

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FONOAUDIOLOGIA

CAIO SERGIO GALINA SPILLA

EFEITO DO TRATAMENTO COM MELATONINA SOBRE O
COMPORTAMENTO, EXPRESSÃO GÊNICA E NEUROQUÍMICA EM UM
MODELO ANIMAL DE AUTISMO

Marília

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE FILOSOFIA E CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FONOAUDIOLOGIA

CAIO SERGIO GALINA SPILLA

EFEITO DO TRATAMENTO COM MELATONINA SOBRE O
COMPORTAMENTO, EXPRESSÃO GÊNICA E NEUROQUÍMICA EM UM
MODELO ANIMAL DE AUTISMO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia da Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP-Campus de Marília-SP, para obtenção do título de Doutor em Fonoaudiologia.

Área de concentração: Distúrbios da Comunicação Humana.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Pinato.

Marília

2023

S756e

Spilla, Caio Sergio Galina

Efeito do tratamento com melatonina sobre o comportamento,
expressão gênica e neuroquímica em um modelo animal de autismo /

Caio Sergio Galina Spilla. -- Marília, 2023

105 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Filosofia e Ciências, Marília

Orientadora: Luciana Pinato

1. Autismo. 2. Aprendizagem. 3. Hipocampo. 4.
Neurodesenvolvimento. 5. Neuroinflamação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Filosofia e Ciências, Marília. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Os resultados impactam no entendimento dos mecanismos dos transtornos que acometem o neurodesenvolvimento explorando uma de suas causas, o ambiente inflamatório pré-natal. A reversão de alterações na memória espacial e das alterações neuroquímicas e moleculares hipocampais deste modelo pelo tratamento com melatonina a destaca como molécula candidata a minimizar danos do quadro inflamatório pré-natal.

Potential impact of this research

The results impact the understanding of the disorders that affect neurodevelopment by exploring one of its causes, the prenatal inflammatory environment. The reversal of changes in spatial memory and hippocampal neurochemical and molecular changes in this model by treatment with melatonin highlights it as a candidate molecule to minimize the damage caused by prenatal inflammation.

CAIO SERGIO GALINA SPILLA

**EFEITO DO TRATAMENTO COM MELATONINA SOBRE O
COMPORTAMENTO, EXPRESSÃO GÊNICA E NEUROQUÍMICA EM UM
MODELO ANIMAL DE AUTISMO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fonoaudiologia, Área de Concentração Distúrbios da Comunicação Humana, da Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Marília (SP), para obtenção do título de Doutor em Fonoaudiologia.

Área de concentração: Distúrbios da Comunicação Humana.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: _____

Prof.^a Dr.^a Luciana Pinato
Universidade Estadual Paulista – UNESP FFC/Marília-SP.

Examinadora: _____

Prof.^a Dr.^a Érika Cecon
Institut Cochin - Université Paris Descartes

Examinadora: _____

Prof.^a Dr.^a Ana Claudia Figueiredo Frizzo
Universidade Estadual Paulista – UNESP FFC/Marília-SP.

Examinadora: _____

Prof.^a Dr.^a Flávia Roberta Faganello Navega
Universidade Estadual Paulista – UNESP FFC/Marília-SP.

Marília, 10 de maio de 2023.

Dedico este trabalho aos meus pais, Sergio (*in memoriam*) e Célia (*in memoriam*) por estarem sempre ao meu lado em cada conquista e em cada oração guiando o meu caminho ensinando-me os verdadeiros valores da vida e por toda luta para proporcionar-me uma educação de qualidade.

“Pra além de quando eu respirar, vou me lembrar de vocês...”. OTM

AGRADECIMENTOS

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

A minha orientadora, a professora Dra. Luciana Pinato pelo acolhimento, consideração, carinho, confiança e tempo dedicado na construção deste trabalho. Agradeço cada conselho, orientação e oportunidade proporcionada. Sou muito grato por você ensinar-me o verdadeiro amor pela pesquisa.

A professora Dra. Célia Maria Giacheti, pelo acolhimento no programa de pós-graduação em Fonoaudiologia e por todos os momentos em que tive a oportunidade de aprender com toda a sua sabedoria.

Aos membros da banca, Dra. Érika Cecon, Dra. Ana Claudia Figueiredo Frizzo, Dra Flávia Roberta Faganello Navega, Dra. Silvia Honda Takada por colaborarem disponibilizando tempo e sugerindo mudanças para a melhoria deste trabalho.

A minha família, especialmente, a minha avó Leobina (*in memoriam*), meu tio José Roberto, minha tia Lucia Helena e minha sogra Rose Maria, por estarem sempre ao meu lado.

A professora Dra. Leila Maria Guissoni Campos, pela amizade e por ter acreditado em minha capacidade.

Aos professores Dra. Percyleine Pelegrini Herculiani e Me. Fábio Augusto Freiria Barbosa, por quem tenho tanta admiração, respeito, carinho e gratidão.

Ao professor Dr. Domingos Donizeti Roque, por sua amizade e por todos os conselhos ao longo desta empreitada.

A professora Dra. Isabela Bazzo, por contribuir para realização desse trabalho.

Aos membros do Laboratório de Estudos em Neuroinflamação, que contribuíram na construção desse trabalho.

Agradecimento Especial

Meu agradecimento especial é a Ana Luiza, minha companheira de todos os momentos. Não há palavras que possam expressar o seu papel ao longo desse caminho. Só posso tentar agradecer dizendo muito obrigado por fazer parte da minha vida e estar sempre ao meu lado. Essa é nossa conquista pois desde o início, se você não estivesse ao meu lado, nada teria acontecido.

RESUMO

A ativação imunológica do organismo materno na gestação pode acarretar alterações no desenvolvimento fetal. A endotoxina proveniente da parede de bactérias gram-negativas, o LPS, é capaz de desencadear a produção de citocinas, mimetizando um quadro de inflamação pré-natal ao ser administrado na gestação. Sabe-se que em quadros inflamatórios pode ocorrer a redução na produção de melatonina (MEL) pela glândula pineal, com conseqüente redução na circulação. A MEL apresenta funções sincronizadora, antioxidante e neuroprotetora. Em estudo anterior do nosso grupo foi demonstrado que fêmeas prenhas injetadas com LPS, cuja prole apresenta problemas no neurodesenvolvimento, tem redução no conteúdo circulante de MEL. Entre os mais diversos quadros que podem resultar de alterações no neurodesenvolvimento está o transtorno do espectro autista (TEA). Dependendo do grau de acometimento é comum encontrar nos indivíduos com TEA problemas comportamentais, atencionais, de aprendizado e memória. Várias alterações comportamentais e em processos cognitivos foram observadas neste modelo animal caracterizando-o como um modelo animal cuja exposição a um quadro inflamatório pré-natal resulta em uma prole com comportamentos autísticos. Nossa hipótese no presente estudo é de que as alterações na síntese e liberação da MEL no organismo materno no decorrer da gestação tem relação com as alterações de neurodesenvolvimento da prole. Para testar esta hipótese o objetivo geral deste estudo foi avaliar se o tratamento com MEL associado à infecção com LPS em fêmeas prenhas reverteria algumas das alterações comportamentais, neuroquímicas e moleculares já demonstradas na prole de fêmeas prenhas expostas ao LPS, causadas pelo quadro inflamatório pré-natal nesse modelo animal experimental. Para isso, primeiramente foram avaliados parâmetros como peso, ingesta hídrica e alimentar das fêmeas prenhas em resposta aos diferentes tratamentos. As proles de ratas expostas ao LPS com ou sem associação ao tratamento com MEL foram avaliadas quanto à memória espacial e comportamento inflexível por meio de teste comportamental de alternância espontânea no labirinto em T. Quanto à neuroquímica foi avaliada a expressão da proteína ligante de cálcio Calretinina em neurônios das diferentes regiões do hipocampo, por já ter sido demonstrada estar alterada neste modelo. Quanto a parte molecular, foi avaliado se administração de LPS durante a gestação pode alterar a expressão gênica de receptores de melatonina MT1 e MT2 e do fator neurotrófico derivado do cérebro BDNF no hipocampo da prole e se o tratamento com MEL em associação ao LPS durante o período gestacional reverteria estas alterações. Os resultados mostraram que no período pós-

tratamento o grupo de ratas prenhez injetadas com LPS apresentou menor ganho de peso ($27,4 \pm 5,6$) que o grupo salina ($59,3 \pm 4,1$, $p = 0,001$) e menor consumo de água (salina $55,4 \pm 5,9$ vs. LPS $44,5 \pm 7,7$, $p < 0,001$). Não houve diferença na ingesta alimentar das fêmeas prenhes nem no número de filhotes das ninhadas entre os grupos, no peso dos filhotes e no peso do encéfalo dos filhotes. No teste comportamental o número total de erros na escolha do braço durante o teste do labirinto em T foi menor no grupo salina ($1,7 \pm 0,9$) em relação ao grupo LPS ($4,1 \pm 0,9$; $p < 0,01$). Os grupos melatonina ($2,3 \pm 0,8$, $p=0,02$) e LPS + melatonina ($2,3 \pm 1,4$, $p=0,02$) apresentaram menor quantidade de erros em relação ao grupo LPS ($4,12 \pm 0,99$, $p=0,01$). Na análise da neuroquímica das regiões do hipocampo para as células imunorreativas a calretinina foi possível observar que na região do giro denteado (GD) houve diferença entre os grupos salina ($34,3 \pm 11,8$) e LPS ($58,3 \pm 1,1$; $p= 0,02$) com maior expressão no grupo LPS. Essa diferença não foi encontrada quando comparados os grupos salina ($34,3 \pm 11,8$) e LPS+Mel ($44,6 \pm 6,1$) ($p= 0,45$). Na análise da expressão de RNAm do MT1 no hipocampo, não foi encontrada diferença na prole dos diferentes grupos. Quanto ao MT2, a prole do grupo LPS apresentou menor valor do RNAm relativo ($0,16 \pm 0,12$) que a do grupo salina ($1,18 \pm 0,7$) ($p < 0,05$). O grupo LPS+MEL não apresentou diminuição na expressão dos receptores MT2 em relação ao grupo salina. Na análise da expressão de RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) não foi observado diferença estatística entre os grupos salina ($1,74 \pm 1,90$) e LPS ($1,28 \pm 0,99$) ($p= 0,98$). Os resultados permitem concluir que: (1) O quadro inflamatório gestacional em ratas prenhes levou a alterações no peso corporal e ingesta hídrica, sem alterar a ingesta de alimento desses animais e o tratamento com MEL reverteu estas alterações. (2) A prole das ratas prenhes com quadro inflamatório gestacional mostrou alteração no teste de memória espacial, aumento na imunorreatividade da calretinina e diminuição na expressão dos receptores MT2 em neurônios do hipocampo. (3) A prole das ratas prenhes com quadro inflamatório gestacional não mostrou alteração na expressão dos receptores MT2 ou do BDNF em neurônios do hipocampo. (4) A MEL quando ofertada previamente e após o desafio imunológico durante o período gestacional promoveu a reversão do efeito do LPS no desempenho no teste de memória espacial da prole e não permitiu a diminuição na expressão do receptor MT2 e o aumento da imunorreatividade da calretinina em neurônios no hipocampo.

Palavras-chave: Autismo. Aprendizagem. Hipocampo. Neurodesenvolvimento. Neuroinflamação.

ABSTRACT

The immune activation of the maternal organism throughout pregnancy can lead to changes in fetal development. The endotoxin from the wall of gram-negative bacteria, LPS, is capable of triggering the production of cytokines, thus mimicking a picture of prenatal inflammation when administered during pregnancy. It is known that in inflammatory conditions there may be a reduction in the production of melatonin by the pineal gland, with a consequent reduction in circulation. Melatonin has important synchronizing, antioxidant, and neuroprotective functions during neurodevelopment. In a previous study by our group, it was demonstrated that pregnant females injected with LPS, whose offspring have neurodevelopmental problems, have a reduction in the circulating melatonin content. Among the most diverse conditions that may result from alterations in neurodevelopment is the autism spectrum disorder (ASD). Depending on the degree of involvement, it is common to find behavioral, attentional, learning and memory problems in individuals with ASD. Several changes in behavior and cognitive processes were observed in this animal model, characterizing it as an animal model whose exposure to a prenatal inflammatory condition results in offspring with autistic behaviors. Our hypothesis in the present study is that changes in the synthesis and release of melatonin in the mother's body during pregnancy are related to changes in the neurodevelopment of the offspring. To test this hypothesis, the general objective of this study was to evaluate whether treatment with melatonin associated with LPS infection in pregnant females would reverse some of the behavioral, neurochemical, and molecular changes already demonstrated in the offspring of pregnant females exposed to LPS, caused by the pre-inflammatory condition. natal in this experimental animal model. For this, parameters such as weight, water and food intake of pregnant females in response to different treatments were first evaluated. The offspring of rats exposed to LPS with or without association with melatonin treatment were evaluated for spatial memory and inflexible behavior using a behavioral test of spontaneous alternation in the T-maze. As for the neurochemistry, the expression of the calcium-binding protein Calretinin was evaluated in neurons from different regions of the hippocampus, as it has already been demonstrated to be altered in this model. As for the molecular part, it was evaluated whether the administration of LPS during pregnancy can alter the gene expression of melatonin receptors MT1 and MT2 and of the brain-derived neurotrophic factor BDNF in the hippocampus of the offspring and whether the treatment with melatonin in association with LPS during pregnancy gestational period could reverse these changes.

The results showed that in the post-treatment period, the group of pregnant rats injected with LPS showed less weight gain (27.4 ± 5.6) than the saline group (59.3 ± 4.1 , $p = 0.001$) and less water consumption (saline 55.4 ± 5.9 vs. LPS 44.5 ± 7.7 , $p < 0.001$). There was no difference in the food intake of the pregnant females, nor in the number of pups in the litters between the groups, in the weight of the pups and in the weight of the brain of the pups. In the behavioral test, the total number of errors in choosing the arm during the T-maze test was lower in the saline group (1.7 ± 0.9) compared to the LPS group (4.1 ± 0.9 ; $p < 0.01$). The melatonin (2.3 ± 0.8 , $p=0.02$) and LPS + melatonin (2.3 ± 1.4 , $p=0.02$) groups had fewer errors than the LPS group (4.12 ± 0.99 , $p=0.01$). In the analysis of the neurochemistry of the hippocampal regions for calretinin-immunoreactive cells, it was possible to observe that in the dentate gyrus (DG) region there was a difference between the saline (34.3 ± 11.8) and LPS (58.3 ± 1.1 ; $p= 0.02$) with greater expression in the LPS group. This difference was not found when comparing saline (34.3 ± 11.8) and LPS+Vehicle (44.6 ± 6.1) groups ($p= 0.45$). In the analysis of MT1 mRNA expression in the hippocampus, no difference was found in the offspring of different groups. As for MT2, the offspring of the LPS group had a lower relative mRNA value (0.16 ± 0.12) than the saline group (1.18 ± 0.7) ($p < 0.05$). The LPS+MEL group did not show a decrease in the expression of MT2 receptors compared to the saline group. In the analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression, no statistical difference was observed between saline (1.74 ± 1.90) and LPS (1.28 ± 0.99) groups ($p= 0.98$). The results allow us to conclude that: (1) The gestational inflammatory condition in pregnant rats led to changes in body weight and water intake, without changing the food intake of these animals and melatonin treatment reversed these changes. (2) The offspring of pregnant rats with gestational inflammation showed alterations in the spatial memory test, an increase in calretinin immunoreactivity and a decrease in the expression of MT2 receptors in hippocampal neurons. (3) The offspring of pregnant rats with gestational inflammation showed no alteration in the expression of MT2 receptors or BDNF in hippocampus neurons. (4) Melatonin, when offered before and after the immunological challenge during the gestational period, promoted the reversal of the effect of LPS on the performance in the spatial memory test of the offspring and did not allow the decrease in the expression of the MT2 receptor and the increase in the immunoreactivity of calretinin in neurons in the hippocampus.

Key words: Autism. Learning .Hippocampus. Neurodevelopment. Neuroinflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura molecular da melatonina e sua via de síntese	30
Figura 2- A via de estímulo e inibição da síntese de melatonina.....	31
Figura 3- Esquema representando as vias de ação da melatonina com efeitos que são mediados via receptores e outros que não são mediados por receptores	32
Figura 4- Esquema representando a classificação dos efeitos da melatonina	34
Figura 5- Esquema representando a organização estrutural do LPS	39
Figura 6- Sinalização intracelular do LPS.....	41
Figura 7- Corte coronal de encéfalo.....	45
Figura 8- Via de informação no hipocampo.....	46
Figura 9- Figura esquemática com a divisão dos grupos do experimento	53
Figura10- Labirinto em T utilizado para os testes de memória espacial e comportamento restrito/repetitivo	55
Quadro 1- Relação da sequência de primers utilizadas para análise da expressão gênica.....	58
Figura 11- Gráfico comparativo do ganho de peso dos grupos de fêmeas prenhes submetidas aos diferentes tratamentos	60
Figura 12- Gráfico ilustrando o ganho de peso individual das fêmeas dos grupos salina e LPS antes e após o tratamento	61
Figura 13- Gráfico ilustrando o ganho de peso individual das fêmeas de cada grupo submetidas aos diferentes tratamentos	61
Figura 14- Gráfico ilustrando o ganho de peso individual das fêmeas dos grupos salina e melatonina antes e após os diferentes tratamentos	62
Tabela 1- Média e desvio padrão da ingestão em gramas de ração das fêmeas prenhes dos grupos submetidos aos diferentes tratamentos.....	63
Tabela 2- Média e desvio padrão do peso em diferentes dias da prole de animais que foram submetidas a diferentes tipos de tratamentos durante a gestação... ..	65
Figura 15- Gráficos comparativos do total de células CR-IR entre os grupos salina, LPS, melatonina (mel) e LPS+Mel.	68
Figura 16- Expressão de RNA mensageiro do receptor de melatonina MT2 no hipocampo da prole, nas quais as fêmeas foram submetidas aos diferentes tratamentos.	69
Figura 17- Expressão de RNA mensageiro do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo da prole de ratas submetidas a administração de salina, LPS, melatonina (mel) ou LPS.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFMK	N-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
AA-NAT	Arilalquilamina-N-Acetil Transferase
AMK	N-acetil-5-metoxiquinurmina
AP-1	Ativador da proteína 1
ASMT	Acetil-Serotonina O-Metil -Transferase
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA1	Região 1 do corno de amon
CA2	Região 2 do corno de amon
CA3	Região 3 do corno de amon
CaBPS	Proteínas ligantes de cálcio
CD14	Proteína de Membrana CD14
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
Caspr2	Anticorpo reativo a proteína 2
CID-10	Classificação internacional das doenças
COX-2	Ciclooxigenase-2
CHD8	Proteína 8 de ligação ao DNA da cromodomaina helicase
CNTNAP2	Do ingles contactin associated protein like 2
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
CR-IR	Imunorreativo a calretinina
clorf30	Gene responsável por codificar proteína EMSY
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSCAM	Molécula de adesão celular DS
DSM-III	Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais III
DSM-III R	Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais III Revisado
DSM-IV	Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais IV
DSM-5	Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais 5
EtOH	Etanol
FMRP	Fragile X mental retardation protein
FMR1	Fragile X mental retardation, gene que codifica proteína

FOXP-3	Fator de Transcrição para diferenciação de células T reguladoras (Forkhead Box 3)
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GATA3	Fator de transcrição da célula Th2
GDNF	Fator neurotrófico derivado de célula glial
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
HIOMT	Hidroxi-Indol-O-Metil Transferase
HIV	Human Immunodeficiency Virus / SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida NIMH Instituto Nacional de Saúde Mental
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
H ₂ O _d	Água destilada
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IBA-1	Proteína de associação de ligação ao cálcio ionizada -1
INF-3	Fator regulador interferon 3
IKK	Nova Quinase
IKB α	Nova Quinase Alfa
IKK β	Nova Quinase Beta
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
LPS	Lipopolissacarídeo
mCD14	CD14 de membrana
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos
MCP-1 α	Proteína quimioatrativa de monócitos α
MD-2	Proteína Mielóide diferenciadora 2
MECP2	Methyl-CpG-binding protein 2, gene que codifica repressor de proteína ligante
MHCI	Complexo de histocompatibilidade classe I
MHCII	Complexo de histocompatibilidade classe II
MPAK	Proteína quinase de ativação mitogênica
MT1	Receptor de melatonina 1
MT2	Receptor de melatonina 2

MT3	Receptor de melatonina 3
MTHFR	Enzima metileno tetra hidrofolato redutase
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NaCL	Cloreto de sódio
NAS	N- Acetilserotonina
NO	Oxido nítrico
NF- α	Fator nuclear alfa
NFKB	Fator nuclear kB
NFKB1	Fator nuclear kB1
NFKB2	Fator nuclear kB2
NF1	Neurofibromin 1
NK	Natural Killer
NLGN3	Neuroigin 3, gene codificante de proteína de superfície neuronal
NLGN4	Neuroigin 4, gene codificante de proteína de superfície neuronal
NRXN1	Neurexin 1, gene que codifica proteína da família das neuroxinas
NQS	Núcleo Supra Quiasmático
OT	Gene da Ocitocina
PAMPS	Padrão molecular associado a patógenos
POGZ	Transposição do elemento derivado do domínio ZNF
PBS	Salina tamponada
PGE2	Prostaglandina E2
PKC	Proteína Quinase
PLC	Fosfolipase específica
PolyI-C	Ácido polirribonucleico-polirribocitidílico
PTEN	Phosphatase and tensin homolog, gene suppressor tumoral
RDoC	Critério de Domínio de Pesquisa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ROR	Receptores órfãos retinoides
RORyT	Fator de transcrição da célula Th17
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RZR	Receptores Z retinoides
sCD14	CD14 solúvel

SCN2A	Subunidade alfa 2 do canal dependente de voltagem de sódio
SH3	Domínio 3 de repetição de anquirina múltipla
SH1L	Histona metiltransferase
SHANK3	Gene que codifica proteína de suporte
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
S100B	Proteína S100 Beta
T-bet	Fator de transcrição da célula Th1
TEA	Transtorno do espectro autista
TGF β	Fator de transformação do crescimento beta
TGF β 1	Fator de transformação do crescimento beta 1
TrkB	Tirosina proteína quinase B

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Autismo	21
2.2 Alterações Estruturais.....	23
2.3 Funções Executivas e Memória.....	24
2.4 Etiologia.....	26
2.5 Melatonina	29
2.6 Receptores de Melatonina MT1 e MT2	32
2.7 Funções da Melatonina.....	34
2.8 Melatonina e TEA	35
2.9 Inflamação pré-natal	37
2.10 Modelos Animais	38
2.11 Lipopolissacarídeo	39
2.12 Placenta	41
2.13 Citocinas	42
2.14 Hipocampo.....	44
2.15 As ligantes de Cálcio	47
2.16 Fator Neutrófico Derivado do Cérebro	48
3 JUSTIFICATIVA	50
4 OBJETIVO	51
4.1 Objetivos Específicos.....	51
5 MATERIAL E MÉTODO	51
5.1 Animais.....	51
5.2 Acasalamento	52
5.3 Divisão dos Grupos	52
5.4 Teste Comportamental	54
5.5 Perfusão Transcardíaca.....	56
5.6 Decaptação.....	56
5.7 Ensaio de PCR Quantitativo.....	57
5.8 Imuno-Histoquímica-Imunoperoxidase	58
5.9 Análise Microscópica	59
5.10 Análise Estatística.....	59

6 RESULTADOS	59
<i>6.1 Parâmetros Analisados nas Fêmeas Prenhes.....</i>	<i>59</i>
<i>6.2 Parâmetros Analisados na Prole.....</i>	<i>63</i>
7 DISCUSSÃO.....	70
8 CONCLUSÃO	79
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

Os avanços dos estudos nas diferentes áreas do conhecimento possibilitaram que o transtorno do espectro autista (TEA) passasse de um quadro patológico raro e desconhecido, descrito em 1943 por Leo Kanner como autismo, para um dos transtornos do neurodesenvolvimento mais estudados e diagnosticados atualmente (KANNER, 1943; PARMEGGIANI; CORINALDESI; POSAR, 2019).

Caracterizado por alterações em duas grandes áreas: a da comunicação e a comportamental, sabe-se que o quadro é heterogêneo, de indivíduos acometidos levemente até gravemente, possibilitando o seu enquadramento dentro de um espectro, o TEA, segundo os critérios estabelecidos pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de transtornos mentais 5 (DSM-5), publicado pela associação de psiquiatria americana (ARAUJO; NETO, 2014; DSM-5, 2014).

Para o diagnóstico de TEA são considerados a dificuldade em cada um dos domínios da comunicação e em dois dos quatro domínios comportamentais estabelecidos pelo DSM-5 (LORD et al., 2018; PARMEGGIANI; CORINALDESI; POSAR, 2019). A identificação pode ser realizada ao longo dos primeiros anos de vida o que permite uma resposta mais eficaz às ferramentas terapêuticas disponíveis para estímulo das habilidades do sistema nervoso e promoção de um melhor desenvolvimento das funções de linguagem, cognitivas e motoras (WALLACE; ROGERS, 2010; REICHOW, 2012; SULLIVAN; STONE; DAWSON, 2014).

