

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE - UNIVILLE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

EFEITOS ANTIOXIDANTE, METABÓLICO E COMPORTAMENTAL DO
RESVERATROL E ARIPIPAZOL EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO
INDUZIDO POR ÁCIDO VALPROICO

ANTIOXIDANT, METABOLIC, AND BEHAVIORAL EFFECTS OF RESVERATROL
AND ARIPIPAZOLE IN A VALPROIC ACID-INDUCED ANIMAL MODEL OF
AUTISM

EFFECTOS ANTIOXIDANTES, METABÓLICOS Y CONDUCTUALES DEL
RESVERATROL Y ARIPIPAZOL EN UN MODELO ANIMAL DE AUTISMO
INDUCIDO POR ÁCIDO VALPROICO

NATALIA CAVICHIOLI

JOINVILLE - SC

2024

NATALIA CAVICHIOLI

EFEITOS ANTIOXIDANTES, METABÓLICOS E COMPORTAMENTAIS DO
RESVERATROL E ARIPIRAZOL EM UM MODELO ANIMAL DE AUTISMO
INDUZIDO POR ÁCIDO VALPROICO

Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre
em Saúde e Meio Ambiente, na
Universidade da Região de Joinville.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Daniela Delwing de
Lima.

Colaborador: Mestre Eduardo Manoel
Pereira.

JOINVILLE

2024

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

C382e Cavichioli, Natalia
Efeitos antioxidantes, metabólicos e comportamentais do resveratrol e aripiprazol em um modelo animal de autismo induzido por ácido valproico / Natalia Cavichioli; orientadora Dra. Daniele Delwing de Lima; colaborador Me. Eduardo Manoel Pereira. – Joinville: UNIVILLE, 2024.

95 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Resveratrol. 2. Aripiprazol. 3. Estresse oxidativo. 4. Autismo. 5. Ácido valproico. I. Lima, Daniela Delwing de (orient.). II. Pereira, Eduardo Manoel (colab.). III. Título.

CDD 616.85882

Termo de Aprovação

“Efeitos Antioxidante, Metabólico e Comportamental do Resveratrol e do Aripiprazol em um Modelo Animal de Autismo Induzido por Ácido Valproico”

por

Natalia Cavichioli

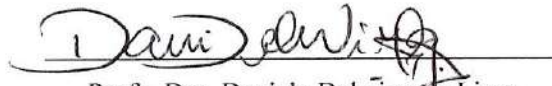
Banca Examinadora:

Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)

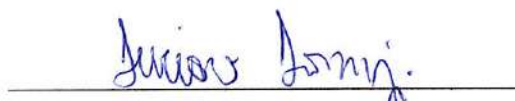
Profa. Dra. Larissa Delmonego
(ANHANGUERA)

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
(UNIVILLE)

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.



Profa. Dra. Daniela Delwing de Lima
Orientadora (UNIVILLE)



Prof. Dr. Luciano Lorenzi
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Joinville, 17 de dezembro de 2024

RESUMO

Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição do neurodesenvolvimento caracterizada por déficits na comunicação social e comportamentos restritivos e repetitivos. Sua etiologia é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais, que contribuem para o estresse oxidativo (EO) e disfunção mitocondrial. Este estudo investiga os efeitos da administração subcrônica de resveratrol, aripiprazol e resveratrol mais aripiprazol no EO, metabolismo energético e parâmetros comportamentais em um modelo de autismo induzido por ácido valproico em ratos. A atividade antioxidante foi avaliada por meio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), conteúdo total de sulfidrilas, conteúdo total de carbonilas e enzimas antioxidantes (catalase - CAT, glutathione peroxidase - GSH-Px e superóxido dismutase -SOD) no sangue total, córtex cerebral e cerebelo. A função mitocondrial foi avaliada pela análise da atividade da piruvato quinase, citrato sintase, complexo II, succinato desidrogenase e complexo IV no córtex cerebral e cerebelo. O tratamento com resveratrol reverteu significativamente a carbonilação proteica no córtex cerebral e os níveis de TBA-RS no córtex cerebral, cerebelo e plasma. Além disso, reverteu a atividade da SOD no córtex cerebral e eritrócitos, e aumentou a atividade da GSH-Px no cerebelo e eritrócitos. O tratamento com aripiprazol reverteu o aumento dos níveis de proteínas carboniladas no córtex cerebral e reverteu os níveis de TBA-RS no córtex cerebral, cerebelo e plasma. Também reverteu o aumento da atividade da SOD no córtex cerebral e a atividade da GSH-Px no cerebelo, e a diminuição da atividade da SOD nos eritrócitos. Além disso, a combinação de resveratrol e aripiprazol exibiu um efeito pronunciado, reduzindo ainda mais os níveis de TBA-RS no córtex cerebral e aumentando a atividade da SOD tanto no córtex cerebral quanto nos eritrócitos. O resveratrol aumentou o índice de sociabilidade no teste de três câmaras para interação social. A associação de resveratrol e aripiprazol melhorou parâmetros das enzimas do metabolismo energético succinato desidrogenase no córtex cerebral e citrato sintase no córtex cerebral e cerebelo, assim como diminuiu a população de dark neurônios no hipocampo nas análises histológicas. Estes achados sugerem um potencial terapêutico promissor para o tratamento do TEA, incentivando futuras pesquisas clínicas.

Palavras-chave: Resveratrol; aripiprazol; estresse oxidativo; modelo animal; ácido valproico; metabolismo energético.

ABSTRACT

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition characterized by deficits in social communication and restrictive, repetitive behaviors. Its etiology is multifactorial, involving both genetic and environmental factors, which contribute to oxidative stress (OS) and mitochondrial dysfunction. This study investigates the effects of subchronic administration of resveratrol, aripiprazole and resveratrol plus aripiprazole on OS, energy metabolism, and behavioral parameters in a valproic acid-induced autism model in rats. Antioxidant activity was assessed through thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content, carbonyl proteins content (CP), and antioxidant enzymes (catalase - CAT, glutathione peroxidase (GSH-Px, and superoxide dismutase - SOD) in whole blood, cerebral cortex and cerebellum. Mitochondrial function was evaluated by analyzing pyruvate kinase, citrate synthase, complex II, succinate dehydrogenase and complex IV in the cerebral cortex and cerebellum. Resveratrol treatment significantly reversed CP levels in the cerebral cortex and TBA-RS levels in the cerebral cortex, cerebellum, and plasma. Additionally, reversed the decrease in SOD activity in the cerebral cortex and the increase in the erythrocytes, and the decrease in GSH-Px activity in the cerebellum and erythrocytes. Aripiprazole treatment reversed the increase in CP levels in the cerebral cortex and TBA-RS levels in the cerebral cortex, cerebellum, and plasma. It also reversed the decrease in SOD activity in the cerebral cortex and GSH-Px activity in the cerebellum, while reversing the increase in SOD activity in erythrocytes. Moreover, the combination of resveratrol and aripiprazole exhibited a pronounced effect, further reducing TBA-RS levels in the cerebral cortex and enhancing SOD activity in the cerebral cortex. Resveratrol increased the sociability index in the three-chamber test for social interaction. The combination of resveratrol and aripiprazole improved parameters of the energy metabolism enzymes succinate dehydrogenase and citrate synthase, as well as decreased the population of dark neurons in the hippocampus in histological analyses.

Keywords: Resveratrol; aripiprazole; oxidative stress; animal model; valproic acid; energy metabolism.

ABSTRACTO

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es una condición del desarrollo neurológico que se caracteriza por dificultades en la comunicación social y por comportamientos restrictivos y repetitivos. Su origen es multifactorial, abarcando tanto factores genéticos como ambientales, que influyen en el estrés oxidativo (EO) y en la disfunción mitocondrial. Este estudio examina los efectos de la administración subcrónica de resveratrol, aripiprazol y la combinación de resveratrol con aripiprazol sobre el EO, el metabolismo energético y los parámetros conductuales en un modelo de autismo inducido por ácido valproico en ratas. La actividad antioxidante se evaluó mediante sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), el contenido total de grupos sulfhidrilos, el contenido total de carbonilos y las enzimas antioxidantes (catalasa - CAT, glutathione peroxidasa - GSH-Px y superóxido dismutasa - SOD) en sangre total, corteza cerebral y cerebelo. La función mitocondrial se analizó mediante la actividad de la piruvato quinasa, citrato sintasa, complejo II, succinato deshidrogenasa y complejo IV en la corteza cerebral y el cerebelo. El tratamiento con resveratrol mostró una reversión significativa de la carbonilación proteica en la corteza cerebral y de los niveles de TBA-RS en la corteza cerebral, cerebelo y plasma. Además, se observó una reversión de la actividad de SOD en la corteza cerebral y en los eritrocitos, junto con un aumento en la actividad de GSH-Px en el cerebelo y en los eritrocitos. Por otro lado, el tratamiento con aripiprazol revirtió el incremento en los niveles de proteínas carboniladas en la corteza cerebral y también los niveles de TBA-RS en la corteza cerebral, cerebelo y plasma. Asimismo, se observó una reversión en el aumento de la actividad de SOD en la corteza cerebral y de la actividad de GSH-Px en el cerebelo, así como una disminución de la actividad de SOD en los eritrocitos. Además, la combinación de resveratrol y aripiprazol mostró un efecto notable, reduciendo aún más los niveles de TBA-RS en la corteza cerebral y aumentando la actividad de SOD tanto en la corteza cerebral como en los eritrocitos. El resveratrol incrementó el índice de sociabilidad en el ensayo de tres cámaras para la interacción social. La asociación de resveratrol y aripiprazol mejoró los parámetros de las enzimas del metabolismo energético, como la succinato deshidrogenasa en la corteza cerebral y la citrato sintasa en la corteza cerebral y el cerebelo, además de disminuir la población de neuronas oscuras en el hipocampo en los análisis histológicos. Estos hallazgos sugieren un potencial terapéutico prometedor para el tratamiento del TEA, fomentando futuras investigaciones clínicas.

Palabras clave: Resveratrol; aripiprazol; estrés oxidativo; modelo animal; ácido valproico; metabolismo energético.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Teste de três câmaras para preferência e novidade social.....	35
Figura 2 - Teste de Enterramento de bolinhas.....	36
Figura 3 - Teste de Campo Aberto.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de tratamento. SI= Animais sem indução pré-natal com ácido valproico.
AVP= Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico (800 mg/Kg)..... 34

ABREVIATURAS

ARIP: Aripiprazol

AVP: Ácido Valproico

CAT: Catalase

CTE: Cadeia Transportadora de Elétrons

EO: Estresse Oxidativo

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

GSH: Glutathiona Reduzida

GSH-Px: Glutathiona Peroxidase

MDA: Malondialdeído

PC: Proteínas Carboniladas

PMS: Fenazina Metassulfato

RSV: Resveratrol

SOD: Superóxido Dismutase

TBA-RS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TEA: Transtorno do Espectro Autista

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. REVISÃO.....	15
4.1 Transtorno do Espectro Autista: definição e diagnóstico.....	15
4.2 Epidemiologia.....	17
4.3 Patogênese.....	19
4.4 Tratamento.....	21
4.4.1 Intervenções comportamentais.....	21
4.4.2 Intervenções medicamentosas.....	22
4.4.2.1 <i>Tratamento farmacológico com aripiprazol.....</i>	<i>23</i>
4.5 Radicais livres e Antioxidantes;.....	24
4.5.1 Radicais Livres.....	24
4.5.2 Antioxidantes.....	25
4.6 Cadeia transportadora de elétrons e disfunção mitocondrial.....	27
4.7 Relação entre Estresse Oxidativo, Cadeia Transportadora de Elétrons e Transtorno do Espectro Autista.....	28
5. METODOLOGIA.....	32
5.1 Animais.....	32
5.2 Protocolo Experimental.....	32
5.3 Testes comportamentais.....	33
5.3.1 Teste de três câmaras para preferência e novidade social.....	33
5.3.2 Enterramento de bolinhas.....	34
5.3.3 Teste de Campo Aberto.....	35
5.4 Análises Bioquímicas.....	36
5.4.1 Preparação dos tecidos:.....	36
5.4.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma:.....	37
5.4.3 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):.....	37
5.4.4 Catalase (CAT):.....	37
5.4.5 Glutathione peroxidase (GSH-Px):.....	38
5.4.6 Superóxido dismutase (SOD):.....	38
5.4.7 Conteúdo Total de sulfidrilas:.....	39
5.4.8 Conteúdo Total de Carbonilas.....	39
5.4.9 Atividade da Citrato Sintase.....	40
5.4.10 Atividade do Complexo I.....	40
5.4.11 Atividade do Complexo II e Succinato Desidrogenase.....	40

5.4.12 Dosagem de proteínas:.....	41
5.5 Análise histológica.....	41
5.6 Análise Estatística.....	41
6. CONDIÇÕES ÉTICAS.....	42
7. INTERDISCIPLINARIDADE.....	42
8. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
9. CONCLUSÃO.....	77

1. INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento heterogêneo que afeta quase 1% das crianças mundialmente (ZEIDAN *et al.*, 2022). O TEA se caracteriza principalmente pela presença de déficits persistentes na comunicação social e interação social e padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2015).

As estimativas de prevalência do TEA variam de acordo com a metodologia de estudos e população avaliada, em todo caso, a prevalência tem aumentado ao longo do tempo. Parte como consequência de uma maior conscientização acerca do transtorno e outra parte por mudanças na definição de caso e substituição diagnóstica (BHAT *et al.*, 2014; HIROTA; KING, 2023). Em outros termos, isso significa que o aumento da prevalência de TEA foi acompanhado por reduções na prevalência de outros distúrbios, como distúrbio de aprendizagem, distúrbios de desenvolvimento da linguagem e/ou deficiência intelectual (ZABLOTSKY *et al.*, 2015).

A deficiência intelectual e o comprometimento da linguagem são condições frequentemente associadas ao TEA e são especificadas como parte do diagnóstico (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2015). O TEA apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas, incluindo, mas não se limitando a: prejuízo na comunicação e interação social (falta de interesse em socializar, habilidades de fala/linguagem ausentes ou atrasadas, resistência a mudanças e interesses restritos); comportamentais (comportamentos estereotipados, respostas atípicas a estímulos sensoriais) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2015). Além disso, as manifestações clínicas do TEA podem variar em intensidade, tornando a individualização dos planos de tratamento essencial (MAGLIONE *et al.*, 2012).

Os tratamentos primários geralmente incluem terapias comportamentais e de desenvolvimento, frequentemente como parte da intervenção precoce (HYMAN *et al.*, 2020). Em alguns casos, intervenções psicofarmacológicas podem ser entendidas como um complemento útil às comportamentais e ambientais, especialmente quando os apoios

para a compreensão e habilidades de comunicação da criança já foram maximizados (BLANKENSHIP *et al.*, 2010).

Muitos indivíduos com TEA experimentam sintomas adicionais que podem interferir em suas vidas, como irritabilidade, agressividade, comportamento autolesivo e acessos de raiva intensos (BLANKENSHIP *et al.*, 2010; MAENNER *et al.*, 2023). Quando o uso de medicamentos no manejo do transtorno se faz necessário, os únicos aprovados pelo *United States Federal Drug Administration* (FDA) são o aripiprazol e a risperidona, dois antipsicóticos atípicos, destinados ao manejo da irritabilidade associada ao TEA (BARTRAM; LOZANO; COURY, 2019; TURAL HESAPCIOGLU *et al.*, 2020). Estes se mostraram eficazes segundo revisão de ensaios clínicos randomizados controlados por placebo em sintomas específicos do TEA (HIRSCH; PRINGSHEIM, 2016).

Embora hoje não haja consistência sobre as causas do TEA, vários fatores de risco ambientais e genéticos foram propostos, o consenso é de que é causado por fatores genéticos que modificam o desenvolvimento do cérebro, afetando regiões relacionadas a aspectos sociais e originando os sintomas do transtorno (MUHLE *et al.*, 2018). Estudos anteriores apontaram que a idade avançada dos pais, tanto da mãe quanto do pai, está associada a um maior risco de ter um filho com TEA (JANECKA *et al.*, 2019; SANDIN *et al.*, 2016). Ainda, os fatores ambientais, como exposições tóxicas, teratógenos, insultos perinatais e coexistentes pré-natais, são considerados menos comuns na etiologia do TEA, mas podem atuar como um "segundo golpe", modulando os fatores genéticos existentes que predispõem ao transtorno (LOPEZ-RANGEL; LEWIS, 2006; MAZINA *et al.*, 2015; MUHLE *et al.*, 2018).

Essa relação entre genética e ambiente pode desencadear respostas imunes e inflamatórias no cérebro, sendo assim considerada uma chave importante na compreensão da fisiopatologia do TEA. No entanto, essa compreensão ainda não foi completamente elucidada e, recentemente, tem sido objeto de intensa pesquisa (BJØRKLUND *et al.*, 2016; HERBERT, 2011; SCHAAFSMA *et al.*, 2017; SKAPER *et al.*, 2018).

Mais recentemente, há evidências crescentes que apoiam o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia de uma série de doenças neuropsiquiátricas, especialmente no TEA (CIPOLLA; LODHI, 2017; ISLAM, 2017; LIU *et al.*, 2022; THORSEN, 2020). O estresse oxidativo (EO) é caracterizado por um desequilíbrio entre pró-oxidantes e

antioxidantes, levando a danos celulares (danos ao DNA, degradação de proteínas e lipídios) devido à ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (NELSON *et al.*, 2019). O EO, considerado potencialmente prejudicial, é denominado como “sofrimento” e é apontado como a principal causa de neuroinflamação e do comprometimento na diafonia entre astrócitos e neurônios, levando ao TEA (BJØRKLUND *et al.*, 2018; RUSSO *et al.*, 2018; USUI; KOBAYASHI; SHIMADA, 2023).

As mitocôndrias são essenciais para uma ampla gama de funções em quase todas as células do nosso corpo (ZHAO *et al.*, 2019). Conhecidas por seu papel na produção de trifosfato de adenosina (ATP) por fosforilação oxidativa, as mitocôndrias estão intimamente envolvidas em outras funções celulares, como metabolismo redox, tamponamento de cálcio, homeostase lipídica e síntese de esteroides (FRYE; ROSSIGNOL, 2011; FRYE; BERK, 2018). Em condições normais de regulação, as mitocôndrias são a principal fonte de produção intracelular de ERO. Níveis moderados de ERO mitocondriais podem ativar o mecanismo de compensação antioxidante, protegendo as organelas dos efeitos prejudiciais das ERO e, finalmente, mantendo o equilíbrio metabólico (SHIN *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2019).

No entanto, quando ocorrem mudanças nas condições externas, o aumento da produção de ERO pode induzir a despolarização da membrana mitocondrial. O EO é desencadeado quando o excesso de ERO ultrapassa as defesas antioxidantes. Tais aumentos podem resultar em um efeito prejudicial adicional nas mitocôndrias, sendo elas o "primeiro campo de batalha" das ERO. Como consequência, as alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias podem afetar diretamente as funções biológicas das células, levando eventualmente à morte celular programada (HAMACHER-BRADY; BRADY, 2016; JAISWAL *et al.*, 2015). Ainda, mitocôndrias disfuncionais produzem grandes quantidades de ERO que podem resultar em disfunção das enzimas da cadeia de transporte de elétrons (FRYE *et al.*, 2021).

A cadeia respiratória mitocondrial ou cadeia transportadora de elétrons (CTE), localizada na membrana mitocondrial interna (DOUARRE *et al.*, 2012), representa uma das principais estruturas funcionais das mitocôndrias. Embora tradicionalmente descrita como composta por cinco complexos – complexos I, II, III, IV e V (LEHNINGER; NELSON; COX, 2017) – é importante observar que alguns autores discutem a inclusão do complexo V nesta contagem, considerando que sua função está mais relacionada à

síntese de ATP do que ao transporte de elétrons. Os complexos I, II, III e IV funcionam de maneira coordenada na catalisação da fosforilação da adenosina difosfato (ADP) em adenosina trifosfato (ATP), atuando como um sistema integrado. Em condições metabólicas normais, o complexo III é o principal local de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Este processo ocorre quando os elétrons são transferidos ao longo da CTE, resultando na redução do oxigênio molecular em água e na formação de ERO como subprodutos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2017). Uma revisão sistemática relatou que a CTE mitocondrial se mostra prejudicada em algumas crianças com autismo, juntamente com uma produção de ERO aumentada (GHANIZADEH *et al.*, 2013), e diversos estudos apontam disfunção em indivíduos com TEA (ANGELOVA; ABRAMOV, 2018; BJØRKLUND *et al.*, 2020; ROSSIGNOL; FRYE, 2014). Neste sentido, compostos antioxidantes, moléculas capazes de inibir a oxidação de outras moléculas e inibir a ação dos radicais livres, ganham destaque.

Os polifenóis, sendo uma das maiores e mais estudadas classes de compostos derivados de plantas, são reconhecidos por seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores (NASIRY; KHALATBARY, 2023). Dentre eles, destaca-se o resveratrol, um estilbeno de ocorrência natural presente no vinho tinto, uvas, pinheiros e amendoins (NASIRY; KHALATBARY, 2023; VANG *et al.*, 2011). Dado o contexto anterior, estas três características podem ser pertinentes na terapêutica do TEA (MIGUEL *et al.*, 2021; ROSSIGNOL; FRYE, 2014; VANG *et al.*, 2011), uma vez que além de efeitos bioquímicos, estudos mostram que a administração de resveratrol, em modelo animal, melhora sintomas centrais (comportamento social e atividade estereotipada) (DECKMANN *et al.*, 2021; MALAGUARNERA; KHAN; CAULI, 2020).

Já em estudo clínico, o aripiprazol, mostrou capacidade a curto prazo de melhoras nos sintomas não apenas de irritabilidade, mas também hiperatividade e estereotipias (HIRSCH; PRINGSHEIM, 2016). Como abordado anteriormente, o aripiprazol tem sido usado como intervenção medicamentosa para a irritabilidade relacionada ao TEA. O antipsicótico atípico de terceira geração, é uma droga relativamente nova que possui um mecanismo de ação único, diferente de outros antipsicóticos (FIEIRAS *et al.*, 2023). Estudos *in vitro* mostram boa capacidade do aripiprazol em relação ao EO e o metabolismo energético (CHEN; NASRALLAH, 2019; KRAMAR *et al.*, 2022; SCAINI *et al.*, 2013), o que se supõe que possa ser uma via de atuação consequentemente relacionada a gravidade comportamental do transtorno

(EISSA *et al.*, 2021). Recentemente, estudos de Nakhal *et al.*, 2023 e Ferreira *et al.*, 2023 mostraram capacidade de atenuação do estado de EO e proteção contra o comportamento tipo-autista em roedores.

Considerando o potencial terapêutico do resveratrol e do aripiprazol, este estudo tem por objetivo verificar os efeitos da administração subcrônica desses compostos em relação ao EO, ao metabolismo energético e a parâmetros comportamentais em ratos induzidos ao autismo.

2. JUSTIFICATIVA

Acredita-se que a neurobiologia do TEA esteja intrinsecamente vinculada ao EO e às disfunções mitocondriais, como discutido anteriormente, através do aumento nos níveis de ERO e na peroxidação lipídica, assim como no incremento de outros marcadores de EO e alterações na CTE (JILL JAMES *et al.*, 2008; JYONOUCHI *et al.*, 2019; ROSE *et al.*, 2012).

Estudos sobre o metabolismo energético (SCAINI *et al.*, 2013), atividade antioxidante (KRAMAR *et al.*, 2022) e a capacidade neuroprotetora do aripiprazol (CHEN; NASRALLAH, 2019) têm sido majoritariamente conduzidos em ambientes *in vitro* (CHEN; NASRALLAH, 2019; KOPRIVICA *et al.*, 2011). No entanto, até o momento, há poucos estudos *in vivo* disponíveis (NAKHAL *et al.*, 2023; DE OLIVEIRA FERREIRA *et al.*, 2023). Além disso, o papel do EO e das disfunções mitocondriais ainda não está totalmente esclarecido, destacando a necessidade de pesquisas adicionais para uma maior compreensão desses mecanismos.

Muitos fatores ambientais pré-natais que aumentam o risco de desenvolver TEA influenciam a fisiologia das mitocôndrias, incluindo exposições a substâncias tóxicas, ativação imune e fatores nutricionais (FRYE *et al.*, 2021). Uma melhor compreensão do papel das mitocôndrias na etiologia do TEA, assim como do EO, pode levar a terapias e estratégias direcionadas para prevenir potencialmente o desenvolvimento do TEA ou a otimizar o prognóstico ao atenuar o EO cerebral antes que ele provoque danos duradouros, por exemplo. Essa estratégia adotada para a avaliação e tratamento precoce

do status antioxidante pode conduzir a um planejamento mais favorável, considerando as opções de terapias direcionadas ao processo de EO ou dano mitocondrial.

