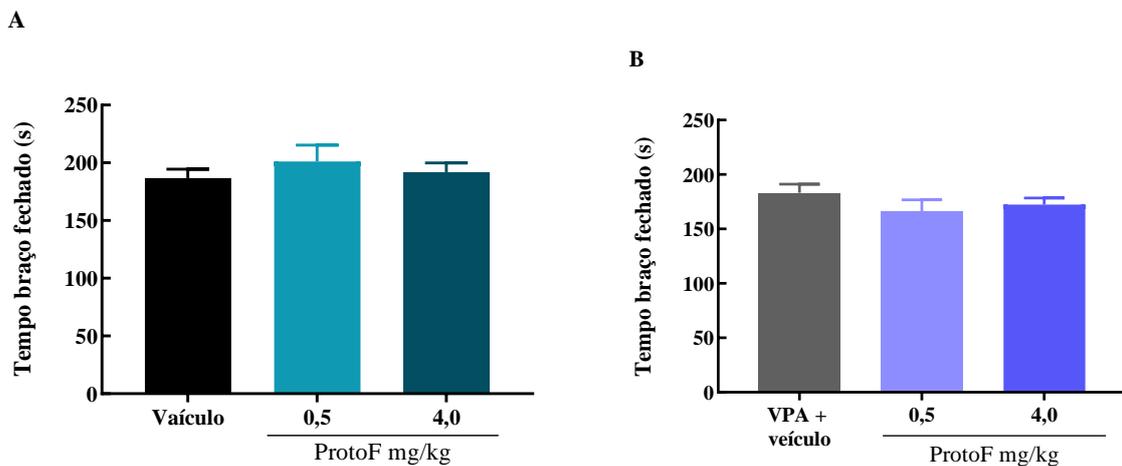


Figura 25: Tempo gasto dos machos nos braços fechados do LCE tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média.

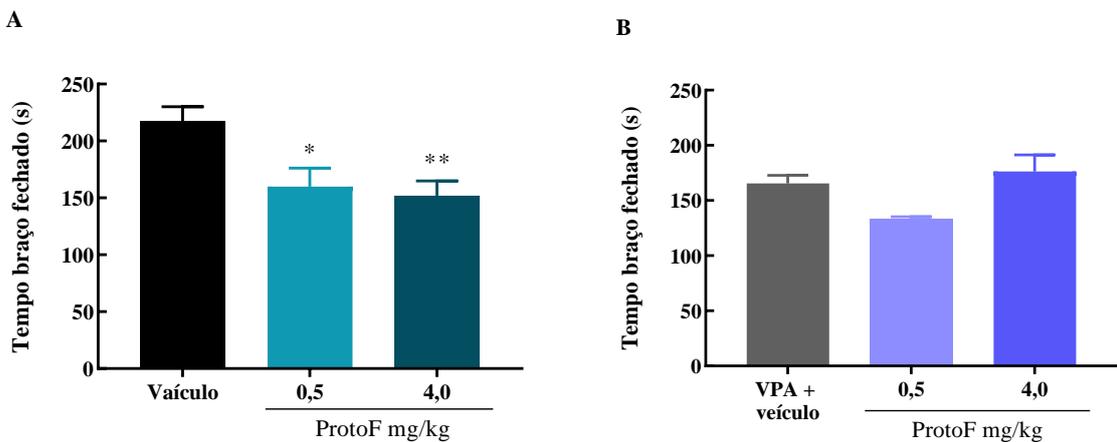


Figura 26: Tempo gasto das fêmeas nos braços fechados do LCE tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Tukey. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média. Diferença significativa com ($p<0,05$) com o veículo (*) e diferença significativa com ($p<0,01$) com o veículo (**) estão indicadas acima.

Avaliação da atividade locomotora (*Open field*)

O modelo VPA de exposição pré-natal foi testado comparando atividade locomotora do animal no teste do campo aberto, os dados mostram que os animais expostos ao VPA e os não expostos, tiveram comportamento semelhante. A análise de teste T no deslocamento, medido em metros (m) mostrou que entre os machos [T=1,684] e as fêmeas [T=0,4692], comparando controle e VPA não houve diferença significativa ($p>0,05$), como observados na figura 27.