Os primeiros dados sobre a epidemiologia do autismo foram obtidos em 1966 por Lotter em crianças entre 08 e 10 anos quando se obteve uma prevalência de 4,5 casos a cada 10.000 crianças (LOTTER, 1966). No decorrer dos anos os diagnósticos de TEA cresceram exponencialmente chegando até a estimativas de que, nos EUA, 1 a cada 68 crianças apresentariam esse transtorno (AUTISM AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES MONITORING NETWORK, 2009). Em 2012, foram publicados dados epidemiológicos apontando para 62/10.000 indivíduos acometidos pelo quadro em escala mundial (ELSABBAGH et al., 2012). Em 2017, a prevalência estimada em países desenvolvidos foi de 1,5% da população (LYALL et al., 2017).

Os mecanismos envolvidos na etiologia do TEA não são totalmente esclarecidos, mas sabe-se que múltiplos fatores como a genética e os fatores ambientais interagem para desencadear o quadro (GADIA; TUCHMAN; ROTTA, 2004). O resultado desta interação de fatores é a quebra da homeostasia durante o neurodesenvolvimento com

alterações que podem levar ao acometimento de áreas encefálicas com funções em atividades como interação social, motricidade, aprendizagem e linguagem resultando em características autísticas (KRIGGER, 2006; DSM-5, 2014).

Outra característica presente em indivíduos com TEA são os distúrbios de sono (FADINI et al., 2015), cujas causas podem estar relacionadas a alterações nos componentes do sistema de temporização circadiano que controla a ritmicidade biológica (PINATO et al., 2019; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2021). O hormônio melatonina, produzido pela glândula pineal, é considerado um dos principais marcadores de ritmicidade endógeno do nosso corpo. A esta molécula são atribuídas função sincronizadora de ritmos biológicos como o sono e a temperatura corporal, além de funções neuroprotetora, antioxidante, de controle imunológico e de processos de divisão celular, aprendizagem e memória, dentre outras (ARENDETT, 2005; PINATO et al., 2015; ZUCULO et al., 2017).

A relação entre o TEA e baixos níveis de melatonina já foi demonstrada anteriormente (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2021). Há também estudos que exploram a possível relação entre a alteração no conteúdo de melatonina na mãe e sua consequência para o neurodesenvolvimento fetal. Em humanos, foi demonstrado que mães de crianças diagnosticadas com TEA apresentaram baixos níveis de melatonina (ARBUCKLE; WILKINS; SHERMAN, 1993; BRAAM et al., 2018; JIN et al., 2018). lembrando que esta seria a fonte de melatonina para o feto já que o desenvolvimento da glândula pineal se dá após o nascimento (BRAAM et al., 2018; JIN et al., 2018).

A falta da melatonina em etapas cruciais do neurodesenvolvimento poderia acarretar alterações no neurodesenvolvimento. Dados do nosso grupo mostram que em um modelo animal de inflamação durante a gestação, fêmeas prenhes apresentam bloqueio parcial na produção de melatonina e a prole apresenta alguns comportamentos autísticos (SPILLA, 2018). O modelo utilizado de exposição de ratas prenhes a endotoxina lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias gram-negativas, é conhecido por resultar em uma prole que expressa alterações neuroquímicas e comportamentos autísticos (LIMA et al., 2011; KIRSTEN, 2012).

A ativação imunológica desencadeada pela injeção de LPS na fêmea prenhe durante o período gestacional mimetiza um quadro de inflamação pré-natal e resulta em um desequilíbrio na produção de citocinas que acabam por afetar o

neurodesenvolvimento fetal e a consequente expressão comportamental (KIRSTEN, 2012; KIRSTEN; BERNARDI, 2017).

Essas alterações na funcionalidade podem estar relacionadas às modificações estruturais de áreas encefálicas específicas em desempenhar tais funções. Dentre as áreas que podem estar envolvidas na expressão dos chamados comportamentos autísticos, encontra-se o hipocampo relacionado a funções de aprendizado e memória. Mudanças no volume, morfologia, aumento no número e na densidade dos neurônios (AYLWARD et al., 1999; PIVEN et al., 1998; MACHADO et al., 2003; EDALATMANESH et al., 2013) e aumento na ativação das células da glia hipocampais já foram demonstradas em indivíduos com TEA (PETRELLI; PUCCI; BEZZI, 2015; TAKANO, 2015). Tais alterações sugerem que alterações morfológicas, moleculares e neuroquímicas no hipocampo podem estar associadas a possíveis alterações de memória e outras funções hipocampais no TEA e ressaltam a importância de se investigar os mecanismos envolvidos na expressão desses comportamentos. Os avanços na busca por terapêuticas farmacológicas e comportamentais no TEA se dão pelo entendimento dos mecanismos envolvidos nesse transtorno do neurodesenvolvimento e para isso, dado a complexidade dos mecanismos envolvidos, a utilização de modelos animais experimentais torna-se uma ferramenta fundamental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AUTISMO

Quadro com alterações no neurodesenvolvimento, de origem complexa e multifatorial, o autismo apresenta uma diáde de prejuízos em funções sociais e comportamentais com heterogeneidade de acometimento de casos leves até mais graves, sendo por essa razão considerado um espectro denominado de transtorno do espectro autista (TEA) (MASI et al., 2017). Esses indivíduos podem apresentar comorbidades associadas como ansiedade, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade e até mesmo deficiência intelectual além de outros como distúrbios no sistema imunológico, gastrointestinal e distúrbios do sono (MANNION; LEADER, 2013; ZERBO et al., 2015).

Leo Kanner utilizou o termo autismo para descrever crianças com incapacidade de se relacionar, solidão e alterações nos processos da linguagem como déficits na comunicação, ecolalia, uso de substantivos e rimas para aprendizado, interpretação literal

e ainda comportamentos repetitivos e hipersensibilidades sensoriais (KANNER, 1943). Já em 1944, Hans Asperger ao avaliar indivíduos com alto grau de funcionamento identificou características semelhantes às que Kanner havia observado como dificuldades na comunicação não verbal e nas habilidades sociais (ASPERGER, 1991). Posteriormente Lorna Wing associou os conhecimentos propostos por Kanner e Asperger e assim demonstrou as similaridades entre as duas descrições tornando o termo autismo cada vez mais evidente e mostrando que existiam variações de condições apresentadas por esses indivíduos (WING, 1981; MASI et al., 2017).

O diagnóstico de Autismo foi incluído pela primeira vez no Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da Associação de Psiquiatria Americana (DSM-III), depois seus critérios foram ampliados para o DSM-III-R e no DSM-IV recebeu o nome de Transtorno Autístico. Posteriormente com a publicação do DSM-5 no ano de 2013 criou-se o termo transtorno do espectro autista. Mesmo depois de evoluções nos critérios estabelecidos para o diagnóstico do quadro, ainda há dificuldades no enquadramento desses indivíduos nos níveis funcionais e na função cognitiva sendo que a influência social e cultural torna o diagnóstico ainda mais complexo (BARNETT, 2016).

Atualmente os dados epidemiológicos referentes a esse transtorno são elevados. Em uma revisão recente, foi encontrado que a prevalência global de TEA está em torno de 65/10.000 (ZEIDAN et al., 2022). Há alta variabilidade também na prevalência do TEA entre os diferentes continentes (CHIAROTTI; VERONESI, 2020). Nos Estados Unidos estudos chegaram a estimar 1 autista em cada 68 indivíduos nascidos (AUTISM AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES MONITORING NETWORK, 2009; BRUGHA et al., 2011; CONSTANTINO; MARRUS, 2017). No Brasil, em 2014, estimava-se cerca de 2 milhões de indivíduos com autismo, o que representaria, na época, cerca de 1% da população do país (VIANA et al., 2020).

Entre as características observadas para o diagnóstico do TEA estão os déficits na interação social e na comunicação, além dos padrões repetitivos e estereotipados de comportamentos e os interesses restritos em determinadas atividades. Esses achados variam de acordo com a gravidade do quadro e com o nível de comprometimento funcional. Dentro do comprometimento estão ainda os prejuízos sociais, atraso na linguagem, ecolalia, déficits na atenção conjunta, perda auditiva, comportamentos e interesses restritivos e repetitivos por determinados objetos ou brinquedos,

comportamentos estereotipados como bater de mãos, comportamento arredoio, falta de reciprocidade emocional, ausência de medo, exacerbação dos estímulos sensoriais e a inflexibilidade e resistência em mudar a rotina pré-estabelecida (SANCHACK; THOMAS, 2016).

Os sinais podem começar a aparecer já por volta dos seis aos 12 meses de idade (SANCHACK; THOMAS, 2016) e a depender do grau de comprometimento, existe um maior ou menor impacto na rotina diária da criança e familiares (LAMÔNICA et al., 2021).

Dado o aumento no número de indivíduos diagnosticados com tal quadro, diversos setores como educação, saúde, assistência social, mercado de trabalho entre outros são impactados devido a esse quadro, pois o custo para possibilitar a inclusão desses indivíduos estende-se até a vida adulta (WUO, 2019). A busca por conhecer as bases e mecanismos neurobiológicos implicados no aparecimento dessa patologia se faz necessário para permitir traçar cuidados adequados, ofertar apoio aos familiares e criar novos tratamentos para melhorar a qualidade de vida destes indivíduos (MASI et al., 2017).

2.2 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS

Alterações na organização estrutural tanto macroscópica quanto microscópica como alterações volumétricas em substância branca e cinzenta, no fluxo sanguíneo e na conectividade vêm sendo relatadas no TEA (DONOVAN; BASSON, 2017).

Dentre as estruturas encefálicas afetadas estão: o cerebelo, com alterações de volume do verme cerebelar, redução do tamanho e no número de células de purkinje as quais podem resultar em alterações importantes em funções cognitivas e motora (COURCHESNE et al., 1988; D'MELLO et al., 2015; DONOVAN; BASSON, 2017); a amígdala, estrutura relacionada a sensações de prazer, medo e agressividade, apresenta aumento no volume, na densidade das células e diminuição do número de neurônios GABAérgicos e as glutamatérgicos (RUBENSTEIN; MERZENICH, 2003; SCHUMANN et al., 2009; DONOVAN; BASSON, 2017); o córtex pré-frontal, com alterações no padrão de crescimento, na espessura e em suas camadas e ainda a falta de organização entre as células, as quais devem influenciar as conexões estabelecidas por essa região com outras áreas do cérebro e assim afetar as denominadas funções executivas

como planejamento, tomada de decisão, aprendizado e memória, interação social e comunicação (DONOVAN; BASSON, 2017).

Outras regiões também relacionadas aos comportamentos autísticos são o tronco encefálico, corpo caloso, tálamo, núcleos da base e áreas que compõem o sistema límbico como o córtex entorrinal e o hipocampo (LIN et al., 2017; YENKOYAN et al., 2017). Neste último, já foram descritas alterações no volume, aumento na densidade celular, modificações na forma e tamanho das células piramidais, alteração no padrão de ramificação dos dendritos e alteração nas subpopulações de neurônios e interneurônios do sistema GABAérgicos (BLATT, 2012; EILAM-STOCK et al., 2016; DONOVAN; BASSON, 2017) que afetariam funções cognitivas como a memória (EICHENBAUM, 2001; RICHARDS et al., 2020).

2.3 FUNÇÕES EXECUTIVAS E MEMÓRIA

Define-se função executiva como uma extensa gama de domínios de habilidades cognitivas de ordem superior, isto é, que requer a integração do córtex pré-frontal com outras áreas corticais para expressar comportamentos como o raciocínio abstrato, a regulação social, o comportamento direcionado a objetos, o planejamento, tomada de decisão, aprendizado e memória (FERRARA et al., 2016; DEMETRIOU; LAMPIT; QUINTANA, 2018).

A memória é um fenômeno complexo que envolve a aquisição, retenção, consolidação e evocação de informações e apresenta uma íntima relação com a aprendizagem (SOUSA; SALGADO, 2015). Evolutivamente tem papel fundamental para os diversos organismos visto que é por meio da evocação de memórias que escolhas são feitas, adaptações ao meio são realizadas, buscas por alimentos são motivadas (IZQUIERDO, 2013).

Para a formação de uma memória, existe uma sequência de etapas: a primeira delas é a aquisição, que corresponde à forma como essa informação chega até o sistema nervoso central. Para que isso ocorra é importante uma via sensitiva que irá levar a informação até o encéfalo (IZQUIERDO, 2013). No segundo momento acontece o armazenamento ou consolidação, processo esse que depende da integridade do hipocampo, que se dá por dois processos: eletrofisiológicos ou bioquímicos. As alterações bioquímicas resultam de modificações estruturais ou funcionais na estrutura das células presentes no tecido nervoso (ROCHA, 2008). No caso das estruturais, temos a

modificação dos neurônios no que tange a sua estrutura morfológica, nesse caso a formação de espinhas dendríticas e até mesmo de seus prolongamentos. Já nas funcionais a modificação das estruturas de seus canais iônicos importantes para os processos originados de sinapses (DIAS et al., 2018). Na sequência de formação de memória temos a evocação que poder ser por reconhecimento ou por recordação com a participação fundamental do córtex pré-frontal (ROCHA, 2008).

Devido a sua complexidade, classifica-se a memória de acordo com sua origem, tempo de retenção e função.

Quanto à origem, as memórias são classificadas em Filogenética e ontogenética (VIEIRA, 2006). A primeira já está pré-estabelecida geneticamente e apresenta informações fundamentais para a sobrevivência do indivíduo. A segunda mostra-se de forma adaptável pois nesta o indivíduo vai agindo de acordo com o ambiente que vive, se adaptando diariamente para obter a sua sobrevivência (VIEIRA, 2006).

Quanto ao tempo, as memórias podem ser de curto prazo, de trabalho e de longo prazo. A memória de curto prazo que tem como característica ser limitada a curto espaço de tempo, elas ficam retidas em nosso cérebro cerca de alguns minutos e devido a isso está sujeita a diferentes fatores que perturbam esse registro (MOURÃO; FARIA, 2015). A memória de trabalho, fundamental dentro do processo de aprendizagem é a que permite darmos continuidade aos nossos atos diários. Apresenta função central no gerenciamento do que será guardado ou não e está intimamente relacionada aos outros tipos de memória (BADDELEY; HITCH, 1974). Seu armazenamento também corresponde a um breve período de tempo e por meio dela é que conseguimos saber onde estamos e o que estamos fazendo. Um exemplo de sua utilização é a capacidade de reter um número de telefone até utilizarmos. Assim, essa memória é importante em processos de tomada de decisões visto que se utiliza de informações pré-existentes e as relaciona com o presente (BADDELEY; HITCH, 1974). Já as memórias classificadas como de longo prazo são aquelas que ficam armazenadas por um longo período de tempo. No caso esse período pode variar de horas até mesmo por toda vida (SOUSA; SALGADO 2015). Dentro da memória de longo prazo, temos as não declarativas ou implícitas que são aquelas que envolvem a aprendizagem de habilidades e hábitos onde não se exige nenhuma memória consciente e as declarativas ou explícitas que consiste na recordação de fatos ocorridos na vida da pessoa e sua relação com o conhecimento do mundo e ainda subdivide-se em episódica e semântica (KESSELS et al., 2001).

A memória espacial, é classificada como uma memória declarativa episódica e é essencial para a sobrevivência, pois é por meio dessa memória que conseguimos criar mapas cognitivos e obter dicas visuoespaciais de acordo com a relevância que possam fornecer para a nossa adaptação ao meio (VIEIRA, 2006). Graças a ela os animais conseguem identificar a presença de ameaças em determinados locais, buscar alimentos e água, perceber cheiros familiares e orientar-se para não gastar tempo retornando a ambientes previamente visitados. Os estudos mostram que essa memória pode ser caracterizada em dois tipos: a aloclétrica que envolve os elementos do ambiente e a egocêntrica que visa o posicionamento do indivíduo em relação ao meio (VIEIRA, 2006).

As bases neurais responsáveis pela formação da memória não ficam restritas a apenas um sistema. Existe a integração dos sistemas visuais, motores e outros que sofrem influência de fatores ambientais, emoções, sono, humor, importância e repetição da informação (ATKINSON; SHIFFRIN, 1968; SANDERSON; BANNERMAN, 2012). Diversas áreas encefálicas como o córtex associativo, núcleos anterior e posterior do tálamo, cerebelo, corpo amigdalóide e hipocampo estão envolvidas no processamento da memória. Entre essas estruturas, o hipocampo tem papel essencial para a memória espacial, com tipos celulares importantes para o desempenho dessa função que são as células de lugar, direção e as de grade (GASBARRI et al., 2005; DIAS et al., 2018).

2.4 ETIOLOGIA

O TEA resulta de um conjunto de fatores ambientais e genéticos que agem juntos para desencadear o quadro (CHEZ et al., 2007; LEVY; MENDELL; SCHULTZ, 2009; HERBERT, 2010; YENKOYAN et al., 2017).

Cerca de 600 genes foram relacionados ao TEA, porém alguns com baixa taxa de influência nos quadros. Dentre as modificações genéticas mais comuns temos as alterações na codificação de proteínas relacionadas às sinapses, rearranjo da cromatina e regulação da transcrição. Além dessas modificações, genes relacionados com a maturação sináptica, conectividade e plasticidade cerebral também estão no foco desse distúrbio (YENKOYAN et al., 2017; WAYE; CHENG, 2018).

Genes que agem sobre a proliferação, migração e posicionamento e interação entre neurônios e glia como o NLGN3/4, NRXN1, PTEN, mTOR, TSC1/2 e NF1 também estão entre os candidatos a comporem o TEA (YENKOYAN et al., 2017; WAYE; CHENG, 2018). Outros vem chamando a atenção, como o OT, gene responsável pela

síntese da ocitocina, e que modula o funcionamento de diversos neurotransmissores e neuromoduladores seria importante para classificar subtipos dentro do espectro autista (FRANCIS et al., 2016; WAYE; CHENG, 2018). O anticorpo reativo a proteína 2 (Caspr2) que quando se liga a Caspr2, leva a uma redução nas ramificações dendríticas dos neurônios excitatórios e na quantidade de neurônios inibitórios principalmente na região do hipocampo. Essa proteína foi encontrada no sangue de mães de crianças com TEA mostrando assim uma possível correlação como agente do quadro (BRIMBERG; MADER; JEGANATHAN, 2016). O SHANK3, gene posicionado no cromossomo 22, responsável por codificar a SH3 (domínio 3 de repetição de anquirina múltipla), cuja função é promover a regulação do complexo de sinalização da densidade sináptica (WAYE; CHENG, 2018). Modificações no gene da triptofano hidroxilase 2 (TPH2) vem sendo associadas a alterações no sistema serotoninérgico, o que resultaria em quadros de TEA (WAYE; CHENG, 2018).

Algumas alterações genéticas esporádicas também estão associadas ao TEA como as seguintes mutações: Na subunidade alfa 2 do canal dependente de voltagem de sódio (SCN2A), molécula de adesão celular DS (DSCAM), proteína 2 de ligação metil-CpG (MECP2), proteína 8 de ligação ao DNA da cromodomaina helicase (CHD8), repetição WD e domínio FYVE 3 (WDFY3), gene da histona metiltransferase (SH1L) e transposição do elemento derivado do domínio ZNF (POGZ). Genes que levam a expressão de proteínas que agem de forma secundária também aparecem com mutações em indivíduos com TEA como os que codificam a enzima ASMT (acetil-serotonina O-metil-transferase) responsável pela via de síntese da melatonina (MELKE et al., 2008; ROSSIGNOL; FRYE, 2011; JONSSON et al., 2014; RODRIGUEZ-GOMEZ et al., 2021).

Além da parte genética, o estudo da epigenética vem ganhando cada vez mais destaque no campo científico. Isso deve-se ao fato de que os genes são altamente influenciados por fatores ambientais e sendo assim, indivíduos que carregam em seu genoma esse potencial ficariam sobre a influência do meio para vir a ativar o gatilho para expressar as características do espectro. Entre os mecanismos epigenéticos temos a metilação do DNA e acetilação de histonas (CHASTE; LEBOYER, 2012). Assim, esses mecanismos resultam em alterar a estrutura da cromatina e controlar a expressão gênica. A busca na literatura permite identificar alguns quadros de alterações na epigenética que

influenciam no neurodesenvolvimento como nas síndromes: Angelman, Prader-Willi, Síndrome de Rett e TEA (TRAN; MYAKE, 2017; OZTENEKECIOGLU et al 2021.).

Outras questões levantadas seriam a possível influência da idade dos pais, pois filhos de pais com idades classificadas como avançadas, isto é, mulheres acima de 35 anos e homens acima dos 40 podem ter grande chance de apresentar comportamentos autísticos (VOLK et al., 2011). O papel da vacinação em gestantes foi um ponto levantado visto que a ativação imune materna desencadearia alterações na epigenética do tecido nervoso do embrião em desenvolvimento (CHASTE; LEBOYER, 2012). Porém, atualmente a literatura mostra que muito do que foi dito anteriormente em relação entre a vacinação e os casos de TEA foi refutado por estudos posteriores (DAVIDSON, 2017; GABIS et al., 2022).

O ambiente pré, peri e neonatal é relevante para o neurodesenvolvimento. A exposição a fatores ambientais durante o período embrionário, entre eles o estresse mental, podem induzir modificações epigenéticas na prole. Agentes como toxinas e poluentes como fumaça de cigarro e metais pesados além de plásticos e drogas são agentes que podem levar a alterações do material genético e assim levar a expressão de genes associados ao TEA (LANDRINGAN, 2010; WAYE; CHENG, 2018).

Fatores como sofrimento fetal, trauma no nascimento, baixo peso no nascimento, idade gestacional e baixo índice de Apgar também estão relacionados a sua etiologia. Alguns ainda como aspiração de mecônio, incompatibilidade do sistema sanguíneo ABO e Rh e a hiperbillirrubinemia também já estão sendo estudados e déficits nutricionais e malformações. A exposição a drogas e toxinas também levam ao quadro como a exposição ao valproato e o uso de medicamentos antidepressivos e os inibidores seletivos da recaptção da serotonina e de agentes tóxicos como os organofosforados (LANDRINGAN, 2010). O ácido valpróico também está associado ao TEA além de outros produtos químicos como chumbo, bisfenol e herbicidas (neste caso está relacionado com modificações na tireoide) que levam a modificações epigenéticas. Esse fato é evidente nas alterações que ocorrem no DNA de indivíduos expostos a essas substâncias, nesse caso, a molécula de DNA pode sofrer modificações no seu processo de metilação levando a expressão anormal de genes relacionados ao autismo (WAYE; CHENG, 2018).

As infecções e os processos inflamatórios maternos durante o desenvolvimento embrionário são pontos relevantes na gênese do autismo. Quando exposta a determinado

patógeno, o organismo materno é ativado e assim promove a produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias (CHASTE; LEBOYER, 2012). Esses mediadores acabam por criar um ambiente inflamatório que pode de maneira direta ou indireta agir sobre o desenvolvimento fetal resultando em alterações do neurodesenvolvimento (WAYE; CHENG, 2018).

As alterações imunes foram demonstradas em estudos que observaram disfunção em células T, B e NK, produção de autoanticorpos e produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (CHASTE; LEBOYER, 2012). Além de influenciar o organismo materno, o desequilíbrio entre as moléculas inflamatórias leva a ativação de células-alvo no tecido cerebral fetal, assim, as microglias e astrócitos são ativados e produzem ainda mais mediadores inflamatórios, o que modificaria o tecido nervoso que está se desenvolvendo, levando ao comprometimento de sua função (MORGAN et al., 2010; CHASTE; LEBOYER, 2012).

Outros fatores que vêm sendo associados ao TEA são as alterações na via de comunicação entre o cérebro e o trato gastrointestinal. Sabe-se da importância da manutenção da flora bacteriana presente no intestino para o equilíbrio em seu funcionamento e o bom funcionamento cerebral, endócrino e imune devido a quantidade de estruturas nervosas que estão presentes ao longo de todo esse sistema, surgindo assim um eixo microbioma-intestino-cérebro (MANGIOLA et al., 2016). A disbiose vem sendo associada a diversos quadros patológicos como doenças inflamatórias, distúrbios auto-imunes, alguns tipos de alergias, obesidade e distúrbios psiquiátricos (WANG; KASPER, 2014). Entre os distúrbios neuropsiquiátricos, o TEA pode estar inserido dentro do grupo de quadros que podem estar associados à disbiose. A explicação para o aparecimento desses quadros é que uma modificação acentuada na microbiota intestinal estaria relacionada a alterações na produção de neurotoxinas que acarreta em modificações no tecido nervoso (WANG; KASPER, 2014; MANGIOLA et al., 2016). Além disso, estudos comparativos da população de bactérias presentes no intestino de indivíduos com TEA e controle mostraram que a presença de determinada bactéria, no caso *Clostridium*, era 10 vezes maior em indivíduos com TEA do que em controles (PARRACHO et al., 2005).

2.5 MELATONINA

A N-acetil-5-metoxitriptamina ou melatonina é uma indolamina que se faz presente em grande parte dos organismos vivos. É produzida principalmente pela

glândula pineal, mas também por grupos celulares localizados em diferentes órgãos como células da retina, da pele, do sistema nervoso, do trato gastrointestinal, plaquetas, linfócitos e medula óssea (BUBENIK, 2002; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003;).