Portanto, a investigação dos efeitos antioxidante, metabólicos e comportamentais do resveratrol e do aripiprazol mostra-se promissora, com o objetivo de identificar fatores preventivos ou coadjuvantes mais eficazes no tratamento do TEA, planejado para novos alvos moleculares. Além disso, contribui para uma compreensão mais profunda das alterações comportamentais e neurobiológicas inerentes a esse transtorno.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar os efeitos antioxidante, metabólicos e moduladores do comportamento do resveratrol e do aripiprazol em modelo animal de autismo induzido por ácido valproico.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade antioxidante do resveratrol e do aripiprazol, isoladamente e em combinação, em um modelo animal de autismo induzido por ácido valproico, através da análise de marcadores como TBA-RS, sulfidrilas, carbonilas e enzimas antioxidantes (CAT, GSH-Px, SOD).
- b) Investigar a influência do resveratrol e do aripiprazol na cadeia transportadora de elétrons (CTE) em ratos com autismo induzido, por meio da avaliação da atividade de enzimas metabólicas como citrato sintase, complexo I, complexo II e succinato desidrogenase.
- c) Analisar o impacto do tratamento subcrônico com resveratrol e aripiprazol no comportamento tipo-autista de ratos induzidos ao autismo por ácido valproico.
- d) Avaliar as alterações histológicas no hipocampo de ratos tratados com resveratrol e aripiprazol em um modelo de autismo induzido por ácido valproico.

4. REVISÃO

4.1 Transtorno do Espectro Autista: definição e diagnóstico

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição neuropsiquiátrica caracterizada por déficits de desenvolvimento neurológico. De acordo com a American Psychiatric Association (APA, 1994), o TEA é definido principalmente pela presença de comportamentos restritos e repetitivos, juntamente com déficits de comunicação e

interação social. Estas características são evidentes desde a infância, contribuindo para o desenvolvimento social e cognitivo (APA, 1994).

As manifestações clínicas do TEA, conforme descritas por Rapin (2002), incluem déficits comportamentais e de comunicação, dificuldade na fala ou incapacidade de se expressar verbalmente, além de um forte predomínio de comportamentos estereotipados e repetitivos. Esses sinais são centrais para a compreensão fisiopatológica do transtorno e variação significativa entre os indivíduos, o que contribui para a complexidade do diagnóstico (RAPIN, 2002).

A incapacidade intelectual também pode ser observada em muitos indivíduos com TEA, definida como déficits nas habilidades cognitivas e no funcionamento adaptativo (APA, 1994). Além disso, é comum que pessoas com TEA apresentem comorbidades, como distúrbios gastrointestinais, epilepsia, distúrbios imunológicos e alterações no sono, como insônia (ALMANDIL *et al.*, 2019). Essas condições adicionais intensificam os desafios no diagnóstico e manejo do TEA, uma vez que podem afetar ainda mais a qualidade de vida dos pacientes e dificultam a compreensão plena da condição.

Os primeiros sintomas devem estar presentes no desenvolvimento inicial, embora os déficits sociais e comportamentais possam se tornar mais evidentes em fases posteriores, conforme as demandas sociais excedam as capacidades limitadas (APA, 2013). Os sintomas também devem prejudicar substancialmente o funcionamento em áreas pessoais, sociais, educacionais, ocupacionais ou outras áreas importantes. A variabilidade dos sintomas, que inclui dificuldades na interação social, comunicação verbal e não verbal e comportamentos repetitivos, gera uma grande diversidade fenotípica e dificulta a identificação precoce e precisa da condição (PIERETTI *et al.*, 1991). Isso ressalta a importância de uma abordagem multidimensional para o diagnóstico.

Devido à heterogeneidade fenotípica e genotípica do TEA, a gravidade dos sintomas e sinais varia amplamente entre os indivíduos, muitas vezes compartilhando características com outras condições neurológicas. Isso torna o diagnóstico ainda mais desafiador para os profissionais de saúde (HAYES *et al.*, 2018). No entanto, apesar dessas dificuldades, existem ferramentas que auxiliam no processo de diagnóstico. O diagnóstico primário do TEA envolve a realização de entrevistas com os pais ou

responsáveis, envolvendo muitas informações fornecidas sobre o comportamento e o desenvolvimento da criança no ambiente social e familiar (LAI *et al.*, 2013).

O diagnóstico do TEA é qualificado por uma série de especificadores, incluindo a presença ou ausência de condições associadas (por exemplo, deficiência intelectual, deficiência de linguagem) (DSM-5, 2022). Entre os instrumentos mais utilizados para auxiliar o diagnóstico está o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), amplamente aceito como referência na definição de critérios diagnósticos para o TEA. O DSM-5-TR também inclui qualificadores para três níveis de gravidade, que são classificados separadamente para comunicação social e comportamentos restritos e repetitivos. Além disso, ferramentas de rastreamento, como o Modified Checklist for Autism in Toddlers (M-CHAT), são frequentemente aplicadas para identificar sinais iniciais da condição (LAI *et al.*, 2013).

Além dos questionários e entrevistas, a realização de um exame físico detalhado também é essencial, especialmente considerando a associação do TEA com síndromes genéticas específicas. A avaliação física geral e neurológica, juntamente com testes genéticos, pode ajudar a descartar ou confirmar a presença de outras condições coexistentes (ALMANDIL *et al.*, 2019; LAI *et al.*, 2013).

Apesar da existência de ferramentas diagnósticas, o processo de diagnóstico é frequentemente demorado, o que gera insatisfação entre os pais. Estudos mostram que o tempo necessário para estabelecer um diagnóstico definitivo é uma das principais causas de frustração entre os responsáveis por crianças com TEA, que relatam sentir-se ansiosos, confusos e desamparados durante esse período (MATSON *et al.*, 2014).

4.2 Epidemiologia

O TEA apresenta uma prevalência consideravelmente maior em meninos do que em meninas, com uma razão de incidência de 3 a 4 vezes mais comum entre indivíduos do sexo masculino (TALANTSEVA *et al.*, 2023). A predisposição genética tem sido um fator relevante nas análises epidemiológicas, uma vez que estudos demonstram uma maior probabilidade de recorrência do transtorno em famílias com histórico de TEA,

quando comparados à população em geral (PERSICO *et al.*, 2013). Isso reforça a importância de considerar fatores hereditários e genéticos no desenvolvimento do TEA.

As estimativas de prevalência do TEA apresentam variações significativas entre os diferentes estudos, refletindo a diversidade nas metodologias empregadas e a incompletude dos dados disponíveis. Pesquisas realizadas na Europa, Ásia e Estados Unidos indicam uma prevalência que varia de 2 a 25 casos a cada 1.000 indivíduos (SHAW *et al.*, 2023; XU *et al.*, 2018). Essas discrepâncias ressaltam a necessidade de cautela ao interpretar os resultados, pois as diferenças nos critérios de diagnóstico, nas amostras populacionais e na coleta de dados podem influenciar significativamente as estimativas observadas.

Em metanálise de três níveis de Talantseva *et al.*, 2023, as estimativas globais de prevalência, compreenderam 72 por 10.000. No entanto, como esperado, uma grande variação na prevalência entre os estudos foi encontrada devido à heterogeneidade dentro e entre os estudos, o que reduz substancialmente a confiabilidade dessas estimativas.

A prevalência do TEA tem mostrado um aumento ao longo do tempo, especialmente desde o final da década de 1990 (WILLIAMS; HIGGINS; BRAYNE, 2006). Revisões sistemáticas de estudos epidemiológicos indicam que grande parte desse aumento aparente pode ser atribuída a mudanças nos critérios de diagnóstico e à maior conscientização sobre o transtorno (BAXTER *et al.*, 2015; ZEIDAN *et al.*, 2022). Outros fatores que podem estar envolvidos incluem a detecção precoce, a ampliação de serviços especializados no desenvolvimento infantil, a substituição diagnóstica - na qual o aumento da prevalência do TEA é acompanhado pela redução nos diagnósticos de transtornos de aprendizagem, distúrbios de linguagem do desenvolvimento e/ ou deficiência intelectual, além da possibilidade de um real aumento na prevalência (ZABLOTSKY *et al.*, 2015).

Em termos de dados epidemiológicos no Brasil, estima-se que aproximadamente 115 mil crianças de 0 a 4 anos poderiam ser prejudicadas com TEA, em uma população total de cerca de 16,5 milhões de crianças dessa faixa etária (GOMES *et al.*, 2015). Em 2010, as estimativas já indicavam cerca de 500 mil casos de TEA no país, ressaltando o impacto crescente da condição na população (GOMES *et al.*, 2015). Esses números destacam a necessidade urgente de políticas públicas específicas e recursos dedicados ao

diagnóstico precoce e tratamento especializado, que ainda são limitados em várias regiões do país.

A alta prevalência de comorbidades associadas ao TEA também tem sido um ponto de preocupação. Souza *et al.* (2021) observaram que entre 30% a 50% dos indivíduos com TEA apresentam deficiência intelectual, enquanto cerca de 70% sofrem com algum transtorno mental, como ansiedade, depressão ou transtorno bipolar. A coexistência dessas condições não apenas agrava o quadro clínico, mas também aumenta os desafios no tratamento e manejo dos pacientes com TEA.

Além disso, a epilepsia, uma das comorbidades mais frequentemente associadas ao TEA, possui uma prevalência diminuída entre indivíduos com deficiência intelectual (JESTE *et al.*, 2015). A presença de outras doenças neuropsiquiátricas também é significativa, como o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), transtorno de ansiedade e depressão, que está presente em aproximadamente 79% dos casos de TEA (HOWES *et al.*, 2017). Esses dados refletem a complexidade do espectro autista, que muitas vezes se apresenta como uma condição multidimensional com múltiplas interações clínicas.

4.3 Patogênese

Embora a patogênese do TEA ainda não esteja completamente elucidada, há um consenso de que o TEA resulta de fatores genéticos que influenciam o desenvolvimento cerebral, particularmente a conectividade neural, o que afeta o desenvolvimento da comunicação social e contribui para os comportamentos repetitivos e interesses restritos (GESCHWIND, 2011; MUHLE *et al.*, 2018). Esse entendimento é apoiado pela "teoria epigenética", segundo a qual um gene alterado é "ativado" precocemente no desenvolvimento fetal, influenciando a expressão de outros genes sem modificar sua sequência primária de DNA (LOPEZ-RANGEL; LEWIS, 2006). Um estudo multinacional de coorte com mais de 2 milhões de crianças, das quais aproximadamente 1% foram diagnosticadas com TEA até os 16 anos, estimou que a herdabilidade do TEA era de cerca de 81% (IC de 95%: 73-86%) (BAI *et al.*, 2019).

Como ocorre em outras síndromes de origem genética, a idade avançada dos pais é considerada um fator de risco significativo e independente para o desenvolvimento

do TEA. A idade parental avançada (tanto paterna quanto materna) tem sido associada a um risco aumentado de ter um filho com TEA (SANDIN *et al.*, 2016). As comparações de idade variam de estudo para estudo, mas geralmente variam de ≥ 30 a 35 anos para mães e ≥ 40 anos para pais (JANECKA *et al.*, 2019). A associação entre idade parental avançada e risco aumentado de ter um filho com TEA talvez esteja relacionada a mutações espontâneas de novo e/ou alterações na impressão genética (KONG *et al.*, 2012).

Dada a complexidade do TEA e a diversidade de manifestações clínicas, é provável que as interações entre múltiplos genes ou combinações de genes sejam responsáveis pelo TEA e que fatores epigenéticos e exposição a modificadores ambientais contribuam para a expressão variável (ROBINSON; NEALE; HYMAN, 2015).

Fatores ambientais, como exposição a toxinas, teratógenos, complicações perinatais e infecções durante a gestação, representam uma pequena parcela dos casos de TEA. No entanto, eles podem atuar como um "segundo golpe", modulando predisposições genéticas já existentes para o transtorno (HYMAN *et al.*, 2020; MAZINA *et al.*, 2015; MUHLE *et al.*, 2018). Alguns estudos observacionais apoiam um risco aumentado de TEA em bebês prematuros (AGRAWAL *et al.*, 2018) e também sugerem que as condições maternas (como exemplo: diabetes, obesidade, hipertensão, pré-eclâmpsia, dieta não saudável durante a gravidez) estão associadas ao risco aumentado de TEA (HISLE-GORMAN *et al.*, 2018; KRAKOWIAK *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2017).

O uso de medicamentos durante o período de concepção tem sido objeto de recentes investigações sobre os fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento do TEA (RASALAM *et al.*, 2005; CHRISTENSEN *et al.*, 2013). O ácido valproico (AVP) é um teratógeno potente que pode aumentar a taxa de grandes anomalias congênitas, especialmente os defeitos do tubo neural, e distúrbios neurocomportamentais, incluindo TEA (CHRISTENSEN *et al.*, 2013). O AVP é um antiepiléptico amplamente empregado no tratamento de distúrbios neurológicos, como a epilepsia, seu efeito teratogênico se apresenta quando administrado no primeiro trimestre da gestação. Estudos demonstram claramente sua associação com malformações neurológicas e o aumento significativo do risco de desenvolvimento de autismo grave (VARGHESE *et al.*, 2017).

Atualmente, modelos de roedores com exposição pré-natal ao AVP são

amplamente utilizados para explorar os mecanismos etiológicos e os danos neurológicos relacionados ao TEA. Desde 1996, pesquisas com ratos e camundongos têm evidenciado que a exposição ao AVP durante o período gestacional induz comportamentos semelhantes aos do espectro autista (RODIER *et al.*, 1996).

Além disso, o AVP atua como inibidor da histona desacetilase, podendo interferir na regulação da transcrição gênica, mecanismo que também pode estar envolvido na indução do TEA. O estudo dessas alterações moleculares e celulares em modelos animais contribui para a caracterização das disfunções relacionadas ao autismo e abre perspectivas para o desenvolvimento de tratamentos potenciais (CHRISTENSEN *et al.*, 2013).

4.4 Tratamento

4.4.1 Intervenções comportamentais

O tratamento do TEA é individualizado de acordo com a idade e as necessidades específicas (MAGLIONE *et al.*, 2012). Requer uma abordagem multidisciplinar ao longo da vida que faça uso dos pontos fortes do indivíduo para enfrentar seus desafios.

As intervenções comportamentais, de desenvolvimento e educacionais têm como foco os principais sintomas do TEA e visam melhorar o funcionamento global dos pacientes (HYMAN *et al.*, 2020; MAGLIONE *et al.*, 2012). Esses tipos de intervenções, especialmente quando inovações de forma intensiva, são componentes essenciais dos programas de tratamento para crianças e adolescentes com TEA (HYMAN *et al.*, 2020). Geralmente, eles são conduzidos por profissionais de educação especial ou terapeutas treinados, que utilizam estratégias personalizadas para abordar déficits comportamentais, sociais e educacionais (LOCK *et al.*, 2015).

Para determinar a melhor intervenção no desenvolvimento de crianças com TEA, os profissionais comportamentais trabalham em conjunto com a família e o paciente. Um dos programas mais conhecidos é a Análise do Comportamento Aplicada (ABA), que utiliza abordagens estruturadas para ensinar habilidades de forma intensiva e individualizada. Além disso, os responsáveis também recebem treinamento para apoiar o desenvolvimento neurocognitivo e social da criança (LOCK *et al.*, 2015).

Os objetivos da terapia de forma geral são baseados em maximizar o funcionamento; mover a criança em direção à independência; melhorar a qualidade de vida da criança e da família (MAGLIONE *et al.*, 2012).

A terapia ABA tem mostrado bons resultados, especialmente quando avançou precocemente, promovendo maior independência e melhor qualidade de vida para a criança autista (ROANE *et al.*, 2016). Outra abordagem terapêutica envolve o uso de tecnologias assistivas, como dispositivos eletrônicos e tablets. O Picture Exchange Communication System (PECS), por exemplo, utiliza símbolos visuais para ensinar habilidades de comunicação e, em alguns casos, para estimular o desenvolvimento da fala (SMITH *et al.*, 2015).

Selecionar uma medida de resultado adequado para intervenções no TEA é um desafio significativo, devido à grande variabilidade de apresentações dentro do espectro (HYMAN *et al.*, 2020). Instrumentos comumente usados para diagnóstico muitas vezes não capturam pequenas melhorias nos déficits centrais e, embora a literatura sobre intervenções comportamentais e educacionais para TEA apresenta resultados mistos, há um consenso sobre a importância crucial da intervenção precoce (HYMAN *et al.*, 2020).

4.4.2 Intervenções medicamentosas

A utilização de agentes psicofarmacológicos é considerada apenas para tratar comorbidades associadas ao TEA, após intervenções educacionais e comportamentais terem sido implementadas e maximizadas sem resposta adequada (MYERS, 2007). As intervenções terapêuticas não farmacológicas devem ser contínuas, independentemente de o paciente estar ou não recebendo terapias psicofarmacológicas (HYMAN *et al.*, 2020). O papel principal da farmacoterapia é tratar condições psiquiátricas e sintomas comportamentais que interferem na socialização, aprendizagem, segurança ou qualidade de vida, sempre ponderando os riscos e benefícios.

O desenvolvimento de medicamentos para os déficits sociais centrais do TEA é dificultado pela ausência de biomarcadores estabelecidos e pela falta de consenso sobre os mecanismos fisiopatológicos subjacentes. Diferentes vias neurobiológicas têm sido sugeridas para elucidar o fenótipo do TEA, auxiliando na criação de abordagens terapêuticas (POSEY *et al.*, 2008). O autismo frequentemente está associado a irritabilidade e agressividade, sendo tratados com antipsicóticos atípicos, como a

risperidona e o aripiprazol.

Risperidona e aripiprazol são exceções notáveis para o tratamento de comportamentos disruptivos no TEA (PARIKH *et al.*, 2008; CHING E PRINGSHEIM, 2012), sendo os únicos medicamentos aprovados pela FDA para essa finalidade (CHING E PRINGSHEIM, 2012). Embora o haloperidol tenha mostrado eficácia na melhoria das habilidades de comunicação, sua segurança foi questionada, o que reduziu sua utilização no TEA (MANEETON *et al.*, 2018).

Comportamentos repetitivos e estereotipados têm sido difíceis de manejar farmacologicamente. Embora inibidores da recaptação de serotonina, como fluvoxamina e fluoxetina, tenham sido estudados, faltam evidências robustas que respaldam seu uso (WINK *et al.*, 2010). Disfunções nos sistemas GABAérgico e glutamatérgico têm sido observadas em modelos animais e estudos em humanos (COGHLAN *et al.*, 2012), sendo potenciais alvos terapêuticos no TEA.

Tratamentos imunológicos também foram considerados, visando reduzir a atividade inflamatória e promover regeneração neuronal (PARQUE *et al.*, 2009). A terapia com células-tronco e o uso de drogas como a suramina têm mostrado resultados promissores na redução de sintomas do TEA em estudos iniciais (BURNS *et al.*, 2009; NAVIAUX *et al.*, 2017).

4.4.2.1 Tratamento farmacológico com aripiprazol

O aripiprazol, assim como a risperidona, é um dos poucos medicamentos aprovados pela FDA para tratar sintomas como agressividade e irritabilidade no TEA (MASI *et al.*, 2009). Ensaios clínicos randomizados controlados por placebo demonstraram que tanto antipsicóticos típicos quanto atípicos podem melhorar sintomas comportamentais em indivíduos com TEA, mas seus efeitos adversos limitam o uso generalizado, como reações distônicas e discinesias observadas no uso do haloperidol (JESNER, 2009).

O aripiprazol apresenta afinidade por receptores de serotonina e dopamina, com uma atividade moduladora no receptor 5-HT₂, além de uma afinidade moderada pelo receptor H₁ e agonismo parcial no receptor D₂. Essa combinação minimiza efeitos adversos comuns a outros antipsicóticos, como sedação, ganho de peso e discinesia tardia, que são mais frequentes com medicamentos como clozapina e olanzapina

(GOODNICK, 2002).

Um estudo conduzido por Ghanizadeh (2014) randomizou 59 crianças e adolescentes com TEA, comparando aripiprazol e risperidona. Ambos os medicamentos demonstraram melhoras nas escalas comportamentais do TEA, com efeitos adversos semelhantes. Outro estudo de Varni (2012) avaliou os efeitos do aripiprazol em crianças e adolescentes ao longo de 8 semanas, observando melhorias nos níveis de qualidade de vida avaliados pela escala PedsQL em pacientes com TEA.

Embora não exista uma cura ou tratamento unificador para o TEA, alguns medicamentos podem auxiliar na gestão de sintomas como hiperatividade, dificuldades de concentração, ansiedade, depressão e convulsões (SOUZA *et al.*, 2021). A intervenção precoce com medicamentos, monitorada por profissionais de saúde, pode ser crucial para melhorar o desenvolvimento de pacientes com TEA (ESBENSEN *et al.*, 2009).

4.5 Radicais livres e Antioxidantes;

4.5.1 Radicais Livres

Radicais livres (RL) são partículas instáveis geradas durante processos fisiológicos que atuam na transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas importantes, como no mecanismo de defesa imunológica, ao eliminar patógenos por meio de “estouro respiratório” em fagócitos (JEVA, 2016; BARBOSA *et al.*, 2010).

Embora em concentrações baixas a moderadas possam ser benéficas, em níveis elevados os RL podem interagir com proteínas, carboidratos, lipídios e DNA, causando danos biológicos significativos (HALLIWELL *et al.*, 2006). Quando a produção ERO supera a capacidade antioxidante do organismo, ocorre o EO, que pode levar à peroxidação lipídica e comprometimento das membranas celulares, alterando o transporte transmembrana, por exemplo (DELWING *et al.*, 2006; OBEAGU, 2018).

Os efeitos negativos das ERO podem ser observados em distúrbios cardíacos e distúrbios metabólicos (ROTARIO *et al.*, 2020) pulmonares (BARNES, 2022) e neurodegenerativos (TELEANU *et al.*, 2022). Pelo fato de tais disfunções no sistema nervoso central aumentarem a vulnerabilidade a condições neurodegenerativas e

inflamatórias, o EO é um fator importante no autismo (ROSE *et al.*, 2012).

Entre as principais ERO encontram-se o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies são derivadas do metabolismo celular normal, especialmente nas mitocôndrias, onde o sistema de transporte de elétrons é responsável por aproximadamente 90% da produção de ERO (JEVA, 2016).

O sistema antioxidante atua para neutralizar as ERO, sendo dividido em enzimático (como SOD, CAT e GSH-Px) e não enzimático (como ácido ascórbico, vitamina E e resveratrol) (GODIC *et al.*, 2014).

4.5.2 Antioxidantes

O sistema de defesa antioxidante tem como função evitar ou reduzir os danos causados pelas ERO. Podem atuar na prevenção da formação das espécies reativas, impedindo a ação danosa das partículas existentes ou então reparando os danos já causados (BARBOSA *et al.*, 2010). Como citado, esse sistema é dividido em enzimático e não enzimático.

As enzimas antioxidantes desempenham um papel crucial na neutralização das espécies reativas de oxigênio (ERO) e na manutenção da homeostase redox, equilibrando os níveis de radicais livres sem interferir em suas funções fisiológicas benéficas. Entre as principais enzimas antioxidantes estão a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GSH-Px), todas fundamentais no controle da produção excessiva de radicais livres, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DEMIRCI-ÇEKİÇ *et al.*, 2022).

A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), gerado como subproduto do metabolismo celular, em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em seguida, o H_2O_2 é decomposto pela ação da CAT e da GSH-Px em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2), prevenindo o acúmulo excessivo de H_2O_2 , que pode causar danos oxidativos a proteínas, lipídios e DNA (JEVA, 2016; DEMIRCI-ÇEKİÇ *et al.*, 2022). Essa ação conjunta das enzimas antioxidantes é fundamental para proteger as células contra o EO, além de promover a manutenção da função celular normal.

Tanto os antioxidantes enzimáticos quanto os não enzimáticos podem neutralizar

a ação prejudicial dos ERO. Para atingir a proteção máxima, eles são estrategicamente compartimentados no citoplasma e organelas (por exemplo, mitocôndrias) (POWERS;JACKSON, 2008).

Os antioxidantes não enzimáticos incluem GSH, ácido úrico, ácido alfa-lipóico, ubiquinonas, bilirrubina, quelantes de metais (como ferritina, lactoferrina), vitamina C, carotenoides, tocoferóis, fenólicos (flavonoides e não flavonoides). Vitamina C, tocoferóis, fenólicos e carotenoides não podem ser sintetizados no corpo humano e são obtidos de alimentos e suplementos alimentares (NELSON *et al.*, 2019).