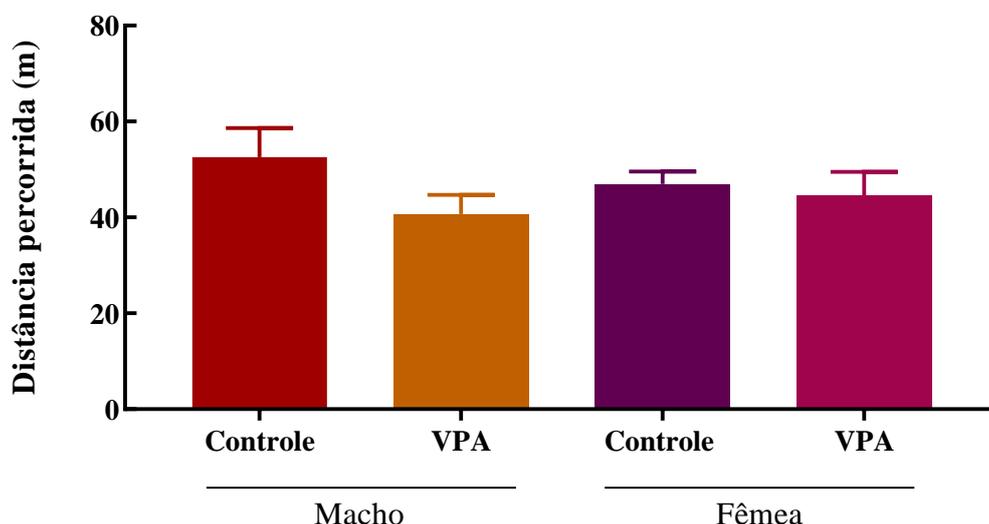


Figura 27: Distância percorrida por machos e fêmeas comparando controle e VPA no teste do OF. Os dados foram submetidos à teste T. Histogramas representam as médias, com barra de erro denominada SEM.

O efeito na atividade locomotora com base na distância percorrida pelo animal tratado com NeuroVAL nas doses de 4,0, 2,0 e 0,5 mg/kg, administrados por via i.n foram analisados. Os machos com e sem exposição ao VPA tratados com NeuroVAL não tiveram locomoção afetada analisado pela distância percorrida no teste OF. Na figura 28 A, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os machos não expostos ao VPA [$F(3, 25) = 0,1612$, $p>0,05$], o que também ocorre no ensaio com exposição ao VPA [$F(3, 32) = 0,2013$, $p>0,05$], mostrado na figura 28 B.

Em relação as fêmeas os dados com e sem exposição ao VPA tratados com NeuroVAL, não tiveram diferenças de distância percorrida. Na figura 29 A, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre as fêmeas no grupo controle e os tratamentos [$F(3,30) = 1,829$, $p>0,05$], assim como no grupo VPA [$F(3, 27) = 1,963$, $p<0,05$] mostrado na figura 29 B.

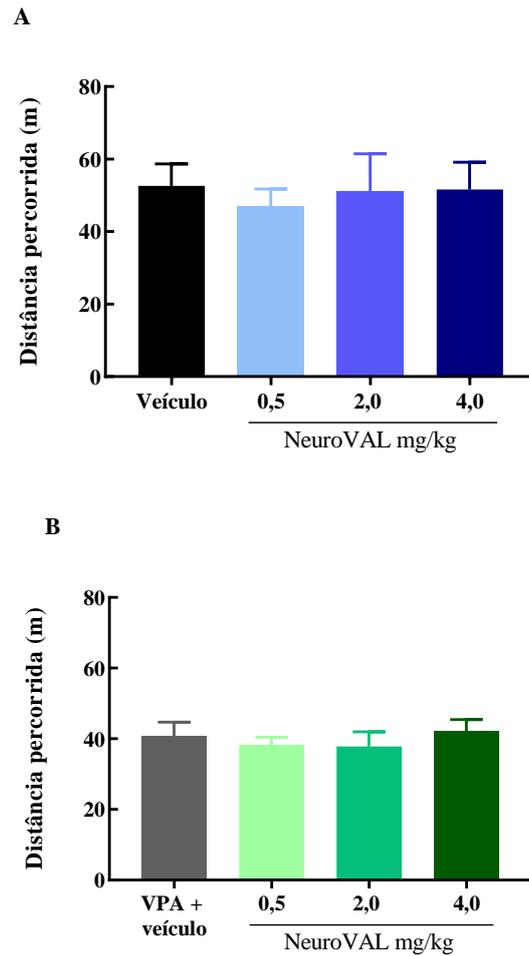


Figura 28: Distâncias percorrida dos animais machos tratados no teste do OF com NeuroVAL, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média.

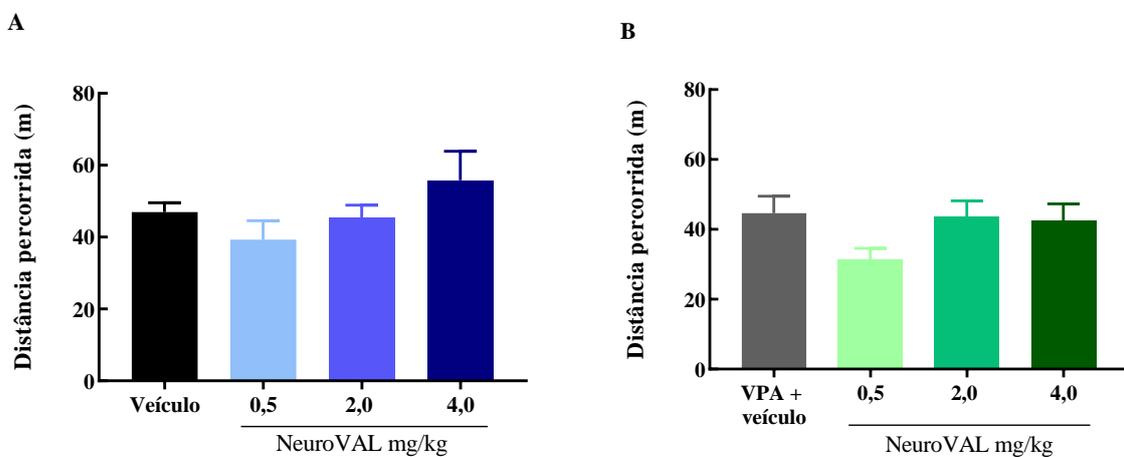


Figura 29: Distância percorrida das fêmeas no teste do OF tratados com NeuroVAL, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média