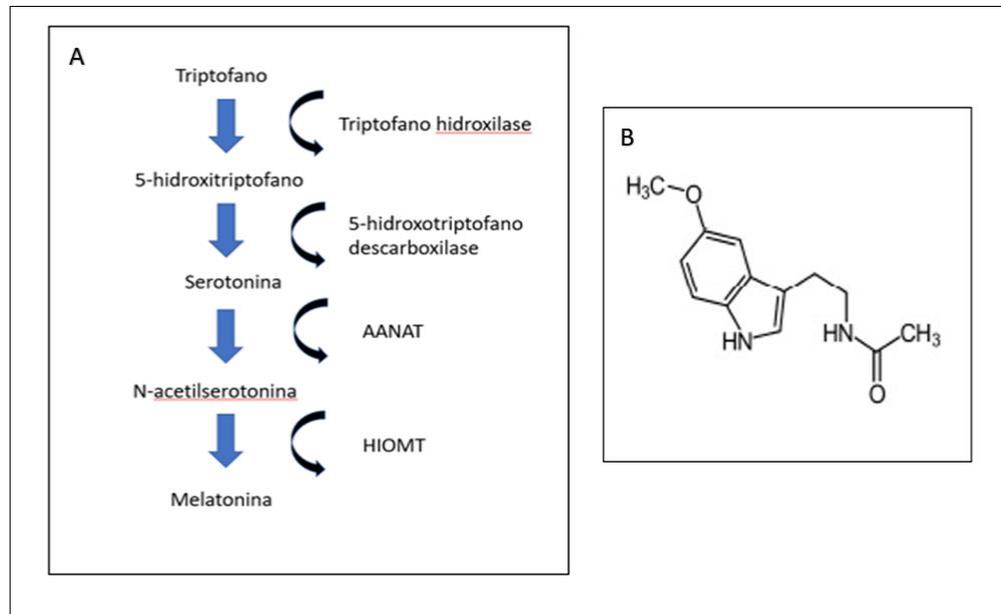


Figura 1. Estrutura molecular da melatonina e sua via de síntese. Em A, via da biossíntese de Melatonina. Em B, estrutura molecular da melatonina.

As etapas que envolvem a síntese desse hormônio têm início com o aminoácido triptofano que após ação da enzima triptofano hidroxilase é transformado em 5-hidroxitriptofano que na sequência será descarboxilado pela enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase e assim convertido em serotonina. A serotonina, por meio da ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) será acetilada e na sequência modificada para N-acetilserotonina (NAS). Em seguida, essa será transformada em melatonina após processo de metilação pela ação da acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT) ou hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT) (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

O mecanismo que controla a síntese de melatonina envolve o núcleo supraquiasmático (NSQ), principal oscilador endógeno circadiano que gera o ritmo circadiano de síntese e liberação deste hormônio sincronizado por vias neurais de informação fótica (SIMONNEAU; RIBELAYGA, 2003). Após a informação fótica passar pela retina, ela é conduzida pelo trato retino hipotalâmico alcançando o núcleo supra-quiasmático. Por uma via polissináptica a informação eferente do NSQ segue para

os núcleos paraventriculares e destes para os neurônios pré-ganglionares posicionados nos segmentos torácicos da medula espinal (TORDJMAN et al., 2017). Daí, os neurônios pós-ganglionares da cadeia de gânglios cervicais superiores projetam-se até a glândula pineal. Assim, a síntese e liberação da melatonina tem início com a estimulação dos receptores beta 1 presentes nos pinealócitos pela liberação do neurotransmissor noradrenalina acarretando a ativação de vias celulares como a cAMP-PKA-CREB e PLC-Ca⁺⁺-PKC que irão resultar na produção de melatonina (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). Na presença de luz esta via fica inibida de forma que, a pineal inicia a secreção de melatonina logo após o anoitecer e seu pico ocorre entre 2 e 4 horas da manhã e na sequência vai diminuindo. As concentrações séricas durante a noite variam entre 80 e 120 pg / ml. Já durante o dia apresenta-se mais baixa (10-20 pg / ml) (KARASEK; WINCZYK, 2006).

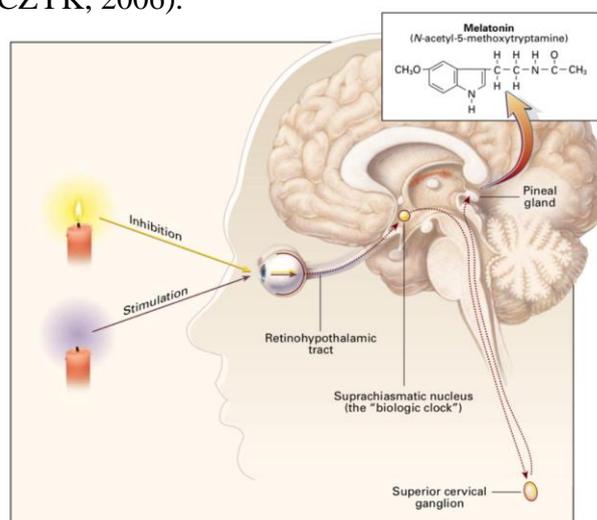


Figura 2. A via de estímulo e inibição da síntese de melatonina. Disponível em <https://seucorposeutempo.wordpress.com/2016/11/18/melatonina-o-hormonio-do-escuro/>.

A medida que esse hormônio é produzido, devido ao fato de sua molécula ser anfifílica, ela já é liberada no sangue e no líquido cefalorraquidiano. Na corrente sanguínea ela liga-se a albumina e será metabolizada em 6-hidroxi melatonina pelo citocromo P450 e posteriormente conjugada a 6-sulfatoxi melatonina para ser excretada pelas vias urinárias. Já no tecido nervoso presente no sistema nervoso central, ela é degradada em N-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) que é convertida em N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (KARASEK; WINCZYK, 2006; AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018).

A ação da melatonina pode ser desencadeada ao menos de duas maneiras. A primeira não envolve a presença de receptores em células alvo. Isso se deve a organização estrutural dessa molécula que confere a ela a característica de ser anfifílica conseguindo transpassar as membranas celulares e a determinadas cadeias de carbonos que estão presentes e que possuem uma alta afinidade com o oxigênio e dessa forma conferem um poder redutor ao estresse oxidativo possibilitando assim os seus efeitos antioxidantes (TORDJMAN et al., 2017).

Já a segunda maneira de realizar sua ação é via interação com receptores celulares específicos que em mamíferos são principalmente de dois tipos: o MT1 (MTNR1A) e o MT2 (MTNR1B), ambos pertencentes à subfamília de receptores acoplados à proteína G (JOCKERS et al, 2016; TORDJMAN et al., 2017).

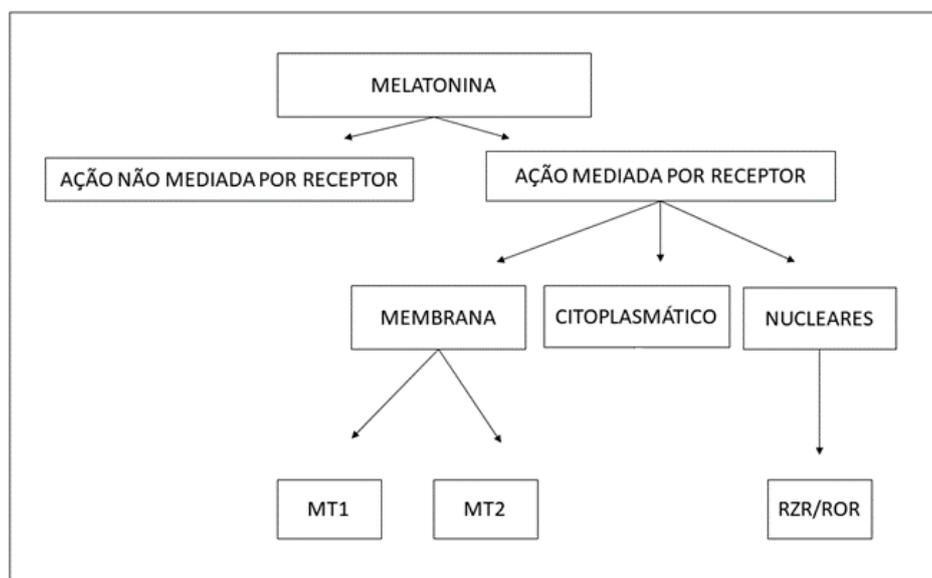


Figura 3. Esquema representando as vias de ação da melatonina com efeitos que são mediados via receptores e outros que não são mediados por receptores. Adaptado de AMARAL; CIPOLLANETO, 2018.

2.6 RECEPTORES DE MELATONINA MT1 E MT2

O efeito mais caracterizado da melatonina está relacionado a ativação da via molecular que envolve a interação dessa molécula com receptores específicos. A literatura mostra que dois receptores são amplamente distribuídos em tecidos como coração, artérias, adrenal, rim, pulmão, fígado, vesícula biliar, intestinos, gônadas, próstata, pele e até mesmo em células como os linfócitos T e B e caracterizados, são eles

os ML1 considerados de alta afinidade e os ML2 de baixa afinidade (ZAWILSKA; SKENE; ARENDT, 2009; TORDJMAN et al., 2017).

É possível reconhecer dois subtipos do ML1, os Mel1a e Mel1b (ZAWILSKA; SKENE; ARENDT, 2009). O Mel1a é conhecido como MT1 e é um receptor codificado no cromossomo humano #4 (4q35.1) e é formado por uma cadeia de 351 aminoácidos (JOCKERS et al., 2008; EMET et al., 2016). Sua distribuição é ampla no tecido nervoso estando presente nas regiões da amígdala, hipocampo, retina, tálamo, hipófise e hipotálamo (JOCKERS et al., 2008; EMET et al., 2016) e dentre outras funções está relacionado com a redução da descarga neuronal no núcleo supraquiasmático (EMET et al., 2016). O Mel1b é conhecido como MT2, esse receptor é codificado no cromossomo humano #11(11q21-q22) e apresenta uma cadeia de 363 aminoácidos e está presente em regiões como retina, córtex, cerebelo e hipocampo (LI et al., 2013; TORDJMAN et al., 2017). No hipocampo sua função está relacionada a inibição de funções vinculadas aos receptores GABAérgicos (DUBOCOVICH et al., 2003; EMET et al., 2016)

Já os ML2 quando ativados levam a hidrólise de fosfo-inosítídeos. Conhecidos como MT3, um receptor de baixa afinidade, estudos mostram que esse receptor é uma enzima classificada como quinona redutase-2 e seu papel está relacionado com a prevenção do estresse oxidativo por mediar a inibição da transferência de elétrons das quinonas (LI et al., 2013; TORDJMAN et al., 2017; LALANNE et al., 2021). Atualmente sabe-se que esta enzima ou possivelmente este receptor está localizado em órgãos como rim, fígado, coração, pulmão, intestino, músculos e tecido adiposo e podem também ter papel no controle e regulação da pressão intra-ocular (EMET et al., 2016; LALANNE et al., 2021).

O início da caracterização dos aspectos farmacológicos dos receptores de melatonina foi na década de 80 com a detecção dos sítios de ligação ao se utilizar ligantes radiomarcados. Na década de 90 o uso de técnicas de clonagem e de expressão permitiu caracterizações ainda mais relevantes para o estudo dessa área (CECON; OISHI; JOCKERS, 2018). Nos aspectos farmacológicos, os receptores MT1 e MT2 apresentaram poucas diferenças sendo que uma das principais está relacionada a sinalização visto que em MT2 há capacidade de inibição da produção de cGMP de determinadas células transfectadas (PETIT et al., 1999; CECON; OISHI; JOCKERS, 2018; BOUTIN; LEGROS, 2019).

A variação na produção de melatonina endógena e a disfunção nesses receptores podem estar relacionados com a gênese de diversos quadros patológicos como doença de alzheimer, doença de parkinson, edema cerebral, alcoolismo, fenilcetonúria, isquemia cerebral, depressão e no TEA onde tais alterações já foram demonstradas (ROSSIGNOL; FRYE, 2011; CHASTE et al., 2011).

2.7 FUNÇÕES DA MELATONINA

De um modo geral, pode-se classificar os efeitos desencadeados pela melatonina em: imediatos, prospectivos, cronobióticos, sazonais e transgeracionais (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018).

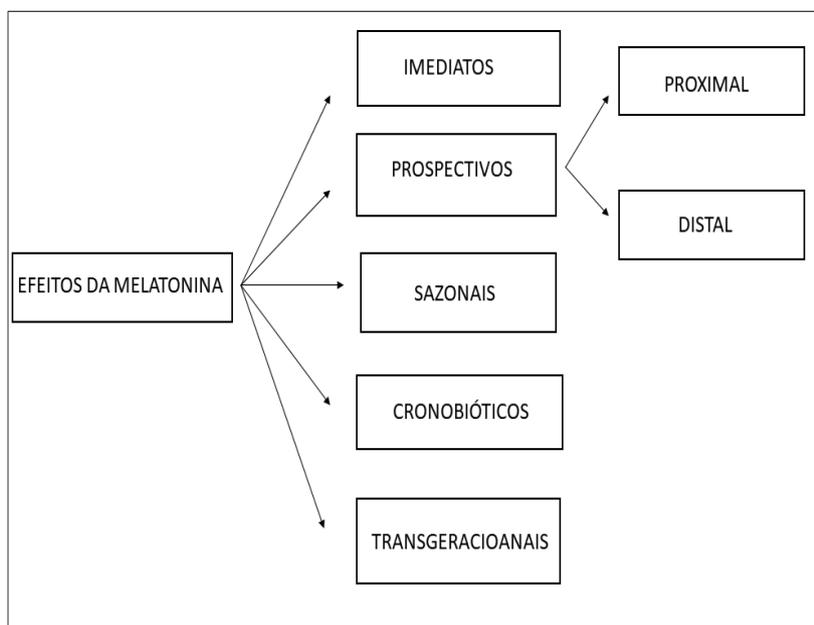


Figura 4. Esquema representando a classificação dos efeitos da melatonina. Adaptado de AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018.

A melatonina apresenta diversas ações no organismo, sendo fundamental para a regulação de processos fisiológicos e neurais (TORDJMAN et al., 2017). Seu papel como cronobiótico deve-se ao fato de ser um sincronizador endógeno do NSQ, de ritmos neuroendócrinos como o de liberação de insulina e cortisol, sono e vigília e de temperatura corporal (ARENDRT, 2006; GUNATA; PARLAKPINAR; ACET, 2019).

Em relação ao neurodesenvolvimento, a melatonina atua sobre a neurogênese (TORDJMAN et al., 2017), sinaptogênese, neuroproteção e plasticidade neuronal. Esse papel foi evidenciado em modelos animais com roedores que mostraram que a ausência desse hormônio impactava a neurogênese fetal (ARENDRT, 2006). O desenvolvimento, maturação e controle da atividade adequada das células da glia também é influenciado

pela presença desse hormônio. Essa ação é vista devido ao fato das células precursoras neurais apresentarem receptores MT1 e também pela melatonina induzir a expressão de fatores para células gliais permitindo dessa forma o equilíbrio adequado para o desenvolvimento do sistema nervoso central (GUNATA; PARLAKPINAR; ACET, 2019). Grupos neuronais caracterizados como dopaminérgicos e que controlam as funções motora e cognitiva, são influenciados pela ação desse hormônio (KONG et al., 2008).

A melatonina também exerce efeito direto sobre a placenta, sendo que a melatonina materna atua sobre o neurodesenvolvimento fetal já que a pineal do feto não atua durante o desenvolvimento embrionário (TORDJMAN et al., 2017; GUNATA; PARLAK PINAR; ACET, 2019).

Outros sistemas também são influenciados por esse hormônio como o sistema cardiovascular e o imunológico devido ao aprimoramento das células imunes em desempenhar sua função, aumento no número de células de defesa como o caso das NK (Natural killers), macrófagos e também pela indução de produção de citocinas (PANDI-PERUMAL; ESQUIFINO; CARDINALI, 2006).

O efeito neuroprotetor desempenhado pela melatonina e também sua ação antioxidante são pontos importantes quanto às suas funções no organismo (TORDJMAN et al., 2017; GUNATA; PARLAKPINAR; ACET, 2019). O efeito antioxidante também é visto ao longo do trato gastrointestinal (PANDI-PERUMAL; ESQUIFINO; CARDINALI, 2006).

Outras funções que ainda justificam a atenção dos estudos para com esse hormônio são o controle da massa corporal, massa óssea e gasto energético. Observa-se a sua relação com tratamento oncológico sendo esse hormônio importante para a inibição do crescimento tumoral, controle na formação e dispersão de metástase e redução dos efeitos tóxicos oriundos da utilização dos quimioterápicos (REITER et al., 2017).

2.8 MELATONINA E TEA

A produção e liberação da melatonina na fase escura permite que ocorra a sincronização do organismo com o meio externo e a sincronização de diversos ritmos biológicos. Alguns fatores podem alterar a síntese e liberação desse hormônio e levar a níveis anormais de melatonina que vem sendo relacionados a distúrbios de ritmos

circadianos e também a quadros que afetam o neurodesenvolvimento como o TEA (JIN et al., 2018).

Parte dos indivíduos com TEA apresentam alterações nos níveis de melatonina o que resulta em alteração do ritmo circadiano deste hormônio. A falta deste ritmo acarreta em modificações orgânicas e alterações em processos importantes como o padrão de sono e vigília. O sono é importante para o neurodesenvolvimento e a melatonina dessa forma é fundamental para induzir e promover uma melhor qualidade de sono (JIN et al., 2018). O desequilíbrio nos níveis desse hormônio está relacionado a modificações estruturais encontradas em estudos como a diminuição no crescimento encefálico e na gliogênese (SOUDERS et al., 2017). Além disso, estudos mostram que indivíduos que apresentam alterações nos níveis de hormônio correm um maior risco de apresentar TEA e que a concentração desse hormônio interfere na gravidade do quadro (MELKE et al., 2008; ROSSIGNOL; FRYE, 2011; ROSSIGNOL; FRYE, 2014). Estudos mostram que o baixo nível de melatonina nas mães pode acarretar no aumento do risco de desenvolvimento de TEA (FIDELEFF et al., 2006; BRAAM et al., 2018). Assim como outros estudos relacionaram os níveis de melatonina durante o desenvolvimento fetal com o risco de TEA (TORDJMAN ET al., 2013; VOICULESCU et al, 2014; JIN et al., 2018).

Em indivíduos com TEA além dos problemas característicos do quadro outras comorbidades muitas vezes estão presentes. Entre os problemas apresentados por esses indivíduos estão as alterações do sono e os problemas relacionados à memória espacial e aprendizagem (GAGNON; GODBOUT, 2018).

Diversos estudos já mostram efeito potencial da melatonina em relação ao sono, mostrando que indivíduos com TEA que receberam essa substância apresentaram melhora na latência, duração, tempo e qualidade do sono (TORDJMAN et al., 2013). Além do seu papel no sono, efeitos relacionados a ansiedade, distúrbios gastrointestinais vem sendo relatados, assim como resultados positivos do uso dessa biomolécula em funções cognitivas como o aprendizado e memória (EL-SHERIF; et al., 2003; CHO et al., 2017; CHOI et al., 2018).

O uso da melatonina vem sendo indicado para o tratamento não apenas dos aspectos relacionados ao sono em indivíduos com TEA mas também outros aspectos como a comunicação, sincronização dos ritmos, interação social e comportamento estereotipado. Desde 1993 há estudos a respeito da suplementação de melatonina no TEA e já é possível observar diretrizes sobre o seu uso inclusive em crianças e adolescentes

(TORDJMAN et al, 2017). Além da melhora nos parâmetros do sono, também foram apontados efeitos positivos do uso da melatonina sobre os seguintes sintomas: comunicação, retraimento social, rigidez e comportamentos estereotipados (MALOW et al., 2012; TORDJMAN et al., 2017; LALANNE et al., 2021).

O uso de melatonina por gestantes tem sido indicado não apenas para tratar aspectos relacionados aos distúrbios do sono, que é muito comum nessa população, mas também no que tange seus efeitos como antioxidante como demonstrado em estudo de revisão realizada que identificou 08 estudos que avaliaram o uso de melatonina durante a gestação (VINE; BROWN; FREY, 2022).

2.9 INFLAMAÇÃO PRÉ-NATAL

O período gestacional é uma fase crítica para o organismo feminino (SCHWARTZER et al., 2013). A homeostasia do organismo nessa fase se dá por meio de um equilíbrio entre o funcionamento dos diferentes sistemas como o endócrino e o imunológico (CRISTIANO et al., 2018). Quaisquer processos que venham a quebrar essa homeostasia pré, peri e pós natal pode desencadear alterações no neurodesenvolvimento do feto, sendo que a fase inicial do desenvolvimento embrionário é crítica e perturbações nessa etapa podem comprometer a migração, conectividade e a diferenciação dos neurônios (BONNEY et al., 2016; CRISTIANO et al., 2018).

Quadros infecciosos e inflamatórios são as principais causas de alterações desse ambiente que acabam por alterar o desenvolvimento embrionário (BONNEY et al., 2016).

Agentes infecciosos como citomegalovírus, o HIV, a rubéola, a hepatite, a sífilis, o *Treponema pallidum*, vírus herpes simples, o *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*, são capazes de passar a barreira física formada pelos trofoblastos maternos e assim agir sobre o feto gerando danos no seu desenvolvimento (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2007; DUBEY; JONES, 2008; COSTA et al., 2013).

Quadros inflamatórios relacionados a microorganismos tanto bacterianos ou virais acarretam a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias que tendem a quebrar a homeostase materna e levar a comprometimento do desenvolvimento fetal (BONNEY et al., 2016). Além disso, fatores como a obesidade materna também geram ativação celular e produção de fatores inflamatórios comprometendo o desenvolvimento fetal (RICE; BARONE, 2000) e alterações resultantes de modificações na microbiota intestinal também podem afetar a comunicação existente entre o eixo cérebro-intestino

levando a processos inflamatórios que acabam por romper com o equilíbrio do organismo materno comprometendo o neurodesenvolvimento do feto (SCHWARTZER et al., 2013).

Outros fatores como o uso de fármacos e fatores emocionais podem levar a um ambiente de estresse intra-uterino e assim afetar o desenvolvimento fetal resultando em quadros de distúrbios do neurodesenvolvimento (ZHANG et al., 2005; SMITH et al., 2007).

2.10 MODELOS ANIMAIS

A complexidade existente nos quadros resultantes de alterações no neurodesenvolvimento constitui um desafio para o campo científico. Para possibilitar uma melhor compreensão dos aspectos morfológicos, fisiológicos, neurobiológicos, moleculares, genéticos e ambientais, envolvidos nesses quadros, os modelos animais surgem como ferramenta para a ciência conseguir entender as relações existentes entre a sintomatologia apresentada pelos indivíduos portadores dessas alterações e os mecanismos que resultam nesses quadros (PARREIRAS, 2018).

Diversos modelos foram desenvolvidos ao longo dos anos cada um com características específicas que permitiram entender os possíveis mecanismos existentes em patologias como é o caso de modelos animais que avaliam transtornos de ansiedade, esquizofrenia, epilepsia e TEA (YOO, 2015; PARREIRAS, 2018).

Devido ao quadro multifatorial associado a sua gênese, os modelos animais que são utilizados para o estudo do TEA são um campo a ser explorado e incluem modelos associados desde a fatores de risco ambientais até os alterados geneticamente (CHADMAN, 2017; YENKOYAN et al., 2017). Além desses modelos, o crescente entendimento da relação existente da participação do sistema imunológico nas alterações do neurodesenvolvimento levou a criação de modelos de alterações no neurodesenvolvimento por ativação imune materna. Esses modelos visam expor a fêmea prenhe a antígenos específicos que podem ser bacterianos ou virais e a partir dessa exposição avaliar os efeitos da ativação do sistema imunológico materno sobre o desenvolvimento da prole. Entre esses modelos destacam-se os que utilizam o vírus influenza, ácido poliinosinico-policitidilico (PolyI:C) e o lipopolissacarídeo (LPS) (BOSKA, 2010; KIRSTEN, 2012; REISINGER et al., 2015; ESTES; MCALLISTER, 2017; NICOLINI; FAHNESTOCK, 2018). O modelo de exposição pré-natal ao LPS vem sendo utilizado com frequência e mostra-se eficaz devido às alterações encontradas

na interação social, comportamento restritivo repetitivo, alterações cognitivas e na vocalização, características do TEA (KIRSTEN, 2012; PARREIRAS, 2018).

2.11 LIPOPOLISSACARÍDEO

A literatura mostra que diversos quadros de alterações do neurodesenvolvimento apresentam quadro neuroinflamatório responsável por levar a morte celular e perda de conexões sinápticas, o que pode levar a alterações cognitivas.

O lipopolissacarídeo (LPS), constituinte da parede celular das bactérias gram-negativas é um padrão molecular associado a patógenos (PAMPS) (PARK; LEE, 2013) composto por uma tríade constituída por: lipídio A, a porção hidrofóbica que ancora o LPS ao folheto externo da membrana externa; oligossacarídeo central, que juntamente com o lipídio A, contribui para manter a integridade da membrana externa e antígeno O, que se conecta ao núcleo e consiste em um polímero formado por unidades repetidas de oligossacarídeos em contato direto com o meio externo (PARK; LEE, 2013; MALDONADO; SÁ-CORREIA; VALVANO, 2016).