Os compostos fenólicos são divididos em: flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonas, isoflavonas, antocianinas) e não flavonoides (ácidos fenólicos, derivados de estilbeno, lignanas) (NELSON *et al.*, 2019). Estes têm uma capacidade há muito confirmada de reduzir os efeitos dos RL (RAHMAN *et al.*, 2022). As habilidades antioxidantes desses polifenóis dietéticos presentes na maioria das frutas e vegetais comestíveis foram atribuídas à regulação enzimática que reduz as espécies de radicais livres e modula os processos enzimáticos que ocorrem durante as reações de redução celular (de Oliveira *et al.*, 2015). Esses antioxidantes podem diminuir a hiperglicemia, exercer atividade antiproliferativa por meio da regulação da progressão do ciclo celular e da apoptose (SIMONYI *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2014; ZENG *et al.*, 2017).

O resveratrol (RSV), composto fenólico não flavonoide, vem sendo visto como um agente antioxidante, anti-inflamatório, antiapoptótico e anticâncer (BLANQUER-ROSSELLÓ *et al.*, 2017; (JARDIM *et al.*, 2018). Além disso, foi relatado que o RSV modula a função mitocondrial, a biologia redox e a dinâmica em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). O RSV também atenua o comprometimento mitocondrial induzido por certos estressores e regula positivamente, por exemplo, enzimas antioxidantes localizadas nas mitocôndrias, diminuindo a produção de espécies reativas por essas organelas (GRUBER *et al.*, 2013; ZHANG; LIU; SHI, 2010). Ademais, RSV também desencadeia a biogênese mitocondrial, melhorando o status bioenergético relacionado às mitocôndrias em células de mamíferos (SHAITO *et al.*, 2023).

Nosso grupo de pesquisa mostrou os efeitos do resveratrol nas alterações do metabolismo energético cerebral causadas por metabólitos acumulados na citrulinemia tipo I em ratos (VINCENZI *et al.*, 2021). Além disso, foi visto que os efeitos antioxidantes e tipo-antidepressivos provocados pelo extrato das folhas de *Eugenia catharinensis* são dependentes da presença de compostos fenólicos ((BARAUNA *et al.*,

2018).

4.6 Cadeia transportadora de elétrons e disfunção mitocondrial

A mitocôndria é responsável pela fosforilação da adenosina difosfato (ADP) para formar adenosina trifosfato (ATP), a fonte de energia do corpo e a CTE, também chamada de cadeia respiratória, é uma parte vital para tornar isso possível (DOUARRE *et al.*, 2012).

Há quase um século, especulava-se que transtornos neuropsiquiátricos poderiam estar ligados a anormalidades na produção de energia celular (LOONEY; CHILDS, 1934). Desde então, estudos elucidam o papel essencial da fosforilação oxidativa, um processo bioquímico nas mitocôndrias, que utiliza uma série de complexos enzimáticos para a geração de energia (RIGOUTET *et al.*, 2020). Esses complexos, localizados na membrana interna mitocondrial, são conhecidos como Complexo I, II, III e IV, que atuam transportando elétrons do NADH e FADH₂ até o oxigênio (O₂), formando água (H₂O) (MIMAKI *et al.*, 2012). O gradiente de prótons gerado por esse transporte de elétrons é utilizado pelo Complexo V (ATP sintase) para sintetizar ATP, a principal molécula de energia celular (MIMAKI *et al.*, 2012).

Durante o transporte de elétrons, as ERO são geradas como subprodutos, especialmente nos complexos I e III (HERNANSANZ-AGUSTÍN; ENRÍQUEZ, 2021). Essas ERO, como o superóxido (O₂•-), desempenham um papel fisiológico importante, mas seu aumento, devido à disfunção na CTE, está associado a diversas condições patológicas (JEVA, 2016). A produção de ERO é exacerbada quando há bloqueio ou disfunção em pontos críticos da CTE, como no Complexo I, onde a deficiência deste complexo está associada ao aumento do EO (BLANCHET *et al.*, 2011). Quando o Complexo I é inibido, há um acúmulo de NADH, levando ao aumento da produção de ERO pelo Complexo III (CHEN *et al.*, 2003).

Além disso, a disfunção mitocondrial (DM) resultante da inibição do Complexo I não apenas aumenta o EO, mas também reduz a produção de ATP, comprometendo funções celulares essenciais dependentes dessa energia (BALSA *et al.*, 2020). A deficiência do Complexo I e o EO subsequente também são observados em outros transtornos neuropsiquiátricos, como o transtorno bipolar (ANDREAZZA *et al.*, 2010).

Estudos indicam que a disfunção dos Complexos I e III na CTE está intimamente ligada à maior geração de ERO em condições patológicas, contribuindo para o desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo TEA (ROJAS-CHARRY *et al.*, 2021).

4.7 Relação entre Estresse Oxidativo, Cadeia Transportadora de Elétrons e Transtorno do Espectro Autista

O funcionamento adequado do cérebro depende da produção eficiente de energia aeróbica, que é fundamentalmente fornecida pelas mitocôndrias (NELSON *et al.*, 2019). A insuficiência na geração de energia, observada em diversas desordens cerebrais, incluindo o TEA, pode impactar negativamente o desenvolvimento cerebral e comprometer diferentes funções cognitivas. A DM, manifestada por anomalias nas atividades da CTE e um metabolismo energético comprometido, desempenha um papel significativo no TEA. Essa disfunção é tão crítica que o TEA tem sido proposto como uma doença mitocondrial. Além de sua função principal na produção de energia, as mitocôndrias também estão envolvidas na regulação da homeostase do cálcio (Ca^{2+}), em mecanismos de morte celular programada, autofagia, e na produção de ERO e ERN (LIN; BEAL, *et al.*, 2006).

O EO tem sido amplamente associado ao TEA, conforme demonstrado em diversos estudos (BJØRKLUND *et al.*, 2020). Indivíduos com TEA frequentemente apresentam um aumento na geração de RL, como as produzidas por citocinas e xantina oxidase, as quais foram detectadas na circulação sanguínea de pacientes autistas (MANIVASAGAM *et al.*, 2020). Esse desequilíbrio no processo fisiológico pode levar à lesão tecidual, particularmente no cérebro (LIU *et al.*, 2022). Marcadores de peroxidação lipídica, tanto diretos quanto indiretos, como a fosfolipase A2 e a perda de lipoproteínas de membrana, têm sido relatados em níveis elevados em pacientes com TEA (FRYE *et al.*, 2024).

Uma meta-análise mostrou que as concentrações sanguíneas de glutatona oxidativa, malondialdeído, homocisteína, S-adenosil-homocisteína, óxido nítrico e cobre foram maiores em crianças com TEA do que em crianças controle saudáveis. Em contraste, as concentrações de glutatona reduzida (GSH) no sangue, glutatona total (tGSH), GSH/GSSG, tGSH/GSSG, metionina, cisteína, vitamina B9, vitamina D,

vitamina B12, vitamina E, S-adenosilmetionina/ S-adenosil-homocisteína e cálcio foram significativamente reduzidas em crianças com TEA (CHEN *et al.*, 2021).

Em estudo de Yenkyan; Harutyunyan e Harutyunyan (2018), foi observado que os níveis de GSH e a atividade de GSH-Px estavam diminuídos em regiões do cérebro de pacientes com TEA. Além disso, a atividade da SOD apresentou variações no plasma e nos eritrócitos, enquanto a atividade da CAT foi reduzida em comparação aos grupos controle (YENKOYAN; HARUTYUNYAN E HARUTYUNYAN 2018).

A SOD, sendo enzima crucial na neutralização do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), mostrou-se com atividade variável, sendo maior nos eritrócitos de crianças com TEA em alguns estudos, enquanto que CAT demonstrou-se reduzida em comparação aos controles. Essa deficiência nas defesas antioxidantes indica uma capacidade limitada do organismo em neutralizar os RL, resultando em maior vulnerabilidade ao EO (GONZÁLEZ-FRAGUELA *et al.*, 2013). Portanto, esses biomarcadores podem ser úteis para o diagnóstico do autismo, além de orientar futuras intervenções terapêuticas.

Biomarcadores relacionados à CTE nas mitocôndrias foram considerados anormais em pacientes com TEA, onde os complexos I e III são os mais comumente encontrados anormais, mas não exclusivamente (WEISSMAN *et al.*, 2008). Estudos cerebrais *post-mortem* de crianças com TEA revelaram níveis mais baixos no cerebelo dos complexos III e V, no córtex temporal dos complexos II, III e V e no córtex frontal apenas do complexo I (CHAUHAN *et al.*, 2011). Como mencionado anteriormente, os complexos I e III são os principais complexos produtores de ERO.

Clinicamente, a DM pode dar origem a uma ampla variedade de sintomas, incluindo, mas não se limitando à, fraqueza muscular, rabdomiólise, atraso no desenvolvimento, convulsões, perda de habilidades e várias doenças multissistêmicas (MORAVA *et al.*, 2006). Alguns dos sintomas da DM são semelhantes à representação dos sintomas vistos no autismo, incluindo perda de habilidades aprendidas anteriormente, atraso no desenvolvimento e convulsões (ROSE *et al.*, 2018). Pacientes com autismo também têm uma prevalência maior de DM (HAAS, 2010). Um estudo populacional encontrou uma prevalência de DM em pacientes com TEA de 7,2%, tornando a DM uma das condições médicas mais comuns associadas ao TEA (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

O uso de antioxidantes como potenciais terapias tem ganhado destaque no manejo

de condições associadas ao EO, incluindo o TEA. Mokni *et al.* (2007), investigou os efeitos do RSV sobre a atividade das enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e GSH-Px, em modelos animais. O estudo demonstrou que o resveratrol não apenas neutraliza os RL, mas também melhora a atividade dessas enzimas, conferindo efeitos neuroprotetores.

Artigo de Rossignol e Frye (2011), revisou os efeitos de antioxidantes, incluindo a vitamina C, carnosina, zinco, óleo de peixe e melatonina, no tratamento dos sintomas comportamentais do TEA. A melatonina, em particular, é destacada por sua eficácia no manejo de distúrbios do sono frequentemente observados em indivíduos com autismo. Além disso, o uso combinado de vitamina B-6 e magnésio também foi relatado como benéfico.

A interconexão entre EO, DM e desregulação imunológica é evidente, pois esses sistemas interagem de maneira complexa. O EO, gerado nas mitocôndrias, leva à produção de ERO, que, por sua vez, podem induzir inflamação através da liberação de citocinas inflamatórias (LI *et al.*, 2013). Esse processo é exacerbado por enzimas pró-oxidativas que aumentam a produção de ERO (CORDA *et al.*, 2001).

Estudos têm demonstrado sinais de EO e DM no cérebro de indivíduos com TEA, especialmente nas regiões frontal e temporal (ROSSIGNOL; FRYE 2014). No lobo frontal, envolvido em funções executivas, observou-se uma diminuição nas atividades da CTE e um aumento nas citocinas inflamatórias, como TNF-alfa e IL-6. No lobo temporal e áreas associadas à memória e linguagem, foram registrados níveis elevados de EO e danos às estruturas mitocondriais, além de uma diminuição na razão GSH/GSSG (CHAUHAN *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2013).

O cerebelo, responsável pela coordenação motora e cognição, demonstrou sinais de neuroinflamação e diminuição da expressão de genes essenciais para a função mitocondrial (SAJDEL-SULKOWSKA *et al.*, 2020). Esses achados indicam que os efeitos deletérios do EO e da DM não estão restritos a uma única região do cérebro, mas se espalham pelo sistema nervoso central, corroborando a complexidade e a heterogeneidade observadas nos sintomas do TEA.

A diversidade dos sintomas e a gravidade do TEA estão intimamente ligadas às áreas do cérebro afetadas e à extensão do dano neurobiológico (CASANOVA *et al.*, 2023). Assim, a análise das funções cerebrais afetadas oferece insights valiosos sobre as

manifestações clínicas do autismo e suas possíveis comorbidades, destacando a importância de abordagens terapêuticas que visem mitigar o EO e restaurar a função mitocondrial.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram utilizados ratos machos *Wistar* expostos ainda no período pré-natal com AVP. As fêmeas gestoras foram induzidas uma única vez de forma intraperitoneal com 800 mg/kg do medicamento no 12º dia de gestação.

Antes do processo de experimentação, os animais foram para o biotério com 20 dias e foram mantidos em número máximo de quatro por gaiola contendo maravalha e aclimatados por 7 dias para adaptação em um novo meio. Foram mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro à temperatura constante de 22°C com livre acesso à comida e água. Os cuidados com os animais seguiram as diretrizes governamentais oficiais sugeridas pela Federação das Sociedades Brasileiras para Biologia Experimental aprovadas pelo Comitê de Ética da Universidade da Região de Joinville (CEUA 02/2022).

As condições de ambiente, iluminação, acomodação e nutrição seguiram as recomendações exigidas pelo “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996”.

5.2 Protocolo Experimental

Para o tratamento subcrônico, os animais receberam o tratamento com resveratrol, aripiprazol e a associação de resveratrol e aripiprazol por 15 dias consecutivos via oral (gavagem), obedecendo a um intervalo de 24 horas entre um tratamento e outro (Tabela 1). A dosagem foi proporcional ao peso do animal.

Grupo	Tratamento
Controle	SI + salina
RSV	SI + Resveratrol 15 mg/kg
ARIP	SI + Aripiprazol 15 mg/kg
RSV + ARIP	SI + Resveratrol + Aripiprazol (15 mg/kg)
AVP	AVP + salina
RSV + AVP	AVP + Resveratrol 15 mg/kg
ARIP + AVP	AVP + Aripiprazol 15 mg/kg
RSV + ARIP + AVP	AVP + Resveratrol + Aripiprazol (15mg/kg)

Tabela 1. Grupos de tratamento. SI= Animais sem indução pré-natal com ácido valproico. AVP= Animais nascidos de mães induzidas por ácido valproico (800 mg/Kg).

Após 12 horas do último tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de interação social e comportamento repetitivo para verificar a resposta motora e psicoterápica dos roedores ao tratamento estabelecido. Os animais foram sacrificados por decapitação na ausência de anestesia e em seguida foi coletado o sangue total, córtex cerebral e cerebelo para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

5.3 Testes comportamentais

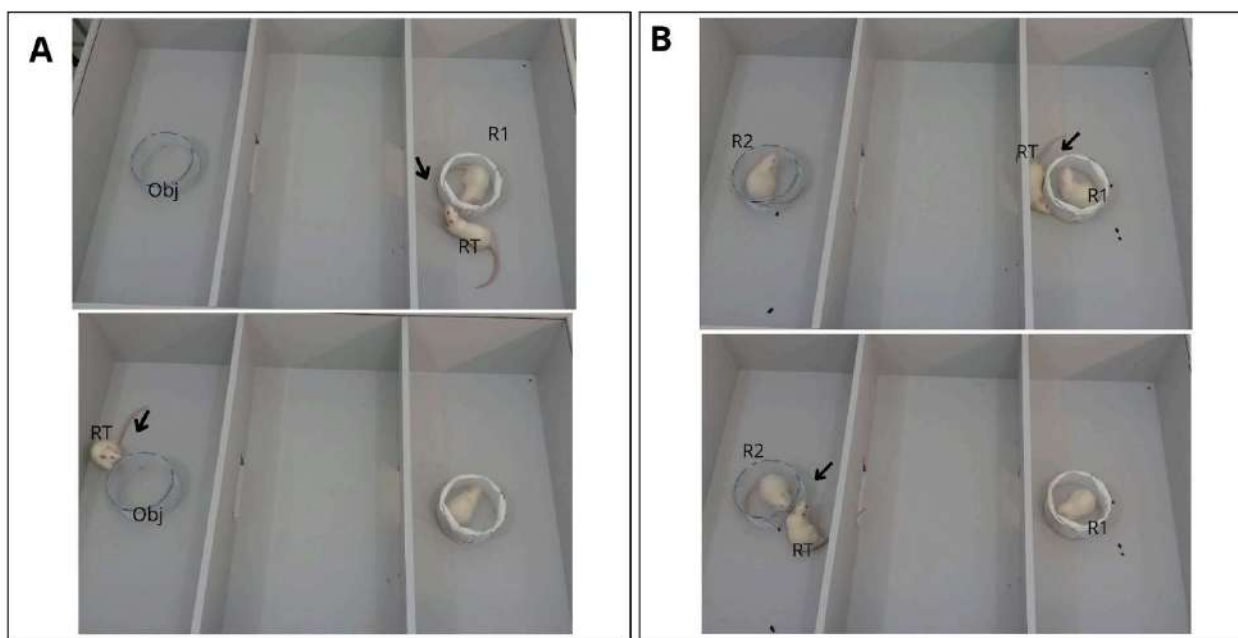
5.3.1 Teste de três câmaras para preferência e novidade social

Consiste em uma caixa retangular de três câmaras fabricada em policarbonato, com 70 cm×24 cm×29cm. As câmaras laterais têm medidas de 25 cm×24 cm×29 cm e a câmara central foi de 15×24×29cm. As paredes divisórias têm portas retráteis que permitem o acesso a cada câmara através de uma abertura de 6,5cm × 6,5cm. Para o ensaio de sociabilidade, foram utilizadas gaiolas de arame de fabricação própria com 14 cm de altura, com diâmetro de fundo de 13 cm e barras espaçadas de 1 cm.

O teste consiste em três etapas consecutivas, de dez minutos cada: habituação, preferência social e preferência por novidade social. No teste de habituação, o sujeito é colocado na câmara do meio, as portas foram abertas e o rato teste é autorizado a explorar o aparato. Depois disso, o rato de teste é colocado no compartimento central e um rato

desconhecido é colocado em uma das gaiolas de arame e colocado em uma das câmaras laterais. Uma gaiola de arame vazia é colocada na câmara oposta. As portas foram reabertas e o sujeito foi autorizado a explorar toda a caixa de teste social (Figura 1 - A). Em seguida, o rato teste é novamente colocado no compartimento central e um animal desconhecido é colocado no mesmo ambiente do animal de teste, este é o teste para novidade social, ou seja, observar a preferência do rato de teste para qualquer um dos ratos familiares e desconhecidos (Figura 1 -B). O tempo em cada câmara foi registrado por dez minutos para cada sessão conforme descrito (KAIDANOVICH-BEILIN *et al.*, 2010; KARVAT; KIMCHI, 2012; MOY *et al.*, 2004).

Figura 1 - Teste de três câmaras para preferência e novidade social.



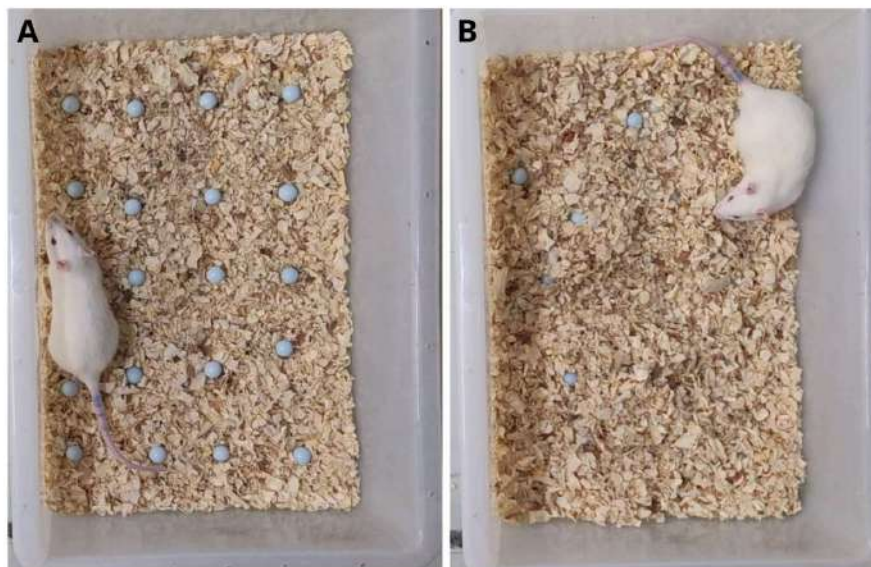
Fonte: Autora (2024). Teste de três câmaras para preferência e novidade social. A) Interação social. B) Novidade social. Interação (flecha). Obj: objeto. R1: Rato desconhecido 1. RT: Rato teste. R2: Rato desconhecido 2.

5.3.2 Enterramento de bolinhas

Utilizado para testar o comportamento repetitivo em ratos, observando a capacidade aumentada de escavação: A caixa de polipropileno (41x34x18cm) foi preenchida com uma camada de serragem de 3- 4,5 cm, seguida de 20 bolinhas de vidro coloridas (15 mm diâmetro) equidistantes. O teste durou um período de exploração de 30

minutos. O número de bolinhas enterradas ($> 50\%$ de material de revestimento de mármore) foi então contado (ANGOA-PÉREZ *et al.*, 2013; THOMAS *et al.*, 2009).

Figura 2 - Teste de Enterramento de bolinhas.

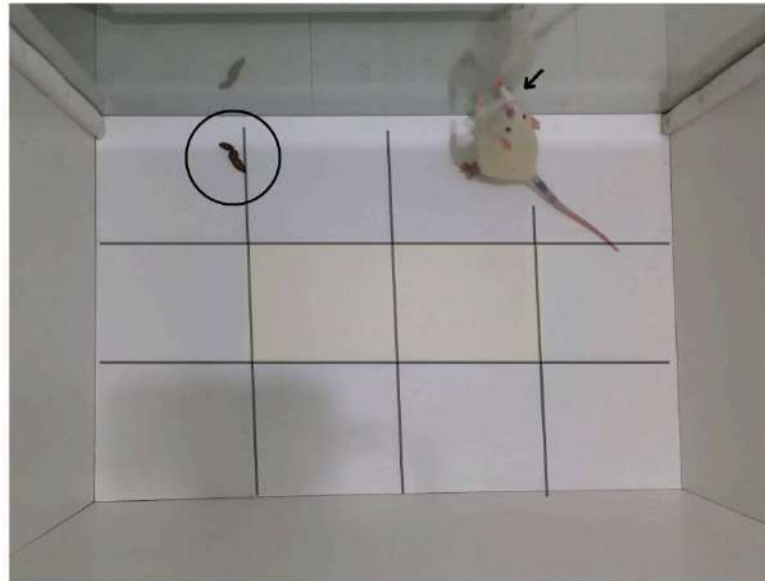


Fonte: Autora (2024). Teste de enterramento de bolinhas. A) Início do teste. B) Fim do teste, após trinta minutos. Foi contabilizado o número de bolinhas enterradas ($> 50\%$ de material de revestimento de mármore).

5.3.3 Teste de Campo Aberto

O teste de campo aberto (TCA) avalia sistematicamente comportamentos de exploração executados em um novo campo aberto (considerado como um novo ambiente). Os animais são autorizados a explorar livremente uma arena de campo aberto (40×60 cm e 50 cm de altura com o chão dividido em 12 quadrados iguais), para avaliar a atividade locomotora geral e comportamentos relacionados à ansiedade (KAS *et al.*, 2014). O teste durou 30 minutos e a gravação do experimento foi realizada. Avalia-se a distância total percorrida em toda a arena, tempo gasto no centro e na periferia. O número de cruzamentos (quadrados cruzados com todas as patas), *rearing* (o animal em pé sobre as patas traseiras) e quantidade de bolos fecais, como atividade locomotora, comportamento exploratório e aspectos emocionais, respectivamente (Figura 3).

Figura 3 - Teste de Campo Aberto.



Fonte: Autora (2024). Teste de Campo Aberto. Arena de campo aberto (40 × 60 cm e 50 cm de altura com o chão dividido em 12 quadrados iguais). Número de cruzamentos = quadrados cruzados com todas as patas. Flecha: movimento de *rearing* (o animal em pé sobre as patas traseiras). Círculo: bolo fecal. Em amarelo: quadrantes centrais onde contabilizado tempo de centro.

As câmaras de teste foram limpas com etanol 70% após cada tentativa e deixadas secar até que ocorra a evaporação do etanol e a dissipação do odor. Para a interpretação dos resultados menos tempo gasto no centro é considerado como um indicador de altos níveis de comportamentos do tipo ansiedade e a distância total percorrida significa a atividade locomotora geral dos animais testados (KIM *et al.*, 2014; SILVERMAN *et al.*, 2010).

A atividade de campo aberto é considerada um controle essencial para os efeitos da atividade física, por exemplo, sedação ou hiperatividade, o que poderia confundir a interpretação dos resultados das interações recíprocas, do condicionamento do medo de autocuidado e das tarefas de abordagem social (DHAMNE *et al.*, 2017).