O efeito na atividade locomotora com base na distância percorrida pelo animal tratado com Protonectina-F nas doses de 4,0 e 0,5 mg/kg, administrados por via i.n foram analisados. Os machos com e sem exposição ao VPA tratados com Protonectina-F não tiveram locomoção afetada analisado pela distância percorrida no teste OF. Na figura 30 A, ANOVA de uma via mostrou que não houve diferença significativa entre os machos não expostos ao VPA [$F(2, 20) = 0,2312, p > 0,05$], o que também ocorre no ensaio com exposição ao VPA [$F(2, 19) = 2,679, p > 0,05$], mostrado na figura 30 B.

Em relação as fêmeas os dados do ensaio de fêmeas não expostas ao VPA aumentaram a locomoção quando o animal foi tratado com a Protonectina-F na maior dose, no ensaio com exposição ao VPA, a locomoção aumentou na maior dose do tratamento e diminuiu na maior dose. Na figura 31 A, ANOVA de uma via mostrou que houve diferença significativa entre as fêmeas no grupo controle e os tratamentos [$F(2, 18) = 6,129, p = 0,0093$], diferente no grupo exposto ao [$F(2, 15) = 7,811, p = 0,0047$], mostrado na figura 31 B. O pós-teste Tukey identificou a diferença significativa entre o VPA a menor dose ($p = 0,0285$) e diferença entre a maior dose do tratamento ($p = 0,0039$).

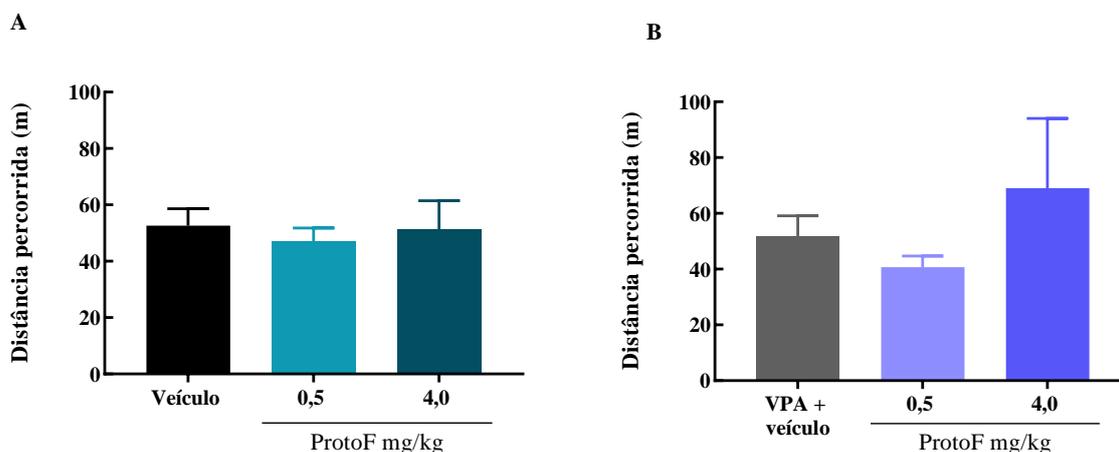


Figura 30: Distâncias percorrida dos animais machos tratados no teste do OF com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via. Histogramas representam as médias, com a barra do erro padrão da média.

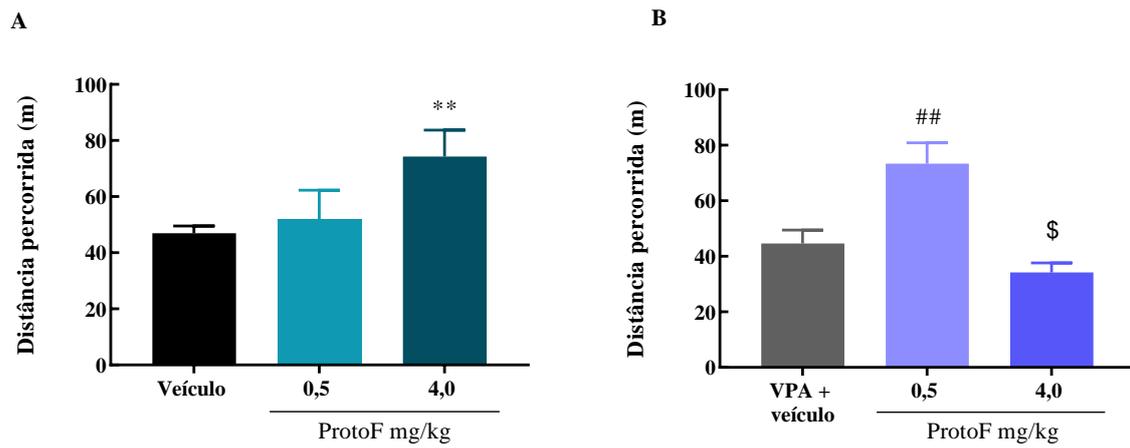


Figura 31: Distância percorrida das fêmeas no teste do OF tratados com Protonectina-F, sem exposição (A) e com exposição ao VPA (B). Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Tukey. Histogramas representam as médias, com barra de erro padrão da média. Diferença significativa ($p < 0,01$) com veículo (**), diferença com ($p < 0,01$) o VPA (##), diferença ($p < 0,05$) com o ProtoF 0,5 mg/kg (\$), estão indicadas acima.