O lipídio A é responsável por desencadear uma forte resposta inflamatória pelo reconhecimento do complexo receptor Toll-like 4 e fator de diferenciação mielóide 2 (TLR4-MD2), que é predominantemente encontrado em macrófagos, neutrófilos, monocitos, células dendríticas, plaquetas e células endoteliais (MALDONADO; SÁ-CORREIA; VALVANO, 2016).

Já a parte composta pelo antígeno O é a responsável por permitir que essas bactérias consigam ter evasão, escapando assim da resposta imunológica do hospedeiro, principalmente do sistema complemento, proteção contra os radicais livres provenientes do estresse oxidativo, atraso na internalização por parte das células epiteliais e maior tempo de sobrevivência no hospedeiro (PARK; LEE, 2013; MALDONADO; SÁ-CORREIA; VALVANO, 2016).

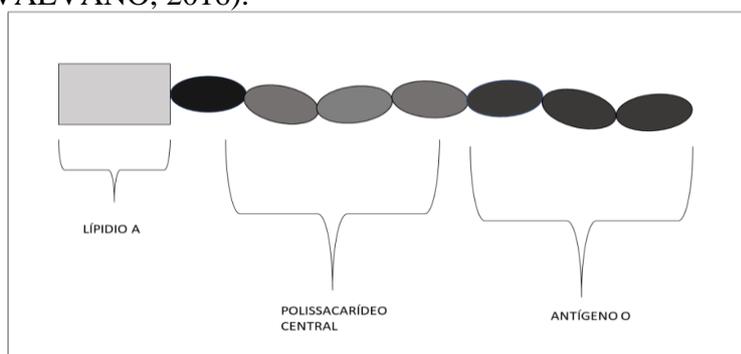


Figura 5. Esquema representando a organização estrutural do LPS. Adaptado de PARK; LEE, 2013.

Assim, esta endotoxina tem a capacidade de interagir com as células do sistema imunológico e ativá-las. Para que isso ocorra, ela é reconhecida mediante proteínas ligadora de LPS, proteína CD14 que pode estar em sua forma livre na (sCD14) ou unida à membrana celular (mCD14) ou a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) que também pode estar livre ou unida à membrana (MALDONADO; SÁ-CORREIA; VALVANO, 2016). Essas proteínas têm como função captar o LPS e na sequência transferi-lo para os Toll like receptor (TLR-4) presentes nas células de defesa dessa forma ativando a resposta imunológica contra essa toxina (PARREIRAS, 2018). A ativação desses receptores acabam por desencadear vias de sinalização intracelular entre as quais encontramos a MAPK (proteína quinase de ativação mitogênica), AP-1 (ativador da proteína 1), STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição), IRF3 (fator regulador interferon (IFN)- 3) e a do NFkB (fator nuclear kappa B) (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, 2010_a).

Dentro do grupo de fatores de transcrição, o NFkB é membro da família dos fatores de transcrição NFkB/REL e possuem em sua formação cinco genes (NFkB1, NFkB2, RELA, c-REL e RELB) que originarão sete proteínas p100, p105, p50, p52, RELA (também conhecida por p65), RELB e c-REL (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, 2010_a).

O LPS ativa a via clássica de sinalização do NFkB. Nesta via, temos a participação do complexo IKK, principalmente a IKK β que fosforila a IKK α , dessa maneira ocorre a translocação do nuclear do heterodímero p50:RelA (CECON, 2010)

Esse processo de translocação por sua vez promove a transcrição de diversos genes que irão promover a produção de mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 beta (IL-1 β) e o TNF- α , óxido nítrico (NO) e prostaglandinas E2 (PGE2) (KIRSTEN, 2012; CHANDLER; ERNST, 2017). A produção desses mediadores inflamatórios leva a uma cascata de ativação de outras células imunológicas resultando em um quadro inflamatório sistêmico (BASTOS, 2018).

O LPS em condições normais não consegue transpassar a barreira hematoencefálica. Porém após essa ativação imunológica, as citocinas resultantes desse processo conseguem atingir o SNC ativando os fagócitos ali presentes o que gera uma produção de mediadores inflamatórios no SNC e como consequência a produção de mais mediadores inflamatórios e de outras moléculas como é o caso do óxido nítrico (NO) que promove uma alteração na permeabilidade vascular e acarreta na entrada de ainda mais

citocinas no tecido nervoso aumentando assim os danos a esse tecido (DUNN, 2006). Além desse mecanismo pelo qual o LPS atinge o SNC, ainda há outras vias como os órgãos localizados fora da barreira hematoencefálica denominados de circunventriculares que são expostos diretamente a essa toxina e também mediante o nervo vago que faria a comunicação da periferia com o SNC e assim constituiria uma via que leva essas citocinas até o tecido nervoso (DUNN, 2006). A interação entre as células endoteliais com prostaglandinas resultantes da exposição ao LPS também são uma forma de produção de moléculas capazes de alterar a barreira hematoencefálica e atingir o SNC (DANTZER, 2009; KIRSTEN, 2012).

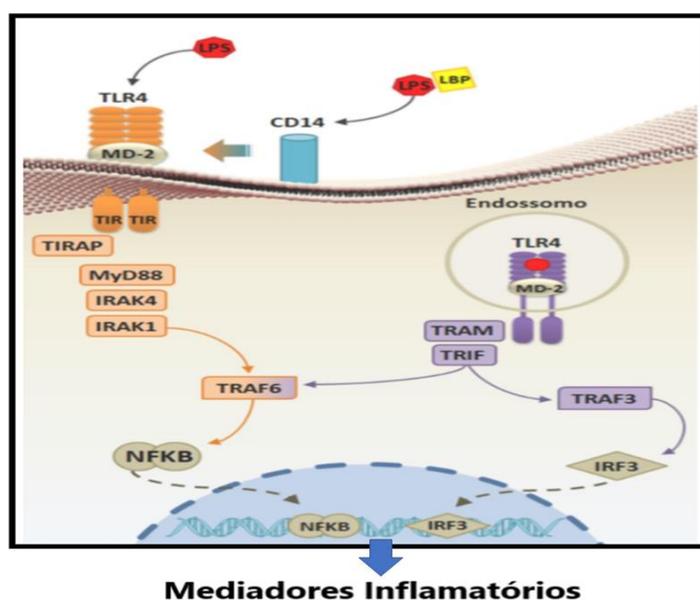


Figura 6. Sinalização intracelular do LPS. O LPS liga-se ao receptor de membrana TLR4 e desencadeia uma via de sinalização intracelular que resulta na ativação do fator NFkB para produzir os mediadores inflamatórios (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, 2010).

2.12 PLACENTA

Desenvolvida durante a gestação via proliferação de células derivadas do zigoto, a placenta constitui uma barreira que isola o feto durante o seu desenvolvimento e assim o protege contra certos patógenos incluindo moléculas que possam vir a comprometer o desenvolvimento embrionário como LPS, estabelece uma comunicação entre o organismo materno e o fetal em desenvolvimento, apresenta um papel endócrino importante devido a síntese e liberação de hormônios que auxiliam a manutenção da gestação (WISCHHOF et al., 2015). Devido a essa estrutura, a endotoxina é impedida de atingir o feto em desenvolvimento, porém uma vez exposta ao LPS, o sistema imune materno torna-se

ativado e como consequência ocorre a produção de citocinas. As citocinas ao atingirem a corrente sanguínea conseguem transpassar essa barreira placentária e alcançar o feto em desenvolvimento. Não somente as citocinas podem vir a comprometer o desenvolvimento intra-uterino, alterações na parte endócrina do organismo materno caso da disfunção do eixo Hipotálamo, hipófise adrenal também pode resultar em alterações do desenvolvimento embrionário. Portanto, o LPS é um potente ativador de respostas imunológicas materna o que pode provocar alterações fetais devido a intensidade das respostas mediadas pelo sistema neuro-imune-endócrino da mãe (BURD; BALAKRISHNAN; KANNAN, 2012; WISCHHOF et al., 2015).

Ainda não está claro se as citocinas produzidas mediante uma ativação imunológica materna cruzam diretamente a barreira placentária para produzir seus efeitos no cérebro fetal ou se essas citocinas levam a produção de outras moléculas em diversos locais e assim ocorreriam as modificações durante o neurodesenvolvimento. Outra hipótese proposta é a produção de citocinas a partir da própria placenta que possibilitaria a passagem de moléculas até o feto e explicaria a presença dessas moléculas no líquido amniótico e na circulação fetal (JIANG et al., 2018).

2.13 CITOCINAS

Processos como a plasticidade sináptica, neuronal, controle e migração celular durante o desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, sono, memória e aprendizagem são controladas mediante a presença dos diferentes tipos de citocinas (KNUESEL et al., 2014).

As citocinas são moléculas de sinalização produzidas nos mais diferentes tipos celulares e são responsáveis por coordenar a resposta imunológica no organismo e permitir a sinalização normal entre as células imunes e não imunes, as citocinas também exercem esse papel no sistema nervoso central. Existe grande diversidade dessas moléculas em nosso organismo (DINARELLO, 2007). Cada uma possui função específica e o seu equilíbrio é o responsável por permitir o bom funcionamento das estruturas que compõem nosso organismo. O desequilíbrio na produção dessas moléculas ou mesmo quando produzidas em excesso, como pode ocorrer após quadros de ativação imunológica levam a uma ampla variedade de efeitos resultando em um conjunto de comportamentos não específico denominados de comportamentos doentio. Alguns desses efeitos são a redução na atividade e no comportamento exploratório e sexual, diminuição

na interação social, aprendizado motor anormal e ativação sensório motora, ansiedade, apatia, febre, falta de atenção, redução na ingestão de alimento e água, insônia, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e aumento na ativação simpática (KIRSTEN, 2012; YOUNG; DAVID; NUNZIO, 2014; PAN et al., 2017).

A inflamação vem sendo associada a diversos quadros de lesão ao sistema nervoso central tanto durante o desenvolvimento inicial quanto na vida adulta (ESTES; MCALLISTER, 2017). Entre os distúrbios relacionados a essas lesões estão a epilepsia, esquizofrenia, depressão, paralisia cerebral, transtornos cognitivos e transtorno do espectro autista (DEVERMAN; PATTERSON, 2009; KNUESEL, 2014). No início do seu desenvolvimento, o tecido nervoso é extremamente suscetível às condições que possam a vir danificá-lo e uma vez lesado, esses danos acabam perdurando a longo prazo (JIANG et al., 2018).

As citocinas atingem o SNC de diversas maneiras, como a difusão por meio dos órgãos circumventriculares, via nervos cranianos, mediante transportadores de citocinas pelas células da barreira hematoencefálica. Podem ser produzidas pelas próprias células do tecido nervoso para mediar o seu funcionamento participando de processos como alterar a ação de neurotransmissores (DANTZER, 2007), além de estimular populações de células da glia, as quais podem elevar ainda mais os níveis de citocinas (DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO et al., 2012; HINES et al., 2013) provocando danos às células neuronais devido à liberação de produtos oxidativos que durante o desenvolvimento encefálico pode acarretar em modificações a esse tecido nervoso (ESPINOSA-OLIVA; DE PABLOS; HERRERA, 2013; PENATTI; SILVA, 2014).

O modelo de ativação imune materna é importante para possibilitar a observação dos efeitos dessa exposição no neurodesenvolvimento. Ao se observar o comportamento da prole de fêmeas prenhes que foram expostas ao LPS foi possível observar algumas alterações em funções relacionadas com a interação social, o comportamento de brincar, a relação mãe-filho, comportamentos restritivos e repetitivos, inflexibilidade, alterações na atividade exploratória e no comportamento do medo e a diminuição nos mecanismos de aprendizagem, características estas presentes no TEA (TARICANO, 2010; KIRSTEN, 2012; BERNARDI; KIRSTEN; TRINDADE, 2012).

Estas alterações comportamentais devem ser decorrentes de mudanças na expressão de moléculas que regulam a conectividade e funções neuronais acarretando em prejuízos na sinaptogênese o que vem sendo associado a quadros de TEA (ESTES;

MCALLISTER, 2017). Outras modificações que resultam da alteração na concentração dessas citocinas são as anormalidades estruturais como as modificações no volume do córtex entorrinal e cingulado, prejuízos nas funções cognitivas como os diferentes tipos de memória (DEVERMAN; PATTERSON, 2009) como a memória condicionada ao medo, memória de aprendizagem, memória de discriminação de objetos e memória espacial (ZAKARIA et al., 2017).

2.14 HIPOCAMPO

Considerado a maior estrutura que compõe o lobo límbico, o hipocampo está posicionado bilateralmente na região medial do lobo temporal, acima do assoalho do corno inferior do ventrículo lateral e também acima do giro para-hipocampal e posteriormente ao complexo amigdalóide (FELIX-ORTIZ; TYE, 2014). É referido como tendo um papel importante em comportamentos defensivos, quadros de ansiedade, comportamentos motores, modulação de emoções, alguns comportamentos motivados e em processos de aprendizado e memória (EICHENBAUM et al., 1999; BARRETO, 2016). Em relação a memória, está vinculado a alguns tipos como memória olfativa, memória de longa duração, memória vinculada a emoções e memória espacial (KNIERIM; NEUNUEBEL, 2016).

É constituído por um conjunto de estruturas conectadas por diversas vias e que resultam na formação hipocampal. Entre essas divisões temos o giro denteado (GD), os cornos de Amons (CA), a área entorrinal e o complexo subicular (BERTAGNA, 2018). O estudo morfológico dessa estrutura permite identificar uma forma peculiar sendo uma eminência alongada que acaba por curvar-se para dentro e para cima similar a letra “C” em um corte sagital (BERTAGNA, 2018). Podemos dividir essa estrutura em duas partes principais: GD e CA sendo que CA subdivide-se em CA1, CA2 e CA3 de acordo com a morfologia dos neurônios corticais (YANG; WANG, 2017). A região do GD é composta por uma camada de células granulosa, uma molecular e uma polimórfica. Já as regiões CA1, CA2 e CA3 estão organizadas por um conjunto de 04 a 05 camadas sendo elas os stratum lucidum, moleculare, piramidale, lacunosum-moleculare (ALTMAN; BRUNNER; BAYER, 1973; CAMPOS; CRUZ-RIZZOLO; PINATO, 2015). No aspecto funcional ele é dividido em parte ventral e parte dorsal (BERTAGNA, 2018).

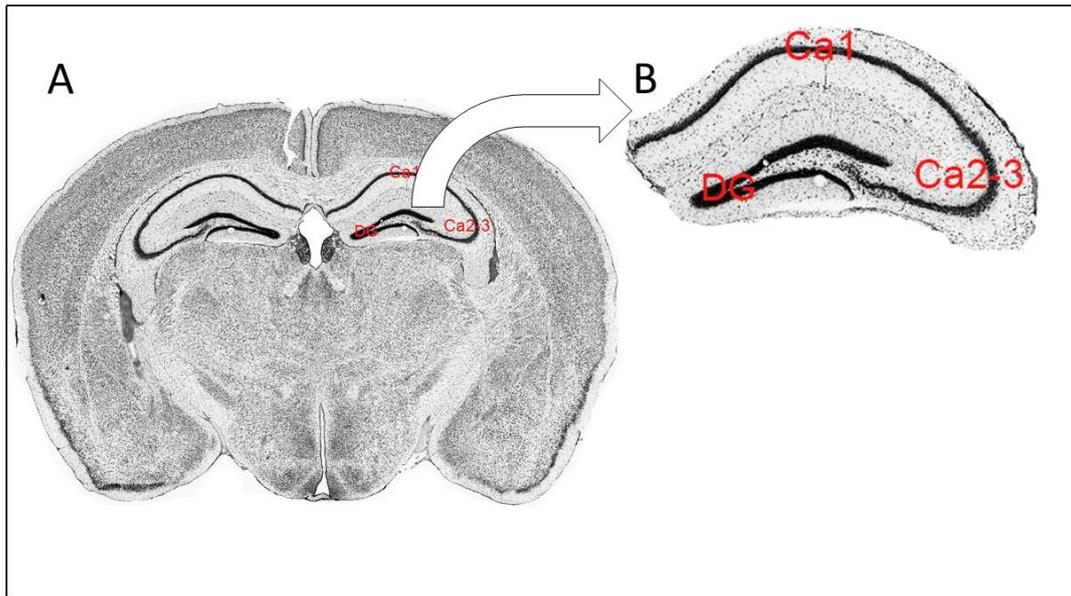


Figura 7. Corte coronal de encéfalo. Em A corte coronal de encéfalo do rato. Em B está evidenciando a região do hipocampo e as suas subdivisões Giro Denteado (DG), Corno de Amon (CA1, CA2 e CA3).

Quanto a suas funções, classificamos os neurônios hipocâmpais em principais e interneurônios. Os principais estabelecem sinapse com neurônios externos participando das vias de entrada e saída de informações (KNOWLES, 1992; KULLMANN, 2011) e os interneurônios estabelecem comunicação local, participando do controle e modulação do fluxo interno de informações excitatórias e inibitórias (FREUND; BUZSÁKI, 1996).

Há na região do hipocampo, além dos neurônios principais, uma população de interneurônios GABAérgicos que acabam por regular as atividades dos principais. Constituindo esse grupo de interneurônios existe uma população de células no qual seu fenótipo é descrito como de pico rápido e sua função é a inibição de sinapses ao redor do corpo neuronal e segundo sugere a literatura, esses interneurônios são responsáveis por gerar uma atividade designada como rede ondulatória (BJOREFELDT et al., 2016).

Classicamente o hipocampo apresenta uma via de conectividade unidirecional entre suas estruturas anatômicas conhecido como ciclo tri-sináptico (KNIERIM, 2015; YANG; WANG, 2017). Essa conexão tri-sináptica tem início quando a informação chega ao hipocampo por sua principal via de entrada de informações que é o córtex entorrinal e a partir dele mediante via perforante, ela é encaminhada para o GD estabelecendo assim uma rede de projeção entre essas áreas (FELIX-ORTIZ; TYE, 2014). Na sequência ela sai do GD via fibras musgosas e chega até CA3 para ser enviada de CA3 para CA1 via fibra colateral de Schaffer (KNIERIM, 2015). CA3 representa um ponto importante nessa

circuitaria, pois, além de encaminhar a informação para outra região, suas fibras também acabam por estabelecer conexões colaterais com outros neurônios presentes na mesma região de CA3 (KNIERIM, 2015). Após a chegada em CA1 a informação será encaminhada novamente para o córtex entorrinal e assim o ciclo será completado (GEVA-SAGIV et al., 2015). Atualmente, os estudos mostraram que a complexidade de interação entre as vias no hipocampo foge do padrão unidirecional estabelecido previamente e mostra-se com uma engenhosidade bem avançada como é o caso do córtex entorrinal que além de projetar-se para o GD, também mantém conexões com áreas como CA3 e CA1 (GEVA-SAGIV et al., 2015; KNIERIM, 2015). Neurônios da área CA3 projetam-se para GD também mantendo uma relação de feedback entre essas vias apontando o importante papel de CA2 que atualmente mostra-se com função específica no trajeto dessa informação (AMARAL; WITER, 1989; GIGANTE, 2013).

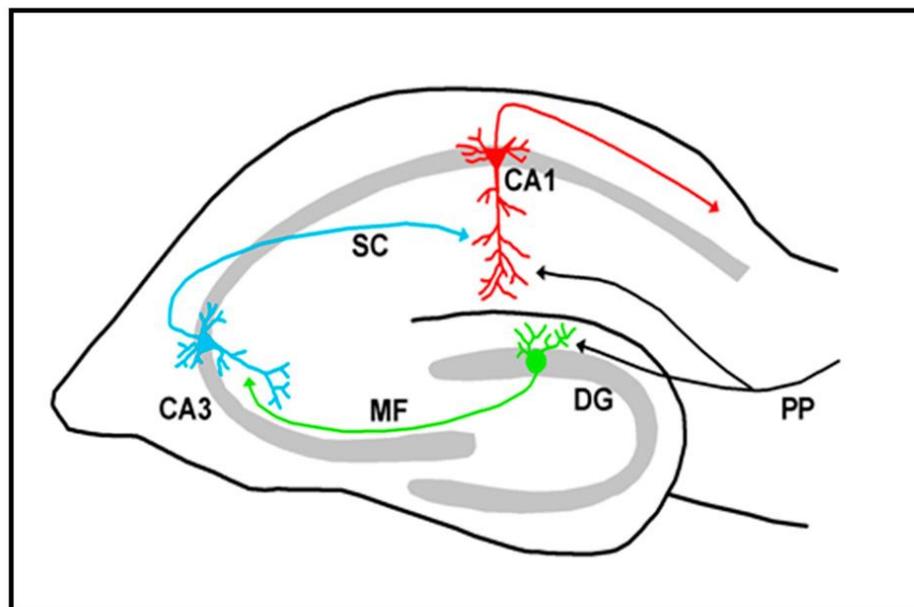


Figura 8. Via de informação no hipocampo. Os sinais entram no hipocampo através das fibras da via perfurante (PP) que irão até os CA1 nos neurônios piramidais CA 1 e no giro denteado (DG) nas células granulares. As células granulares se comunicam com as células piramidais de CA3 por meio das fibras musgosas (MF). CA3 via fibracolateral de Schaffer (SC) envia informação até as células piramidais em CA1. Os axônios das células piramidais CA1 se projetam para outras estruturas cerebrais, como o subículo. Adaptado de CAMMALLERI; BAGNOLI; BIGIANI, 2019.

2.15 AS LIGANTES DE CÁLCIO

Diversos íons são importantes para a manutenção da homeostase do nosso organismo. Entre todos os íons, o cálcio destaca-se por exercer ampla gama de funções participando como mediador de vias metabólicas até outros processos como alguns cognitivos caso de memória e aprendizagem resultado de seu estímulo a neuroplasticidade (BERRIDGE et al., 1998; CUNHA, 2008). Estudos mostram que a movimentação desse íon para o interior da célula nervosa como os neurônios modificam sua atividade estimulando a liberação de neurotransmissores e a plasticidade sináptica o que é fundamental em processos de memória (BERRIDGE et al., 1998). E sendo assim, as modificações das atividades dos neurônios alterariam a homeostase do cálcio nas células ao redor caso das células da glia levando a um aumento nos níveis de cálcio intracelular dessas células. As oscilações nos níveis desse íon no tecido nervoso acarretam efeitos neurotóxicos. Para que isso não ocorra os níveis de cálcio são mantidos em sua normalidade no meio intracelular por meio da união desses íons com as proteínas específicas que promovem sua ligação (CUNHA, 2008).

No interior do citoplasma das células que compõem o tecido nervoso existe uma ampla distribuição das proteínas que se ligam ao cálcio. Essas proteínas são denominadas proteínas ligantes de cálcio (CaBPs) e permitem a passagem deste íon através da membrana celular modulando ações celulares (SILVA, 2011). Estão divididas em dois grupos: As anexinas e as EF hand. As EF hand apresentam um domínio contínuo composto por 29 aminoácidos e uma e em sua organização estrutural há duas α -hélices responsáveis por funcionar como um suporte para ancorar a molécula e permitir as mudanças na conformação estrutural provocadas pela modificação do íon possam ser realizadas (SILVA, 2011). Essas hélices estão dispostas de maneira perpendicular ao lado de uma alça curta que apresenta em seu interior resíduos carregados negativamente de dois aminoácidos: o aspartato e o glutamato, esses são os responsáveis pela afinidade de ligação ao cálcio (DEMEULEMEESTER et al., 1989; HOF et al., 1999). A literatura mostra mais de 40 tipos de proteínas dentro do grupo das EF hand e dentre elas a calretinina (CR) (ALPAR et al., 2012; ZIMMERMANN et al., 2013).

Dentre as funções das proteínas ligantes estão a modulação das reações cálcio dependentes e também o tamponamento do cálcio no interior das células. Mecanismos esses que controlam processos fundamentais para as atividades do sistema nervoso, como

é o caso da plasticidade desse sistema, aprendizagem, memória e envelhecimento (HOF et al., 1999; SILVA, 2011).

As ligantes de cálcio destacam-se por estarem presentes em interneurônios que compõem o tecido nervoso. Esses interneurônios fazem parte do sistema GABAérgico, um sistema inibitório que controla e modula o fluxo de transmissão do impulso no sistema nervoso central devido ao seu posicionamento ao redor de neurônios excitatórios (SILVA, 2011). Alterações dessas ligantes resultam em alterações no funcionamento de estruturas nervosas como é o caso do córtex e do hipocampo o que compromete funções relacionadas à memória e aprendizagem (MIETTINEN et al., 1996; WOUTERLOOD; GROSCH; HARTIG, 2001; SILVA, 2011).

2.16 FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO

Durante o neurodesenvolvimento, uma série de processos ocorrem para que as estruturas cerebrais sejam formadas. A formação do tecido nervoso se dá por meio das células nervosas desencadeadas por processos de neurogênese e também de gliogênese. As diversas etapas presentes dentro desses processos permitem a formação das projeções dos neurônios, das conexões entre esses neurônios por meio da sinaptogênese e também da eliminação e reprogramação dessas conexões.

O tecido nervoso possui a capacidade de, mediante um estímulo, reorganizar sua estrutura e o seu funcionamento. Este processo recebe o nome de neuroplasticidade (PALASZ et al., 2020). A literatura mostra que existem diversos mecanismos pelo qual esse processo pode vir a acontecer, como exemplo temos a neurogênese após o nascimento no hipocampo.