5.4 Análises Bioquímicas

5.4.1 Preparação dos tecidos:

A eutanásia dos animais foi por meio de decapitação. O cerebelo e o córtex cerebral foram dissecados de imediato sobre a superfície gelada. O intervalo de tempo entre a decapitação e a dissecação não ultrapassou 1 minuto. O homogeneizado foi preparado em tampão adequado usando homogeneizador Potter-Elvehjem (5 pulsos). O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm, a 4°C por 15 minutos para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante foi estocado em alíquotas e armazenado a -80°C para posterior análises bioquímicas.

5.4.2 Preparação dos eritrócitos e do plasma:

O sangue coletado foi transferido para tubos contendo heparina, e então centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos para separar o plasma do precipitado. O plasma foi separado em novos microtubos e congelado para posterior determinação. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina gelada (0,153 mol/L de cloreto de sódio). Os lisados foram preparados pela adição de 1 mL de água destilada para 100 µL de eritrócitos lavados e congelados para posterior determinação bioquímica (LIMA *et al.*, 2017).

Para determinação da atividade das enzimas antioxidantes, os eritrócitos foram congelados e descongelados três vezes e centrifugados a 13.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi diluído para conter aproximadamente 0,5 mg/mL de proteína (LIMA *et al.*, 2017).

5.4.3 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS):

O método de TBARS foi determinado de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). A metodologia de TBARS, mensura o Malondialdeído (MDA), um produto da lipoperoxidação, causado principalmente por RL hidroxil. As amostras são misturadas com ácido tricloroacético a 20% e 0,8% de ácido tiobarbitúrico e aquecidas num banho de água fervente durante 60 min. TBA-RS é determinado pela absorbância de 535 nm. Uma curva de calibração foi obtida utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como o precursor de MDA e cada ponto da curva foi submetido ao mesmo tratamento que o dos sobrenadantes. Os resultados foram expressos em nmol de MDA por mg de proteína.

5.4.4 Catalase (CAT):

A atividade de CAT foi ensaiada pelo método de Aebi (1984) usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. O método utilizado baseia-se no desaparecimento de H_2O_2 a 240 nm num meio de reação contendo 25 μL de amostra e 600 μL de tampão de fosfato de potássio 10mM, pH 7,0, H_2O_2 20mM. A absorbância foi lida a cada 10 segundos por 1 minuto e 40 segundos no espectrofotômetro. Uma unidade foi definida como 1 μmol de H_2O_2 consumido por minuto e a atividade específica é calculada como unidades de CAT/mg de proteína.

5.4.5 Glutathione peroxidase (GSH-Px):

A atividade de GSH-Px foi mensurada pelo método de Wendel (1981), utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm por 3 minutos e 30 segundos (espectrofotômetro Shimadzu UV-visível). 90 μL de cada amostra foi adicionado ao meio contendo 800 μL de tampão, 20 μL de GSH 2,0 mM, 30 μL de GSH redutase 0,15 U/mL, 10 μL de azida 0,4 mM e 10 μL de NADPH 0,1 mM. A absorbância foi lida a cada 10 segundos por 1 minuto e 30 segundos. Posteriormente, 50 μL de tert-butilhidroperóxido 0,5 mM foi adicionado e a absorbância foi lida por mais 2 minutos. Uma unidade de GSH-Px foi definida como 1 μmol de NADPH consumido por minuto e a atividade específica foi apresentada como unidades de GSH-Px/mg de proteína.

5.4.6 Superóxido dismutase (SOD):

A atividade da SOD foi determinada pelo método de auto oxidação do pirogalol, como descrito por Marklund (1985), um processo altamente dependente de superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), que é um substrato para a SOD. Resumidamente, 15 μL de cada amostra, 215 μL de uma mistura contendo 50 uM de tampão Tris, pH 8,2 é adicionado à 1 μM de EDTA e 30 uM de CAT. Subsequentemente, é adicionado 20 uL de pirogalol e a absorbância é registada imediatamente a cada 30 segundos durante 3 minutos a 420 nm usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-visível. A inibição da auto oxidação do pirogalol ocorre na presença de SOD, cuja atividade pode ser indiretamente testada espectrofotometricamente. Uma curva de calibração é realizada com SOD purificada como referência, para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Uma unidade

de SOD é definida como a quantidade de SOD necessária para inibir 50% da auto oxidação de pirogalol e a atividade específica é relatado como unidades / mg de proteína .

5.4.7 Conteúdo Total de sulfidrilas:

O conteúdo total de sulfidrilas foi determinado de acordo com o método descrito por Aksenov e Markesbery (2001), o qual se baseia na redução do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) por tiois, gerando um derivado amarelo (TNB) que foi mensurado espectrofotometricamente em 412nm. Resumidamente, 50µL de homogeneizado é adicionado a 1 mL de tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA 1mM. A reação foi iniciada pela adição de 30µL de DTNB 10,0mM e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente em local escuro. Os resultados foram expressos em nmol TNB/mg de proteína.

5.4.8 Conteúdo Total de Carbonilas

O teor de carbonilas foi verificado através de um método descrito por Reznick e Packer (1994), com base na reação de carbonilação de proteínas com dinitrofenilhidrazina formando dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo, medido espectrofotometricamente a 370 nm. Resumidamente, 200 µL de homogeneizado é adicionado a tubos de plástico contendo 400 µL de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparado em HCl 2 M). As amostras são mantidas no escuro durante 1 h e agitadas em vórtex a cada 15 min. Subsequentemente, 500 µL de ácido tricloroacético a 20% são adicionados a cada tubo. A mistura é submetida a vórtex e centrifugada a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante obtido é descartado. O sedimento é lavado com 1 mL de etanol / acetato de etila (1: 1 v / v), agitado e centrifugado a 14000 x g durante 3 min. O sobrenadante é rejeitado e o sedimento ressuspenso em 600µL de guanidina 6M (preparado numa solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 2,3), antes de agitação em vórtex e incubação a 60°C durante 15 min. As amostras foram em seguida centrifugadas a 14.000 x g durante 3 min e o sobrenadante é usado para medir a absorbância a 370 nm (UV) numa cubeta de quartzo. Os resultados são relatados como conteúdo total de carbonilas (nmol / mg de proteína).

5.4.9 Atividade da Citrato Sintase

A atividade da citrato sintase foi determinada pelo método descrito por Srere (1969). De acordo com a metodologia, adiciona-se 800 uL de tampão, 100 uL de DTNB 1 mM, 40 uL de acetil-CoA 2,5 mM, 10 uL de triton 10% e 10 uL de amostra homogeneizada. Após 2 minutos à temperatura ambiente, adiciona-se 50 uL de oxaloacetato 4 mM, homogeneiza-se e lê-se em espectrofotômetro durante 3 minutos no comprimento de onda de 412 nm. A atividade da citrato sintase foi então normalizada para o conteúdo total de proteína e foi relatada como nanomoles por miligrama de proteína por minuto.

5.4.10 Atividade do Complexo I

A NADH desidrogenase (complexo I) foi avaliada pelo método descrito por Cassina e Radi (1996) pela taxa de redução de ferricianeto dependente de NADH em $\lambda=420$ nm. A atividade do Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial foi calculada como nmol/min mg proteína.

5.4.11 Atividade do Complexo II e Succinato Desidrogenase

A atividade do complexo II e da succinato desidrogenase foram determinadas pelo método descrito por Fischer et al. (1985). As dosagens realizadas em homogeneizados de córtex cerebral e cerebelo, seguindo a diminuição da absorbância devido à redução de 2,6- dicloroindofenol (DCIP) a 600 nm com 700 nm como comprimento de onda de referência ($\epsilon= 19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na presença de metassulfato de fenazina (PMS). A mistura da reação, é constituída por fosfato de potássio 40,0 mM, pH 7,4, succinato 16,0 mM e DCIP 8 μM , é pré-incubada com 40-80 g de proteína homogeneizada a 30°C durante 20 min. Posteriormente, para a atividade do complexo II, é adicionado azida sódica 4,0 mM, rotenona a 7 μM e a reação é iniciada pela adição de DCIP 40 μM e monitorizada durante 5 min. A atividade da SDH é determinada no mesmo meio de incubação por adição de PMS 1,0 mM e monitorizada durante 5 min. As atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram calculadas como nmol/min mg proteína.

5.4.12 Dosagem de proteínas:

A determinação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

5.5 Análise histológica

As amostras de tecido cerebral de ratos foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10% por 72 horas. Após a fixação, as amostras foram processadas em séries de etanol de diferentes concentrações, desidratadas em xileno e incluídas em meio de inclusão parafinado Paraplast (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Cortes seriados de 6µm de espessura foram realizados utilizando um microtomo rotativo e montados em lâminas de vidro. As seções de tecido foram submetidas à coloração com azul de toluidina, a fim de determinar a média de número de neurônios intactos e a densidade óptica média dos grânulos de Nissl, que estão reduzidos em casos de neurodegeneração (Einarson, 1932). A análise histológica foi realizada utilizando microscopia de luz (Primo Star 3), permitindo a observação detalhada da morfologia neuronal e a identificação de possíveis alterações patológicas.

Considerando a importância do hipocampo na fisiopatologia do autismo, principalmente devido à disfunções mitocondriais e EO, foi feita uma análise estereológica de neuronios hipocampais. A contagem foi realizada utilizando a gráticula de Weibel nº2 – M42 acoplada ao microscópio óptico Olympus®, em aumento de 400x. Foram observadas duas regiões: CA1 e CA3, nos quais apenas células com núcleos picnóticos, basofílicas e sem contorno evidente foram contabilizadas. O cálculo da densidade celular por área foi feito através da fórmula de Weibel, Kistler e Scherle (1966):

$$\text{Densidade celular} = \text{número de células positivas} / 36,36 * \text{aumento}^2$$

5.6 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados por meio do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguido do teste múltiplo de Duncan quando indicado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram analisados usando o SPSS para Windows, versão 29.0.1 (SSPS, Chicago, IL, EUA). Os gráficos foram gerados através do Software GraphPad versão 8.0.

6. CONDIÇÕES ÉTICAS

Esse projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE e aprovado sob parecer número 02/2022. Esse projeto não apresenta conflitos de interesse.

7. INTERDISCIPLINARIDADE

Este projeto é interdisciplinar, pois busca compreender as alterações e os controles subjacentes à patogênese do autismo, uma vez que a fisiopatologia da condição ainda é parcialmente desconhecida. Ao investigar os efeitos do resveratrol e do aripiprazol nos parâmetros de EO e do metabolismo energético, o estudo pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos e avanços no tratamento do autismo. Essas descobertas podem reduzir a morbidade associada à doença e melhorar os sintomas e a qualidade de vida dos autistas, assim como também influenciar na qualidade de vida dos familiares, melhora do indivíduo com TEA em ambientes como escola e melhores respostas às terapias comportamentais utilizadas. Ao mesmo tempo, impulsionam a indústria farmacêutica e a econômica.

A abordagem interdisciplinar deste projeto não apenas abrange áreas da neurociência e farmacologia, mas também se estende à psicologia e à educação, reconhecendo que a compreensão do autismo exige uma visão holística. A interação entre os aspectos biológicos e comportamentais é fundamental para desenvolver intervenções eficazes. Pesquisas indicam que fatores como a neuroplasticidade e o ambiente social desempenham um papel significativo na forma como os indivíduos com TEA respondem a tratamentos e terapias. Assim, ao considerar o impacto do resveratrol e do aripiprazol

sobre a fisiopatologia do autismo, este estudo poderá oferecer insights valiosos sobre como otimizar intervenções educacionais e comportamentais que atendam às necessidades específicas dos autistas, contribuindo para um melhor desenvolvimento social e emocional (Kern et al., 2016; Frye et al., 2013).

Além disso, a pesquisa interdisciplinar pode fomentar colaborações entre universidades, centros de pesquisa e a indústria farmacêutica, promovendo um ambiente de inovação. A exploração dos efeitos do resveratrol e do aripiprazol poderá estimular o desenvolvimento de novos tratamentos e produtos farmacêuticos que visem não apenas os sintomas do TEA, mas também as condições comórbidas frequentemente associadas, como distúrbios de ansiedade e problemas de sono (Rossignol & Frye, 2011). Essa colaboração pode levar a resultados benéficos tanto para os pacientes quanto para a sociedade, contribuindo para a formação de profissionais qualificados e a criação de políticas públicas que apoiem a inclusão e o bem-estar dos indivíduos com TEA e suas famílias. A busca por soluções integradas tem o potencial de não apenas melhorar a qualidade de vida dos autistas, mas também de impactar positivamente o sistema de saúde e a economia como um todo.

8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

ANTIOXIDANT, METABOLIC AND BEHAVIORAL EFFECTS OF RESVERATROL AND ARIPIRAZOLE IN AN ANIMAL MODEL OF AUTISM INDUCED BY VALPROIC ACID

Natalia Cavichioli¹ Alessandra Betina Gastaldi¹, Ramon Fernandes Olm¹, Katherine Plautz¹, Gabriela Borgmann¹, Thayná Patachini Maia¹, Klaus Johann Jacques Schebek Teixeira², Kassielly Longo Brizola², Débora Delwing-Dal Magro^{3,4}, Mariella Reinol da Silva⁵, Larissa Espindola da Silva⁵, Bruna Barros Fernandes⁵, Eduardo Manoel Pereira, Daniela Delwing-de Lima^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

²Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville– UNIVILLE, Rua Paulo Malschitzki, 10- Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil.

³Departamento de Ciências Naturais, Centro de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade - PPGBio Universidade Regional de Blumenau, Rua Antônio da Veiga, 140, CEP 89012-900, Blumenau, SC, Brazil

⁵Universidade do Sul de Santa Catarina - Av. José Acácio Moreira, 787 - CEP 88704-900, Dehon, Tubarão, SC, Brazil.

*Address for correspondence: Dra. Daniela Delwing-de Lima, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente e Departamento de Medicina, Universidade da Região de Joinville, Rua Paulo Malschitzki, 10 – Zona Industrial Norte, CEP 89201-972, Joinville, SC, Brazil, Phone 55 47 3461 9112, E-mail: daniela.delwing@univille.br; daniela.delwing@gmail.com

Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition characterized by deficits in social communication and restrictive, repetitive behaviors. Its etiology is multifactorial, involving both genetic and environmental factors, which contribute to oxidative stress (OS) and mitochondrial dysfunction. This study investigates the effects of subchronic administration of resveratrol, aripiprazole and resveratrol plus aripiprazole on OS, energy metabolism, and behavioral parameters in a valproic acid-induced autism model in rats. Antioxidant activity was assessed through thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content, carbonyl proteins content (CP), and antioxidant enzymes (catalase - CAT, glutathione peroxidase (GSH-Px, and superoxide dismutase - SOD) in whole blood, cerebral cortex and cerebellum. Mitochondrial function was evaluated by analyzing - citrate synthase, complex I, complex II, succinate dehydrogenase and complex IV in the cerebral cortex and cerebellum. Resveratrol treatment significantly reversed CP levels in the cerebral cortex and TBA-RS levels in the cerebral cortex, cerebellum, and plasma. Additionally, reversed the decrease in SOD activity in the cerebral cortex and the increase in the erythrocytes, and the decrease in GSH-Px activity in the cerebellum and erythrocytes. Aripiprazole treatment reversed the increase in CP levels in the cerebral cortex and TBA-RS levels in the cerebral cortex, cerebellum, and plasma. It also reversed the decrease in SOD activity in the cerebral cortex and GSH-Px activity in the cerebellum, while reversing the increase in SOD activity in erythrocytes. Moreover, the combination of resveratrol and aripiprazole exhibited a pronounced effect, further reducing TBA-RS levels in the cerebral cortex and enhancing SOD activity in the cerebral cortex. Resveratrol increased the sociability index in the three-chamber test for social interaction. The combination of resveratrol and aripiprazole improved parameters of the energy metabolism enzymes succinate dehydrogenase in the cerebral cortex and citrate synthase in the cerebral cortex and cerebellum, as well as decreased the population of dark neurons in the hippocampus in histological analyses. These findings suggest a promising therapeutic potential for the treatment of ASD, encouraging future clinical research.

Keywords: Resveratrol; aripiprazole; oxidative stress; animal model; valproic acid; energy metabolism.

1. Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by deficits in social communication, restricted interests, and repetitive behaviors. Its etiology is multifactorial, involving both genetic and environmental factors, and increasing evidence suggests that oxidative stress (OS) plays a significant role in its pathophysiology (FRANCISCHETTI *et al.*, 2020). This stress results from an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense mechanisms, which can impair cerebral energy metabolism and mitochondrial function, leading to neuroinflammation and neural dysfunction (BALBUENA *et al.*, 2018).

Epidemiological studies indicate that ASD affects approximately 1% of children worldwide, with prevalence rates showing a marked increase over the past few decades (ZEIDAN *et al.*, 2022). This rise in prevalence is attributed not only to greater awareness and improved diagnostic criteria but also to shifts in the classification of related disorders (BHAT *et al.*, 2014; HIROTA; KING, 2023). Consequently, as the recognition of ASD has improved, a corresponding decrease in the prevalence of other developmental disorders, such as language disorders and intellectual disabilities, has been observed (ZABLOTSKY *et al.*, 2015). Furthermore, ASD exhibits considerable heterogeneity in clinical presentation, requiring individualized approaches to intervention and treatment (MAGLIONE *et al.*, 2012). These trends highlight the need for continued research into the underlying biological mechanisms and risk factors associated with ASD.

Mitochondria, the main organelles responsible for cellular energy production, are highly susceptible to OS, and mitochondrial dysfunction is frequently associated with ASD (GU *et al.*, 2021). Studies suggest that modulating this stress can alleviate the characteristic behavioral symptoms of the disorder (ROSENFELD; ZHENG, 2015).

Among the compounds with therapeutic potential, resveratrol, a polyphenol known for its antioxidant and anti-inflammatory properties, stands out (PESIĆ *et al.*, 2020). Additionally, aripiprazole, an atypical antipsychotic approved for treating irritability associated with ASD, has shown beneficial effects in animal models, including the modulation of OS (PAULZEN *et al.*, 2022).

Thus, this study aims to investigate the effects of subchronic administration of resveratrol and aripiprazole on oxidative stress, energy metabolism and behavior in rats with ASD induced by valproic acid.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Male *Wistar* rats exposed to valproic acid during the prenatal period were used. The pregnant females were induced once intraperitoneally with 800 mg/kg of the drug on the 12th day of gestation. The animals were transferred to the vivarium at 20 days of age, kept in a maximum of four per cage containing wood shavings and acclimated for 7 days to adapt to a new environment. They were kept in a 12-hour light and dark cycle with a controlled temperature of 25°C without water or food restrictions.

2.2 Experimental protocol

For subchronic treatment, animals received resveratrol, aripiprazole or resveratrol plus aripiprazole for 15 consecutive days via oral administration (gavage), with a 24-hour interval between treatments (Table 1). The dosage was proportional to the animal's body weight.

Group	Treatment
Controle	SI + saline
RSV	SI + Resveratrol 15 mg/kg
ARIP	SI + Aripiprazole 15 mg/kg
RSV + ARIP	SI + Resveratrol + Aripiprazole (15 mg/kg)
VPA	AVP + saline
RSV + VPA	AVP + Resveratrol 15 mg/kg
ARIP + VPA	AVP + Aripiprazole 15 mg/kg
RSV + ARIP + VPA	AVP + Resveratrol + Aripiprazol (15mg/kg)

Table 1. Treatment groups. SI = Animals without prenatal induction with valproic acid. VPA = Animals born from mothers induced with valproic acid (800 mg/kg).

Twelve hours after the last treatment, animals were subjected to social interaction and repetitive behavior tests to assess motor and psychotherapeutic responses

to the established treatment. Animals were sacrificed by decapitation without anesthesia, and whole blood, cerebral cortex and cerebellum were collected for biochemical analysis.

2.3 Behavioral tests

2.3.1 Three-Chamber Social Preference and Novelty Test

The three-chamber test consists of a rectangular apparatus made of polycarbonate, measuring 70 cm × 24 cm × 29 cm. The lateral chambers measure 25 cm × 24 cm × 29 cm, while the central chamber measures 15 cm × 24 cm × 29 cm. The dividing walls have retractable doors that allow access to each chamber through openings measuring 6.5 cm × 6.5 cm. For the sociability assessment, custom-made wire cages (14 cm high, 13 cm diameter, with 1 cm spaced bars) are utilized.

The test comprises three consecutive phases, each lasting 10 minutes: habituation, social preference, and preference for social novelty. During the habituation phase, the subject is placed in the central chamber, the doors are opened, and the test rat is allowed to explore the apparatus. Subsequently, the test rat is returned to the central chamber while an unfamiliar rat is placed in one of the wire cages located in a lateral chamber. An empty wire cage is positioned in the opposite chamber. The doors are reopened, allowing the subject to explore the entire social testing box.

In the following phase, the test rat is again placed in the central chamber, and an unfamiliar rat is introduced into the same chamber as the test rat. This phase assesses social novelty by observing the test rat's preference for either the familiar or unfamiliar rat. The duration of time spent in each chamber is recorded for 10 minutes per session, as described (Kaidanovich-Beilin et al., 2010; Karvat & Kimchi, 2012; Moy et al., 2004).

The sociability index (SI) and the social novelty preference index (SNI) were calculated using the following equations:

$$SI = \frac{(\text{time exploring novel rat 1} - \text{time exploring novel object})}{(\text{time exploring novel rat 1} + \text{time exploring novel object})}$$

$$SNI = \frac{(\text{time exploring novel rat 2} - \text{time exploring known rat})}{(\text{time exploring novel rat 2} + \text{time exploring known rat})}$$

2.3.2 Open Field Test

The open field test (OFT) systematically evaluates exploratory behaviors exhibited in a novel environment. Rats are placed in a wooden box (dimensions: 40 × 60 × 50 cm) with the floor divided into 12 equal quadrants and a glass front to facilitate observation. The number of quadrants crossed by the animal with all four paws is recorded over a 30-minute period, along with the total number of rearing events, the quantity of fecal bolus, and the time spent in the center area. This assessment allows for the evaluation of general locomotor activity and anxiety-related behaviors (Lenzi et al., 2015).

In interpreting the results, less time spent in the center is considered indicative of higher levels of anxiety-like behavior, while total distance traveled reflects the overall locomotor activity of the tested animals. The open field activity is considered an essential control for the effects of physical activity, such as sedation or hyperactivity, which could confound the interpretation of results from reciprocal interactions, self-care fear conditioning, and social approach tasks (Dhamne et al., 2017).

2.3.3 Marble burying

The Marble burying test is utilized to assess repetitive behavior in rats by observing increased digging capacity. A plexiglass box is filled with a 2-3 cm layer of sawdust, followed by 20 equidistant colored glass marbles (15 mm in diameter). The test lasts for a 30-minute exploration period. The number of marbles that are excavated (with > 50% of the marble covering material removed) is subsequently counted (Angoa-Pérez et al., 2013; Thomas et al., 2009).

2.4 Biochemical analysis

All reagents and salts used in this study were obtained from Sigma-Aldrich. The purity and quality of these compounds were ensured to be suitable for the experimental procedures conducted.

2.4.1 Preparation of Tissues:

Euthanasia of the animals was performed through decapitation. The cerebral cortex and cerebellum were immediately dissected on a cold surface, with the interval between decapitation and dissection not exceeding 1 minute. The homogenate was prepared in an appropriate buffer using a Potter-Elvehjem homogenizer (5 pulses). The homogenate was then centrifuged at 3,000 rpm at 4°C for 15 minutes to remove cellular debris. The resulting supernatant was stored in aliquots and kept at -80°C for subsequent biochemical analyses.

2.4.1.1 Preparation of Erythrocytes and Plasma:

Blood collected was transferred to tubes containing heparin and centrifuged at 1,000 rpm for 5 minutes to separate the plasma from the precipitate. Plasma was transferred to new microtubes and frozen for later analysis. Erythrocytes were washed three times with cold saline solution (0.153 mol/L sodium chloride). The lysates were prepared by adding 1 mL of distilled water to 100 µL of washed erythrocytes, which were frozen for subsequent biochemical determinations (Lima et al., 2017).

To determine the activity of antioxidant enzymes, erythrocytes were frozen and thawed three times and then centrifuged at 13,500 rpm for 10 minutes. The supernatant were be diluted to approximately 0.5 mg/mL of protein (Lima et al., 2017).

2.4.2 Thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS):

The TBA-RS method was determined according to the protocol described by Ohkawa et al. (1979). This methodology measures malondialdehyde (MDA), a product of lipoperoxidation primarily caused by hydroxyl free radicals. Samples were mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 minutes. TBA-RS were determined by absorbance at 535 nm. A calibration curve was obtained using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as the MDA precursor, and each point of the curve underwent the same treatment as the supernatants. Results were expressed in nmol of MDA per mg of protein.