DISCUSSÃO

O TEA é uma condição que até o momento não tem tratamentos efetivos, e os tratamentos disponíveis causam efeitos adversos que podem diminuir a adesão dos pacientes e causar danos aos portadores do transtorno. Somente dois antipsicóticos atípicos são aprovados pela agência de vigilância dos Estados Unidos, os outros usos são relacionados apenas aos sinais identificados ao longo da vida dos pacientes (Farmer *et al.* 2013; Masi *et al.*, 2017).

O uso de biomoléculas inspirada em compostos das peçonhas de vespas contém classes de moléculas neuroativas com o potencial de desenvolvimento de fármacos. Os peptídeos desse trabalho foram testados quanto a característica antinociceptiva em estudos prévios e capazes de interagir com o sistema endocanabinoide (Moser, 2018; Galante *et al.*, 2023).

O modelo animal do TEA baseia-se no princípio de compartilhamento de mecanismos neurobiológicos com os humanos, uma das limitações é quanto a comportamentos que não são tão específicos, o modelo de indução por VPA de TEA é pautado em prejuízos sociais e de interação e a abordagem deve levar em consideração essas limitações (Gadad *et al.* 2013). O modelo de TEA induzido por VPA pré-natal tem sido usado por diversos pesquisadores e tem sido validado como um modelo animal viável de TEA (Tordjman *et al.*, 2006). Um estudo anterior comparou a administração de VPA nos dias DG7, DG9,5 e DG15, com alterações comportamentais induzidas apenas com a injeção do 12º dia de gestação, sendo o melhor momento para a administração do VPA (Kim *et al.*, 2011). O dia 12 é equivalente ao período embrionário do início do primeiro trimestre humano, fase gestacional de fechamento do tubo neural, o que torna os fetos mais suscetíveis à exposição ao VPA (Kim *et al.* 2011).

Uma das fases importantes e cruciais desse modelo é identificar o dia de acasalamento, pois a partir desse dado todo o protocolo é seguido e implementado, podendo estabelecer corretamente o DG12 (Schneider e Przewlocki, 2004). Logo, o uso da análise citológica no modelo VPA é crucial para a implementação da injeção pré-natal, pois somente as fêmeas próximas ao período fértil (estro) acasalarão (Vilela *et al.*, 2007), isso resultou em todos os grupos experimentais desse trabalho e possibilitou a exatidão na injeção do VPA e uma taxa de sucesso acima de 30% para que os experimentos fossem realizados.

O teste STC avalia a sociabilidade do animal, feita através do tempo de interação do animal testado com o animal não familiar e a avaliação da sociabilidade após a exposição pré-natal de VPA (Kim *et al.*, 2011; Rouillet e Foster, 2013). Com o objetivo de avaliar o modelo, observou-se a diferença entre o tempo de interação do controle veículo e dos animais expostos ao VPA os grupos foram estatisticamente diferentes com uma redução na interação pelo grupo

VPA, assim como foi descrito por Crawley (2004), quando o modelo foi descrito pela primeira vez.

Os tratamentos nos ensaios de animais não expostos ao VPA foram avaliados observando se haveria alguma alteração no comportamento normal desses animais, o que aconteceu com as fêmeas tratadas com NeuroVAL nas doses de 4,0 e 2,0 mg/kg, o tempo de interação foi maior que os animais veículo. Nos animais expostos ao VPA tratados, observa-se o potencial terapêutico do NeuroVAL tanto em machos como em fêmeas da dose de 0,5 mg/kg que foi capaz de aumentar o tempo de interação comparado ao animal não tratado.

O teste MB, avalia o comportamento repetitivo e estereotipado presente como um dos sinais do TEA, em roedores, o comportamento de escavação está relacionado a construir ninhos, segurança e termorregulação (Thomas *et al.*, 2009). O objetivo desse teste foi de avaliar o comportamento repetitivo comparando os grupos controle e VPA, que apresentaram resultados diferente dos achados de outros estudos, nos quais o modelo mostra esse comportamento repetitivo (Xiao *et al.*, 2022; Mehta *et al.*, 2011). O resultado mesmo que diferente da literatura foi significativo na avaliação do modelo, comparando os machos e fêmeas controles e VPA, todos tiveram menor porcentagem de bolas enterradas. Esses resultados podem ter ocorrido pelo aumento da aversão provocada pelo fator externo, que gera um comportamento de evitar objetos, nesse caso as bolinhas (Thomas *et al.*, 2009). Os animais expostos ao VPA são mais sensíveis aos estímulos externos, o que pode justificar o comportamento de não enterrar as bolinhas (Himanshu *et al.*, 2020).