Os fatores cerebrais desempenham funções importantes nesse quadro (PALASZ et al., 2020). Entre os fatores presentes no tecido nervoso, está o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), pertencente à família das neurotrofinas e amplamente expresso em neurônios e células gliais (PIUS-SADOWSKA; MACHALIŃSKI, 2017).

O BDNF está associado à preservação, manutenção, plasticidade e regulação neuronal bem como de sua funcionalidade mediante controle dos neurotransmissores (LIMA et al., 2019).

Sua localização gênica é no cromossomo 11 e nele podemos identificar 09 promotores que acabam por resultar em 24 transcritos gênicos. O mecanismo pelo qual esta molécula é sintetizada envolve algumas etapas com a formação de precursores que

irão originá-lo. Seu primeiro fator é o pré-pró-BDNF que é produzido no interior do retículo endoplasmático e depois transportado até o complexo de golgi. Neste local, temos a formação do pró-BDNF devido a clivagem da região pré-BDNF. Na sequência, este é convertido em BDNF maduro (mBDNF). No meio extracelular, a formação do mBDNF é catalisada por plasmina e por outras proteases existentes na matriz (JE et al., 2012). Existe um equilíbrio entre o pró-BDNF e o mBDNF o que pode ser alterado de acordo com o período do desenvolvimento em que o cérebro se encontra e até mesmo de acordo com a região encefálica estudada (AID et al., 2007). O pró-BDNF é encontrado em um nível mais elevado durante o neurodesenvolvimento enquanto que o mBDNF já está presente em maior quantidade na vida adulta com função de neuroproteção e associado aos processos de neuroplasticidade (JE et al., 2012).

Devido a sua capacidade de se ligar a uma diversidade de receptores e com isso influenciar diversas vias de sinalização, este fator, controla uma ampla gama de processos, apresentando funções como a regulação de diversas vias de manutenção do funcionamento cerebral como o crescimento axonal, diferenciação neuronal e a manutenção e plasticidade das sinapses (ZHANG; YAO; HASHIMOTO, 2016).

Em relação às sinapses, esta neurotrofina é capaz de atuar na modulação da transmissão sináptica o que resulta em uma maior eficácia desta transmissão quer seja alterando a liberação do neurotransmissor, quer seja aumentando a sensibilização dos receptores pós-sinápticos o que estaria relacionada com fortalecimento da plasticidade sináptica e também com potenciação de longo prazo LTP sendo assim um importante fator no complexo mecanismo relacionado ao processo de aprendizado e memória (ZHANG; YAO; HASHIMOTO, 2016; WU et al., 2020).

Para realizar sua função, o BDNF liga-se a Tirosina proteína quinase B (TrkB), considerada um receptor de alta afinidade e por meio dessa ligação ocorrem eventos de sinalização que resultam nas funções desempenhadas por este fator (PODYMA et al., 2021). Essa via de sinalização BDNF-TrkB ao longo do desenvolvimento embrionário é responsável pela diferenciação de células progenitoras que futuramente se diferenciam em neurônios, o que aponta para uma relação entre essa via de sinalização e a neurogênese presente no hipocampo. De fato, o aumento na expressão de BDNF na região do hipocampo está relacionado com aumento da neurogênese hipocampal e também melhora no funcionamento cerebral (PODYMA et al., 2021).

Indivíduos que apresentam distúrbios psiquiátricos e também quadros neurodegenerativos apresentam alterações nos níveis dessa neurotrofina tanto no sangue quanto no cérebro (DING et al., 2020). A associação com diversos quadros neurodegenerativos e neuro inflamatórios como doença de Alzheimer, depressão, esquizofrenia, ansiedade, doença de Huntington, transtornos bipolares, TDAH e TEA já foi demonstrada (COLUCCI-D'AMATO et al., 2020).

No TEA, os baixos níveis de BDNF já foram associados com anormalidades encontradas nas estruturas cerebrais e alterações do padrão de conectividade sináptica o que estaria relacionado com as características comportamentais apresentadas por esses indivíduos (LIMA GIACOBBO et al., 2019).

Estudo realizado com 21 crianças diagnosticadas com TEA mostrou redução nos níveis de BDNF e que quanto menor estes níveis, maior era a gravidade dos sintomas apresentados por esses indivíduos (HAN et al., 2022).

3. JUSTIFICATIVA

Vários quadros que acometem o neurodesenvolvimento apresentaram aumento da incidência na população nos últimos anos. A possível quebra da homeostasia do organismo materno, em relação a sua suscetibilidade aos mais diversos quadros inflamatórios, vem sendo associada a diversas alterações no desenvolvimento fetal.

Dentro deste grupo, o TEA ganha destaque devido a sua alta incidência e a complexidade do quadro. O entendimento dessa desordem aponta para diversas modificações nos padrões neuro-estruturais, neuroquímicos e neuromoleculares de áreas fundamentais para o funcionamento do sistema nervoso como o hipocampo. Assim, investigar as bases neurológicas envolvidas nos transtornos do neurodesenvolvimento e oferecer novos dados que possibilitem o desenvolvimento de medidas farmacológicas que minimizem estes comprometimentos constitui-se de importante parâmetro para melhorar a qualidade de vida destes indivíduos. A melatonina é uma molécula candidata ao uso como agente que minimize tais efeitos devido a sua gama de funções no organismo, dentre eles a função antiinflamatória que no presente estudo foi explorada no período pré-natal.

4. OBJETIVO

Analisar se a administração de melatonina na fêmea prenhe em associação à exposição ao LPS é capaz de reverter alterações comportamentais, neuroquímicas e moleculares que ocorrem na prole proveniente de fêmeas prenhes expostas ao LPS.

4.1 Objetivos Específicos

✓ Investigar se a administração de melatonina antes e após a exposição ao LPS durante o período gestacional pode reverter alterações na memória espacial da prole cuja rata prenhe foi exposta ao LPS.

✓ Investigar se administração de melatonina antes e após a exposição ao LPS durante o período gestacional pode reverter alterações neuroquímicas de populações de neurônios hipocampais da prole cuja rata prenhe foi exposta ao LPS.

✓ Investigar se administração de LPS durante a gestação pode alterar a expressão gênica de receptores de melatonina MT1 e MT2 no hipocampo da prole e se o tratamento com melatonina antes e após a exposição ao LPS durante o período gestacional poderia reverter estas alterações.

✓ Investigar se administração de LPS durante a gestação pode alterar a expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro BDNF no hipocampo da prole e se o tratamento com melatonina antes e após a exposição ao LPS durante o período gestacional poderia reverter estas alterações.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 ANIMAIS

Para formar os casais foram utilizados cinco ratos machos e 10 fêmeas da espécie Wistar, provenientes do biotério de criação da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu, com idade entre 14-17 semanas, sendo a média do peso desses animais de $256,5 \pm 22,6$ g. Os animais ficaram alojados no biotério de manutenção da FFC-UNESP, campus de Marília, em caixas de polipropileno com as seguintes dimensões: 38x32x16cm forradas com maravalha, com água filtrada e ração (Nuvilab) “*ad libitum*”, em salas com aeração e exaustão controladas, temperatura em 22° C e ciclo claro/escuro de 12/12horas.

Os experimentos seguem as normas estabelecidas pela Lei nº 11.794, de 2008, regulamentada pelo Decreto nº 6.899, de 2009. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética local, CEUA-FFC, proc. N.001/2019 (Anexo 1).

5.2 ACASALAMENTO

Para o acasalamento, dez casais foram colocados em caixas até o acasalamento detectado pela presença de espermatozóides por meio de esfregaço vaginal no qual o material coletado com cotonete umedecido em solução de cloreto de sódio a 0,9%, colocado em lâminas e analisado em microscopia óptica. Assim que foi detectada a presença de espermatozóides, este foi considerado o dia de gestação zero (DG 0) e a fêmea foi colocada em caixa individual até o nascimento dos filhotes (KIRSTEN, 2012; PACCOLA et al., 2013).

5.3 DIVISÃO DOS GRUPOS

As fêmeas prenhes (N=10) foram divididas de forma aleatória em quatro grupos: o grupo injetado com LPS no dia gestacional 9,5 (DG 9,5) (grupo LPS) (N=03), o grupo injetado com salina no DG 9,5 (Salina) (N=02), o grupo injetado salina no DG 9,5 e tratado com melatonina a partir da noite anterior até o último dia gestacional (melatonina) (N=02) e o grupo injetado LPS no DG 9,5 e tratado com melatonina a partir da noite anterior até o último dia gestacional (grupo LPS+Mel) (N=03). No DG 9,5 de cada rata prenhe do grupo LPS, foi administrado por via intraperitoneal (i.p) 200µg/Kg de LPS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluído em solução salina 0,9% e o mesmo volume de salina (solução aquosa de NaCl estéril a 0,9%) foi injetado (i.p) nas fêmeas no grupo controle. O dia no qual foi administrado o LPS corresponde a uma etapa importante para o processo do neurodesenvolvimento embrionário visto que nesse período ocorre a migração e diferenciação das células nervosas (INOUE; NAKAMURA; OSUMI, 2001; KIRSTEN et al., 2012). Já a dose administrada foi fundamentada na literatura que refere que doses a partir de 100 µg/Kg promovem alterações nos sistemas neuro-imune-endócrino da rata prenhe, alteram o tecido placentário e elevam os níveis de citocinas, resultando em alterações comportamentais da prole (KIRSTEN et al., 2012). No DG 9, os grupos tratados com melatonina (Sigma M5250) começaram a recebê-la diluída na água de seu bebedouro uma hora antes da luz do biotério se apagar na concentração de (25 ug/ml de melatonina em EtOH 0.05%, ou seja, 15 mg melatonina em 300ul álcool e

600 mL de água). Já para os grupos que não receberam melatonina foi ofertada uma solução veículo (300uL mais 600mL água). No dia seguinte, uma hora após as luzes se acenderem essa água era retirada e colocada outra sem a presença de melatonina para que o animal consumisse ao longo do dia. A administração de melatonina ou veículo para as fêmeas prenhes foi realizada até o dia do nascimento da prole.

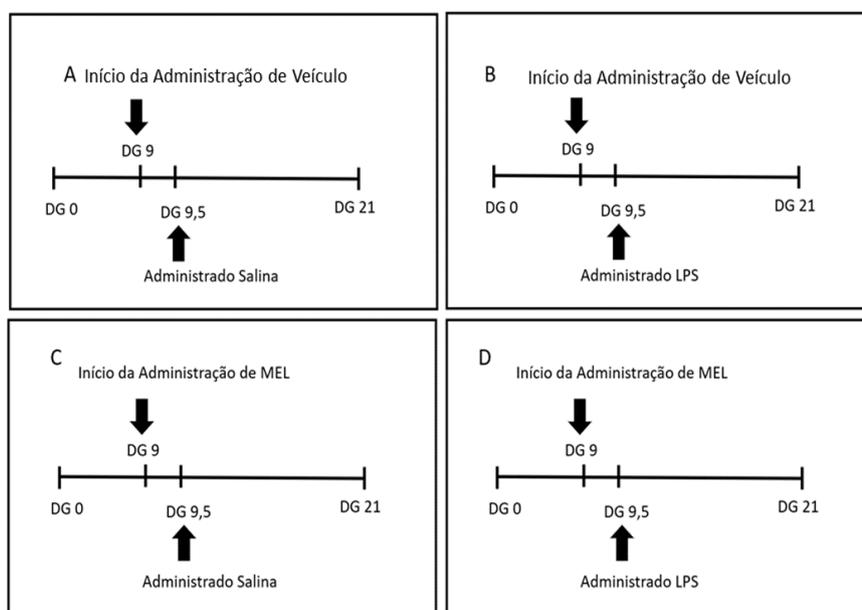


Figura 9. Figura esquemática com a divisão dos grupos do experimento. Em A, o grupo salina (n=2 ratas prenhes) no qual no DG 9 teve início a oferta de água+veículo que continuou até o DG 21 e foi administrado salina intraperitoneal no DG 9,5. Em B, o grupo LPS (n=3 ratas prenhes) no qual no DG 9 iniciou-se a oferta de água+veículo que continuou até o DG 21 e no DG 9,5 foi administrado o LPS intraperitoneal. Em C, o grupo melatonina (n=2 ratas prenhes), no qual no DG 9 teve início a oferta de água+melatonina que continuou até o DG 21 e no 9,5 ocorreu a administração de salina intraperitoneal. Em D, grupo LPS+Melatonina (n=03) no DG 9 teve início a oferta de água+melatonina que continuou até o DG 21 e no DG 9,5 foi administrado LPS intraperitoneal.

No primeiro dia pós-nascimento (PN1) os filhotes não foram manipulados para evitar um fator de estresse para a mãe que poderia levar ao infanticídio (KIRSTEN, 2012). No PN2 foi realizada a sexagem dos filhotes (SANTOS, 2002). As fêmeas das ninhadas foram eutanasiadas e os machos (N=5 por ninhada) foram mantidos com a mãe. A escolha pela prole de machos foi devida a validação do modelo apenas em filhotes machos, os quais, nesse modelo apresentaram alguns dos comportamentos autísticos (KIRSTEN, 2012). O tecido nervoso da prole masculina possui uma maior vulnerabilidade a desafios imunológicos na fase inicial da vida quando comparado ao feminino isso explica a

diferença entre a incidência de determinados quadros do neurodesenvolvimento dependo do sexo (BILBO; SMITH; SCHWARZ, 2012; EDLOW et al., 2019).

5.4 TESTE COMPORTAMENTAL

Para avaliação da memória espacial, foi utilizado o teste do labirinto em T (GERLAI, 1998). Nesse teste, foram utilizados 48 animais provenientes das proles das ratas que receberam diferentes tratamentos (10 animais provenientes de ratas que receberam injeção de Salina e Veículo na água (grupo salina), oito animais provenientes de ratas que receberam injeção de LPS e Veículo na água (grupo LPS), 12 animais provenientes de ratas que receberam injeção de Salina e Melatonina na água (grupo melatonina-MEL) e 18 animais provenientes de ratas que receberam injeção de LPS e Melatonina na água (grupo LPS+MEL) provenientes de ninhadas diferentes (PEREIRA; BERNARDI; GERARDIN, 2006).

O labirinto, confeccionado em acrílico de cor preta pela Sciencelabor[®], contém um braço “A” com 90 cm de comprimento e um braço “B” com 95 cm de comprimento, ambos conectados formando uma estrutura que se assemelha a um T. A 40 cm do início do braço “A”, havia uma porta guilhotina e esse local era considerado o braço inicial do teste. Após essa porta, havia mais 50 cm de comprimento para o animal percorrer até chegar ao local de escolha tendo acesso ao braço B. A distância entre as paredes laterais tanto no braço A quanto no B era de 15 cm e a altura dos braços era de 50 cm, inibindo assim a possibilidade do animal sair do aparato do teste. O labirinto ficava sobre uma mesa a 75 cm de altura do chão, facilitando a ergonomia na hora de realizar o teste e o experimento foi realizado com luz de baixa intensidade (MORATO, 2006; KIRSTEN, 2012).

O peso de “linha de base” foi estabelecido avaliando-se o ganho de peso dos animais todos os dias a partir do PN 60 até que a variação não passasse de 10g ao longo de três dias. Este peso foi determinado como “linha de base”. Após essa “estabilização” do peso dos animais, foi realizada restrição na quantidade de ração ofertada (15 à 20g por dia) e o monitoramento do peso todos os dias até que este se estabiliza em 85% do peso estabelecido como linha de base (NERY, 2015).

Ao redor do PN 70 foi realizado o teste do labirinto em T adaptado, sempre no horário entre 13:00h e 15:00h (DEACON; RAWLINS, 2006; TIMOFEEVA et al., 2008). Inicialmente o animal foi colocado e mantido no braço de início por 10 segundos. Em

seguida, a porta guilhotina do braço A era aberta e o animal podia percorrer o labirinto até chegar ao ponto onde o braço A cruza com o braço B. Neste ponto o animal tinha que escolher entre o lado direito e o esquerdo do braço B sendo que na entrada para cada um desses lados havia uma porta basculante aberta para permitir a entrada do animal. Feita a escolha, a porta era fechada e o animal permanecia confinado no lado do braço escolhido por 20 segundos e então era removido do local e colocado novamente no braço inicial (DEACON; RAWLINS, 2006). Esse processo foi realizado por sete vezes consecutivas e foi considerado que o animal alternou quando ele entrava com as quatro patas no lado do braço B em que ele não havia visitado anteriormente. Caso o animal não explorasse o labirinto no período de dois minutos, ele era retirado e na sequência realizado mais uma tentativa. Caso ele não explorasse novamente, ele era retirado do teste. Para excluir qualquer possibilidade de pistas olfativas, o aparato era limpo a cada tentativa realizada pelo animal com solução de hipoclorito 30% e álcool 70%. Todas as tentativas realizadas pelos animais foram filmadas e analisadas por um integrante do grupo que não teve acesso à identificação dos animais. Para nosso estudo foram avaliados o número de alternância e o tempo entre cada escolha realizada pelo animal.

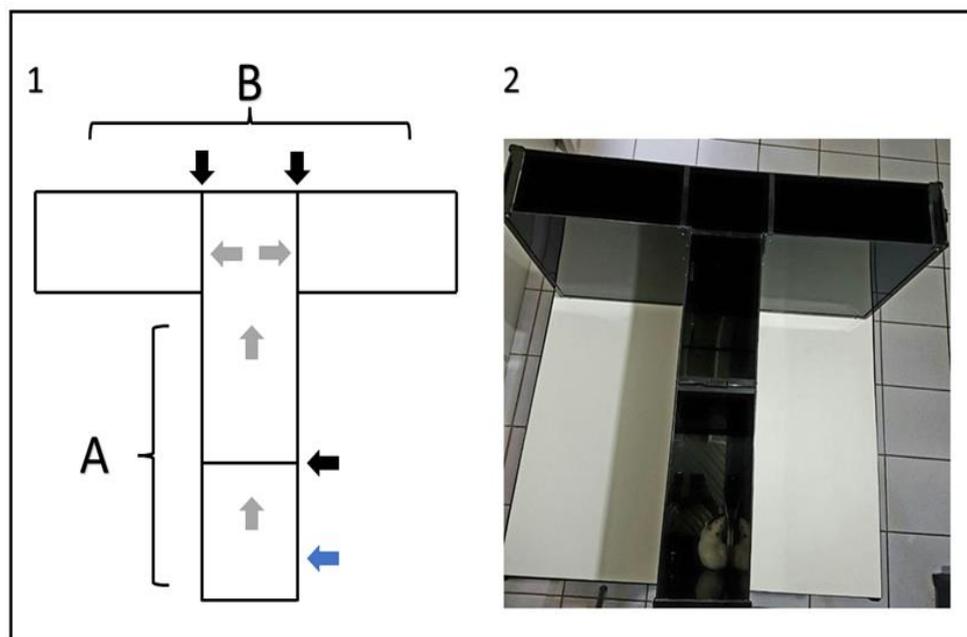


Figura 10. Labirinto em T utilizado para os testes de memória espacial e comportamento restrito/repetitivo. Em 1. Esquema ilustrativo do modelo de labirinto em T utilizado. A letra (A) representa o braço vertical e (B) o braço na horizontal. A seta em azul indica o braço de início onde o animal era posicionado. As setas em preto representam as portas que separam o acesso do animal aos outros braços e as setas cinzas indicam o caminho que o animal poderia percorrer para realizar a escolha entre cada uma das tentativas.

5.5 PERFUSÃO TRANSCARDÍACA

Para obtenção dos encéfalos visando realizar a análise da neuroquímica das áreas de interesse, foi realizado a perfusão transcardíaca na fase de escuro (ZT 17) após a administração de 1mL do anestésico Rompum (solução com Acepromazina 1,8mL, Ketamina 4,5mL, Xylazina 4,5mL e H₂O_d 7,2mL), o grau de anestesia do animal foi verificado por teste de reflexo de aversão à dor com a deflexão da pata do animal quando pinçada.

Os animais (N=20 sendo 05 animais do grupo Salina, 05 animais do grupo LPS, 05 animais do grupo MEL e 05 animais do grupo LPS+MEL) foram submetidos à perfusão transcardíaca, para a qual foi realizada a exposição da região torácica do animal por incisão mediana no eixo axial. As costelas foram cortadas bilateralmente e a parede anterior da caixa torácica rebatida facilitando o acesso ao coração. Com a cavidade torácica exposta, a artéria aorta descendente do animal foi clampeada e foi realizada uma pequena incisão na parede do ventrículo esquerdo do coração, para inserção da cânula conectada à bomba de perfusão. A aurícula direita foi cortada para permitir extravasamento das soluções perfundidas, primeiramente salina 0,9% (200mL) e em seguida paraformaldeído 10% (400mL).

Ao final cada encéfalo foi retirado, pesado e colocado em solução de pós-fixação (25 mL de paraformaldeído e 5g de sacarose) por 12 horas, e em seguida em solução crioprotetora contendo 25mL de PBS (Água destilada, Fosfato Monobásico, Fosfato Bibásico e Cloreto de Sódio pH 7,4) e 5g de sacarose, até o momento do congelamento e criosecção em cortes coronais de 30µm de espessura em criostato (Leica CM 1850). Os cortes foram coletados em seis séries rostro-caudais e estocados em solução anti-congelamento (125mL de PBS, 125mL de H₂O_d, 75g de sacarose e 125mL de etilenoglicol) à -20°C.

5.6 DECAPITAÇÃO

Para coleta de sangue e também obtenção de material para realizar a PCR, cinco animais de cada grupo foram decapitados, sem a utilização de anestésico, em guilhotina específica para este fim na fase de escuro (ZT 17) sob luz de baixa intensidade para coleta de sangue e das áreas encefálicas. O sangue foi centrifugado, o sobrenadante foi congelado em -80°C até o momento da dosagem da melatonina por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Ensaio imunoenzimático), seguindo o protocolo do

fabricante (IBL, Hamburg, Germany). Os resultados obtidos nesta dosagem foram expressos em pg/mL. 31 Os encéfalos foram retirados e as diferentes áreas encefálicas (córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo e hipotálamo), foram dissecadas em condição estéril e imediatamente congeladas a -80°C até o momento da extração do RNA. A quantificação da expressão gênica do RNAm dos receptores de melatonina foi realizada por PCR em tempo real quantitativo com iQ[™] SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA).

5.7 ENSAIO DE PCR QUANTITATIVO

Para a análise da expressão do RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e dos receptores de melatonina (MT1 e MT2) foi utilizada a PCR em tempo real quantitativo com iQ[™] SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA) seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Essa técnica possibilita amplificar, detectar e quantificar os fragmentos de DNA e RNA visto que podemos utilizar marcadores fluorescentes e analisar a quantidade de fluorescência que esses marcadores emitem. Para realização da técnica é necessário um termociclador acoplado a um aparato ótico que visa promover a excitação da fluorescência e obtenção da emissão, além de um computador para a captação de resultados que posteriormente será analisado em um software (NOVAIS, PIRES ALVES, 2004). As regiões encefálicas previamente extraídas e congeladas em -80°C , foram descongeladas no momento do procedimento de extração de RNA (ácido ribonucleico). Na sequência foi adicionado 100 μL de Trizol para facilitar a maceração da amostra, por meio de um pistilo elétrico. Quando a amostra e o Trizol se dissolveram, adicionou-se 900 μL de Trizol (para completar um 1mL). Em seguida, foi inserido 200 μL de clorofórmio e a amostra foi misturada. Após, a amostra passou pelo processo de centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C , na sequência ocorreu uma separação de 3 fases: 1^a fase: aquosa/transparente, contém o RNA; 2^a fase: branca, contém DNA; 3^a fase: rosa, contém proteínas. Neste protocolo foi utilizada a fase do RNA. Para isso, foi selecionada a fase aquosa, pipetando-se aproximadamente 500 μL desta fase em um novo eppendorf e adicionado 500 μL de Isopropanol. Posteriormente a amostra ficou 10 minutos em temperatura ambiente e logo depois foi centrifugada por 10 minutos a 12000 rpm, neste momento o RNA forma um “pellet” no fundo do eppendorf. Então o sobrenadante foi removido sem descartar o pellet, este foi ressuspense em 500 μL de etanol 75%, e a amostra foi levada à centrífuga por 5 minutos a 7500 rpm. Desprezou-se o sobrenadante, os eppendorfs secaram naturalmente, sobre um papel toalha, dentro da

capela de fluxo laminar até no máximo 10 minutos. O pellet foi ressuspensão em 50µL de água DEPC, e em seguida foi levado para a placa de leitura no aparelho Biotek, modelo EPOCH. Onde utilizou-se o software GEN-1 para realizar a quantificação de RNA (ng/µL). Para fazer as fitas complementares, ou seja, o processo de conversão do RNA em fitas de DNA (ácido desoxirribonucleico) seguiu-se o protocolo do fabricante (Super Script VILO - 11755-500). Os primers utilizados estão apresentados no quadro abaixo:

Quadro 1. Relação da sequência de primers utilizadas para análise da expressão gênica.

Primers	Sequência (Forward/Reverse)
GAPDH	(F) 5'-TTCTTGTGCAGTGCCAGCC-3' (R) 5'-GTAACCAGGCGTCCGATACG-3'
MT1	(F) 5'-CCTCCTGTCTGCCCTTTAATC-3' (R) 5'-CACCCAGAGATGAGAGTCTGC-3'
MT2	(F) 5'-AATTGCTGTGGTGTCCCTTTG-3' (R) 5'-TCAGGCGTAGCTTTCTCTCAG-3'
BDNF	(F) 5'-ATGACC ATC CTT TTC CTT ACT ATG GT-3' (R) 5'-TCT TCC CCT TTT AAT GGT CAG TGT AC-3'

Os ensaios foram efetuados em StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) passando pelas fases (Holding Stage) 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C, 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 15 segundos a 95°C, com aumento gradual de 0,3°C (Melt Curve Stage).