2.4.4 Total Sulphydryl Content:

Total sulphydryl content was determined according to the method described by Aksenov and Markesbery (2001), which is based on the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) measured spectrophotometrically at 412 nm. Briefly, 50 μ L of homogenate were added to 1 mL of PBS buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA. The reaction is initiated by the addition of 30 μ L of 10.0 mM DTNB and incubated for 30 minutes at room temperature in the dark. Results were expressed in nmol TNB/mg of protein.

2.4.7 Total Carbonyl Content:

The carbonyl content were assessed using a method described by Reznick and Packer (1994), based on the carbonylation reaction of proteins with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound measured spectrophotometrically at 370 nm. Briefly, 200 μ L of homogenate were added to plastic tubes containing 400 μ L of 10 mM DNPH (prepared in 2 M HCl). Samples were kept in the dark for 1 hour and vortexed every 15 minutes. Subsequently, 500 μ L of 20% trichloroacetic acid was added to each tube. The mixture was vortexed and centrifuged at 14,000 x g for 3 minutes, and the resulting supernatant discarded. The sediment were washed with 1 mL of ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v), vortexed, and centrifuged at 14,000 x g for 3 minutes. The supernatant was discarded, and the sediment resuspended in 600 μ L of 6 M guanidine (prepared in 20 mM potassium phosphate solution, pH 2.3), followed by vortexing and incubation at 60°C for 15 minutes. Samples were then centrifuged at 14,000 x g for 3 minutes, and the supernatant used to measure absorbance at 370 nm (UV). Results were reported as total carbonyl content (nmol/mg of protein).

2.4.3 Catalase (CAT):

CAT activity was determined by the method of Aebi (1984). This method is based on the disappearance of hydrogen peroxide (H_2O_2) in a reaction medium composed of 25 μ L of sample and 600 μ L of 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 20 mM H_2O_2 .

The absorbance was counted every 10 seconds for 1 minute and 40 seconds at 240 nm using a spectrophotometer. One CAT corresponds to 1 μmol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT units/mg protein.

2.4.5 Glutathione Peroxidase (GSH-Px):

GSH-Px activity was measured by the method of Wendel (1981), using tert-butylhydroperoxide as substrate. The decomposition of NADPH was controlled in a spectrophotometer at 340 nm for 3 minutes and 30 seconds. 90 μL of each sample was added to the medium containing 800 μL of buffer, 20 μL of 2.0 mM GSH, 30 μL of 0.15 U/mL GSH reductase, 10 μL of 0.4 mM azide, and 10 μL of 0.1 mM NADPH. The absorbance was counted every 10 seconds for 1 minute and 30 seconds. Subsequently, 50 μL of 0.5 mM tert-butylhydroperoxide were added and the absorbance was read for a further 2 minutes. One GSH-Px unit is characterized as 1 μmol of NADPH consumed per minute and the specific activity is defined as GSH-Px units/mg of protein.

2.4.6 Superoxide Dismutase (SOD):

SOD activity was determined by the pyrogallol autoxidation method, as described by Marklund (1985), a process that is highly dependent on superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$), which is a substrate for SOD. Briefly, 15 μL of each sample and 215 μL of a mixture containing 50 μM Tris buffer, pH 8.2, is added to 1 μM EDTA and 30 μM CAT. Subsequently, 20 μL of pyrogallol is added, and absorbance is recorded immediately every 30 seconds for 3 minutes at 420 nm using a Shimadzu UV-visible spectrophotometer. The inhibition of pyrogallol autoxidation occurs in the presence of SOD, whose activity can be indirectly assessed spectrophotometrically. A calibration curve is performed with purified SOD as a reference to calculate the SOD activity present in the samples. One unit of SOD is defined as the amount of SOD required to inhibit 50% of the autoxidation of pyrogallol, and specific activity is reported as units of SOD per mg of protein.

2.4.7 Citrate Synthase Activity:

Citrate synthase activity was determined by the method described by Srere (1969). According to the methodology, 800 μ L of buffer, 100 μ L of 1 mM DTNB, 40 μ L of 2.5 mM acetyl-CoA, 10 μ L of 10% Triton, and 10 μ L of homogenized samples were added. After waiting 2 minutes at room temperature, 50 μ L of 4 mM oxaloacetate was added, homogenized, and read in a spectrophotometer for 3 minutes at a wavelength of 412 nm. Citrate synthase activity was then normalized to total protein content and was reported as nanomoles per milligram of protein per minute.

2.4.8 Complex I

NADH dehydrogenase (complex I) was evaluated by the method described by Cassina and Radi (1996) by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction at $\lambda=420\text{nm}$. The activities of Complex I were calculated as nmol/min mg protein.

2.4.8 Complex II and Succinate Dehydrogenase Activity

The activity of complex II and succinate dehydrogenase were determined by the method described by Fischer et al. (1985). The assays were performed on brain homogenates, following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-dichloroindophenol (DCIP) at 600 nm with 700 nm as reference wavelength ($\epsilon = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in the presence of phenazine metasulfate (PMS). The reaction mixture, consisting of 40.0 mM potassium phosphate, pH 7.4, 16.0 mM succinate and 8 μ M DCIP, is pre-incubated with 40-80 g of homogenized protein at 30°C for 20 min. Subsequently, for the activity of complex II, 4.0 mM sodium azide, 7 μ M rotenone are added and the reaction is initiated by the addition of 40 μ M DCIP and monitored for 5 min. SDH activity is determined in the same incubation medium by adding 1.0 mM PMS and monitored for 5 min. Results were expressed as units/min mg protein.

2.4.12 Protein determination:

Protein determination was performed using the Lowry method (1951), using bovine serum albumin as a standard.

2.5 Histological Analysis:

Rats' brain tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin for 72 hours. Following fixation, samples were processed through serial grades of ethanol, cleared in xylene, and embedded in Paraplast tissue embedding medium (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Serial sagittal brain sections, 6 µm thick, were cut using a rotary microtome and mounted on glass slides. Tissue sections were stained with toluidine blue to determine the mean number of intact neurons and the mean optical density of Nissl's granules, which are depleted in cases of neurodegeneration (Einarson, 1932). Histological analysis was performed using an optical microscope, allowing for detailed observation of neuronal morphology and the identification of potential pathological alterations. The count was performed using a Weibel graticule no. 2 – M42 coupled to an Olympus® optical microscope, at 400x magnification. Two regions were observed: CA1 and CA3, in which only cells with pyknotic, basophilic nuclei and no evident contour were counted. The calculation of cell density per area was done using the formula of Weibel, Kistler and Scherle (1966):

$$\text{Cell density} = \text{number of positive cells} / 36.36 * \text{magnification}^2$$

2.6 Statistical analysis

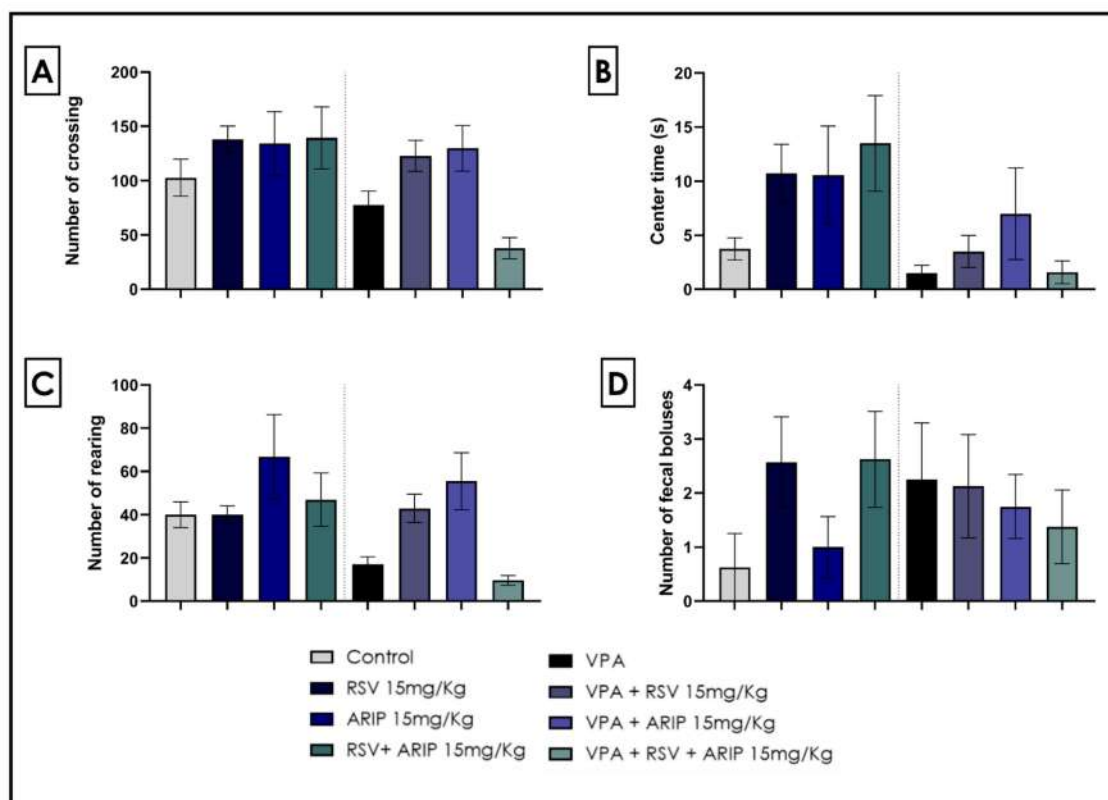
The results were evaluated through the Kolmogorov-Smirnov normality test and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's Multiple Test when indicated. *p* values < 0.05 were considered significant. Data were analyzed using SPSS for Windows, version 29.0.1 (SSPS, Chicago, IL, USA). The graphs were generated using GraphPad Software version 8.0.

3. Results

3.1 Behavioral tests

Figure 1 presents the results of the open field test, indicating that there were no significant differences in any of the periods analyzed, including crossing (Figure 1 - A), rearing (Figure 1 -C), fecal bolus (Figure 1 -D), and center time (Figure 1 - B).

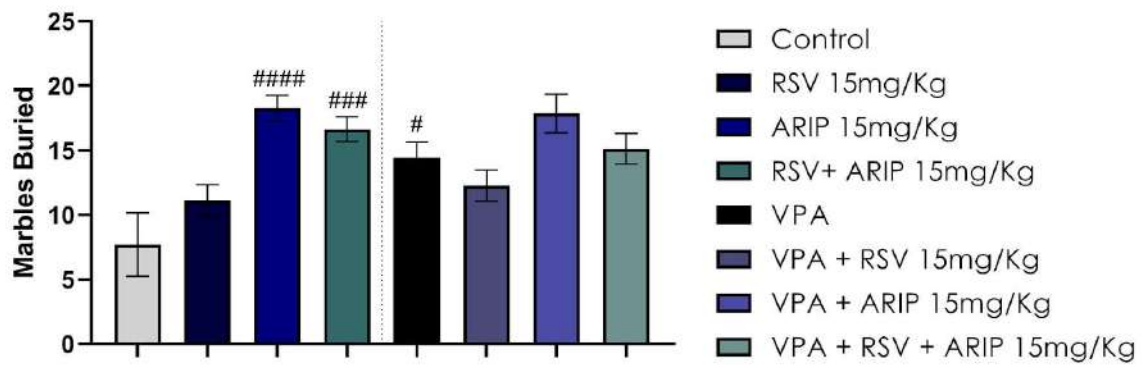
Figure1- Open Field Test of animals subchronically treated with RSV, ARIP, or RSV + ARIP



Source: Author (2024). Open field Test, Legend: A) Number of crossing of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg, or RSV + ARIP 15mg/kg. B) Center Time of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg, or RSV + ARIP 15mg/kg. C) Number of crossing of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg, or RSV + ARIP 15mg/kg. D) Number of fecal boluses of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg, or RSV + ARIP 15mg/kg. VPA: animals induced by valproic acid (800mg/kg). All values expressed as mean $\pm$ SEM, n=8.

The number of buried marbles in the AVP group was higher compared to the saline control group ($p < 0.05$). Treatment with ARIP ($p < 0.0001$) and the combination of RSV + ARIP ($p < 0.001$) significantly increased the number of buried marbles compared to the saline group. However, there was no statistical difference between the treatments of the induced groups relative to the VPA control (Figure 2).

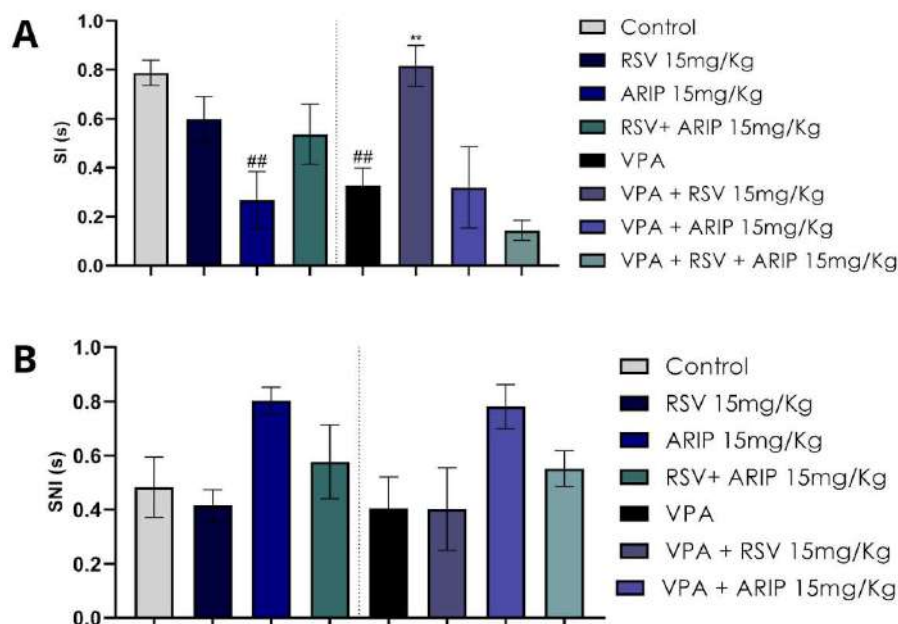
Figure 2 - Marble burying Test of animals subchronically treated with RSV, ARIP or RSV + ARIP.



Source: Author (2024). Behavioral responses of rats on the marble-burying. Rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg, or RSV + ARIP 15mg/kg. VPA: animals induced by valproic acid (800mg/kg). # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$; ##### $p < 0.0001$ when compared to the saline control group. All values expressed as mean $\pm$ SEM, $n=8$.

The sociability index (SI) and the social novelty preference index (SNI) are shown in Figure 3. The VPA group decreased the SI compared to the saline control group ($p < 0.01$). This decrease was reversed by the RSV-treated group ($p < 0.01$). Furthermore, the ARIP group decreased the sociability time when compared to the saline control ($p < 0.01$). There was no statistical difference in SNI.

Figure 3 - The sociability index (SI) and the social novelty preference index (SNI) of animals subchronically treated with RSV, ARIP or RSV + ARIP.

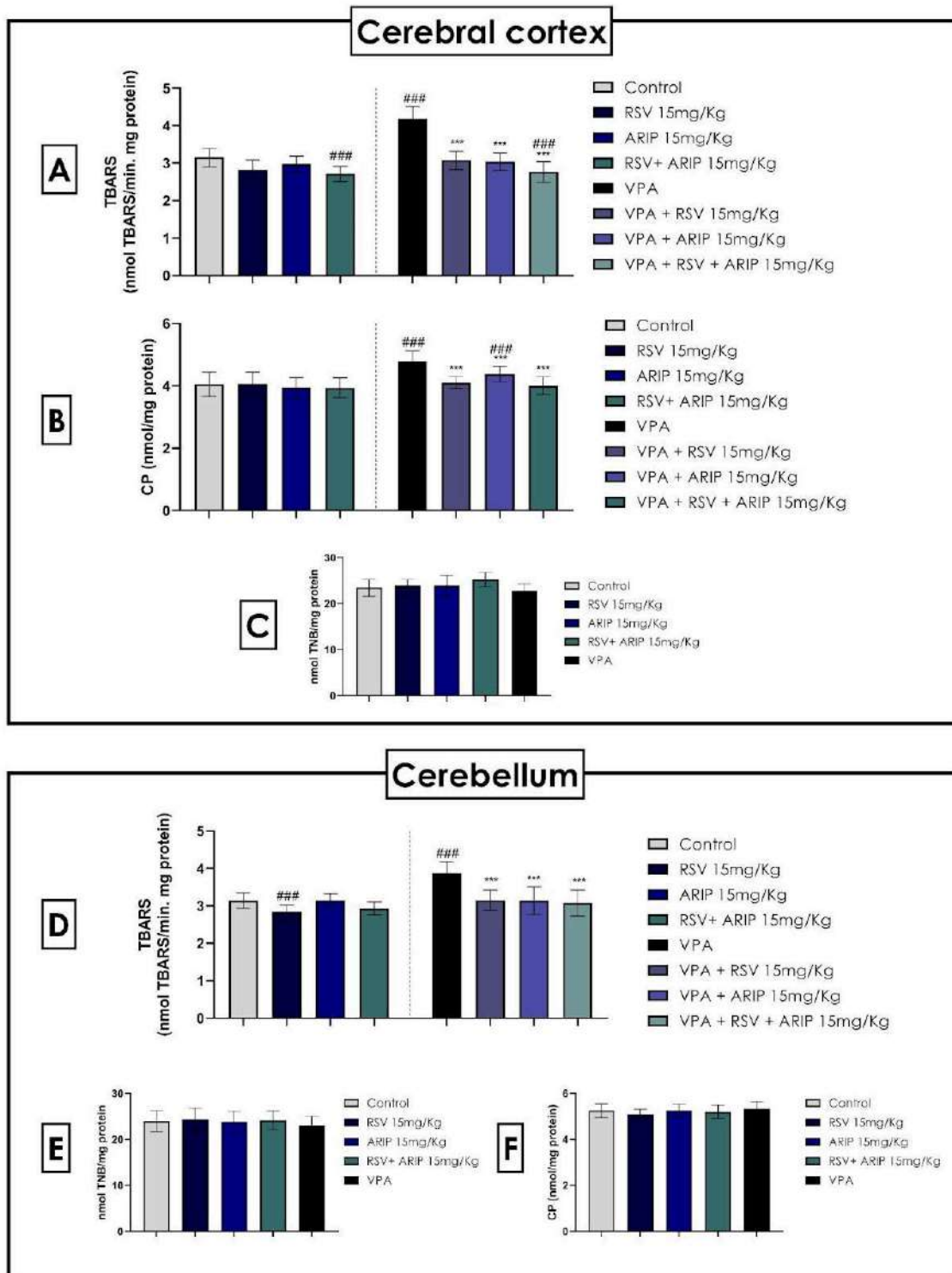


Source: Author (2024). The sociability index (SI) (A) and the social novelty preference index (SNI) (B) of Rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg, or RSV + ARIP 15mg/kg. ## $p < 0.01$ when compared to the saline control group. ** $p < 0.01$ when compared to the VPA group. All values expressed as mean $\pm$ SEM, $n=8$.

3.2 Oxidative Stress Parameters

In the cerebral cortex, the VPA group increased TBA-RS and carbonyl protein content (Figure 4, A and B) and increased TBA-RS in the cerebellum (Figure 4, D), when compared to the saline control. All induced treated groups (VPA+RSV, VPA+ARIP and VPA+RSV+ARIP) decreased the levels of TBA-RS in the cerebral cortex and cerebellum, when compared to the VPA control (Figure 4, A and D). In the cerebral cortex, the RSV+ARIP group decreased TBA-RS compared to the saline group ($p < 0.001$) and the VPA+RSV+ARIP group compared to the VPA control ($p < 0.001$), showing total reversion and decrease of TBA-RS in the tissue (Figure 4, A). In the cerebellum, the RSV group decreased TBA-RS content when compared to the saline control (Figure 4, D).

Figure 4- Quantification of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total sulfhydryl content and carbonyl protein (PC) content in the cerebral cortex and cerebellum of rats treated subchronically with saline, resveratrol (RSV), aripiprazole (ARIP), resveratrol + aripiprazole (RSV + ARIP).



Source: Author (2024). Legend: TBA-RS (A), carbonyl proteins (CP) (B) and sulfhydryl proteins (C) from the cerebral cortex of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg or RSV + ARIP 15mg/Kg. TBA-RS (D), sulfhydryls proteins (E), and carbonyl proteins (CP) (F) from the cerebellum of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg, or RSV + ARIP 15mg/kg. VPA: animals induced by valproic acid (800mg/kg). *** p<0.001

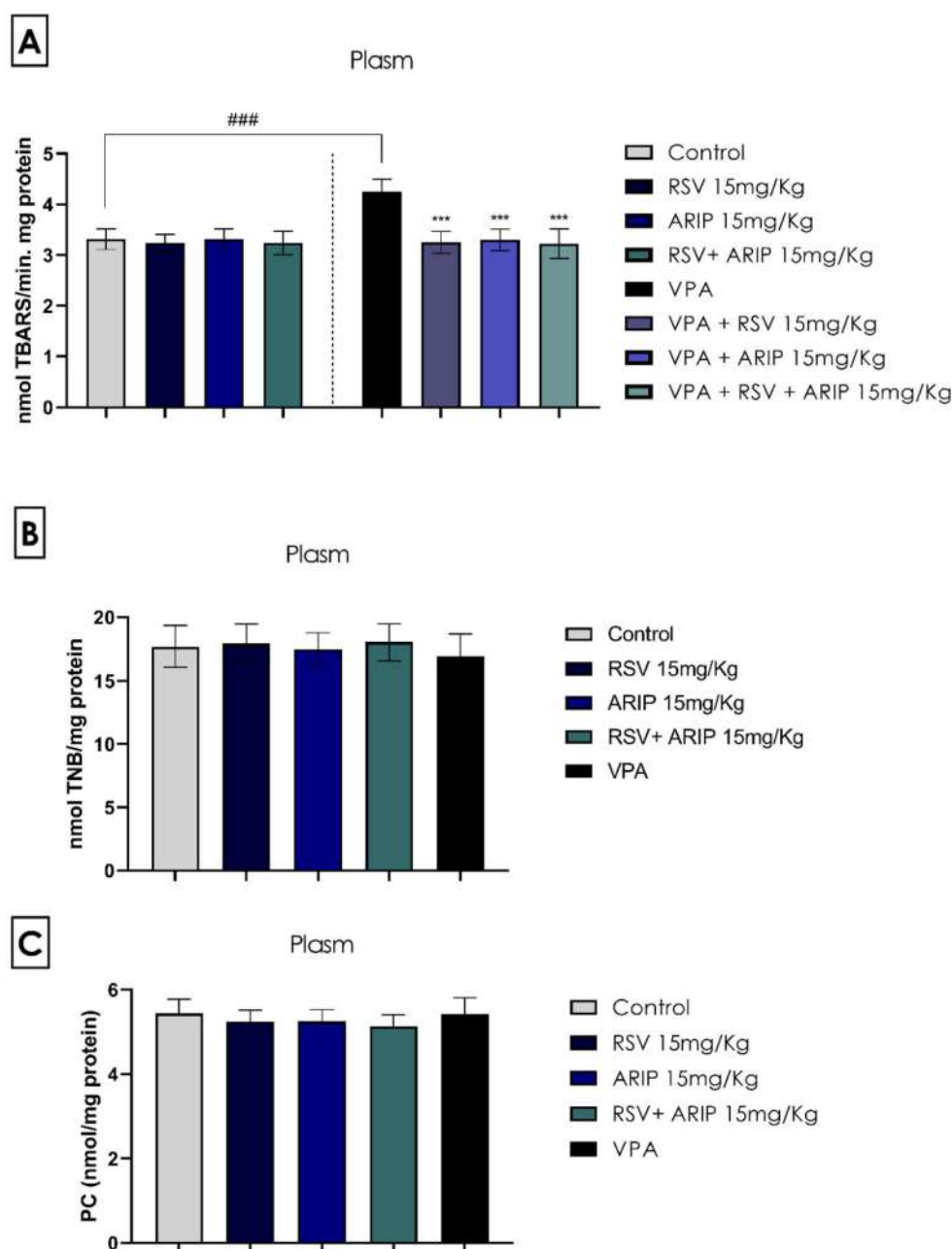
when compared to the VPA control. ### $p < 0.001$ when compared to the saline control group. All values expressed as mean $\pm$ SEM, $n=8$.

The VPA+ARIP group in the cerebral cortex partially decreased the carbonyl proteins, when compared to the VPA control and saline control (Figure 4, B $p < 0.001$). The VPA+RSV and VPA+RSV+ARIP groups reversed the increase, when compared to the VPA control (Figure 4, B $p < 0.001$).

The VPA group did not alter total sulfhydryl content in the cerebral cortex and cerebellum and protein carbonyl protein in the cerebellum of rats (Figure 4, C, E and F, respectively).