A avaliação dos tratamentos nos animais sem exposição ao VPA mostrou, nos machos tratados com NeuroVAL, um aumento do comportamento repetitivo na dose de 4,0 mg/kg, o que representa alteração das características normais dos animais. As fêmeas expostas ao VPA tratadas com NeuroVAL nas doses de 4,0 e 0,5 mg/kg também aumentaram o comportamento repetitivo com mais bolas enterradas, diminuindo a possível aversão que as bolas podem ter causado quando o animal exposto ao VPA não foi tratado. Esse mesmo comportamento ocorreu nas fêmeas expostas ao VPA tratadas com Protonectina-F nas doses de 4,0 e 0,5 mg/kg, com aumento do interesse para interagir com as bolas.

O teste do LCE explora o conflito entre um comportamento normal do animal por espaços fechados e a curiosidade em explorar novos espaços (File, 1996), é observado no teste que os animais permanecem mais tempo nos braços fechados, mostrando essa preferência. O objetivo do teste é avaliar o tempo em que os roedores permanecem nos braços abertos, esse comportamento está relacionado a um menor comportamento semelhante à ansiedade (Rodgers

e Dalvi, 1997). A avaliação do modelo consiste em comparar os grupos em relação a sua exposição ao VPA, entre machos e fêmeas, o que foi observado alteração nas fêmeas expostas ao VPA um efeito ansiolítico, com o tempo nos braços abertos maior que nos braços fechados, com isso, conclui-se que o VPA não aumentou comportamentos semelhantes a ansiedade.

As fêmeas tratadas com NeuroVAL na dose de 4,0 mg/kg foram capazes de aumentar o tempo nos braços abertos, ou seja, gerar um comportamento ansiolítico nesse grupo. Assim como as fêmeas tratadas com Protonectina-F nas doses de 4,0 e 0,5 mg/kg, aumentando o tempo nos braços abertos.

A exploração é um comportamento normal dos animais, como meio de avaliação de riscos (Crusio, 2001). Alguns estudos indicam que a injeção de VPA pré-natal reduz esse comportamento normal de exploração (de Leão *et al.*, 2021; Olexová *et al.*, 2013). O objetivo desse estudo é avaliar como a injeção de VPA pré-natal altera a locomoção dos animais, por meio da distância percorrida. No presente estudo, os animais tiveram comportamento locomotor semelhante nos ensaios que os animais foram expostos ao VPA e quando não foram, tanto em machos, quanto em fêmeas. Esse comportamento de locomoção normal, indica que os animais estão aptos a executarem os outros testes, que não há limitações para os animais explorarem os braços abertos do LCE e percorrer o aparato STC com a livre escolha de interagir ou não com o animal não familiar.

Os tratamentos avaliados no teste do OF nas fêmeas não expostas ao VPA, tratadas com Protonectina-F na dose de 4,0 mg/kg aumentou a distância percorrida pelo animal, indicando que essa dose do peptídeo alterou a atividade espontânea. Assim como o animal exposto ao VPA, tratado com Protonectina-F na dose de 0,5 mg/kg, com maior distância percorrida.

Os dados em conjunto demonstram que o NeuroVal foi capaz de reduzir os sinais induzidos pela administração de VPA, além disso o peptídeo foi bem tolerado. A Protonectina-F por sua vez não apresentou melhora no comportamento dos animais expostos ao VPA, apenas alterações normais nos animais não expostos ao VPA.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar dois peptídeos bioinspirados em um modelo bem estabelecido de TEA, inicialmente avaliando os comportamentos dos animais em diferentes testes. Os principais achados foram: 1) Taxa de sucesso de nascimento dos animais maior que 30%, possibilitando a execução do modelo; 2) Diferença dos animais expostos ao VPA com os não expostos, tanto em machos quanto em fêmeas; 3) Padrão no aumento da interação de machos e fêmeas expostos ao VPA nos animais tratados com NeuroVAL na dose de 0,5 mg/kg.

O trabalho apresentou limitações, quanto a obtenção de animais, antes do processo de citologia, na padronização do protocolo de execução do teste *Marble burying* devido à dificuldade com o uso das bolas, padronização da maravalha e tempo de ambientação. As limitações pessoais foram em relação a acompanhar todos os experimentos, as matérias da faculdade e os estágios da graduação.

Os resultados aqui obtidos são capazes de serem caracterizados como um potencial terapêutico para o TEA, minimizando os efeitos da interação social avaliado pelo modelo de indução do TEA por exposição pré-natal de VPA. Será necessário dar sequência aos estudos com o NeuroVAL.

REFERÊNCIAS

- Adewole, AM.; Ileke, KD.; Oluyede, PO. (2013). Perception and knowledge of bee venom therapy as an alternative treatment for common ailments in southwestern Nigeria. *FUTA J Res Sci*, 9: 235-240.
- Amin Md. R., Ali D.W. (2019). Pharmacology of Medical Cannabis. *Adv Exp Med Biol*. 1162:151-165
- Anderson, GM, Minderaa, RB, Cho, SC, Volkmar, FR, e Cohen, DJ, (1989a): A questão da hiperserotonemia e da exposição à serotonina plaquetária: Um estudo preliminar. *J. Autismo Dev. Desordem*. 19: 349-351
- Associação Psiquiátrica Americana, DSMTF e Associação Psiquiátrica Americana. (2013). Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5 (Vol. 5, No. 5). Washington, DC: Associação Psiquiátrica Americana.