5.8 IMUNO-HISTOQUÍMICA- IMUNOPEROXIDASE

Séries adjacentes de cortes encefálicos de cada animal (N=3 animais por grupo) foram processadas por imuno-histoquímica para a proteína calretinina. Para isso foi utilizado anticorpo primário, anti-calretinina (1:7500), diluído em solução contendo 2% de soro normal de burro (NDS). Inicialmente os cortes encefálicos contendo o hipocampo foram lavados em tampão PBS 0,1 M pH 7,4 composta por, sódio fosfato dibásico (Labsynth, Brasil) sódio fosfato monobásico anidro (Labsynth, Brasil), cloreto de sódio (Labsynth, Brasil) e H₂O. Em seguida os cortes foram incubados em solução tampão PBS-TX (PBS + Triton X-100-Amresco, Solon, EUA) contendo 2% de soro normal (NDS). Após 1 hora foi adicionado o anticorpo primário por 48 horas à 4° C em agitação. Em seguida os cortes foram lavados em tampão PBS 0,1 M pH 7,4, e incubados em PBS-TX contendo anticorpo secundário biotilado específico para cada anticorpo primário diluído 1: 200 por 2 horas (CAMPOS *et al.*, 2014). Na sequência, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M pH 7,4, incubados por 90 min em solução contendo complexo

avidina biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA) e lavados novamente com tampão PBS (0,1 M; pH 7,4). A marcação foi revelada utilizando-se o cromógeno diaminobenzidinatetrahidrocloreto (DAB) com metal cobalto como intensificador (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) diluído em 5 mL de água deionizada. Na sequência, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados, deslipidificados e as lâminas foram cobertas com lamínulas com o DPX como meio de montagem (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA).

5.9 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A análise dos cortes encefálicos foi realizada em microscopia de campo claro e fluorescente (microscópio *Nikon Eclipse E1000*, adaptado a câmera digital *CoolSNAP-Pro Color*, e microcomputador com *software Image-Pro®Plus* (Média Cybernetcs, Silver Spring, MA, Estado Unidos). Para a identificação da área encefálica foi utilizado o atlas *The Rat Brain Atlas* (Paxinos; Watson, 2006).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Após aplicação do teste de Shapiro-Wilk para análise da distribuição de normalidade, a comparação entre os grupos foi feita por ANOVA. O nível de significância foi de 5%.

6. RESULTADOS

6.1 Parâmetros analisados nas fêmeas prenhes

A análise do ganho de peso das ratas prenhes submetidas aos diferentes tratamentos mostrou que não houve diferença entre os grupos em relação ao ganho de peso no período pré-tratamento. No período pós-tratamento o grupo LPS apresentou menor ganho de peso ($27,4 \pm 5,6$) que o grupo salina ($59,3 \pm 4,1$, $p = 0,001$); o grupo LPS + melatonina ($75,7 \pm 5,5$) apresentou maior ganho de peso que o grupo LPS ($27,4 \pm 5,6$, $p < 0,001$); os grupos melatonina ($54,3 \pm 6,0$) e LPS + melatonina ($75,7 \pm 5,5$) não apresentaram diferença no ganho de peso em relação ao grupo salina ($59,3 \pm 4,1$) (Figura 11).

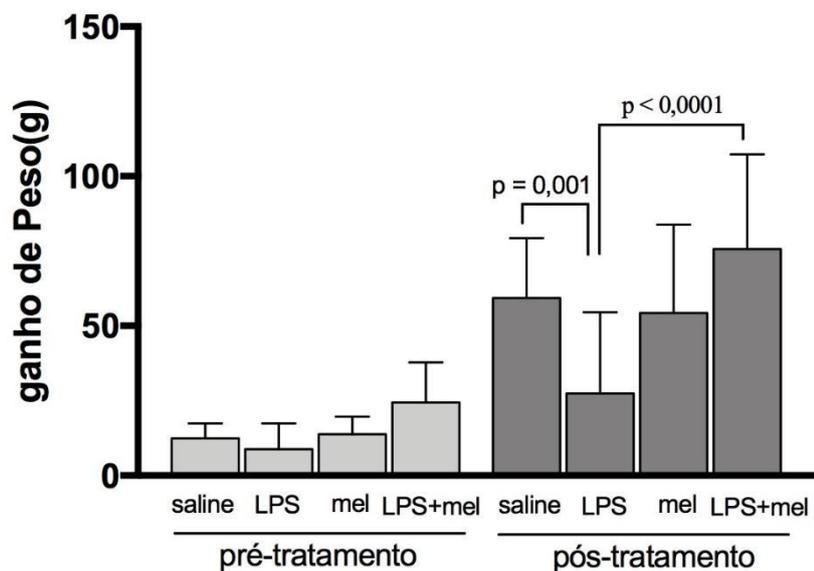


Figura 11. Gráfico comparativo do ganho de peso dos grupos de fêmeas prenhes submetidas aos diferentes tratamentos. No período pré-tratamento não houve diferença entre os grupos. No período pós tratamento o grupo LPS apresentou menor ganho de peso quando comparado ao salina ($P < 0,001$). O grupo LPS + melatonina apresentou maior ganho de peso que o grupo LPS ($P < 0,001$) e os grupos melatonina (mel) e LPS + melatonina não apresentaram diferença de peso em relação ao grupo salina.

Analisando-se os ganhos de peso das fêmeas individualmente percebe-se que as fêmeas do grupo LPS apresentam um platô na curva de ganho de peso nos dias seguintes à injeção com LPS o que não acontece com as ratas do grupo salina (Figura 12). Já as ratas do grupo LPS + melatonina apresentam o mesmo padrão nas curvas de ganho de peso que as ratas do grupo salina (Figura 13).

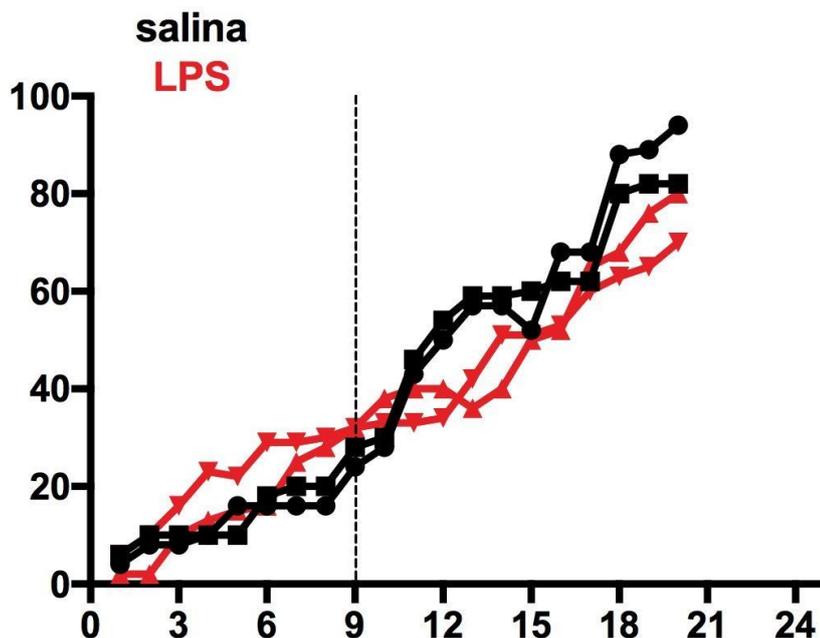


Figura 12. Gráfico ilustrando o ganho de peso individual das fêmeas dos grupos salina e LPS antes e após o tratamento (linha pontilhada dia 09). As fêmeas do grupo LPS apresentam um platô na curva de peso nos dias seguintes à injeção de LPS, o que não acontece com as fêmeas do grupo salina.

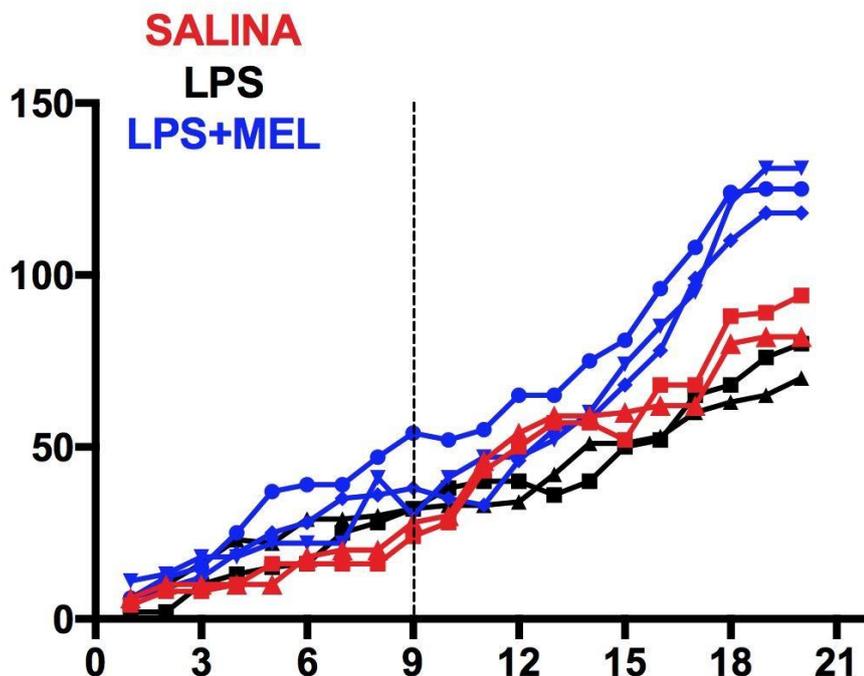


Figura 13. Gráfico ilustrando o ganho de peso individual das fêmeas de cada grupo submetidas aos diferentes tratamentos (linha pontilhada dia 09). As fêmeas do grupo LPS (linha preta) apresentam um platô na curva de peso nos dias seguintes à injeção de LPS o que não acontece com as fêmeas do grupo salina (linha vermelha). Já as fêmeas do grupo LPS + melatonina (linha azul) apresentam também o mesmo padrão nas curvas que as fêmeas do grupo salina.

A administração de melatonina, sem a associação com LPS, também alterou o padrão de ganho de peso das ratas (Figura 14).

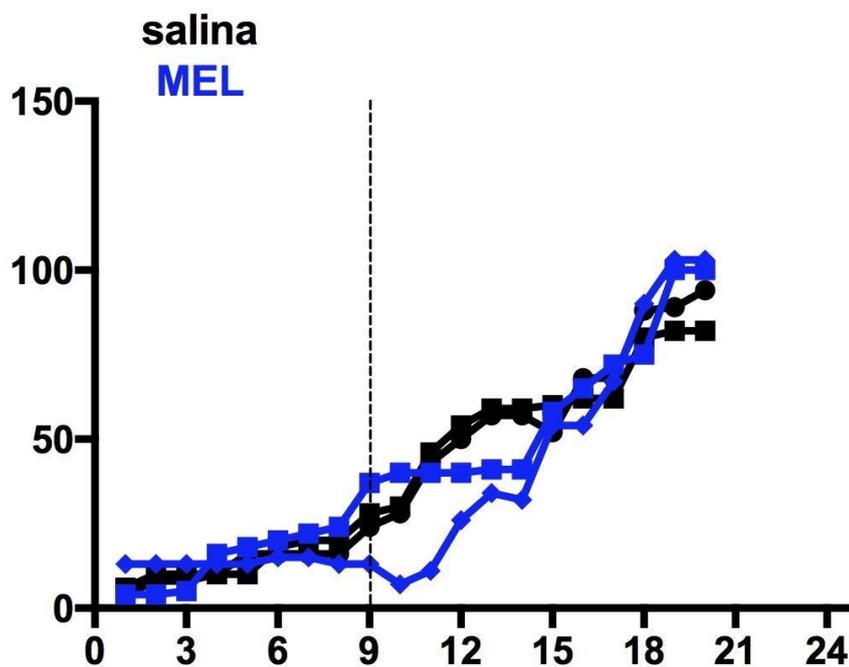


Figura 14. Gráfico ilustrando o ganho de peso individual das fêmeas dos grupos salina e melatonina antes e após os diferentes tratamentos (linha pontilhada dia 09). As fêmeas do grupo no qual foi injetada somente a melatonina sem associação ao LPS também tiveram seu padrão de ganho de peso alterado.

Analisando-se o consumo de ração das fêmeas prenhes não foi encontrada diferença entre os grupos após o início dos tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão da ingestão em gramas de ração das fêmeas prenhes dos grupos submetidos aos diferentes tratamentos.

Grupo	Ingesta (g) média \pm DP	P (comparação com salina)
salina	25,5 \pm 5,2	
LPS	25,3 \pm 2,9	>0,05
melatonina	26,5 \pm 6,3	>0,05
LPS + melatonina	27,3 \pm 6,1	>0,05

Analisando-se o consumo de água das fêmeas prenhes foi encontrado consumo de água maior no grupo salina (55,4 \pm 5,9) em relação aos grupos LPS (44,5 \pm 7,7, $p < 0,001$), melatonina (43,9 \pm 10,0, $p < 0,01$) e LPS + melatonina (46,4 \pm 8,2, $p < 0,05$).

6.2 Parâmetros analisados na prole

Não houve diferença no número de filhotes entre as fêmeas dos diferentes grupos. Quanto ao peso da prole, este foi avaliado em cinco diferentes idades, como descrito a seguir.

No terceiro dia pós nascimento (PN3), o grupo cuja fêmea prenhe havia recebido melatonina apresentou menor peso (7,7 \pm 0,4) que o grupo salina (8,8 \pm 0,6, $p < 0,01$). O grupo cuja fêmea prenhe havia recebido LPS não apresentou diferença de peso (8,2 \pm 0,8) em relação ao grupo salina (8,8 \pm 0,6), porém o grupo LPS + melatonina (7,8 \pm 0,6) também apresentou menor peso que o grupo salina (8,8 \pm 0,6; $p < 0,01$).

No PN21, as proles dos grupos cujas fêmeas prenhes haviam recebido LPS, melatonina e LPS + melatonina não apresentaram diferença de peso em relação ao grupo salina.

No PN30, a prole do grupo LPS não apresentou diferença de peso em relação ao grupo salina. Já as proles dos grupos melatonina (78,4 \pm 3,5; $p < 0,001$) e LPS + melatonina (79,2 \pm 3,3, $p < 0,0001$) apresentaram maior peso em relação a prole do grupo

salina ($69,6 \pm 1,8$). O peso da prole do grupo LPS + melatonina ($79,2 \pm 3,3$) também foi maior em relação à prole do grupo LPS ($70,0 \pm 3,9$; $p < 0,0001$). Não houve diferença de peso entre as proles dos grupos melatonina e LPS + melatonina.

No PN60, a prole do grupo LPS ($294,4 \pm 7,2$) apresentou maior peso que as dos grupos salina ($281,3 \pm 7,0$; $p < 0,05$) e melatonina ($277,9 \pm 16,2$; $p < 0,05$). A prole do grupo LPS + melatonina ($292,3 \pm 14,2$) apresentou maior peso em relação a do grupo melatonina ($277,9 \pm 16,2$; $p < 0,05$).

No PN70, não houve diferença no peso dos grupos LPS, melatonina e LPS + melatonina em relação ao grupo salina. Também não houve diferença no peso da prole entre os grupos LPS e LPS + melatonina. A prole do grupo LPS ($296,2 \pm 6,7$) apresentou maior peso que o grupo melatonina ($272,8 \pm 16,8$; $p < 0,001$). A prole do grupo melatonina ($272,8 \pm 16,8$) apresentou menor peso que a do grupo LPS + melatonina ($289,3 \pm 14,9$; $p < 0,05$).

Tabela 2. Média e desvio padrão do peso em diferentes dias da prole de animais que foram submetidas a diferentes tipos de tratamentos durante a gestação.

PESO – FÊMEAS TRATADAS	PERÍODO PÓS-NASCIMENTO	MÉDIA±DP	VALOR DE P
Salina vs.melatonina	PN3	8,8±0,60 vs.7,7±0,40	P<0,01
Salina vs.LPS	PN3	8,80±0,60 vs.8,20±0,80	P>0,05
LPS+melatonina vs.Salina	PN3	7,80±0,60 vs.8,80±0,60	P<0,01
LPS vs.Salina	PN21	50,92±2,42 vs.49,80±2,70	P>0,005
melatonina vs.Salina	PN21	42,23±4,32 vs.49,80±2,70	P>0,005
LPS+melatonina vs.Salina	PN21	53,04±2,03 vs.49,80±2,70	P>0,05
LPS vs.Salina	PN30	70,00±3,86 vs.69,60±1,83	P>0,005
melatonina vs.Salina	PN30	78,40±3,50 vs.69,90±1,83	P<0,001
LPS+melatonina vs.Salina	PN30	79,20±3,30 vs.69,90±1,83	P<0,0001
LPS+melatonina vs.LPS	PN30	79,20±3,30 vs.70,00±3,90	P<0,0001
melatonina vs.LPS+melatonina	PN30	78,4±3,5 vs.79,20±3,30	P>0,005
LPS vs.Salina	PN60	294,4±7,20 vs.281,30±7,0	P<0,05
LPS vs.melatonina	PN60	294,4±7,20 vs.277,9±16,20	P<0,05
LPS+melatonina vs.melatonina	PN60	292,30±14,20 vs.277,9±16,2	P<0,05
LPS vs.Salina	PN70	296,2±6,7 vs.283,6±5,81	P>0,05
melatonina vs.Salina	PN70	272,8±16,8 vs.283,6±5,81	P>0,05
LPS+melatonina vs.Salina	PN70	289,30±14,9 vs.283,6±5,81	P>0,05
LPS vs.LPS+melatonina	PN70	296,2±6,7 vs.289,30±14,9	P>0,005
LPS vs.melatonina	PN70	296,2±6,7 vs.272,8±16,8	P<0,001
melatonina vs.LPS+melatonina	PN70	272,8±16,8 vs.289,3±14,90	P<0,05

Com relação ao peso dos encéfalos, não houve diferença entre os pesos dos encéfalos das proles provenientes das fêmeas que receberam salina e os demais grupos provenientes das fêmeas submetidas aos diferentes tratamentos.

Os testes comportamentais no labirinto em T mostraram que o tempo de escolha (em segundos) do braço a ser visitado em cada tentativa não diferiu entre os animais de cada grupo.

Em relação ao número de acertos no teste do labirinto em T, o grupo salina apresentou maior número de acertos em alternar o braço de escolha ($4,50 \pm 0,70$) em relação ao grupo LPS ($1,9 \pm 0,9$; $p < 0,001$). O grupo melatonina ($3,7 \pm 0,8$) apresentou maior número de acertos que o grupo LPS ($1,9 \pm 0,9$; $p < 0,05$). Não houve diferença entre os demais grupos.

O número total de erros na escolha do braço durante o teste do labirinto em T foi menor no grupo salina ($1,7 \pm 0,9$) em relação ao grupo LPS ($4,1 \pm 0,9$; $p < 0,01$). Os grupos melatonina ($2,3 \pm 0,8$, $p=0,02$) e LPS + melatonina ($2,3 \pm 1,4$, $p=0,02$) apresentaram menor quantidade de erros em relação ao grupo LPS ($4,12 \pm 0,99$, $p=0,0149$). Não houve diferença entre os demais grupos.

Considerando-se o número de acertos nas três primeiras tentativas de escolha do braço no teste do labirinto em T, a prole do grupo salina ($2,2 \pm 0,8$) apresentou maior número de acertos em relação a prole do grupo LPS ($0,9 \pm 0,3$; $p < 0,01$). Não houve diferença entre os outros grupos. Considerando-se as três últimas tentativas não houve diferença no número de acertos entre os grupos.

Considerando-se o número de erros nas três primeiras tentativas não houve diferença entre os grupos. Já nas três últimas tentativas de escolha a prole do grupo LPS ($2,4 \pm 0,5$, $p= 0,0180$) apresentou maior número de erros em relação ao grupo salina ($1,00 \pm 1,15$). A prole do grupo LPS ($2,4 \pm 0,5$) apresentou maior número de erros em relação ao grupo melatonina ($1,1 \pm 0,7$; $p < 0,05$). O número de erros da prole do grupo LPS ($2,4 \pm 0,5$) foi maior em relação ao grupo LPS + melatonina ($1,16 \pm 1,04$; $p < 0,05$).

Na análise da neuroquímica das regiões do hipocampo para as células IR-CR foi possível observar que na região do giro denteado (GD) houve diferença entre os grupos salina ($34,3 \pm 11,8$) e o grupo LPS ($58,3 \pm 1,1$; $p= 0,02$) com maior expressão no grupo LPS. Essa diferença não foi encontrada quando comparados os grupos salina ($34,3 \pm 11,8$) e LPS+Mel ($44,6 \pm 6,1$) ($p= 0,45$), mostrando que a melatonina reverteu o efeito do LPS. Também não foi encontrada diferença entre os grupos: salina ($34,3 \pm 11,8$) e melatonina ($55,0 \pm 9,53$) ($p= 0,0593$); LPS ($58,3 \pm 1,1$) e melatonina ($55,0 \pm 9,5$; $p= 0,95$); LPS ($58,3 \pm 1,1$) e LPS+Mel ($44,6 \pm 6,1$) ($p= 0,25$); melatonina ($55,0 \pm 9,5$) e LPS+Mel ($44,6 \pm 6,1$) ($p= 0,45$) (Figura 15A).

Já na região de CA1, não houve diferença estatística quanto ao número de células IR-CR entre os grupos analisados: salina ($49,0 \pm 10,0$) e LPS ($66,3 \pm 6,5$; $p=0,19$); salina ($49,0 \pm 10,0$) e melatonina ($71,6 \pm 8,73$; $p=0,07$); salina ($49,0 \pm 10,0$) e LPS+Mel ($63,6 \pm 12,0$) ($p=0,30$); LPS ($66,3 \pm 6,5$) e melatonina ($71,6 \pm 8,7$) ($p=0,89$); LPS ($66,3 \pm 6,50$) e LPS+Mel ($63,6 \pm 12,0$) ($p=0,98$); melatonina ($71,6 \pm 8,7$) e LPS+Mel ($63,6 \pm 12,0$) ($p=0,73$) (Figura 15B).

Em CA2 foi encontrada diferença estatística no número de células IR-CR entre os grupos salina ($35,0 \pm 11,3$) e melatonina ($60,3 \pm 9,2$) ($p=0,03$). Por outro lado não houve diferença estatística entre os grupos: salina ($35,0 \pm 11,3$) e LPS ($52,0 \pm 8,1$) ($p=0,18$); salina ($35,0 \pm 11,3$) e melatonina ($46,3 \pm 7,0$) ($p=0,46$); LPS ($52,0 \pm 8,1$) e melatonina ($60,3 \pm 9,2$) ($p=0,68$); LPS ($52,0 \pm 8,1$) e LPS+Mel ($46,3 \pm 7,0$) ($p=0,86$); melatonina ($60,3 \pm 9,2$) e LPS+Mel ($46,3 \pm 7,0$) ($p=0,30$) (Figura 15C).

Na região de CA3, houve diferença estatística no número de células IR-CR entre os grupos: salina ($34,3 \pm 2,5$) e LPS ($54,0 \pm 4,3$) ($p=0,004$). Por outro lado, não houve diferença entre os grupos salina ($34,3 \pm 2,5$) e LPS+Mel ($38,6 \pm 5,0$) ($p=0,69$), indicando que a melatonina pode ter revertido o efeito do LPS. Também houve diferença entre os grupos: salina ($34,3 \pm 2,5$) e melatonina ($56,6 \pm 6,3$; $p=0,002$); LPS ($54,0 \pm 4,3$) e LPS+Mel ($38,6 \pm 5,0$) ($p=0,018$); melatonina ($56,6 \pm 6,3$) e LPS + Mel ($38,6 \pm 5,0$) ($p=0,007$). Não houve diferença entre os grupos LPS ($54,0 \pm 4,3$) e melatonina ($56,6 \pm 6,3$) ($p=0,90$) (Figura 15D).