In the plasma, the VPA group significantly increases TBA-RS in relation to the saline control (Figure 5, A). All induced treated groups (VPA+RSV; VPA+ARIP and VPA+RSV+ARIP) decreased TBA-RS quantification in relation to the VPA control (Figure 5, A). Also, the VPA group did not alter total sulfhydryl content and protein carbonyl protein in the plasma (Figure 5, B and C).

Figure 5- Quantification of thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), total sulfhydryl content and carbonyl protein (CP) content in the plasma of rats subchronically treated with saline, resveratrol (RSV), aripiprazole (ARIP), resveratrol + aripiprazole (RSV + ARIP).

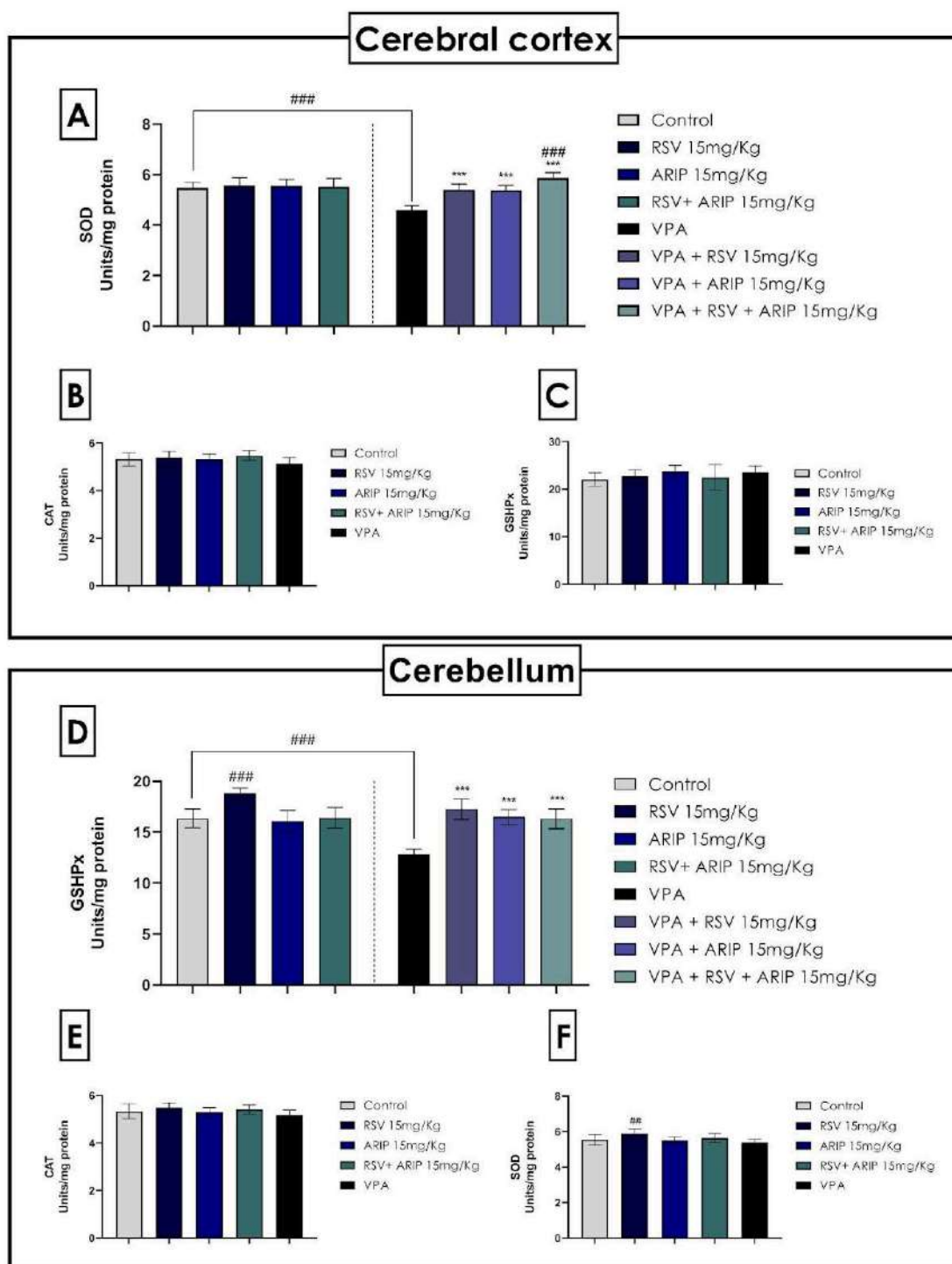


Source: Author (2024). Legend: TBA-RS (A), sulfhydryls content (B) and carbonyl proteins (CP) (C) from the plasma of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg or RSV + ARIP 15mg/Kg. VPA: animals induced by valproic acid (800mg/Kg). *** $p < 0.001$ when compared to the VPA control. ### $p < 0.001$ when compared to the saline control group. All values expressed as mean $\pm$ SEM, $n=8$.

3.3 Antioxidant enzyme parameters

In the cerebral cortex, VPA group decreased SOD activity when compared to the saline control. The VPA+RSV, VPA+ARIP and VPA+RSV+ARIP groups reversed the decrease in SOD activity, when compared to the VPA control, and VPA+RSV+ARIP yet increased SOD activity, when compared to the saline control (Figure 6, A $p<0.001$).

Figure 6- Quantification of the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), in the cerebral cortex and cerebellum of rats treated subchronically with saline, resveratrol (RSV), aripiprazole (ARIP), resveratrol + aripiprazole (RSV + ARIP).



Source: Author (2024). Legend: SOD (A), CAT (B) and GSH-Px (C) from the cerebral cortex of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg or RSV + ARIP 15mg/kg. GSH-Px (D), CAT (E) and SOD (F) from cerebellum of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg or RESV + ARIP 15mg/Kg. VPA: animals induced by valproic acid (800mg/Kg). *** $p < 0.001$ when compared to the AVP control. ## $p < 0.01$ ### $p < 0.001$ when compared to the saline control group. All values expressed as mean $\pm$ SEM, $n=8$.

In the cerebellum, the VPA group significantly decreased GSH-Px activity when compared to the non-induced control treated with saline. The VPA+RSV, VPA+ARIP and VPA+RSV+ARIP groups reversed the decrease in the enzymatic activity of GSH-Px when compared to the VPA control (Figure 6, D).

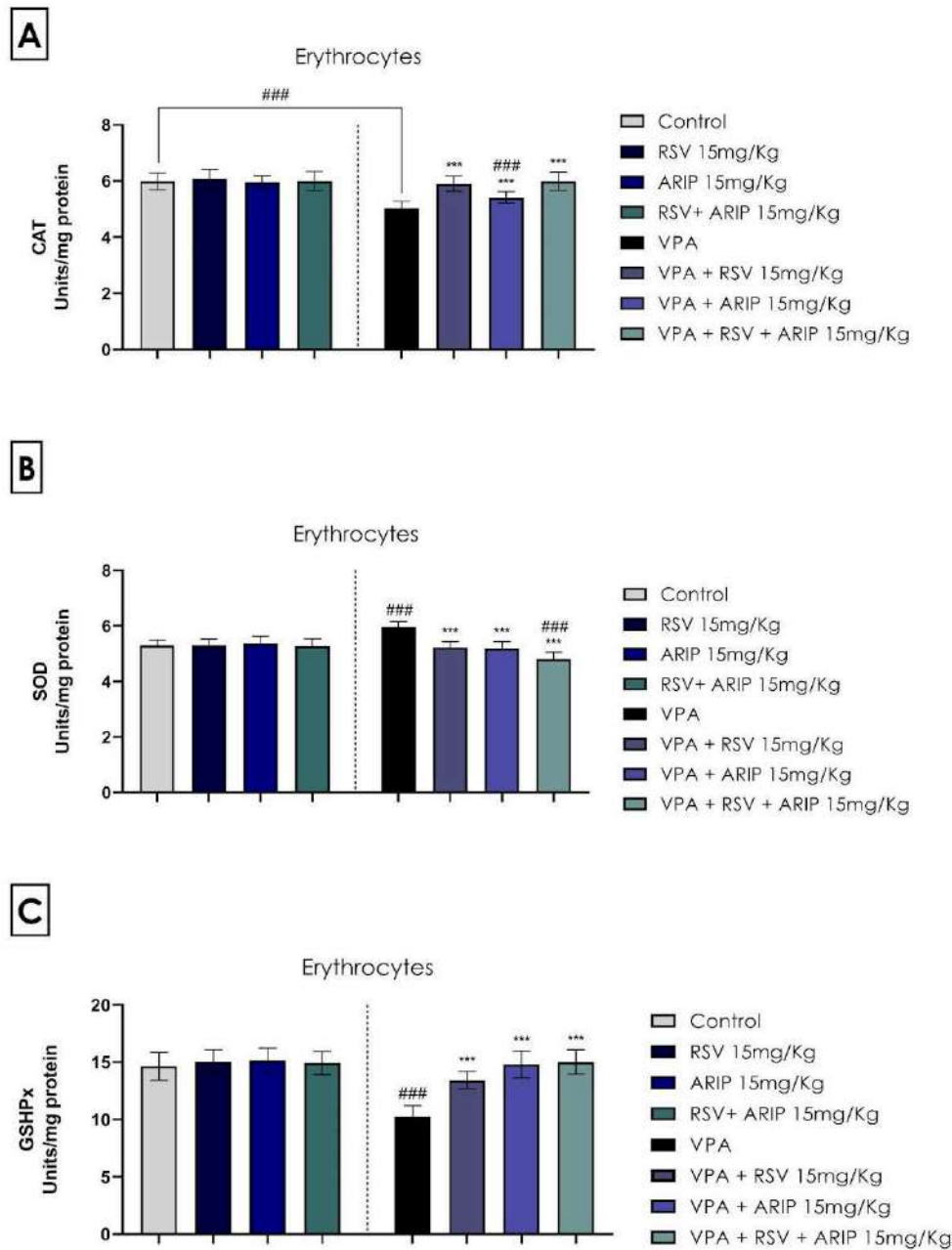
Furthermore, as seen in Figure 3, the RSV group showed an increase in the enzymatic activity of SOD (Figure 6, F, $p<0.01$) and GSH-Px in the cerebellum (Figure 6, D, $p<0.001$).

The VPA group did not alter CAT and GSH-Px activities in the cerebral cortex (Figure 6, B and C, respectively) and CAT and SOD activities in the cerebellum of rats (Figure 6, E and F, respectively).

In the erythrocytes, VPA group decreased CAT activity when compared to the saline control group (Figure 7, A $p<0.001$). The VPA+RSV and VPA+RSP+ARIP groups reversed the decrease in CAT activity when compared to the VPA control ($p<0.001$), and VPA+ARIP partially reversed the decrease in the enzyme activity when compared to the VPA control and saline control (Figure 7, A $p<0.001$).

Figure 4 also shows the activity of SOD (B) and GSH-Px (C) in the erythrocytes of rats. The VPA control increased SOD and decreased GSH-Px activities when compared to the saline control ($p<0.001$). Treatment with RSV, ARIP and RSV+ARIP in the induced groups reversed the alterations in SOD and GSH-Px activities (Figure 7, B and C, $p<0.001$). The VPA+RSV+ARIP group also diminished SOD activity, when compared to saline control (Figure 7, B, $p<0.001$).

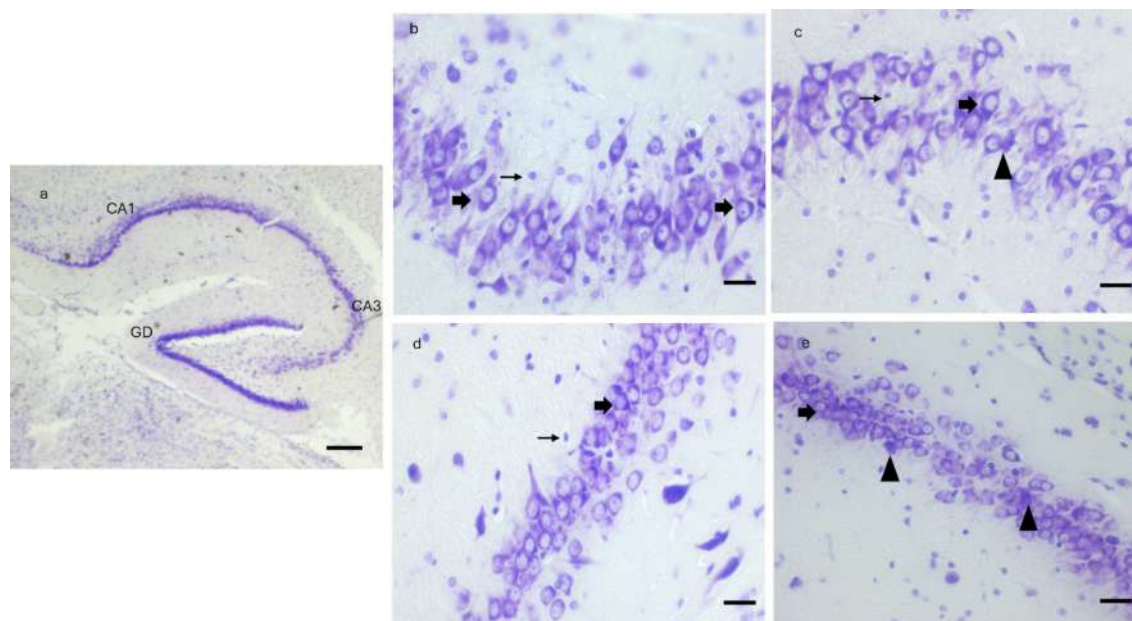
Figure 7- Quantification of the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in erythrocytes of rats treated subchronically with saline, resveratrol (RSV), aripiprazole (ARIP), resveratrol + aripiprazole (RSV + ARIP).



Source: Author (2024). Legend: CAT (A), SOD (B) and GSH-Px (C) from the erythrocytes of rats treated for 15 days with saline, RSV 15mg, ARIP 15mg or RSV + ARIP 15mg/Kg. VPA: animals induced by valproic acid (800mg/Kg). *** $p < 0.001$ when compared to the AVP control. ### $p < 0.001$ when compared to the saline control group. All values expressed as mean $\pm$ SEM, $n=8$.

3.4 Histological Analysis

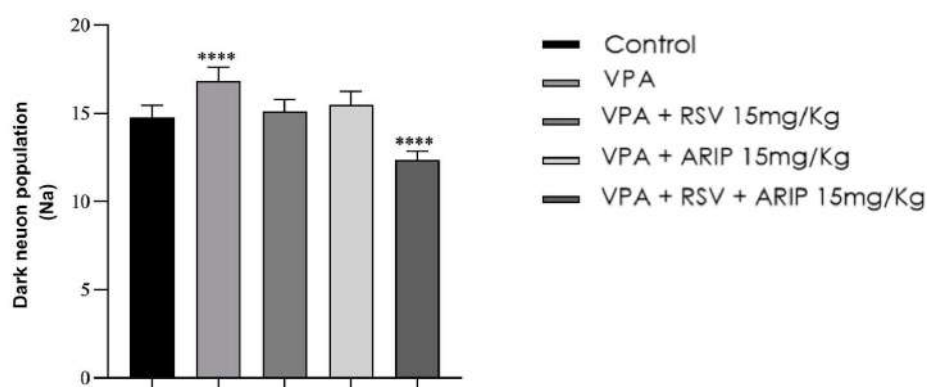
Figure 8- Histological section of the hippocampus stained using the Nissl method.



Source: Author (2024). Legend: a) Panoramic view of the hippocampus and its fields CA1, CA3, and the Dentate Gyrus. b) Field CA3 of the control group. c) Field CA3 of the group treated with RSV + ARIP. d) Field CA1 of the ARIP group. e) Field CA1 of the RSV group. Neurons (thick arrow); glia (thin arrow); and dark neuron (arrowhead). Scale bar 50 μ m.

The results of the histological analysis of the hippocampus are presented in Figure 8, which illustrates the neuronal architecture in the CA1 and CA3 fields, as well as the dentate gyrus. Image (a) shows a panoramic view of the hippocampus, highlighting the distinct regions mentioned. Image (b) represents the CA3 field of the control group, demonstrating the typical morphology of neurons and glia. In contrast, image (c) displays the CA3 field of the group treated with Resveratrol and Aripiprazole, where notable alterations in neuronal structure. Image (d) presents the CA1 field of the group treated solely with Aripiprazole, while image (e) illustrates the CA1 field of the group treated with Resveratrol. Neurons are indicated by thick arrows, glial cells by thin arrows, and dark neurons are marked by the arrowhead, suggesting pathological alterations in response to treatment.

Figure 9- Comparison of Dark Neuron Populations Across Treatment Groups in Rat Brain.



Source: Author (2024). Legend: Quantification of dark neurons in the brains of rats induced to autistic-like behavior for 15 days with saline, RSV 15mg/Kg, ARIP 15mg/Kg or RSV + ARIP 15mg/Kg. VPA: animals induced by valproic acid (800mg/Kg). **** $p < 0.0001$ when compared to control.

According to Figure 9, the control group treated with VPA exhibited a significantly higher population of dark neurons compared to the saline control group. Furthermore, combined treatment of RSV and ARIP reversed and reduced the population of dark neurons, showing lower levels than those observed in the saline control group ($p < 0.0001$, Figure 9).

3.5 Energy Metabolism

The results of the energy metabolism analyses are presented in Table 2. The AVP control group showed lower citrate synthase activity in the cerebellum when compared to the saline control ($p < 0.01$). Furthermore, the RSV+ARIP group exhibited a significant increase in citrate synthase activity in the cerebral cortex compared to the saline control group ($p < 0.001$). This enhancement was also observed in animals induced to autistic-like behaviors, with the RSV+ARIP+AVP group showing higher citrate synthase activity in both the cerebral cortex and cerebellum compared to the AVP group ($p < 0.0001$). The RSV+AVP ($p < 0.01$) and ARIP+AVP ($p < 0.05$) groups also showed increased citrate synthase activity in the cerebellum compared to the AVP control group.

Table 2. Enzymatic Activity Results for Energy Metabolism.

Group (n=8)	Tissue	Citrate Synthase (U/mg)	Complex I (U/mg)	Succinate Dehydrogenase (U/mg)	Complex II (U/mg)
Control	Cerebral Cortex	54.08 ± 6.773	1465 ± 378.3	8.186 ± 1.607	4.029 ± 1.127
Control	Cerebellum	57.17 ± 8.650	965.2 ± 228.5	5.106 ± 1.203	1.653 ± 0.1368
RSV	Cerebral Cortex	53.04 ± 5.952	1294 ± 227.5	8.123 ± 1.418	4.661 ± 0.8620
RSV	Cerebellum	56.51 ± 4.600	919.4 ± 166.8	5.023 ± 0.995	1.579 ± 0.4618
ARIP	Cerebral Cortex	61.99 ± 4.830	1359 ± 461.0	9.841 ± 2.065	3.823 ± 0.6902
ARIP	Cerebellum	59.97 ± 8.946	944.1 ± 265.5	5.087 ± 1.819	1.807 ± 0.4031
RSV + ARIP	Cerebral Cortex	61.33 ± 6.527 ^{###}	1422 ± 389.9	9.880 ± 1.776	4.293 ± 1.315 ^{###}
RSV + ARIP	Cerebellum	56.47 ± 7.383	933.6 ± 257.9	4.971 ± 1.494	2.830 ± 0.5382
VPA	Cerebral Cortex	47.57 ± 5.672	1824 ± 288.4	8.873 ± 1.400	4.006 ± 1.259
VPA	Cerebellum	39.39 ± 9.770 ^{##}	813.3 ± 191.9	3.971 ± 1.652	1.647 ± 0.4602
RSV + VPA	Cerebral Cortex	56.81 ± 8.444	1894 ± 477.4	9.749 ± 1.369	3.906 ± 0.9246
RSV + VPA	Cerebellum	56.29 ± 9.601 ^{**}	1014 ± 225.1	5.529 ± 1.172	2.129 ± 0.6676
ARIP + VPA	Cerebral Cortex	54.89 ± 6.835	1952 ± 254.8	9.840 ± 1.466	3.949 ± 0.9130
ARIP + VPA	Cerebellum	55.85 ± 7.674 [*]	1199 ± 264.8	4.870 ± 1.056	2.091 ± 0.6461
RSV + ARIP + VPA	Cerebral Cortex	72.14 ± 11.16 ^{****}	2136 ± 525.0	11.69 ± 2.004 ^{* ##}	3.951 ± 0.5073
RSV + ARIP + VPA	Cerebellum	55.06 ± 8.935 [*]	1213 ± 336.1	5.211 ± 1.087	1.840 ± 1.517

Table 2. Enzymatic Activity Results for Energy Metabolism: Citrate Synthase, Complex I, Succinate Dehydrogenase, and Complex II. RSV = group treated subchronically with resveratrol 15mg/Kg. ARIP = group treated subchronically with aripiprazole 15mg/Kg, RSV + ARIP = group treated subchronically with the combination of resveratrol and aripiprazole 15mg/Kg. AVP = Animals born to mothers induced by valproic acid (800 mg/Kg). * p<0.5; ** p<0.01; **** p<0.0001 when compared to the AVP control. ## p<0.01; ### p<0.001 when compared to the saline control group. All values expressed as mean ± SEM, n=8.

In the cerebral cortex, the group treated with the combination of RSV and ARIP exhibited a significant increase in succinate dehydrogenase activity compared to both the saline control (p<0.01) and the AVP control groups (p<0.05). Additionally, the RSV + ARIP group showed increased activity of complex II in the cerebral cortex (p<0.001).

4. Discussion

4.1 Behavioral tests

In the present study, the marble burying test was used to evaluate stereotyped behavior in rats induced to autism with VPA. Unlike what is reported in the literature, where ARIP demonstrates efficacy in reducing stereotyped behaviors in other experimental models (EGASHIRA *et al.*, 2008; NAKHAL *et al.*, 2023; ZOHNYY *et al.*, 2023), our results did not show such a reduction. This discrepancy may be attributed to several factors, such as the dose of ARIP used (15 mg/kg), the duration of treatment (15 days), and the route of administration (oral), which may differ from the parameters adopted in other studies. Additionally, experimental conditions, such as the age of the animals, environment, and handling of the animals, may have contributed to this variation in results. These differences highlight the need for further studies to investigate the specific mechanisms of ARIP and RSV in autism-like behavior models.

The results of the present study indicate that prenatal exposure to VPA during the critical phase of brain development was able to induce core characteristics of autism. This was evidenced by a decrease in the SI, indicating deficits in social communication, and an increased number of buried marbles, reflecting repetitive stereotyped behavioral patterns.

Interestingly, RSV treatment was able to prevent the VPA-induced alterations, with treated animals displaying behaviors similar to the control group, particularly in the social interaction test. Similar results were reported by Bambini-Junior (2014) and Juybari *et al.* (2020). However, our study did not find significant results for the effects of ARIP on VPA-induced social interaction deficits. Previous studies, such as that by Hara *et al.* (2017), indicate that chronic but not acute administration of ARIP improves social interaction deficits, which may explain the lack of significant effects in our experimental protocol.

Social impairments found in VPA rats, such as reduced preference for social novelty, were not present in either the AVP group or the studied treatments, corroborating the study by Bambini-Junior, 2014. Thus, we can understand that the prevention of autism-like social characteristics in rodents seems to depend on a global process rather

than isolated modulation of specific brain regions. Investigations into the physiological effects of VPA, RSV, and ARIP should, therefore, adopt a comprehensive approach that integrates different modulatory aspects of social behavior.

These findings suggest that RSV may play a protective role, while the mechanisms underlying the limited effects of ARIP in this model still require investigation. Future studies should examine the pathways and structures that may mediate these social responses, exploring the etiological triggers and molecular changes associated with ASD.

4.2 Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes

Neuronal dysfunction resulting from neuroinflammation, triggered by the activation of matrix metalloproteinases (MMPs) and the subsequent release of pro-inflammatory cytokines, is widely considered to be one of the key mechanisms in the pathogenesis of ASD (Liu *et al.* 2022). This process is closely related to OS and mitochondrial dysfunction, as suggested by studies highlighting the imbalance between the oxidative and antioxidant systems in autism (Bjørklund *et al.*, 2020; Rossignol and Frye 2014). Significant reduction of endogenous antioxidants, such as GSH-Px, SOD and CAT is consistently reported in the literature (Ghanizadeh *et al.*, 2012).