- Banerjee, A., García-Oscos, F., Roychowdhury, S., Galindo, L. C., Hall, S., Kilgard, M. P., & Atzori, M. (2013). Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, Jul; 16(6): 1309-18.
- Bogdanov, S (2015). Bee venom: composition, health, medicine: a review. *Peptides*, (1): 1-20.
- Bolaños JP, Medina JM. 1997. Effect of valproate on the metabolism of the central nervous system. *Life Sci.* 60:1933–1942.
- Bristol Silvestrin, R., Bambini-Junior, V., Galland, F., Daniele Bobermim, L., Quincozes-Santos, A., Torres Abib, R., Gottfried, C. (2013). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Research*, 1495, 52–60.
- Carobrez, A. P., and L. J. Bertoglio. "Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29.8 (2005): 1193-1205.
- Chakrabarti B, Persico A, Battista N, et al. (2015) Endocannabinoid signaling in autism. *Neurotherapeutics* 12: 837–847.
- Christensen J, Grønberg TK, Sørensen MJ, et al. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *JAMA*. 2013;309(16):1696–1703.
- Christianson, Arnold L., Nicole Chester, and Jennifer GR Kromberg. "Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs." *Developmental Medicine & Child Neurology* 36.4 (1994): 361-369.
- Clayton-Smith, J., and D. Donnai. "Fetal valproate syndrome." *Journal of Medical Genetics* 32.9 (1995): 724.
- Crawley, Jacqueline N. "Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors." *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 10.4 (2004): 248-258.

- Crusio WE. 2001. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behav. Brain Res.* 125:127–132.
- da Silva Junior EA, Medeiros WMB, Torro N, de Sousa JMM, de Almeida IBCM, da Costa FB, and others. 2022. Cannabis and cannabinoid use in autism spectrum disorder: a systematic review. *Trends Psychiatry Psychother.* 44:1–12.
- de Leão ERLP, de Souza DNC, de Moura LVB, da Silveira Júnior AM, dos Santos ALG, Diniz DG, and others. 2021. Lateral septum microglial changes and behavioral abnormalities of mice exposed to valproic acid during the prenatal period. *J. Chem. Neuroanat.* 111.
- Dias NB, De Souza BM, Gomes PC, Palma MS. 2014. Peptide diversity in the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera): A comparison of the intra- and inter-colony compositions. *Peptides* 51:122–130.
- DiLiberti, John H., et al. "The fetal valproate syndrome." *American journal of medical genetics* 19.3 (1984): 473-481.
- Dohtsu, K; Okumura, K; Hagiwara, K; Palma, MS; Nakajima, T. (2013). Isolation and sequence analysis of peptides from the venom of *Protonectarina sylveirae* (hymenoptera-vespidae). *Nat Toxins*, 1(5): 271-6.
- Farmer C, Thurm A, Grant P. 2013. Pharmacotherapy for the core symptoms in autistic disorder: Current status of the research. *Drugs* 73:303–314.
- File SE. 1987. The Contribution of Behavioural Studies to the Neuroparmacology of Anxiety. *Neuropharmacology*, Vol 26, n 7b 887-886.
- Gabis L V, Leon O, Goldman M, Barak N, Tefera P, Shefer S, Shaham M and Lerman-Sagie T. (2021). The myth of vaccination and autism spectrum. *European Journal of Paediatric Neurology.* 151-158.
- Gadad BS, Hewitson L, Young KA, German DC. 2013. Neuropathology and Animal Models of Autism: Genetic and Environmental Factors. *Autism Res. Treat.* 2013:1–12.

- Galante P, Campos GAA, Moser JCG, Martins DB, dos Santos Cabrera MP, Rangel M, and others. 2023. Exploring the therapeutic potential of an antinociceptive and anti-inflammatory peptide from wasp venom. *Sci. Rep*13:1–15.
- Galante P, Mortari MR. 2019. Avaliação do efeito antinociceptivo em diferentes vias de administração e da interação farmacológica com receptores opioides e canabinoides da protonectina - F Avaliação do efeito antinociceptivo em diferentes vias de administração e da interação farmacol.
- Galante, P. Identificação e avaliação do efeito antinociceptivo da protonectina natural e modificada da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. vii, 81 f.,il. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) — Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- Genovese A, Butler MG. 2020. Clinical assessment, genetics, and treatment approaches in autism spectrum disorder (ASD). *Int. J. Mol. Sci.* 21:1–18.
- Genovese A, Ellerbeck K. 2022. Autism Spectrum Disorder: a Review of Behavioral and Psychiatric Challenges Across the Lifespan. *SN Compr. Clin. Med* 4:1–10.
- Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK, and others. 2013. Valproic acid pathway: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet. Genomics* 23:236–241.
- Gillberg, C.; Hagberg, B.; Witt-Engerstom, I.; Eriksson, I. CSF beta endorphins in childhood neuropsychiatric disorders. *Brain Dev.* 1990, 12, 92.
- Girianelli VR, Tomazelli J, da Silva CMFP, Fernandes CS. 2023. Early diagnosis of autism and other developmental disorders, Brazil, 2013–2019. *Rev. Saude Publica* 57:1–12.
- Goncalves, J.C. Identificacao e efeitos antinociceptivos de um mastoparano isolado da peçonha da vespa social *Parachartergus fraternus*. 2013. Dissertacao (Mestrado em Ciencias da Saude) – Instituto de Ciencias Biologicas, Universidade de Brasilia, Brasilia.
- Himanshu, Dharmila, Sarkar D, Nutan. 2020. A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 18:341–351.