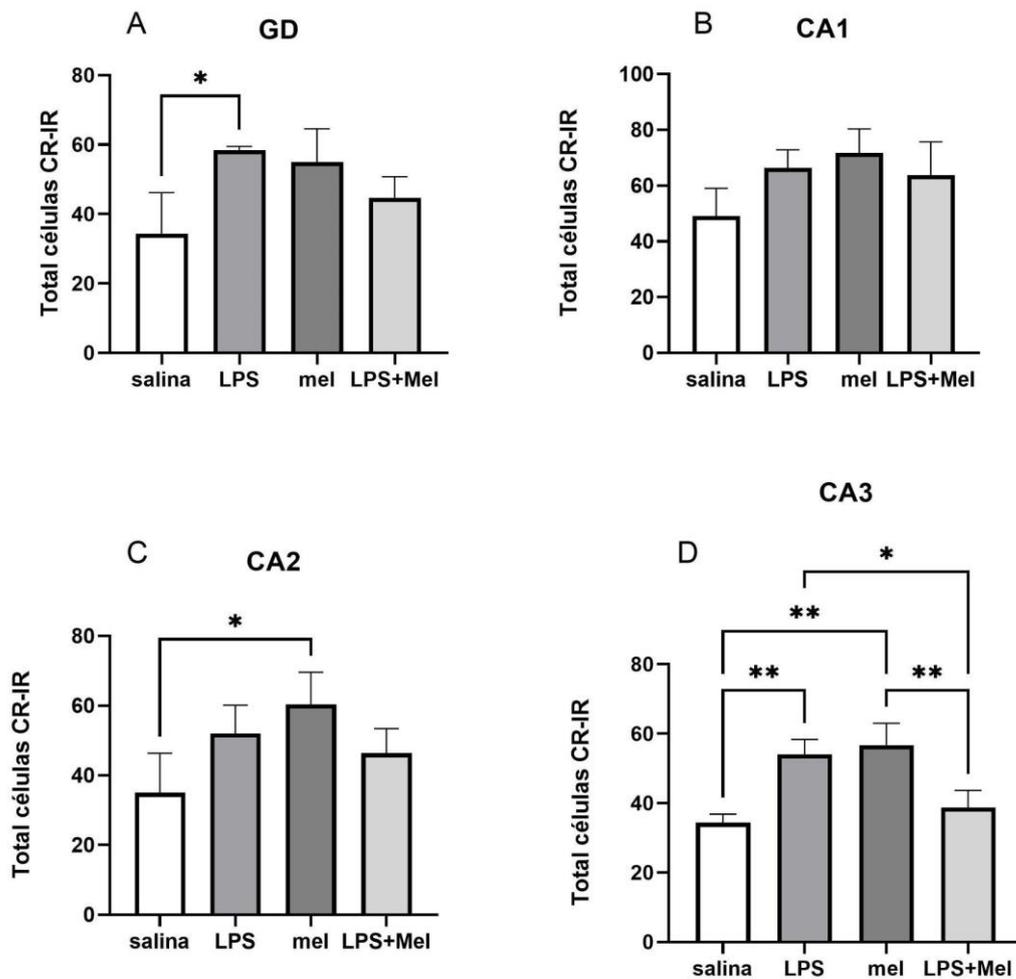


Figura 15. Gráficos comparativos do total de células CR-IR entre os grupos salina, LPS, melatonina (mel) e LPS+Mel. Em A, na região do giro denteado (GD). Em B na região de CA1. Em C está representada a região de CA2 onde houve diferença entre os grupos salina e melatonina. Em D a região de CA3 onde há diferença entre os grupos salina e LPS, salina e mel, mel e LPS+Mel e LPS e LPS+Mel.* significa $p < 0.05$.** significa $p < 0.01$.

Na análise da expressão de RNAm do receptor de melatonina MT1 no hipocampo, não houve diferença entre a prole dos diferentes grupos. Quanto ao MT2, a prole do grupo LPS apresentou menor valor do RNAm relativo ($0,16 \pm 0,12$) no hipocampo que no grupo salina ($1,18 \pm 0,7$) ($p < 0,05$). No grupo de animais compostos pela prole de fêmeas prenhes tratadas com melatonina ou LPS+MEL não foi encontrada diminuição na expressão dos receptores MT2 em relação ao grupo salina ($1,10 \pm 0,29$), mostrando que o tratamento com melatonina reverteu o efeito do LPS (Figura 16).

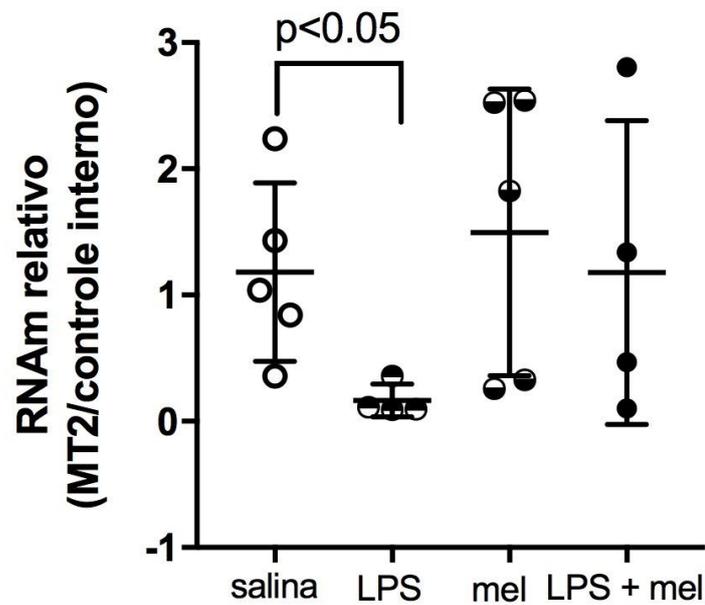


Figura 16. Expressão de RNA mensageiro do receptor de melatonina MT2 no hipocampo da prole, nas quais as fêmeas foram submetidas aos diferentes tratamentos. A prole do grupo LPS apresentou menor expressão de RNA mensageiro para o receptor de melatonina MT2 em relação ao grupo salina ($P < 0,05$), $N=5$ por grupo.

Na análise da expressão de RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) não foi observado diferença estatística entre os grupos salina ($1,74 \pm 1,90$) e LPS ($1,28 \pm 0,99$) ($p= 0,98$). Também não foi encontrada diferença estatística entre os grupos salina ($1,74 \pm 1,90$) e melatonina ($3,27 \pm 3,60$) ($p= 0,66$) ou nas demais comparações entre os grupos: salina ($1,74 \pm 1,90$) e LPS+Mel ($1,61 \pm 0,71$) ($p= 0,97$); LPS ($1,28 \pm 0,99$) e melatonina ($3,27 \pm 3,60$) ($p= 0,46$); LPS ($1,28 \pm 0,99$) e LPS+Mel ($1,61 \pm 0,71$) ($p= 0,99$); melatonina ($3,27 \pm 3,60$) e LPS+Mel ($1,61 \pm 0,71$; $p= 0,42$) (Figura17).

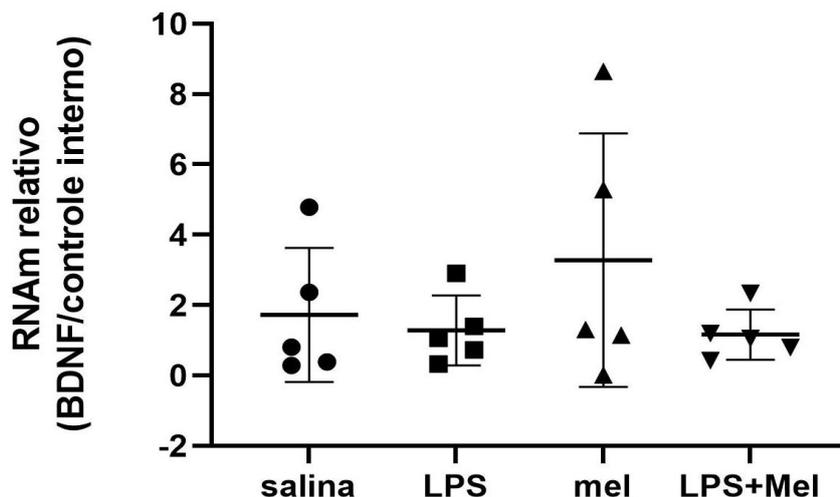


Figura 17. Expressão de RNA mensageiro do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo da prole de ratas submetidas a administração de salina, LPS, melatonina (mel) ou LPS em associação com melatonina (LPS + mel) no período gestacional. N=5 ratos machos por grupo.

7. DISCUSSÃO

Modelos animais que mimetizam quadros inflamatórios pré-natais são importantes para se elucidar os mecanismos envolvidos nos sintomas encontrados nos transtornos do neurodesenvolvimento (EIKELENBOOM et al., 2002; QIN et al., 2007; WANG et al., 2013; DEAN et al., 2015; ZHAO et al., 2019).

No presente estudo, a injeção de LPS em ratas prenhes foi utilizada como modelo de inflamação pré-natal para análise de parâmetros comportamentais, neuroquímicos e moleculares da prole associados ou não ao tratamento com melatonina. Porém, antes de analisar tais parâmetros na prole, foi feita uma caracterização dos efeitos deste quadro na rata prenhe.

O primeiro parâmetro analisado foi o peso corporal das ratas. O ganho de peso observado no período pré-tratamento durante a gestação já era esperado considerando-se que durante a gestação, o organismo materno sofre uma série de modificações com a finalidade de proteger e proporcionar condições adequadas para o desenvolvimento fetal (AJUOGU et al., 2020). Após a injeção do LPS as ratas apresentaram menor ganho de peso em relação ao grupo salina sendo que as fêmeas do grupo LPS apresentaram um platô na curva de ganho de peso logo nos primeiros dias após a administração o que não ocorreu no grupo salina.

Estudos anteriores mostraram que, de fato, durante um período de 24 a 48 horas após a administração da endotoxina LPS, os animais podem apresentar redução no peso corporal (AVITZUR; SHERIDAN, 2009; MORA et al., 2021) e que após este período ocorre o restabelecimento da homeostase do organismo e os animais voltam a ganhar peso seguindo o padrão do grupo controle (MORA et al., 2021). Em estudos com outros modelos de inflamação em ratas prenhes com peptídeo viral polil:C, o mesmo resultado foi encontrado, com redução no peso corporal nas primeiras 48 horas quando comparados ao grupo que recebeu somente salina (LINS et al., 2018).

Dessa forma, o presente estudo, assim como os estudos da literatura mostrou um efeito transitório de redução no ganho de peso em ratas prenhes expostas a toxinas provavelmente devido ao processo inflamatório gerado o qual leva a alterações fisiológicas e comportamentais como a febre, anorexia, diminuição da interação social, redução na atividade exploratória e outras alterações endócrinas e metabólicas (POON et al., 2015; KAZLAUSKAS et al., 2016).

Sabe-se também que o quadro inflamatório gerado nas ratas pode influenciar estruturas encefálicas de controle do metabolismo como o núcleo supraquiasmático dentre outros núcleos hipotalâmicos e a glândula pineal que conhecidamente participam dos processos metabólicos e estão sujeitos às ações das citocinas inflamatórias (GUISSONI CAMPOS et al., 2017; AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018).

Com relação aos efeitos da administração de melatonina neste modelo foi possível observar que o grupo LPS+melatonina apresentou maior ganho de peso em relação ao grupo LPS e não apresentou diferença em relação ao grupo salina o que sugere uma reversão dos efeitos do LPS com o tratamento com a melatonina. Estudos anteriores mostraram que a melatonina é capaz de reduzir alguns dos efeitos desencadeados pelo LPS (ARIOZ et al., 2019) provavelmente devido a sua função antiinflamatória (REITER; TAN; GALANO, 2014; GUAN et al., 2021).

O grupo de ratas que não sofreu a indução do quadro inflamatório e recebeu o tratamento com melatonina não apresentou diferença no ganho de peso corporal em relação ao grupo controle sem tratamento com melatonina. Porém, ao se analisar individualmente as curvas de ganho de peso percebe-se uma estabilização no ganho de peso nos primeiros dias de administração da melatonina. Sabe-se que entre as funções da melatonina endógena está a modulação do gasto e consumo energético (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018) e que quando administrada, ela apresenta propriedades

antiobesogênicas (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018). A modulação de vias de regulação do apetite e também de mecanismos bioquímicos resultam na redução do peso corporal e na otimização do gasto energético e mobilização do tecido adiposo o que também influencia na redução do peso corporal (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018).

A hipótese de que a diminuição no ganho de peso das ratas prenhes tanto no grupo no qual foi administrado LPS quanto no grupo que recebeu melatonina ser devido a menor ingesta de alimentos quer seja pela expressão de comportamento doentio causado pelo LPS (FRITZ et al., 2020; SINGH et al., 2021) ou pela diminuição do apetite causada pela melatonina (AMARAL; CIPOLLA-NETO, 2018) não foi confirmada no presente estudo, já que a alteração no ganho de peso das ratas prenhes não coincidiu com alterações na ingesta de ração o que vai de encontro a resultados de estudos que mostraram que em camundongos expostos ao LPS não houve alteração na ingesta de ração (PEARSON et al., 2020) e contra resultados de estudos que mostraram que pode ocorrer um quadro de anorexia levando a uma redução no consumo de ração por parte dos animais por 24 ou 48 horas após o LPS e volta ao consumo normal após este período (POON et al., 2015; BAO; HOFKINK; PLOSCH, 2022).

Quanto à ingesta hídrica, os resultados do presente estudo mostraram redução no consumo de água das ratas prenhes após a administração do LPS corroborando com dados da literatura que mostraram diminuição (DUBOS; SCHAEDELER, 1961) ou nenhuma alteração (PEARSON et al., 2020; VAN BEUSECUM et al., 2019) na ingestão de água em camundongos expostos ao LPS.

Quanto a alteração no desempenho reprodutivo das fêmeas dos diferentes grupos os resultados do presente estudo não mostraram diferença em relação ao número de filhotes por ninhada diferindo de estudos anteriores onde houve uma perda maior de implantação e uma menor porcentagem de fetos vivos em ratas as quais foram submetidas ao tratamento com LPS (KIRSTEN, 2017) e em camundongos, onde houve maior taxa de reabsorção fetal no grupo de fêmeas expostas ao LPS durante a gestação (BAO; HOFKINK; PLOSCH, 2022).

Quanto aos parâmetros da prole, não houve diferença no peso da prole entre os grupos salina e LPS nos dias pós-natais PN3, PN21 e PN30. Porém, no PN60, a prole do grupo LPS apresentou maior peso quando comparado ao grupo salina e esta diferença não foi mais observada quando os mesmos animais atingiram o PN70. Há uma diversidade de resultados na literatura com estudos que apontam tanto para ganho quanto para perda

de peso da prole de animais submetidas a desafios imunológicos ao longo da gestação. Quando presentes, os efeitos podem se expressar na prole logo após o nascimento e perdurar ou não ao longo do desenvolvimento (SPENCER et al., 2007; BURDICK et al., 2017; BAO; HOFKINK; PLOSCH, 2022).

Em alguns estudos, foi observado que ao administrar o LPS, houve aumento no peso dos animais em um período de 4 a 12 semanas após o nascimento (NILSSON et al., 2001; BURDICK et al., 2017). Também já foi demonstrado que o metabolismo lipídico foi alterado em prole provenientes de fêmeas exposta ao LPS durante a gestação o que foi representado por aumento na deposição de gordura acarretando aumento de peso ao nascimento (PACHECO-LÓPEZ et al., 2013).

Na prole das ratas que receberam melatonina na gestação houveram diferenças de peso para mais ou para menos em relação ao grupo que recebeu salina no PN3 e no P30. Porém, quando os animais atingiram o PN60 e no PN70 não foi mais encontrada diferença entre os grupos. Outros estudos com diferentes modelos experimentais de inflamação pré-natal também não encontraram efeito permanente da melatonina administrada na rata prenhe no peso da prole (CHEN et al., 2006).

No modelo utilizado no presente estudo ocorrem altos níveis de citocinas inflamatórias circulantes tanto no organismo materno quanto na prole em desenvolvimento visto que essas moléculas são capazes de transpassar a barreira placentária. Considerando que essas moléculas estão associadas a anormalidades encefálicas da prole, como aumento do líquido nas estruturas ventriculares e diminuição do volume das estruturas corticais (SPENCER et al., 2007), o presente estudo investigou se a injeção de LPS na fêmea prenhe alteraria o peso dos encéfalos da prole. Os resultados não confirmaram esta hipótese, assim como estudos anteriores que também não encontraram diferenças no tamanho e no peso dos encéfalos da prole de ratas que foram submetidas a desafios imunológicos durante a gestação tanto com o polil:C quanto com o LPS (SPENCER et al., 2007; LINS et al., 2018).

Quanto às alterações comportamentais encontradas no modelo animal utilizado no presente estudo são conhecidas, dentre outras a diminuição da vocalização e da socialização, e o comportamento repetitivo / restrito (KIRSTEN et al., 2012; WANG et al., 2013; KIRSTEN et al., 2015; KIRSTEN; BERNARDI, 2017). Em estudo anterior realizado pelo nosso grupo (SPILLA, 2018), foi demonstrado que este modelo apresenta

também alterações na memória espacial que utiliza como princípio paradigmas de escolha no teste do labirinto em T (CHAG; COLE; COSTA, 2017; DEACON; RAWLINS, 2006).

A capacidade do animal alternar é intrínseco à espécie, essa função depende da preservação da memória espacial e permite que ele possa explorar locais diferentes evitando assim retornar a locais onde já havia visitado. Dessa forma, essa capacidade promoveria uma redução no gasto energético evitando o retorno dos animais locais previamente visitados (LALONDE, 2002). Ao insistir em visitar o mesmo braço do labirinto pode-se sugerir que o animal apresenta alterações na memória espacial e/ou um comportamento restritivo/repetitivo em decorrência de alterações no funcionamento de estruturas encefálicas responsáveis por estas funções (LALONDE, 2002; EDALATMANESH et al., 2013).

Entre as estruturas encefálicas responsáveis pelo desempenho nesse processo está o hipocampo, fundamental nos processos como o de memória e aprendizado. (LALONDE, 2002). Assim, animais que apresentam um bom funcionamento hipocampal apresentam a memória espacial preservada e com isso mantém a alternância frente a paradigmas de labirintos que se apresentam para realizá-los. Quando essa estrutura está prejudicada, há comprometimento nessa função (BROADBENT; SQUIRE; CLARK, 2004).

No presente estudo, a prole das fêmeas injetadas com LPS apresentaram pior performance neste teste em relação ao grupo controle composto pela prole das ratas que receberam injeção de salina na gestação mostrando que a exposição materna ao LPS na fase gestacional leva a prole masculina a apresentar problemas em relação a memória espacial e/ou comportamento repetitivo / restrito exemplificado pela inflexibilidade cognitiva por meio do uso do teste de alternância espontânea no labirinto em T. Isto independe da análise ter sido feita nas primeiras ou últimas tentativas o que descarta a hipótese de alguma interferência por fator motivacional do animal (DEACON; RAWLINS, 2006). Dados da literatura também demonstraram que a prole de fêmeas expostas a toxinas no período gestacional, apresentaram dentre os déficits comportamentais a redução da alternância espontânea do teste do labirinto em T (CHAG; COLE; COSTA, 2017; DEACON; RAWLINS, 2006; CHAG; COLE; COSTA, 2017; KIRSTEN et al., 2019).

A ativação imune materna via administração intraperitoneal de LPS em camundongo também mostrou na prole diminuição no comportamento de alternância espontânea no teste do labirinto em Y (PARROTT et al., 2016).

Desafios imunológicos induzidos pelo uso de LPS levam a um aumento na produção de citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, ciclooxigenase (COX)-2 e óxido nítrico (REBAI; JASMIM; BOUDAH, 2021).

O hipocampo pode ser uma das áreas encefálicas impactadas pela excessiva quantidade de citocinas inflamatórias acarretando em prejuízos em funções como a memória (REBAI; JASMIM; BOUDAH, 2021). Estudos mostram que o LPS leva a uma desorganização das células piramidais e atrofia dendrítica o que interfere no processamento neurais como é o caso da potenciação de longa duração (LTP) fundamental para a conectividade e formação da memória espacial (KOLESKE, 2013; VOJTCHOVA et al., 2018; ANO et al., 2019).

Quanto à nossa hipótese de que o tratamento com a melatonina reverteria essa alteração no comportamento da prole, no presente estudo foi possível avaliar que os animais do grupo melatonina e LPS + melatonina apresentaram um melhor desempenho no teste de memória espacial, com menos erros (repetições) quando comparados ao grupo LPS e sem diferença em relação ao controle (salina). O mecanismo pelo qual a melatonina é capaz de agir sobre os déficits cognitivos ainda vem sendo estudado e dessa forma a literatura nos fornece bases que indicam alguns caminhos a serem explorados. O primeiro se relaciona com o seu papel sobre a LTP (BAUMAN, 2012) e o segundo mediante ao seu efeito antioxidante e antiinflamatória (SHAH et al., 2017).

Quanto às suas propriedades antiinflamatórias já foi demonstrado que a melatonina pode controlar a inflamação provocada pelo LPS (CARRASCO et al., 2013). A melatonina pode levar ao aumento na produção de citocinas antiinflamatórias e ainda a inibição de outros fatores pró-inflamatórios como a COX, prostanoídes e leucotrienos além das moléculas de adesão e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (DENG et al., 2006; REBAI; JASMIM; BOUDAH, 2021).

Em estudo anterior, utilizando também um modelo de inflamação pré-natal com LPS a administração de dose única de melatonina 25mg no dia anterior a administração do LPS resultou em efeito neuroprotetor e uma redução dos danos cognitivos na prole (DOMÍNGUES et al., 2017).

Já foi observado que a utilização de antioxidantes previamente a administração de LPS foi capaz de atenuar o impacto de mediadores inflamatórios no tecido nervoso (ZHAO et al., 2019; SANGCHART et al., 2021).

Quanto a sua atuação no LTP, de fato, o efeito direto da melatonina quando administrada em modelos com déficits cognitivos já foi demonstrado (MUKDA et al., 2016; SHAH et al., 2017).

Sabe-se que muitas das funções da melatonina são exercidas via receptores, incluindo sua função neuroprotetora e modulação das funções hipocampais (PANDI-PERUMAL et al., 2008; LACOSTE et al., 2015; PINATO et al., 2015; OSIER et al., 2017; MUSSHOF et al., 2022). Além disso, em vários quadros neuropatológicos ocorrem alterações na quantidade e funcionalidade de seus receptores (OSIER et al., 2017; ROCHA et al., 2017; LIU et al., 2013; PERMPOONPUTTANA et al., 2018) incluindo o TEA (PANDI-PERUMAL et al., 2008; CHASTE; LEBOYER, 2012; NIKOLAEV; ROBEVA; KONAKCHIEVA, 2021) e quadros de alterações em processos de aprendizagem e memória (JILG et al., 2019).

Assim, foi investigada no presente estudo a hipótese de que a expressão gênica dos receptores de melatonina MT1 e MT2 poderia estar alterada neste modelo.

Apesar de ser conhecido que o LPS pode gerar alterações na expressão gênica de diversos receptores (KOWALEWSKA et al., 2017) no presente estudo, a análise da expressão gênica do RNAm do receptor de melatonina MT1 no hipocampo não mostrou diferença entre os grupos. A literatura mostra uma variabilidade de resultados em relação à expressão do MT1 com aumento na expressão em um modelo de administração de ácido valpróico em ratos (BAHNA; NILES, 2018) e redução em modelo de inflamação induzida por LPS em fatias do encéfalo de camundongos. Neste mesmo modelo foi demonstrado que o tratamento prévio com melatonina reverteu os efeitos do LPS e esta ação antiinflamatória se deu via ação dos receptores de melatonina (LIU et al., 2022).

No presente estudo foi encontrada redução na expressão do receptor MT2 no grupo LPS em relação ao grupo salina. O receptor MT2 apresenta um importante papel ao influenciar a atividade do sistema GABAérgico da região do hipocampo. Ao ser ativado, esse receptor é capaz de influenciar esse sistema regulando o funcionamento dessa circuitaria local. A menor expressão do MT2 no grupo LPS sugere uma diminuição dos mecanismos de controle desse sistema o que poderia levar a uma elevação na taxa de

ativação desses neurônios levando a uma hiperestimulação neuronal (DUBOCOVICH et al., 2003; EMET et al., 2016).

Outros estudos demonstraram modelos animais que mimetizam quadros neuroinflamatórios e neurodegenerativos que apresentaram uma diminuição de receptores MT2 no hipocampo, e sugeriram a relação deste receptor com quadros de disfunção cognitiva (PANDI-PERUMAL et al., 2008; SANCHEZ-HIDALGO et al., 2009; PERMPOONPUTTANA et al., 2018). Em um modelo animal para epilepsia foi observado um aumento inicial na expressão de MT2 durante a fase aguda e após esse período uma redução nos níveis desse receptor no hipocampo (ROCHA et al., 2017). Em um outro modelo de déficits cognitivos em ratos idosos também houve redução na expressão de MT2 no hipocampo (LIU et al., 2013).

Confirmando a função do MT2 na memória espacial, no presente estudo, quando as fêmeas prenhes foram tratadas com melatonina o LPS não causou redução na expressão dos receptores MT2 e estes animais não apresentaram diminuição na performance do labirinto em T.

A análise da neuroquímica do hipocampo mostrou aumento na quantidade de células IR-CR no hipocampo na região do GD e em CA3 no grupo LPS. Uma das principais ligantes de cálcio, a calretinina está presente em interneurônios inibitórios classificados como GABAérgicos e tem como principais funções a regulação do fluxo do cálcio, a participação nos dos processos relacionados à plasticidade das sinapses e o controle da excitabilidade de outros neurônios hipocampais(KOVÁCS-ÖLLER et al., 2019). Diversas funções desempenhadas pelo tecido nervoso estão associadas aos mecanismos de comunicações resultantes do sistema GABAérgico como é o caso dos processos intrínsecos de regulação e controle da atividade das células nervosas (COGHLAN et al., 2012; WU; SUN, 2015). Dessa forma foi possível observar que o ambiente inflamatório desencadeado pela exposição materna ao LPS promoveu alterações em algumas classes de neurônios hipocampais durante o desenvolvimento embrionário com consequente alteração nas vias de comunicações sinápticas nessa estrutura.