Studies have shown that prenatal VPA exposure induces autistic behaviors manifested by reduced social interaction, increased repetitive stereotypic behavior and anxiety, cognitive dysfunction, decreased pain sensitivity, and delayed neurodevelopment (Elnahas *et al.*, 2020). Furthermore, inflammatory cytokines and oxidative/nitrosative stress markers were elevated in the prefrontal cortex and hippocampal homogenates (Dufour-Rainfray *et al.*, 2010; Elnahas *et al.*, 2020). Our results also show increased OS, with lipid and protein damage in the cerebral cortex, cerebellum, and plasma of the VPA control group compared to the control group. VPA can induce metabolic alterations and deficiencies in gene expression, leading to significant developmental damage (Nicolini *et al.*, 2017). RSV, known for its antioxidant and neuroprotective properties (Bastianetto, Zheng, & Quirion, 2000; Barone *et al.*, 2019), has been shown to mitigate the damage caused by VPA (Figures 1-4). Recent studies also highlight RSV's epigenetic effects, which counteract the impact of environmental factors like VPA on molecular targets associated with autism spectrum disorder (Fontes-Dutra *et al.*, 2018).

While previous studies, such as that of Santos-Terra *et al.* (2017), and Fontes-Dutra *et al.* (2018), showed the reversal of autistic-like behaviors with the use of RSV during the induction phase with VPA, our study focuses on the reversal of these behaviors and biochemical parameters after the development of the autistic phenotype.

In our study, RSV treatment reversed CP levels in the cerebral cortex and TBA-RS levels in the cerebral cortex, cerebellum, and plasma of rats. In addition, it reversed the decrease of SOD activity in the cerebral cortex and erythrocytes, and in the GSH-Px levels in the cerebellum and erythrocytes.

The efficacy of RSV in suppressing neuroinflammation in the ASD model was demonstrated by Bhandari and Kuhad (2017), who reported the dose-dependent restoration (better responses at doses of 10 and 15mg/kg) of neurological, behavioral and biochemical deficits, in addition to the reduction of TNF- α and MMP-9 expression, in rats with propanoic acid-induced autism. We observed similar results in our study, with RSV promoting a significant reduction in the OS (Figures 1 and 2). The upregulation of SOD and the decrease in brain lipid peroxidation are also seen by Mokni *et al.* (2017).

To date, the Food and Drug Administration (FDA) has approved only two medications – risperidone and aripiprazole – for the treatment of irritability associated with ASD. However, no drug has been specifically approved for the treatment of repetitive and stereotyped movements (SRMs) frequently observed in patients with ASD (Mais *et al.*, 2017). Therefore, it is crucial to understand the neurochemical mechanisms involved in the circuits in SRMs in order to enable the development of new pharmacological interventions targeted to this specific symptom (Wink *et al.*, 2010). Furthermore, SRMs also appear in other disorders frequently comorbid with ASD, which suggests that this behavior may arise from multiple etiologies or from dysfunctions of different parts of the central nervous system (Frith, 1990; Evans *et al.*, 2017).

Increasing evidence indicates that, in addition to genetic and environmental factors, several neurotransmitters that play fundamental roles in early brain development are implicated in the pathogenesis and progression of ASD. Among these neurotransmitters are acetylcholine (ACh), serotonin (5-HT), dopamine (DA), gamma-aminobutyric acid (GABA), glutamate (Glu), and histamine (HA) (Eissa *et al.*, 2018). The implication of such neurotransmitter systems reinforces the relevance of neurochemical studies in understanding the etiology of SRMs in the context of ASD.

Our results revealed that treatment with ARIP, at a dose of 15 mg/kg, significantly reduced OS markers in the tissues tested, compared with the control group exposed to VPA. This finding raises the hypothesis that ARIP may be exerting additional neuroprotective effects, in addition to its well-documented antipsychotic action. A comprehensive review of the literature suggests that second-generation antipsychotics, including ARIP, exert measurable neuroprotective effects mediated by multiple molecular mechanisms, with emphasis on dose-dependent effects (Chen and Nasrallah, 2019). These findings support the notion that ARIP, in addition to its efficacy in controlling psychiatric symptoms, may also modulate neurochemical pathways associated with OS, a critical factor in the pathophysiology of disorders such as ASD.

ARIP treatment resulted in a decrease in CP levels in the cerebral cortex and reversed TBA-RS levels in the cerebral cortex, cerebellum, and plasma. Regarding antioxidant enzymes, it reversed the decrease in SOD activity in the cerebral cortex and in GSH-Px activity in the cerebellum, although the increase in SOD activity observed in erythrocytes. Moreover, reestablished the activity of CAT and GSH-Px in erythrocytes.

Furthermore, a recent study by Ferreira *et al.* (2023), showed that maternal treatment with ARIP (10mg/kg) in pregnant mice exposed to VPA protects the animals against the ASD-like behavioral phenotype, and this effect may be related, at least in part, to synaptic plasticity and neuronal protection in the prefrontal cortex and hippocampus. Nakhal *et al.* (2023) also showed similar results to ours, regarding ARIP (3mg/kg), that attenuated the OS state by restoring GSH levels and CAT activity and decreasing malondialdehyde (MDA) levels in the hippocampus, prefrontal cortex and cerebellum. ARIP may serve as an effective pharmacological therapeutic target against autistic behaviors in the VPA animal model of ASD, which should be further investigated to verify its clinical relevance.

In the erythrocytes and cerebellum, GSH-Px activity alteration was reversed by RSV and ARIP treatment. Glutathione has been widely recognized as a crucial biomarker for OS in individuals with ASD. In a study conducted by Faber *et al.* (2019), a significant reduced to oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) was observed in the blood of children with ASD. Furthermore, a meta-analysis conducted by Chen *et al.* (2021) revealed reduced activity of GSH-Px in children with ASD. These results strengthen the clinical evidence of increased OS implicating in the pathogenesis of ASD. Furthermore, given the

consistent and large effective size, biomarkers of glutathione metabolism have the potential to inform the diagnosis of ASD.

Moreover, the combined administration of ARIP and RSV notably reversed and decreased TBA-RS levels in the cerebral cortex of rats, with results significantly lower than those of the saline control. A similar effect was observed in the increased SOD enzymatic activity in both the cerebral cortex and erythrocytes.

In general, while OS is elevated in autism, antioxidant function is reduced. Treatment with RSV and ARIP was shown to be effective in reducing lipid peroxidation in the cerebellum and cerebral cortex, as well as in the plasm. The group that received the combination of treatments (VPA + RSV + ARIP) showed complete reversal and decrease of OS damage, which represents an interesting result for further research into its pathways of action.

4.3 Histological Analysis

Dark (hyperchromic) neurons are nerve cells that indicate cellular stress and neuronal dysfunction and are frequently observed in histological sections and can also appear as shrunken dark neurons. These neurons have been a topic of discussion in clinical and experimental neuromorphology, with ongoing debate regarding whether they are artifacts or indicators of pathological changes (AHMADPOUR; BEHRAD; FERNÁNDEZ-VEGA, 2019).

Non-shrunken dark neurons are characterized by hyperchromic cytoplasm, with sizes comparable to normochromic neurons. In contrast, shrunken hyperchromic neurons are smaller, elongated, narrow, and deformed, often exhibiting corkscrew-like processes along with pyknotic nuclei (EMEL'YANCHIK; ZIMATKIN, S. M, 2011). Throughout postnatal development, dark neurons constitute 8% of all neurons in Nissl-stained sections of the neocortex of intact rats on postnatal day 2, increasing to 11% on day 45 and decreasing to 9% on day 90. Hyperchromic shrunken neurons emerge from postnatal day 20 onward (2%), representing 3% of neurons on day 45 and being virtually absent by day 90 (ZIMATKIN; BON, 2018). The number of dark neurons can significantly increase under experimental and pathological conditions. A study by Eid *et al.* (2023) demonstrated that rats subjected to autism-like behavior induction via AVP showed histological sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) and the Nissl method,

revealing signs of degeneration in the cerebellum compared to the control group. Our research indicates that the induction of autism-like behaviors in animal models resulted in a significant increase in dark neurons in the hippocampus (Figure 6). This finding is particularly significant, as dark neurons are indicative of cellular stress and morphological changes that may reflect neuronal dysfunction (ZIMATKIN; BON, 2018).

Previous studies suggest that the hippocampus in individuals with ASD may exhibit anatomical differences, such as increased or decreased volume, which could relate to behavioral and functional aspects of the disorder (BANKER *et al.*, 2021). The hippocampus is crucial for social understanding and emotional regulation (MONTAGRIN *et al.*, 2018) and is frequently implicated in ASD. Therefore, the increased presence of dark neurons may be associated with cognitive function deterioration.

The rise in dark neuron population can be understood in terms of OS and electron transport chain (ETC) dysfunction. OS is commonly observed in individuals with ASD and may stem from mitochondrial dysfunction (KHALIULIN; HAMOUDI; AMAL, 2024). Impaired ATP production and the consequent accumulation of free radicals may contribute to cell death and neuronal disorganization, adversely affecting hippocampal health.

Furthermore, the combined treatment with ARIP and RSV demonstrated a significant reversal of these conditions, suggesting promising therapeutic potential. ARIP, an atypical antipsychotic, is known for its ability to modulate neurotransmitters (GRINCHII; DREMENCOV, 2020), while RSV possesses antioxidant properties that can alleviate OS (AZARGOONJAHROMI; ABUTALEBIAN; HOSEINPOUR, 2024). Histological analyses by Santos-Terra (2021) revealed total neuronal loss in the hippocampus of animals induced to autism via AVP, with RSV preventing such changes. Similarly, a study by Neelotpol (2024) indicated reduced neuronal loss and degeneration in mice treated with ARIP compared to those exposed to VPA. Thus, our results suggest that the combined treatment may foster a neuroprotective environment, promoting neuronal morphology recovery and reducing the dark neuron population.

In summary, the combined treatment of ARIP and RSV shows potential to reverse conditions associated with ASD, emphasizing the importance of integrative approaches that involve both neurotransmitter modulation and OS reduction. However, the understanding of dark neurons' role in ASD remains preliminary, and the limitations of

current studies highlight the need for further investigations to clarify the mechanisms underlying these neuronal changes. Future research should focus on the relationship between dark neurons and autistic behaviors, as well as the effectiveness of various therapeutic interventions.

4.4 Energy metabolism

Proper brain function depends on efficient aerobic energy production, which is largely provided by mitochondria (NELSON; COX, 2021). Insufficient energy generation, observed in several disorders, including ASD, can impact brain development and compromise various cognitive functions (GU *et al.*, 2013). Evidence suggests that mitochondria play a crucial role in the pathophysiology of ASD, with biomarkers of the ETC showing abnormalities in patients, especially in complexes I and III, though not exclusively (WEISSMAN *et al.*, 2008).

Citrate synthase, as the first enzyme of the Krebs cycle, is essential for the production of metabolic intermediates critical for ATP generation (VOET;VOET, 2021). Alterations in its activity can influence the efficiency of cellular energy metabolism, impacting the availability of energy for specific brain functions (GU *et al.*, 2013). Furthermore, citrate synthase is often used as a marker of mitochondrial mass, as variations in its activity may indicate changes in mitochondrial quantity or integrity (LEGIDO *et al.*, 2013; FRYE, 2020). In our studies, we observed decreased citrate synthase activity in the cerebellum of rats induced to develop autism with VPA. Considering that the cerebellum is vital for sensory processing, cognition, and social behavior, deficits in bioenergetics during postnatal brain development may lay the groundwork for impaired neuronal metabolism, resulting in behavioral and developmental deficits (NAPOLI *et al.*, 2015). Factors such as aberrant synaptic excitation/inhibition, neuroinflammation, reduced neurogenesis, and OS are associated with ASD pathology (TALEB *et al.*, 2021).

Succinate dehydrogenase (SDH), another crucial enzyme in the Krebs cycle and ETC, also plays a vital role in ATP production (NELSON; COX, 2021). A reduction in its activity can lead to an energy deficit, compromising brain function (NELSON; COX, 2021). Furthermore, dysfunctions in SDH can result in succinate accumulation,

promoting hypoxia and alterations in signaling, in addition to increasing OS due to ROS production (ESVAP;ULGEN, 2023). Our results indicate that the combination of RSV and ARIP increased SDH activity in VPA models, even surpassing the levels observed in the saline control group.

The combination of RSV and ARIP may potentially affect the activity of mitochondrial enzymes citrate synthase and SDH, which play crucial roles in the Krebs cycle. RSV, known for its antioxidant properties (AZARGOONJAHROMI; ABUTALEBIAN; HOSEINPOUR, 2024), may help mitigate OS and protect against mitochondrial damage by promoting mitochondrial biogenesis and possibly improving mitochondrial efficiency. These effects may directly benefit the activity of essential mitochondrial enzymes. A study by Bhandari and Kuhad (2017) indicated that resveratrol significantly and dose-dependently restored the activity of Complexes I, II, and IV, as well as cell viability. In parallel, ARIP, by stabilizing neurotransmission (GRINCHII; DREMENCOV, 2020), may create a cellular environment that favors enzymatic activity and metabolic efficiency. A study by Streck *et al.*, (2007) showed an increase in SDH in the prefrontal cortex of rats caused by chronic administration of ARIP (2, 10, 20mg/kg), showing that the antipsychotic alters SDH activity.

Additionally, the anti-inflammatory properties of both compounds may contribute to reducing pressure on mitochondria (MANI; ALSHAMMERI, 2024; KATO *et al.*, 2011; MENG *et al.*, 2021). This combination may have synergistic effects that enhance overall mitochondrial function, offering a promising approach to mitigating metabolic deficits in contexts of neurological dysfunction. However, further research is required to confirm these effects.

Overall, these findings emphasize the crucial role of mitochondrial health in addressing the metabolic irregularities associated with ASD. By enhancing the activity of key mitochondrial enzymes, RSV and ARIP offer a potential strategy for improving cellular energy balance. This promising approach warrants further exploration to better understand its implications for therapeutic interventions aimed at mitigating the neurological and developmental challenges faced by individuals with ASD.

5. Conclusion

The interplay between OS, mitochondrial dysfunction, and behavior is complex. Our results indicate that prenatal exposure to AVP induced autistic-like behaviors indicated by deficits in social interaction and increased stereotyped behaviors. RSV demonstrated significant antioxidant effects, mitigating VPA-induced alterations in OS, energy metabolism, and behavioral parameters, suggesting a potential therapeutic agent in ASD.

Although ARIP demonstrated limited effects in behavioral tests, it contributed to reducing OS markers, indicating possible neuroprotective properties. Furthermore, the combination of RSV and ARIP increased mitochondrial enzyme activity, which may be a promising strategy to address energy metabolism deficits associated with ASD.

Therefore, these results highlight the importance of a comprehensive approach, considering the multifaceted mechanism of ASD, including neurochemical factors. Further research is needed to elucidate new specific pathways and molecular targets involved in the disorder, addressing both behavioral and physiological aspects. Improving our understanding of these complex interactions will lead to new therapeutic strategies that can improve the quality of life of individuals with autism.

9. CONCLUSÃO

A interação entre estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e comportamento é complexa. Nossos resultados indicam que a exposição pré-natal com AVP induziu comportamentos tipo-autistas indicados através de déficits na interação social e aumento de comportamentos estereotipados. O RSV demonstrou efeitos antioxidantes significativos, mitigando alterações induzidas pelo VPA nos parâmetros de EO, de metabolismo energético e comportamental, sugerindo um potencial agente terapêutico no TEA.

Embora o ARIP tenha demonstrado efeitos limitados em relação aos testes comportamentais, ele contribuiu para reduzir os marcadores de EO, indicando possíveis propriedades neuroprotetoras. Além disso, a combinação de RSV e ARIP aumentou atividade enzimática mitocondrial, a qual pode ser uma estratégia promissora para abordar déficits do metabolismo energético associada ao TEA.

Portanto, esses resultados destacam a importância de uma abordagem abrangente, considerando o mecanismo multifacetado do TEA, incluindo fatores neuroquímicos. Novas pesquisas são necessárias para elucidar novos caminhos específicos e alvos moleculares envolvidos no transtorno, abordando os aspectos comportamentais e fisiológicos. O aprimoramento da nossa compreensão dessas interações complexas nos levará a novas estratégias terapêuticas que possam melhorar a qualidade de vida de indivíduos com autismo.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AGRAWAL, Sachin *et al.* Prevalence of autism spectrum disorder in preterm infants: A meta-Analysis. **Pediatrics**, [s. l.], v. 142, n. 3, 2018.
- AHMADPOUR, Shahriar; BEHRAD, Arman; VEGA, Iván Fernández. Dark Neurons: A protective mechanism or a mode of death. **Journal of Medical Histology**, v. 3, n. 2, p. 125-131, 2019.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS - 5**. Fifth Edited. Washington, DC London, England: American Pschiatric Publishing, 2015.
- ANDREAZZA, A C *et al.* Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder.[Erratum appears in Arch Gen Psychiatry. 2010 Dec;67(12):1254]. **Archives of General Psychiatry**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 360–368, 2010. Disponível em: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=medl&AN=20368511%5Cnhttp://bf4dv7zn3u.search.serialssolutions.com.myaccess.library.utoronto.ca/?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft_id=info:sid/Ovid:medl&rft.
- ANGELOVA, Plamena R.; ABRAMOV, Andrey Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **FEBS Letters**, [s. l.], v. 592, n. 5, p. 692–702, 2018.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, n. 2–3, p. 141–145, abr. 2001.
- AZARGOONJAHROMI, Ali; ABUTALEBIAN, Fatemeh; HOSEINPOUR, Fatemeh. The role of resveratrol in neurogenesis: a systematic review. **Nutrition Reviews**, p. nuae025, 2024.
- BAI, Dan *et al.* Association of Genetic and Environmental Factors with Autism in a 5-Country Cohort. **JAMA Psychiatry**, [s. l.], v. 76, n. 10, p. 1035–1043, 2019.
- BALSA, Eduardo *et al.* Defective NADPH production in mitochondrial disease complex I causes inflammation and cell death. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16423-1>.
- BANKER, Sarah M. et al. Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. **Trends in neurosciences**, v. 44, n. 10, p. 793-807, 2021.

BARAUNA, Sara Cristiane *et al.* Antioxidant and antidepressant-like effects of *Eugenia catharinensis* D. Legrand in an animal model of depression induced by corticosterone. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 1985–1994, 2018.

BARTRAM, Lindsay A.; LOZANO, Juan; COURY, Daniel L. Aripiprazole for treating irritability associated with autism spectrum disorders. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s. l.], vol. 20, no. 12, p. 1421–1427, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1626825>.

BURNS, T. C.; VERFAILLIE, C. M.; LOW, W. C. Stem cells for ischemic brain injury: A critical review. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 515, n. 1, p. 125–144, jul. 2009.

BAXTER, A. J. *et al.* The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. **Psychological Medicine**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 601–613, 2015.

BHAT, Shreya *et al.* Autism: Cause factors, early diagnosis and therapies. **Reviews in the Neurosciences**, [s. l.], vol. 25, no. 6, p. 841–850, 2014.

BHANDARI, Ranjana; KUHAD, Anurag. Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. **Neurochemistry International**, v. 103, p. 8-23, 2017.

BJØRK, Marte Helene *et al.* Association of Prenatal Exposure to Antiseizure Medication with Risk of Autism and Intellectual Disability. **JAMA Neurology**, [s. l.], v. 79, n. 7, p. 772–781, 2022.

BJØRKLUND, Geir *et al.* Cerebral hypoperfusion in autism spectrum disorder. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, [s. l.], vol. 78, no. 1, p. 21–29, 2018.

BJØRKLUND, Geir *et al.* Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, [s. l.], vol. 73, p. 257–268, 2016. Available at: <https://ojs.nencki.edu.pl/index.php/ane/article/view/2076/2073>.

BJØRKLUND, Geir *et al.* Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 57, n. 5, p. 2314–2332, 2020.

BLANCHET, Lionel *et al.* Isolated Mitochondrial Complex I Deficiency: Explorative Data Analysis of Patient Cell Parameters. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 17, n. 36, p. 4023–4033, 2012.

BLANKENSHIP, Kelly *et al.* Aripiprazole for irritability associated with autistic disorder in children and adolescents aged 6-17 years. **Pediatric Health**, [s. l.], vol. 4, no. 4, p. 375–381, 2010.

BLANQUER-ROSSELLÓ, M^a del Mar *et al.* Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], v. 1861, n. 2, p. 431–440, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.009>.

CASSINA, Adriana; RADI, Rafael. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 328, n. 2, p. 309–316, 1996.

CHAUHAN, Abha *et al.* Brain region-specific deficit in mitochondrial electron transport chain complexes in children with autism. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 209–220, 2011.

CHEN, Alexander T.; NASRALLAH, Henry A. Neuroprotective effects of the second generation antipsychotics. **Schizophrenia Research**, [s. l.], vol. 208, no. xxxx, p. 1–7, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.04.009>.

CHEN, Alexander T.; NASRALLAH, Henry A. Neuroprotective effects of the second generation antipsychotics. **Schizophrenia Research**, [s. l.], v. 208, n. xxxx, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.04.009>.

CHEN, Jin Qiang; YAGER, James D.; RUSSO, Jose. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], vol. 1746, no. 1, p. 1–17, 2005.

CHEN, Lei *et al.* Oxidative stress marker aberrations in children with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis of 87 studies (N= 9109). **Translational psychiatry**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 15, 2021.

CHEN, Qun *et al.* Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 38, p. 36027–36031, 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M304854200>.

CIPOLLA, Cynthia M.; LODHI, Irfan J. Peroxisomal Dysfunction in Age-Related Diseases. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], vol. 28, no. 4, p. 297–308, 2017. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2016.12.003>.

CORDA, S. *et al.* Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- α is mediated by ceramide. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 762–768, 2001.

COGHLAN, S. *et al.* GABA system dysfunction in autism and related disorders: From synapse to symptoms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 9, p.

2044–2055, out. 2012.

CHRISTENSEN, J. et al. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. **JAMA**, v. 309, n. 16, p. 1696, abr. 2013b. CLARD, D. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The National Academies Press (US), Washington, DC, ed. 8, 1996.

DE OLIVEIRA FERREIRA, Emerson *et al.* Maternal treatment with aripiprazole prevents the development of a valproic acid-induced autism-like phenotype in juvenile male mice. **Behavioural Pharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 2–3, 2023. Disponível em: https://journals.lww.com/behaviouralpharm/fulltext/2023/04000/maternal_treatment_with_aripiprazole_prevents_the.9.aspx.

DE OLIVEIRA, Marcos Roberto *et al.* Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [s. l.], v. 1860, n. 4, p. 727–745, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.01.017>.

DECKMANN, Iohanna *et al.* Resveratrol prevents brain edema, blood–brain barrier permeability, and altered aquaporin profile in autism animal model. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], vol. 81, no. 7, p. 579–604, 2021.

DEMIRCI-ÇEKİÇ, Sema *et al.* Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 209, p. 114477, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708521005884>.

DOUARRE, Céline *et al.* Mitochondrial topoisomerase I is critical for mitochondrial integrity and cellular energy metabolism. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 7, no. 7, 2012.

DOUARRE, Céline *et al.* Mitochondrial topoisomerase I is critical for mitochondrial integrity and cellular energy metabolism. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 7, 2012.

EID, Lubna Taher Mahmoud et al. Evaluation of prenatal administration of valproic acid on the cerebellum of albino rat offspring: A model of autism. **International Journal of Health Sciences**, v. 7, n. S1, p. 2715-2738, 2023.

EISSA, Nermin *et al.* The multi-targeting ligand St-2223 with histamine H3 receptor and dopamine D2/D3 receptor antagonist properties mitigates autism-like repetitive behaviors and brain oxidative stress in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 22, no. 4, p. 1–21, 2021.

EISSA, Nermin *et al.* The multi-targeting ligand St-2223 with histamine H3 receptor and dopamine D2/D3 receptor antagonist properties mitigates autism-like repetitive behaviors and brain oxidative stress in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 1–21, 2021.

ESBENSEN, A. J. et al. A Longitudinal Investigation of Psychotropic and Non-Psychotropic Medication Use Among Adolescents and Adults with Autism Spectrum Disorders. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 39, n. 9, p. 1339–1349, set. 2009.

EINARSON L. (1932). A Method for Progressive Selective Staining of Nissl and Nuclear Substance in Nerve Cells. **The American journal of pathology**, 8(3), 295–308.5.

EMEL'YANCHIK, S. V.; ZIMATKIN, S. M. The Brain in Cholestasis. **Grodno State University**, Grodno, 2011.

ESVAP, Elif; ULGEN, Kutlu O. Neuroinflammation, energy and sphingolipid metabolism biomarkers are revealed by metabolic modeling of autistic brains. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 583, 2023.

EGASHIRA, Nobuaki et al. Aripiprazole inhibits marble-burying behavior via 5-hydroxytryptamine (5-HT) 1A receptor-independent mechanisms. **European journal of pharmacology**, v. 592, n. 1-3, p. 103-108, 2008.