- Hirai, Yuko, et al. "A new mast cell degranulating peptide" mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 27.8 (1979): 1942-1944.
- Hosie S, Malone DT, Liu S, et al. (2018) Altered amygdala excitation and CB1 receptor modulation of aggressive behavior in the neuroligin-3R451C mouse model of autism. *Front Cell Neurosci* 12: 234
- Hyman SL, Levy SE, Myers SM, Children ON, Disabilities W. 2020. Identification , Evaluation , and Management of Children With Autism Spectrum Disorder. 145.
- Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, Rodier PM. (2000). Prenatal Exposure of Rats to Valproic Acid Reproduces the Cerebellar Anomalies Associated with Autism. *Neurotoxicology and Teratology*, 22:319-24.
- Kaidanovich-Beilin, Oksana, et al. "Assessment of social interaction behaviors." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 48 (2011): e2473.
- Kaplan JS, Stella N, Catterall WA, Westenbroek RE. 2017. Cannabidiol attenuates seizures and social deficits in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114:11229–11234.
- Keller R, Basta R, Salerno L, Elia M. 2017. Autism, epilepsy, and synaptopathies: a not rare association. *Neurol. Sci.* 38:1353–1361.
- Kim KC, Kim P, Go HS, Choi CS, Yang S Il, Cheong JH, and others. 2011. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.* 201:137–142
- Landrigan, Philip J. "O que causa o autismo? Explorando a contribuição ambiental." *Opinião atual em pediatria* 22.2 (2010): 219-225.
- Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, and others. 2020. Autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 6.
- Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, and others. 2023. Transtorno do espectro do autismo. :1–36.

- Maenner MJ, Warren Z, Williams AR, Amoakohene E, Bakian V, Bilder DA and others. 2023. Prevalência e características do transtorno do espectro do autismo entre crianças de 8 anos - Rede de monitoramento de deficiências de desenvolvimento e autismo. 1–22.
- Malone DT, Jongejan D, Taylor DA. 2009. Cannabidiol reverses the reduction in social interaction produced by low dose Δ^9 -tetrahydrocannabinol in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93:91–96.
- Masi A, DeMayo MM, Glozier N, Guastella AJ. 2017. An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. *Neurosci. Bull.* 33:183–193.
- McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SAL. 2012. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J. Vis. Exp.*
- Mehta, Mili V., Michael J. Gandal, and Steven J. Siegel. "mGluR5-antagonist mediated reversal of elevated stereotyped, repetitive behaviors in the VPA model of autism." *PloS one* 6.10 (2011): e26077.
- Miyazaki, K., Narita, N., & Narita, M. (2005). Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(2–3), 287–297
- Mizoguchi, h.; Watanabe, c.; Sakurada, t.; Sakurada, s. *New vistas in opioid control of pain*, 2011.
- Mortari MR et al. (2007). Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr 6 - bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. *Br J Pharmacol.*, 151(6):860-869.
- Moser, Jacqueline Coimbra Gonçalves. "Caracterização da atividade antinociceptiva do peptídeo NeuroVAL, desenvolvida a partir do mastoparano Agelaia-MP." (2018).
- Nakajima, T. et al. Amphiphilic peptides in wasp venom. *Biopolymers*, v. 25 Suppl, p.S115–21, 1986.

- Narita, N., Kato, M., Tazoe, M., Miyazaki, K., & Narita, M. (2002). Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide-and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatric*. 52, 576–579.
- Nau, Heinz, Ralf-Siegbert Hauck, and Katharine Ehlers. "Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms." *Pharmacology & toxicology* 69.5 (1991): 310-321.
- Nicolini C, Fahnestock M. 2018. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp. Neurol*. 299:217–227.
- Olexová L, Senko T, Štefánik P, Talarovičová A, Kršková L. 2013. Habituation of exploratory behaviour in VPA rats: Animal model of autism. *Interdiscip. Toxicol*. 6:222–227.
- Organização das Nações Unidas. *Classificação Internacional das doenças 11ª edição*. (2022). <https://icd.who.int/en>
- Ornoy A, Weinstein-Fudim L, Ergaz Z. (2015). Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (ASD). *Reprod Toxicol.*, Aug 15;56:155-69.
- Ornoy, Asher e Zivanit Ergaz. "Infecção por parvovírus B19 durante a gravidez e riscos para o feto." *Pesquisa de defeitos de nascença* 109.5 (2017): 311-323.
- Osborne AL, Solowij N, Weston-Green K. 2017. A systematic review of the effect of cannabidiol on cognitive function: Relevance to schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev*.
- Pemberton, R.W. (1999). Insects and other arthropods used as drugs in Korean traditional medicine. *JEthnopharmacol*, 65: 207-21.
- Prut, L.; Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology* Elsevier, , 28 fev. 2003.
- Rahman M, Awosika AO, Nguyen H. Valproic Acid. [Updated 2023 Aug 17]. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-*.