FIEIRAS, Cecilia *et al.* Risperidone and aripiprazole for autism spectrum disorder in children: an overview of systematic reviews. **BMJ Evidence-Based Medicine**, [s. l.], vol. 28, no. 1, p. 7 LP – 14, 2023. Available at: <http://ebm.bmj.com/content/28/1/7.abstract>.

FIEIRAS, Cecilia *et al.* Risperidone and aripiprazole for autism spectrum disorder in children: an overview of systematic reviews. **BMJ Evidence-Based Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 7 LP – 14, 2023. Disponível em: <http://ebm.bmj.com/content/28/1/7.abstract>.

FINKEL, Toren; HOLBROOK, Nikki J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, [s. l.], vol. 408, no. 6809, p. 239–247, 2000.

FRYE, Richard E *et al.* Biomarkers of mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorder: A systematic review and meta-analysis. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], p. 106520, 2024.

FRYE, Richard E. *et al.* Mitochondria may mediate prenatal environmental influences in autism spectrum disorder. **Journal of Personalized Medicine**, [s. l.], vol. 11, no. 3, 2021.

FRYE, Richard E.; ROSSIGNOL, Daniel A. Mitochondrial dysfunction can connect the diverse medical symptoms associated with autism spectrum disorders. **Pediatric Research**, [s. l.], vol. 69, no. 5 PART 2, p. 41–47, 2011.

FRYE, Richard E.; ROSSIGNOL, Daniel A. Mitochondrial dysfunction can connect the diverse medical symptoms associated with autism spectrum disorders. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 69, n. 5 PART 2, p. 41–47, 2011.

FRYE, Richard Eugene; BERK, Michael. **The therapeutic use of N-acetylcysteine (NAC) in medicine**. [S. l.: s. n.], 2018.

GESCHWIND, Daniel H. Genetics of autism spectrum disorders. **Trends in Cognitive Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 409–416, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tics.2011.07.003>.

GHANIZADEH, Ahmad *et al.* Targeting the mitochondrial electron transport chain in autism, a systematic review and synthesis of a novel therapeutic approach. **Mitochondrion**, [s. l.], vol. 13, no. 5, p. 515–519, 2013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2012.10.001>.

GHANIZADEH, Ahmad *et al.* Targeting the mitochondrial electron transport chain in autism, a systematic review and synthesis of a novel therapeutic approach. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 515–519, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2012.10.001>.

GOMES, P. T. M. et al. Autism in Brazil: a systematic review of family challenges and coping strategies. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 2, p. 111–121, mar. 2015.

GOODNICK, P. J.; JERRY, J. M. Aripiprazole: profile on efficacy and safety. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 3, n. 12, p. 1773–1781, dez. 2002.

GRINCHIL, Daniil; DREMENCOV, Eliyahu. Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs in mood disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, p. 9532, 2020.

GRUBER, Jan *et al.* Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 563–592, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.005>.

GU, F. *et al.* Alterations in mitochondrial DNA copy number and the activities of electron transport chain complexes and pyruvate dehydrogenase in the frontal cortex from subjects with autism. **Translational psychiatry**, v. 3, n. 9, p. e299–e299, 2013.

GUO, Chun Yan *et al.* Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. **Neural Regeneration Research**, [s. l.], v. 8, n. 21, p. 2003–2014, 2013.

HAAS, Richard H. Autism and mitochondrial disease. **Developmental Disabilities Research Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 144–153, 2010.

HALLIWELL, Barry; RAFTER, Joseph; JENNER, Andrew. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. **The American journal of clinical nutrition**, [s. l.], v. 81, n. 1 Suppl, p. 268–276, 2005.

HARA, Yuta et al. Risperidone and aripiprazole alleviate prenatal valproic acid-induced abnormalities in behaviors and dendritic spine density in mice. **Psychopharmacology**, v. 234, p. 3217-3228, 2017.

HAMACHER-BRADY, Anne; BRADY, Nathan Ryan. Mitophagy programs: Mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], vol. 73, no. 4, p. 775–795, 2016.

HERBERT, Martha R. SHANK3, the synapse, and autism. **N Engl J Med**, [s. l.], vol. 365, no. 2, p. 173–175, 2011.

HERNANSANZ-AGUSTÍN, Pablo; ENRÍQUEZ, José Antonio. Generation of reactive oxygen species by mitochondria. **Antioxidants**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–18, 2021.

HIROTA, Tomoya; KING, Bryan H. Autism Spectrum Disorder: A Review. **JAMA**, [s. l.], vol. 329, no. 2, p. 157–168, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1001/jama.2022.23661>.

HIRSCH, Lauren E.; PRINGSHEIM, Tamara. Aripiprazole for autism spectrum disorders (ASD). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], vol. 2016, no. 6, 2016.

HISLE-GORMAN, Elizabeth *et al.* Prenatal, perinatal, and neonatal risk factors of autism spectrum disorder. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 190–198, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2018.23>.

HYMAN, Susan L. *et al.* Identification, evaluation, and management of children with autism spectrum disorder. **Pediatrics**, [s. l.], vol. 145, no. 1, 2020.

HYMAN, Susan L. *et al.* Identification, evaluation, and management of children with autism spectrum disorder. **Pediatrics**, [s. l.], v. 145, n. 1, 2020.

HOWES, O. D. et al. Autism spectrum disorder: Consensus guidelines on assessment, treatment and research from the British Association for Psychopharmacology. **Journal of Psychopharmacology**, v. 32, n. 1, p. 3–29, jan. 2018.

ISLAM, Md Torequl. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. **Neurological Research**, [s. l.], vol. 39, no. 1, p. 73–82, 2017. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>.

JAISWAL, Natasha *et al.* Fructose induces mitochondrial dysfunction and triggers apoptosis in skeletal muscle cells by provoking oxidative stress. **Apoptosis**, [s. l.], vol. 20, no. 7, p. 930–947, 2015.

JANECKA, Magdalena *et al.* Parental Age and Differential Estimates of Risk for Neuropsychiatric Disorders: Findings From the Danish Birth Cohort. **Journal of the**

American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, [s. l.], vol. 58, no. 6, p. 618–627, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2018.09.447>.

JANECKA, Magdalena *et al.* Parental Age and Differential Estimates of Risk for Neuropsychiatric Disorders: Findings From the Danish Birth Cohort. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 618–627, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2018.09.447>.

JARDIM, Fernanda Rafaela *et al.* Resveratrol and Brain Mitochondria: a Review. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 2085–2101, 2018.

JESTE, S. S.; TUCHMAN, R. Autism Spectrum Disorder and Epilepsy: Two Sides of the Same Coin? *Journal of Child Neurology*, v. 30, n. 14, p. 1963–1971, dez. 2015.

JILL JAMES, S. *et al.* Abnormal transmethylation/transsulfuration metabolism and DNA hypomethylation among parents of children with autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, [s. l.], vol. 38, no. 10, p. 1966–1975, 2008.

JUYBARI, Kobra Bahrapour *et al.* Sex dependent alterations of resveratrol on social behaviors and nociceptive reactivity in VPA-induced autistic-like model in rats. **Neurotoxicology and teratology**, v. 81, p. 106905, 2020.

JYONOUCHI, Harumi *et al.* Variations in mitochondrial respiration differ in IL-1 β /IL-10 ratio based subgroups in autism spectrum disorders. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], vol. 10, no. FEB, p. 1–15, 2019.

KAIDANOVICH-BEILIN, Oksana *et al.* Assessment of social interaction behaviors. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], vol. 0, no. 48, p. 1–6, 2010.

KARVAT, Golan; KIMCHI, Tali. Systematic autistic-like behavioral phenotyping of 4 mouse strains using a novel wheel-running assay. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], vol. 233, no. 2, p. 405–414, 2012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.05.028>.

KAS, Martien J. *et al.* Assessing behavioural and cognitive domains of autism spectrum disorders in rodents: Current status and future perspectives. **Psychopharmacology**, [s. l.], vol. 231, no. 6, p. 1125–1146, 2014.

KATO, T. *et al.* Anti-Inflammatory properties of antipsychotics via microglia modulations: are antipsychotics a ‘fire extinguisher’ in the brain of schizophrenia?. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 7, p. 565–574, 2011.

KIM, Ji Woon *et al.* Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 9, no. 8, 2014.

KHALIULIN, Igor; HAMOUDI, Wajeha; AMAL, Haitham. O papel multifacetado das mitocôndrias no transtorno do espectro do autismo. **Psiquiatria Molecular**, p. 1-22, 2024.

KONG, Augustine *et al.* Rate of de novo mutations and the importance of father-s age to disease risk. **Nature**, [s. l.], v. 488, n. 7412, p. 471–475, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11396>.

KOPRIVICA, Vuk *et al.* Aripiprazole protects cortical neurons from glutamate toxicity. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 651, n. 1–3, p. 73–76, 2011.

KRAKOWIAK, Paula *et al.* Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. **Pediatrics**, [s. l.], v. 129, n. 5, 2012.

KRAMAR, Barbara *et al.* Antipsychotic Drug Aripiprazole Protects Liver Cells from Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 23, no. 15, 2022.

KRAMAR, Barbara *et al.* Antipsychotic Drug Aripiprazole Protects Liver Cells from Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 15, 2022.

LEGIDO, Agustin; JETHVA, Reena; GOLDENTHAL, Michael J. Mitochondrial dysfunction in autism. In: **Seminars in pediatric neurology**. WB Saunders, 2013. p. 163-175.

LIMA, Aline Barbosa *et al.* Hypolipemiant and antioxidant effects of *Eugenia brasiliensis* in an animal model of coconut oil-induced hypertriglyceridemia. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], vol. 96, no. July, p. 642–649, 2017.

LIN, Michael T; BEAL, M Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, [s. l.], v. 443, n. 7113, p. 787–795, 2006.

LIU, Xukun *et al.* Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder—Current Progress of Mechanisms and Biomarkers. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], vol. 13, no. March, p. 7–9, 2022.

LIU, Xukun *et al.* Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder—Current Progress of Mechanisms and Biomarkers. **Frontiers in Psychiatry**, [s. l.], v. 13, n. March, p. 7–9, 2022.

LOONEY, Joseph M; CHILDS, Hazel M. The lactic acid and glutathione content of the blood of schizophrenic patients. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 963–968, 1934.

LOPEZ-RANGEL, E; LEWIS, M E S. Loud and clear evidence for gene silencing by epigenetic mechanisms in autism spectrum and related neurodevelopmental disorders. **Clinical genetics**, Denmark, vol. 69, no. 1, p. 21–22, 2006.

LOPEZ-RANGEL, E; LEWIS, M E S. Loud and clear evidence for gene silencing by epigenetic mechanisms in autism spectrum and related neurodevelopmental disorders. **Clinical genetics**, Denmark, v. 69, n. 1, p. 21–22, 2006.

LOCK, J.; LA VIA, M. C. Practice Parameter for the Assessment and Treatment of Children and Adolescents With Eating Disorders. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 54, n. 5, p. 412–425, maio 2015.

MAENNER, Matthew J *et al.* Relatório Semanal de Morbidade e Mortalidade (MMWR) Prevalência e características do transtorno do espectro do autismo entre crianças de 8 anos - Rede de monitoramento de deficiências de desenvolvimento e autismo , 11 locais , Estados Unidos , 2020 Abst. [s. l.], p. 1–22, 2023.

MAGLIONE, Margaret A. *et al.* Nonmedical interventions for children with ASD: Recommended guidelines and further research needs. **Pediatrics**, [s. l.], vol. 130, no. SUPPL. 2, 2012.

MAGLIONE, Margaret A. *et al.* Nonmedical interventions for children with ASD: Recommended guidelines and further research needs. **Pediatrics**, [s. l.], v. 130, n. SUPPL. 2, 2012.

MALAGUARNERA, Michele; KHAN, Haroon; CAULI, Omar. Resveratrol in autism spectrum disorders: Behavioral and molecular effects. **Antioxidants**, [s. l.], vol. 9, no. 3, p. 1–13, 2020.

MANI, V., & ALSHAMMERI, B. S. Aripiprazole Attenuates Cognitive Impairments Induced by Lipopolysaccharide in Rats through the Regulation of Neuronal Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis. **Medicina**, 60(1), 46., 2024. <https://doi.org/10.3390/medicina60010046>

MANIVASAGAM, Thamilarasan *et al.* Role of oxidative stress and antioxidants in autism. **Personalized food intervention and therapy for autism spectrum disorder management**, [s. l.], p. 193–206, 2020.

MANEETON, N. *et al.* Risperidone for children and adolescents with autism spectrum disorder: a systematic review. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 14, p. 1811–1820, 2018.

MASI, Anne *et al.* An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. **Neuroscience Bulletin**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 183–193, 2017.

MAZINA, Varvara *et al.* Epigenetics of autism-related impairment: Copy number variation and maternal infection. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, [s. l.], vol. 36, no. 2, p. 61–67, 2015.

MAZINA, Varvara *et al.* Epigenetics of autism-related impairment: Copy number variation and maternal infection. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 61–67, 2015.

MENG, Tiantian *et al.* Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 229, 2021.

MIGUEL, C A *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective actions of resveratrol after experimental nervous system insults. Special focus on the molecular mechanisms involved. **Neurochemistry International**, [s. l.], vol. 150, p. 105188, 2021. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018621002345>.

MIMAKI, Masakazu *et al.* Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1817, n. 6, p. 851–862, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabbio.2011.08.010>.

MORAVA, E. *et al.* Mitochondrial disease criteria: Diagnostic applications in children. **Neurology**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 1823–1826, 2006.

MONTAGRIN, Alison; SAIOTE, Catarina; SCHILLER, Daniela. The social hippocampus. **Hippocampus**, v. 28, n. 9, p. 672-679, 2018.

MORETTI, Morgana *et al.* Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **Journal of Molecular Neuroscience**, [s. l.], vol. 49, no. 1, p. 68–79, 2013.

MUHLE, Rebecca A. *et al.* The emerging clinical neuroscience of autism spectrum disorder a review. **JAMA Psychiatry**, [s. l.], vol. 75, no. 5, p. 514–523, 2018.

MUHLE, Rebecca A. *et al.* The emerging clinical neuroscience of autism spectrum disorder a review. **JAMA Psychiatry**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 514–523, 2018.

MYERS, Scott M. The status of pharmacotherapy for autism spectrum disorders. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 1579–1603, 2007.

NAKHAL, Mohammed Moutaz *et al.* Canagliflozin Ameliorates Oxidative Stress and Autistic-like Features in Valproic-Acid-Induced Autism in Rats: Comparison with Aripiprazole Action. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 1–18, 2023.

NASIRY, Davood; KHALATBARY, Ali Reza. Natural polyphenols for the management of autism spectrum disorder: a review of efficacy and molecular mechanisms.

Nutritional Neuroscience, [s. l.], p. 1–11, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2023.2180866>.

NAVIAUX, R. K. et al. Low-dose suramin in autism spectrum disorder: a small, phase I/II, randomized clinical trial. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 4, n. 7, p. 491–505, jul. 2017.

NAPOLI, Eleonora et al. Mitochondrial citrate transporter-dependent metabolic signature in the 22q11. 2 deletion syndrome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 38, p. 23240-23253, 2015.

NELSON, David L.; COX, Michael M.. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 7 Porto Alegre: Artmed, 2019, 1278.

NEELOTPOL, Sharmind et al. Pharmacological intervention of behavioural traits and brain histopathology of prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. **Plos one**, v. 19, n. 9, p. e0308632, 2024.

OLIVEIRA, G. *et al.* Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: A population-based study. **Developmental Medicine and Child Neurology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 185–189, 2005.

POWERS, Scott K.; JACKSON, Malcolm J. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 1243–1276, 2008.

POSEY, D. J.; ERICKSON, C. A.; MCDOUGLE, C. J. Developing Drugs for Core Social and Communication Impairment in Autism. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 17, n. 4, p. 787–801, out. 2008.

RAHMAN, Mominur *et al.* Role of Phenolic Compounds in Human Disease : Current. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 233, p. 1–36, 2022.

RAPIN, Isabelle. Language heterogeneity and regression in the autism spectrum disorders—Overlaps with other childhood language regression syndromes. **Clinical Neuroscience Research**, [s. l.], v. 6, n. 3–4, p. 209–218, 2006.

RASALAM, A. D. *et al.* Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. **Developmental Medicine and Child Neurology**, [s. l.], v. 47, n. 8, p. 551–555, 2005.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. [38] Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 1994. v. 233p. 357–363.

RIGOULET, M. *et al.* Cell energy metabolism: An update. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1861, n. 11, 2020.

ROANE, H. S.; FISHER, W. W.; CARR, J. E. **Applied Behavior Analysis as Treatment for Autism Spectrum Disorder**. The Journal of Pediatrics, v. 175, p. 27–32, ago. 2016.

ROBINSON, Elise B.; NEALE, Benjamin M.; HYMAN, Steven E. Genetic research in autism spectrum disorders. **Current Opinion in Pediatrics**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 685–691, 2015.

RODIER, P. M. *et al.* Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 370, n. 2, p. 247–261, jun. 1996.

ROJAS-CHARRY, Liliana *et al.* Abnormalities of synaptic mitochondria in autism spectrum disorder and related neurodevelopmental disorders. **Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 161–178, 2021.

ROSE, S. *et al.* Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. **Translational Psychiatry**, [s. l.], vol. 2, no. May, 2012.

ROSE, S. *et al.* Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v. 2, n. May, 2012.

ROSE, Shannon *et al.* Clinical and Molecular Characteristics of Mitochondrial Dysfunction in Autism Spectrum Disorder. **Molecular Diagnosis and Therapy**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 571–593, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0352-x>.

ROSSIGNOL, Daniel A.; FRYE, Richard E. Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], vol. 5 APR, no. April, p. 1–15, 2014.

ROSSIGNOL, Daniel A.; FRYE, Richard E. Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 5 APR, n. April, p. 1–15, 2014.

ROTARIU, Dragos *et al.* Oxidative stress – Complex pathological issues concerning the hallmark of cardiovascular and metabolic disorders. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 152, n. April, p. 113238, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113238>.

RUSSO, Fabiele Baldino *et al.* Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Biological Psychiatry**, [s. l.],

vol. 83, no. 7, p. 569–578, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2017.09.021>.

SAJDEL-SULKOWSKA, Elizabeth M. *et al.* Brain region-specific changes in oxidative stress and neurotrophin levels in autism spectrum disorders (ASD). **Cerebellum**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 43–48, 2011.

SANDIN, S. *et al.* Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], vol. 21, no. 5, p. 693–700, 2016.

SANDIN, S. *et al.* Autism risk associated with parental age and with increasing difference in age between the parents. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 693–700, 2016.

SANTOS-TERRA, Júlio *et al.* Resveratrol prevents long-term structural hippocampal alterations and modulates interneuron organization in an animal model of ASD. **Brain research**, v. 1768, p. 147593, 2021.

SCAINI, Giselli *et al.* In vitro effect of antipsychotics on brain energy metabolism parameters in the brain of rats. **Acta Neuropsychiatrica**, [s. l.], vol. 25, no. 1, p. 18–26, 2013.

SCAINI, Giselli *et al.* In vitro effect of antipsychotics on brain energy metabolism parameters in the brain of rats. **Acta Neuropsychiatrica**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 18–26, 2013.

SCHAAFSMA, Sara M. *et al.* Sex-specific gene-environment interactions underlying ASD-like behaviors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], vol. 114, no. 6, p. 1383–1388, 2017.

SHAITO, Abdullah *et al.* Resveratrol-mediated regulation of mitochondria biogenesis-associated pathways in neurodegenerative diseases: Molecular insights and potential therapeutic applications. **Current neuropharmacology**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 1184–1201, 2023.

SHAW, Kelly A. *et al.* Early Identification of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 4 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. **MMWR Surveillance Summaries**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 3–16, 2023.

SHIN, Nara *et al.* p66shc siRNA-encapsulated PLGA nanoparticles ameliorate neuropathic pain following spinal nerve ligation. **Polymers**, [s. l.], vol. 12, no. 5, p. 1–13, 2020.

SILVERMAN, Jill L. *et al.* Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], vol. 11, no. 7, p. 490–502, 2010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2851>.

SILVERMAN, Jill L. *et al.* Repetitive self-grooming behavior in the BTBR mouse model of autism is blocked by the mGluR5 antagonist MPEP. **Neuropsychopharmacology**, [s. l.], vol. 35, no. 4, p. 976–989, 2010. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2009.201>.

SMITH, T.; IADAROLA, S. Evidence Base Update for Autism Spectrum Disorder. **Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology**, v. 44, n. 6, p. 897–922, nov. 2015.

SIMONYI, Agnes *et al.* Polyphenols in cerebral ischemia. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 135–147, 2005. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1385/MN:31:1-3:135>.

SKAPER, Stephen D. *et al.* An inflammation-centric view of neurological disease: Beyond the neuron. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], vol. 12, no. March, p. 1–26, 2018.

STRECK, Emilio L. *et al.* Effect of antipsychotics on succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in rat brain. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 376, p. 127–133, 2007.

SOUZA, N. *et al.* The role of the pediatrician in accurate recognition of autistic spectrum disorders and symptoms: literature review. **Residência Pediátrica**, v. 11, n. 3, 2021.

TALANTSEVA, Oksana I. *et al.* The global prevalence of autism spectrum disorder: A three-level meta-analysis. **Frontiers in psychiatry**, v. 14, p. 1071181, 2023.

TALEB, Abdoh *et al.* Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in autism and its implications for pharmacological treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111322, 2021.

TANG, Guomei *et al.* Mitochondrial abnormalities in temporal lobe of autistic brain. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 54, p. 349–361, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2013.01.006>.

TELEANU, Daniel Mihai *et al.* An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 11, 2022.

THOMAS, Alexia *et al.* Marble burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psychopharmacology**, [s. l.], vol. 204, no. 2, p. 361–373, 2009.

THORSEN, Morten. **Oxidative stress, metabolic and mitochondrial abnormalities associated with autism spectrum disorder**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2020-. ISSN 18780814.vol. 173 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.04.018>.

TURAL HESAPCIOGLU, Selma *et al.* Olanzapine, risperidone, and aripiprazole use in children and adolescents with Autism Spectrum Disorders. **Research in Autism Spectrum Disorders**, [s. l.], vol. 72, no. September 2019, 2020.

USUI, Noriyoshi; KOBAYASHI, Hikaru; SHIMADA, Shoichi. Neuroinflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Autism Spectrum Disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], vol. 24, no. 6, 2023.

VANG, Ole *et al.* What is new for an old molecule? systematic review and recommendations on the use of resveratrol. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 6, no. 6, 2011.

VARGHESE, Merina *et al.* Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 134, n. 4, p. 537–566, 2017.

VARNI, J. W. et al. Effect of Aripiprazole 2 to 15 mg/d on Health-Related Quality of Life in the Treatment of Irritability Associated with Autistic Disorder in Children: A Post Hoc Analysis of Two Controlled Trials. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 4, p. 980–992, abr. 2012.

VINCENZI, Karine Louize *et al.* Effects of resveratrol on alterations in cerebrum energy metabolism caused by metabolites accumulated in type I citrullinemia in rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 394, n. 5, p. 873–884, 2021.

VOET, Donald; VOET, Judith G. *Biochemistry*. 5. ed. Hoboken: Wiley, 2021.

WEISSMAN, Jacqueline R. *et al.* Mitochondrial disease in autism spectrum disorder patients: A cohort analysis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 1–6, 2008.

WEIBEL, Ewald R.; KISTLER, Gonzague S.; SCHERLE, Walter F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **The Journal of cell biology**, v. 30, n. 1, p. 23-38, 1966.

WENDEL, A. [44] Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.

WILLIAMS, J. G.; HIGGINS, J. P.T.; BRAYNE, C. E.G. Systematic review of prevalence studies of autism spectrum disorders. **Archives of Disease in Childhood**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 8–15, 2006.

WING, Lorna; POTTER, David. The epidemiology of autistic spectrum disorders: Is the

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) a disponibilizar em ambiente digital institucional, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/IBICT) e/ou outras bases de dados científicas, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data 01/02/2026.

1. Identificação do material bibliográfico: () Tese (x) Dissertação () Trabalho de Conclusão

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor: Natalia Cavichioli

Orientadora: Dra.Daniela Delwing de Lima. Coorientador: _____

Data de Defesa: 17/12/2024

Título: Efeitos Antioxidante, Metabólico e Comportamental do Resveratrol e Aripiprazol em um modelo animal de Autismo induzido por Ácido Valproico.

Instituição de Defesa: Universidade da Região de Joinville

3. Informação de acesso ao documento:

Pode ser liberado para publicação integral (x) Sim () Não

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese, dissertação ou relatório técnico.

Documento assinado digitalmente
 NATALIA CAVICHIOLI
Data: 30/01/2025 17:46:22-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do autor

Joinville/30/01/2025