- Riesgo, R. D. S., Becker, M. M., Ranzan, J., Bragatti Winckler, M. I., & Ohlweiler, L. (2013). Evolución de los niños con retraso del desarrollo y conductas del espectro autista. *Medicina (Buenos Aires)*, 73, 16-19.
- Rodgers RJ, Dalvi A. 1997. Anxiety , Defence and the Elevated Plus-maze. 21:801-810.
- Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Croog VJ. (1997). Linking Etiologies in Humans and Animal Models: Studies of Autism. *Reproductive toxicology.*, 11:417-22.20.
- Roulet FI, Lai JKY, Foster JA. 2013. In utero exposure to valproic acid and autism - A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 36:47–56.
- Sala-Roca, Josefina, et al. "Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 72.3 (2002): 643-650.
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *Jama*, 311(17), 1770-1777.
- Sandman, C.A. The opiate hypothesis in autism and self-injury. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.* 1991, 1, 237– 248.
- Sandman, C.A. Various Endogenous Opioids and Autistic Behavior: A Response to Gillberg. *J. Dev. Disord.* 1992, 22, 132–133.
- Schneider T, Przewłocki R. 2005. Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30:80–89.
- Silva J, Monge-Fuentes V, Gomes F, Lopes K, dos Anjos L, Campos G, and others. 2015. Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: Wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. *Toxins (Basel)*. 7:3179–3209
- Stepanova E, Dowling S, Phelps M, Findling RL. 2011. Pharmacological Aspects. *Diet Nutr. Palliat. Care*:401–401.
- Sui L, Chen M. (2012). Prenatal Exposure to Valproic Acid Enhances Synaptic Plasticity in the Medial Prefrontal Cortex and Fear Memories. *Brain research bulletin.*,87:556-63.

- Taleb A, Lin W, Xu X, Zhang G, Zhou QG, Naveed M, and others. 2021. Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in autism and its implications for pharmacological treatment. *Biomed. Pharmacother.* 137:111322.
- Thomas A, Burant A, Bui N, Graham D, Yuva-Paylor LA, Paylor R. 2009. Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 204:361–373.
- Tordjman, S.; Anderson, G.M.; Botbol, M.; Brailly-Tabard, S.; Perez-Diaz, F.; Graignic, R.; Carlier, M.; Schmit, G.; Rolland, A.C.; Bonnot, O.; et al. Pain reactivity and plasma β -endorphin in children and adolescents with autistic disorder. *PLoS ONE* 2009, 4, e5289.
- Tordjman, S.; Anderson, G.M.; McBride, P.A.; Hertzog, M.E.; Snow, M.E.; Hall, L.M.; Thompson, S.M.; Ferrari, P.; Cohen, D.J. Plasma β -endorphin, adrenocorticotropin hormone, and cortisol in autism. *J. Child Psychol. Psychiatry* 1997, 38, 705–715.
- Vijayakumar, N. Thenhara e MV Judy. "Transtornos do espectro do autismo: integração do genoma, transcriptoma e meio ambiente." *Journal of the neurological sciences* 364 (2016): 167-176.
- Vilela MG, dos santos Junior, JL, Silva JGC. 2007. Determinação do cilo estral em ratas por lavado vaginal. *Feminina*, vol 35, n 10.
- von Reumont BM, Anderluh G, Antunes A, Ayvazyan N, Beis D, Caliskan F, and others. 2022. Modern venomics-Current insights, novel methods, and future perspectives in biological and applied animal venom research. *Gigascience* 11:1–27.
- Wang L, Wang B, Wu C, Wang J, Sun M. 2023. Autism Spectrum Disorder: Neurodevelopmental Risk Factors, Biological Mechanism, and Precision Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 24.
- Waye MMY, Cheng HY. 2018. Genetics and epigenetics of autism: A Review. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 72:228–244.
- Werler, Martha M., et al. "Use of antiepileptic medications in pregnancy in relation to risks of birth defects." *Annals of epidemiology* 21.11 (2011): 842-850.

- Williams, Gail, et al. "Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association." *Developmental medicine and child neurology* 43.3 (2001): 202-206.
- Williams, P. Gail, and Joseph H. Hersh. "A male with fetal valproate syndrome and autism." *Developmental Medicine & Child Neurology* 39.9 (1997): 632-634.
- Xiao L, Jiang S, Wang Y, Gao C, Liu C, Huo X, and others. 2022. Continuous high-frequency deep brain stimulation of the anterior insula modulates autism-like behavior in a valproic acid-induced rat model. *J. Transl. Med.* 20:1–25.
- Zamberletti E, Gabaglio M, Parolaro D. 2017. The endocannabinoid system and autism spectrum disorders: Insights from animal models. *Int. J. Mol. Sci.* 18:1–14.
- Zeidan J, Fombonne E, Scolah J, Ibrahim A, Durkin MS, Saxena S, and others. 2022. Global prevalence of autism: A systematic review update. *Autism Res.* 15:778–790.