As células CR-IR são fundamentais para o equilíbrio dos mecanismos de excitação e inibição das sinapses. Trata-se de uma ligante de cálcio fundamental para a neurogênese hipocampal especificamente na região do giro denteado. A literatura já sugere a desregulação desses mecanismos em doenças neuropsiquiátricas e

neurodegenerativas como é o caso da esquizofrenia e do TEA (ADORJAN et al., 2017). Disfunções nesse sistema de comunicação entre os neurônios já foram relatadas em quadros que acometem o neurodesenvolvimento como o observado no TEA. O maior conhecimento do papel dessas proteínas na intrincada rede envolvida na circuitaria hipocampal pode ser a chave para o entendimento das características comportamentais presentes em indivíduos que apresentam esses quadros e o comprometimento de suas funções como é o caso da memória e aprendizagem.

Devido a sua presença no meio intracelular, como mostra a literatura, o cálcio exerce papel fundamental em diversas funções sendo fundamental na sinalização celular e também em diversos processos como os de proliferação, diferenciação e sobrevivência neuronal (MATYSEK et al., 2022). Outros processos como a formação e aquisição de memória também cursam com vias que acabam por ter esse íon influenciando etapas importantes nestes processos (MATYSEK et al., 2022). Visto seu importante papel nesses processos, qualquer fator que possa vir a afetar a homeostase do cálcio no tecido nervoso, pode resultar em reações que possam levar as células nervosas a ficarem com suas funções comprometidas ou mesmo a morte celular (MATYSEK et al., 2022).

A administração da melatonina inibiu esse efeito do LPS, demonstrando mais uma vez que esta suplementação nas ratas prenhes preveniu diversas alterações teciduais no sistema nervoso em desenvolvimento que acarreta sintomas decorrentes de transtornos do neurodesenvolvimento. Vale ressaltar que ao controlar o quadro inflamatório, a administração de melatonina exógena inibiu o bloqueio da melatonina endógena o que por si já seria importante para o neurodesenvolvimento já que a melatonina é considerada uma molécula importante na modulação da organização do citoesqueleto, na sinalização do cálcio e no desenvolvimento neuronal (DE FARIA et. al, 2011).

Considerando-se que os fatores cerebrais como o BDNF desempenham um papel importante em quadros de quebra de homeostasia do organismo que poderiam a vir a alterar as estruturas nervosas e assim produzindo modificações permanentes na circuitaria das estruturas encefálicas (CHAN; TONG; YIP, 2008) e ainda, que outro importante papel do BDNF está relacionado com os mecanismos de transmissão sináptica e o potencial de longa duração LTP, um dos processos relacionados à formação da memória (HENSCH; BILIMORIA, 2012), no presente estudo foi avaliada a expressão do BDNF no hipocampo das proles dos diferentes grupos experimentais.

Na análise da expressão gênica do RNAm para o BDNF não foram observadas diferenças entre os diferentes grupos analisados. Cabe ressaltar que ao analisarmos os indivíduos presentes em cada um dos grupos podemos observar que a quantificação do RNAm do BDNF apresentou uma grande variação. Esta variação intra grupo pode ter sido determinante para as diferenças entre os grupos não serem estatisticamente significantes. Com o intuito de minimizar tal variação, futuros estudos devem explorar esta análise em grupos com um maior número de animais ou na prole logo após o nascimento.

8. CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que: (1) O quadro inflamatório gestacional em ratas prenhes levou a alterações no peso corporal e na ingesta hídrica, sem alterar a ingesta de alimento desses animais e o tratamento com melatonina reverteu estas alterações. (2) A prole das ratas prenhes com quadro inflamatório gestacional mostrou alteração no teste de memória espacial, aumento na imunorreatividade da calretinina e diminuição na expressão dos receptores MT2 em neurônios do hipocampo. (3) A prole das ratas prenhes com quadro inflamatório gestacional não mostrou alteração na expressão dos receptores MT1 ou do BDNF no hipocampo. (4) A melatonina quando ofertada previamente e após o desafio imunológico durante o período gestacional e não permitiu a diminuição na expressão do receptor MT2 e o aumento da imunorreatividade da calretinina em neurônios no hipocampo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALPÁR, A. et al. The renaissance of Ca²⁺-binding proteins in the nervous system: secretagoin takes centre stage. **Cellular signalling**, v.24, n.2, p.378-87, 2012.

AJUOGU, P.K. et al. Effect of low- and high-protein maternal diets during gestation on reproductive outcomes in the rat: a systematic review and meta-analysis. **J Anim Sci.** v.1, p.98, 2020.

ALTMAN, J.; BRUNNER, R.L.; BAYER, S.A. The hippocampus and behavioral maturation. **Behav. Biol.**, v.5, p.557-96, 1973.

AMARAL, F.; CIPOLLA-NETO, J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. **Archive Endocrinology Metabolism**, v.62, n.4, p.472-479, 2018.

AMARAL, D.G.; WITTER; M.P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v.31, n. 3, 571-91, 1989.

American Psychiatric Association. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais-: DSM-5. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

ANO, Y. et al. Theaflavins Improve Memory Impairment and Depression-Like Behavior by Regulating Microglial Activation. **Molecules**. v.24, e.3, p.467, 2019.

ASPERGER, H. (1991). 'Autistic psychopathy' in childhood. In U. Frith (Ed.), **Autism and Asperger Syndrome**, p.37-92, 1991.

ATKINSON, R. C; SHIFFRIN, R. M. Human memory: A proposed system and its control processes. **Psychology of Learning and Motivation**, v.2, p. 89-195, 1968.

ARAÚJO, A. C.; NETO, F. N. A nova classificação americana para os transtornos mentais: o DSM-5. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva**, v. 16, n. 1, p. 67-82, 2014.

ARBUCKLE, T.E.; WILKINS. R.; SHERMAN, G.J. Birth weight percentiles by gestational age in Canada. **Obstet Gynecol.**v.81,n.1, p.39-48, 1993.

ARENDDT, J. Melatonin: Characteristics, concerns, and prospects. **J Biol Rhythms**, v.20, n.4, p. 291-303, 2005.

ARENDDT, J. Melatonin and human rhythms. **Chronobiology International**, v.29, p.21-37, 2006.

ARIOZ, B.I. et al. Melatonin Attenuates LPS-Induced Acute Depressive-Like Behaviors and Microglial NLRP3 Inflammasome Activation Through the SIRT1/Nrf2 Pathway. **Front Immunol.** v.2, n.10, p.1511. doi: 2019.

AVITSUR, R.; SHERIDAN, J.F. Neonatal stress modulates sickness behavior. **Brain Behav Immun.** v.23, n.7, p.977-85, 2009.

AUTISM AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES MONITORING NETWORK, UNITED STATES (CDC). Prevalence of Autism Spectrum disorders. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 58, p.57-66, 2009.

AYLWARD, E.H. et al. MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. **Neurology**, v. 53, p. 2145-50, 1999.

BADDELEY, A. D.; HITCH, G. J. Working memory. **The Psychology of Learning and Motivation**, v.8, p.47-89,1974.

BAO, M.; HOFSTINK, N.; PLÖSCH, T. LPS versus Poly I:C model: comparison of long-term effects of bacterial and viral maternal immune activation on the offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.322, n.2, p.99-111, 2022.

BAHNA, S.G.; NILES, L.P. Epigenetic regulation of melatonin receptors in neuropsychiatric disorders. **Br J Pharmacol.** v.175, n.16, p.3209-3219, 2018.

BARRETO, D. D. C. C. A área hipocampal CAI é essencial para a memória similar à episódica. 2016.69f. Dissertação (Mestrado Neurociências Cognitiva eComportamento), Universidade Federal da Paraíba UFPB – João Pessoa –PB, 2016.

BARNETT, J. E. HART.; CLEARY, SHANNON. Evidence-Based Mathematics Interventions for Students with Autism Spectrum Disorders: A Meta-Analytic Review. **Annual "Education and Training in Autism and Developmental Disabilities"** v.50, n.2, p.172-185, 2015.

BASTOS, Priscilla Rachel Oliveira. **Inflamação sistêmica induzida por LPS em anuros da espécie *Rhinella icterica*: efeito sobre os mediadores inflamatórios citocinas, corticosterona e melatonina.** 2017. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

BAUMAN, N. L. Melatonin and Its Effect on Learning and Memory. **The Science Journal of the Lander College of Arts and Sciences**, v.6, n.1, 2012.

BERNARDI, M.M.; KIRSTEN, T.B.; TRINDADE, M.O. Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: uma revisão. **Rev Neurocienc.**, v.20, n.1, p.117-27, 2012.

BERRIDGE MJ. Neuronal calcium signaling. **Neuron**. v.21, n.1, p.13-26, 1998.
Bertagna, Natalia Bonetti. **Avaliação do hipocampo nas respostas comportamentais e celulares de camundongos submetidos a modelos de ansiedade.** Universidade Federal de Uberlândia 78.2018.

BILBO, S.; SMITH, S.; SCHWARZ, J. A lifespan approach to neuroinflammatory and cognitive disorders: a critical role for glia. **J Neuroimmune Pharmacol**. v.7, e.1, p.24-41, 2012.

BOUTIN, J.A.; LEGROS, C. The five dimensions of receptor pharmacology exemplified by melatonin receptors: An opinion. **Pharmacol Res Perspect.**, v.8, n.1, p.00556, 2019.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: a review of findings from animal models. **Brain Behav Immun.**, v.24, n.6, p.881-97, 2010.

BONNEY, E. A. et al. Differential senescence in feto-maternal tissues during mouse pregnancy. **Placenta**. v.43, p.26-34, 2016.

BRIMBERG, L. et al. Caspr2-reactive antibody cloned from a mother of an ASD child mediates an ASD-like phenotype in mice. **Mol Psychiatry**. v.21, n.12, p.1663-1671, 2016.

BRAAM, W. et al. Low maternal melatonin level increases autism spectrum disorder risk in children. **Res Dev Disabil.** , v. 18, p. 42-8, 2018.

BLATT, G.J. The neuropathology of autism. **Scientifica (Cairo)**. v.2012, n.703, p.675, 2012.

BROADBENT, N.; SQUIRE, L.; CLARK, R. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.101, e.40, p.1415-14520, 2004.

BRUGHA, T. S. et al. Epidemiology of autism spectrum disorders in adults in the community in England. **Archives of general psychiatry**, v.68, n.5, p.459-65, 2011.

BUBENIK, G.; Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Digestion*. **Disturbie Science**, v.47, p.2336–2348, 2012.

BURD, I.; BALAKRISHNAN, B.; KANNAN, S. Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, p.287 - 95, 2012.

BURDICK SANCHEZ, N.C. et al. Exposure to lipopolysaccharide in utero alters the postnatal metabolic response in heifers. **J Anim Sci.** v.95, n.12, p.5176-5183, 2017.

CAMMALLERI, M.; BAGNOLI, P.; BIGIANI, A. Molecular and Cellular Mechanisms Underlying Somatostatin-Based Signaling in Two Model Neural Networks, the Retina and the Hippocampus. **Int J Mol Sci.** v.20, n.10, p.2506, 2019.

CAMPOS, L. M. G.; CRUZ-RIZZOLO R. J.; PINATO, L. The primate seahorse rhythm. **Brain Research**, v.1613, p. 81 - 91, 2015.

CARRASCO, C. et al. Anti-Inflammatory Effects of Melatonin in a Rat Model of Caerulein-Induced Acute Pancreatitis. **Cell Biochem. Funct.** v.31, p.585–590, 2013.

CECO, E. **Fator de Transcrição NFkB em glândulas Pineais de Ratos F74.** Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, 2010.

CECON, E.; OISHI, A.; JOCKERS R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. **Br J Pharmacol.**, v.175, n.16, p.3263-3280, 2018.

CEZAR, L. et al. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. *Prog. Neuropsychopharmacol.* **Biol. Psychiatry** v.84, p.173-180, 2018.

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. Melatonin as an hormone: New physiological and clinical insights. **Endocrine Reviews**, 2018.

CHANG, Y.; COLE, T.; COSTA, L. Behavioral Phenotyping for Autism Spectrum Disorders in Mice. **Curr Protoc Toxicol.** v.72, e.11, p.1-11, 2017.

CHADMAN, K. Animal models for autism in 2017 and the consequential implications to drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v.12, n.12, p. 1187-1194, 2017.

CHANDLER, C.E.; ERNST, R.K. bacterial lipids: powerful modifiers of the innate immune response. **F1000 Research.**, v.6, p. 1-11, 2017.

CHASTE, P. et al. Identification of pathway-biased and deleterious melatonin receptor mutants in autism spectrum disorders and in the general population. **PLoS One.**, v.5, n.7, p.11495, 2010.

CHASTE, P.; LEBOYER, M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. **Dialogues Clin Neurosci.** v.14, n.3, p.281-92, 2012.

CHEN, J.A. et al. The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. **Annu Rev Pathol.**, v.10, p.111- 44, 2015.

CHEZ, M. G. et al. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. **Pediatr. Neurol.**,v.36, n.6, p.361- 65, 2007.

CHEN, Y.H. et al. Melatonin protects against lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and growth retardation in mice. **J Pineal Res.** v.40, n.1, p.40-7, 2006.

CHIAROTTI, F.; VENEROSI, A. epidemiology of autism spectrum disorders: a review of worldwide prevalence estimates since 2014. **brain sci.** v.10, n.5, p.274, 2014.

CHO, H. et al. Changes in brain metabolic connectivity underlie autistic-like social deficits in a rat model of autism spectrum disorder. **Sci Rep** v.7, p.13213, 2017.

CHOI J. et al. Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. **PLoS One.** v.13, n.2, 2018.

CONSTANTINO, J.N.; MARRUS, N. The early origins of autism. **Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.**, v, 26, n.3, p. 555-70, 2017.

COSTA, F.A.S. et al. Síndrome da rubéola congênita: revisão de literatura. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 2, n. 1, p. 46-57, 2013.

COURCHESNE, E. et al. Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. **N Engl J Med** v.318, p.1349–1354, 1988.

CRISTIANO, C., et al. Palmitoylethanolamide counteracts autistic-like behaviours in BTBR T+ tf/J mice: Contribution of central and peripheral mechanisms. **Brain, behavior, and immunity**, v. 74, p. 166-175, 2018.

CUNHA, Jinger do Carmo . **Estudo da imunorreatividade das proteínas ligantes de cálcio na neuroquímica da medula espinal de ratos submetidos à atividade física espontânea na roda de corrida**. Universidade de São Paulo. 78, 2008.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF- kB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40-43, 2010a.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. et al. TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. **J Pineal Res.**, v.49, n.2, p.183-92, 2010b.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. Glia-Pinealocyte network: The paracrine modulation of melatonin synthesis by tumor necrosis factor (TNF). **Plos One**, v. 7, p. 401-42, 2012.

DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S. et al. Disrupted nocturnal melatonin in autism: Association with tumor necrosis factor and sleep disturbances. **J Pineal Res.** v.70, n.3, 2021.

DANTZER, R. Expression and action of cytokines in the brain: Mechanisms and pathophysiological implications. **In Psychoneuroimmunology**, v.1, p.271-80, 2007.

DANTZER R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Immunology and allergy clinics of North America**, v.29, n.2, p. 247-64, 2009.

D'MELLO, A.M. et al. Cerebellar gray matter and lobular volumes correlate with core autism symptoms. **Neuroimage Clin** v.7, p.631–639, 2015.

DEACON, R.M.; RAWLINS, J.N.T-maze alternation in the rodent. **Nat Protoc.**, v.1, n.1, p. 7-12, 2006.

DEAN, J. et al. A Critical Review of Models of Perinatal Infection. **Dev. Neurosci.** v.37, p.289-304, 2015.

DE FARIA POLONI, J.; FELTES, B.C.; BONATTO, D. Melatonin as a central molecule connecting neural development and calcium signaling. **Funct Integr Genomics.**, v.3, p.383-8, 2011.

DEMETRIOU, E. A. et al. Autism spectrum disorders: a meta-analysis of executive function. **Mol Psychiatry.** v.23, n.5, p.1198-1204, 2018.

DEMEULEMEESTER, H. et al. Calbindin D-28K and parvalbumin immunoreactivity is confined to two separate neuronal subpopulations in the cat visual cortex, whereas partial coexistence is shown in the dorsal lateral geniculate nucleus. **Neurosci Lett.**, v.99, n.1-2, p.6-11, 1989.

DENG, W.G. et al. Melatonin Suppresses Macrophage Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Inhibiting P52 Acetylation and Binding. **Blood.** v.108, p.518–524, 2006.

DEVERMAN, B.; PATTERSON, P. Cytokines and CNS, **Development. Neuron**, v.61, p.61-78, 2009.

DIAS, B.F. et al. Relationship between visuospatial episodic memory, processing speed and executive function: are they stable over a lifespan?. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 76, p. 89-92, 2018.

DIAS, P. et al. Late Brain Involvement after Neonatal Immune Activation. **Biomedicine Research Internacional**, 2019.

DINARELLO, C.A. Historical review of cytokines. **European journal of immunology**, v.37, 2007.

DOMINGUEZ-ALONSO, A. et al. Melatonin stimulates dendrite formation and complexity in the hilar zone of the rat hippocampus: participation of the ca⁺⁺/calmodulin complex. **Int J Mol Sci.**, v.16, p.1907–1927, 2015.

DOMÍNGUEZ, R. A.P. et al. Maternal administration of melatonin exerts short- and long-term neuroprotective effects on the offspring from lipopolysaccharide-treated mice. **J Pineal Res.**, v.63, n.4, p. 124-39, 2017.

DONOVAN, A.P.; BASSON, M.A. The neuroanatomy of autism - a developmental perspective. **J Anat.** v.230, n.1, p.4–15, 2017.

DUBOS, R.J.; SCHAEGLER, R.W. The effect of bacterial endotoxins on the water intake and body weight of mice. **J Exp Med.** 1961.

DUBOCOVICH, M.L. et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Front Biosci.**, v.8, .1093-108, 2003.

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States **Int J Parasitol.**, v.38, n.11, p.1257-78, 2008.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical Neuroscience Research**, v.6, n.1-2, p.52-68, 2006.

EDALATMANESH, M.A. et al. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. **Brain Res.**, v. 1526, p.15-25, 2013.

EDLOW, A. et al. Placental Macrophages: A Window Into Fetal Microglial Function in Maternal Obesity. **Int J Dev Neurosci.** v.77, p.60-68, 2019.

EICHENBAUM, H. et al. The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? **Neuron.**, v.23, n.2, p.209-26, 1999.

EICHENBAUM, H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. **Behavioural Brain Research.** v.127, n.1-2, p.199–207, 2001.

EIKELENBOOM, P. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. **Glia**, v.40, p.232-239, 2002.

EILAM-STOCK, T, et al. Neuroanatomical alterations in high-functioning adults with autism spectrum disorder. **Frontiers in Neuroscience**, v.10, p.237, 2016.

EL-SHERIF Y. et al. Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. **J Neurosci Res.** v.72, n.4, p.454-60, 2003.

ELSABBAGH, M. et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. **Autism Research.** v.5, n.3, p.160-179, 2012.

EMET, M. et al. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. **Eurasian J Med.**, v.48, n.2, p.135-41, 2016.

ESHRAGHI, A.A. et al. Epigenetics and Autism Spectrum Disorder: Is There a Correlation? **Front Cell Neurosci.** v.12, n.78, 2018.

ESPINOSA-OLIVA, A.M.; DE PABLOS, R.M.; HERRERA, A.J. Intracranial injection of LPS in rat as animal model of neuroinflammation. **Methods Mol Biol.**, v.1041, p.295-305, 2013.

ESTES, M. L.; MCALLISTER, K. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. **Science**, v. 353, n.6301, p.772-777, 2017.

FADINI, C.C. et al. Influence of sleep disorders on the behavior of individuals with autism spectrum disorder. **Front Hum Neurosci.**, n.9, p.347, 2015.

FELIX-ORTIZ, A.; TYE, K. Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. **Journal Neuroscience.** v.34, p.586–595, 2014.

FENG, X. et al. MicroRNA-138-5p Regulates Hippocampal Neuroinflammation and Cognitive Impairment by NLRP3/Caspase-1 Signaling Pathway in Rats. **J Inflamm Res.** v.14, p.1125-1143, 2021.

FERRARA, M. et al. Motor kinematic differences in children with autism spectrum disorder: ecological gameplay with a sensorised toy. **In: International Meeting for Autism Research**, 2016.

FIDELEFF, H. L. et al. Gender-related differences in urinary 6-sulfatoxymelatonin levels in obese pubertal individuals. **J Pineal Res.**, v.40, n.3, p.214-8, 2006.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. et al. Frequência das infecções pelo HIV-1, rubéola, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes simples, hepatite B, hepatite C, doença de Chagas e HTLV I/II em gestantes, do Estado de Mato Grosso do Sul. **RevSocBrasMedTrop.**, v.40, n.2, p.181-87, 2007.

FRANCIS, S. M. et al. Variants in adjacent oxytocin/vasopressin gene region and associations with ASD diagnosis and other autism related endophenotypes. **Frontiers in neuroscience**, v. 10, p. 195, 2016.

FRITZ, M. et al. Structural and biochemical imaging reveals systemic LPS-induced changes in the rat brain. **J Neuroimmunol.** v.348, n.5, p.773-67, 2020.

FREUND, T.F.; BUZSÁKI, G. Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus**, v.6, n.4, p.347- 470, 1996.

GABIS, L.V. et al. The myth of vaccination and autism spectrum. **Eur J Paediatr Neurol.** v.36, p.151-158, 2022.

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N.T. Autismo e doenças invasivas de desenvolvimento. **Jornal de pediatria**, v.80, n.2, p. 583-94, 2004.

GAGNON, K.; GODBOUT, R. Melatonin and Comorbidities in Children with Autism Spectrum Disorder. **Curr Dev Disord Rep.** v.5, n.3, p.197-206, 2018.

GASBARRI A. et al. Declarative memory retention and emotional stimuli. A study of an Italian sample. **Funct Neurol.** v.20, n.4, p.157-62, 2005.

GERLAI, R. A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice. A strain comparison and lesion study. **Behav Brain Res.**, n.1, p. 91-101, 1998.

GEVA-SAGIV M. et al. Spatial cognition in bats and rats: from sensory acquisition to multiscale maps and navigation. **Nature Review Neuroscience.** v.16, p.94–108 2015.

GIGANTE, A. D. **Estudo do hipocampo de portadores de transtorno afetivo bipolar após o primeiro episódio de mania através do uso da espectroscopia por ressonância magnética de próton (1H-ERM)**. 2013. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

GUAN, Q. et al. Mechanisms of Melatonin in Obesity: A Review. **Int J Mol Sci.** v.23, n.1p.218, 2021.

CAMPOS, L.M.G. et al. Suprachiasmatic nucleus and subordinate brain oscillators: clock gene desynchronization by neuroinflammation. **Neuroimmunomodulation**, v. 24, n. 4-5, p. 231-241, 2017.

GUNATA, M.; PARLAKPINAR, H.; ACET, H. Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. **Revist Neurology**, v.19, p.30882-30883, 2019.

GU C. et al. Microglial MT1 activation inhibits LPS-induced neuroinflammation via regulation of metabolic reprogramming. **Ageing Cell.** V.20, N.6, 2021.

HERBERT, M.R. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. **Curr Opin Neurol.**, v.23, n.2, p.103-10, 2010.

HINES, D. J. et al. Prevention of LPS-Induced Microglia Activation, Cytokine Production and Sickness Behavior with TLR4 Receptor Interfering Peptides. **PLoS ONE.**, v.8, n.3, p. 1-10, 2013.

HOF, P.R. et al. Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. **J.Chem. Neuroanat.**, v.16, p.77-116,1999.

HOL, E.M.; PEKONY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Curr Opin Cell Biol.**, v.32, p.121-30, 2015.

INOUE, T.; NAKAMURA, S.; OSUMI, N. Current topics in comparative developmental biology of vertebrate brains. **Neurosci Res.**, v.39, n.4, p.371-76, 2001.

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. **Revista USP**, n. 98 p. 9-16, 2013.

JIN, Y. et al. The relationship between Autism Spectrum Disorder and Melatonin during Fetal Development. **Molecules**, n.23, p.198, 2018.

JILG, A. et al. Melatonin modulates daytime-dependent synaptic plasticity and learning efficiency. **J Pineal Res.** v.66, n.3, 2019.

JIANG, N. et al. The Impact of Systemic Inflammation on Neurodevelopment. *Trends Molecular Medicine*, v.9, p.794-804, 2018.

JOCKERS, R. et al. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? **Britain Journal. Pharmacology.** v.154 n.6, p.1182-1195, 2008.

JOCKERS, R. et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. **Br J Pharmacol.**, v.173, n.18, p.2702-25, 2016.

JONSSON, L. et al. Association between ASMT and autistic-like traits in children from a Swedish nationwide cohort. **Psychiatr Genet.**, v.24, n.1, p. 21-7, 2014.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Nervous Child**, v.2, p. 217-50, 1943.

KANNER, L.; EISENBERG, L. Early infantile autism, 1943-1955. **Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc.**, n.7, p.55-65, 1957.

KARASEK, K.; WINCZYK, K. Melatonin in humans. **Journal Physiology Pharmacology**, v.57, n.5, p.19-39, 2006.

KANTRONG, N.; JIT-ARMART, P.; ARAYATRAKOOLLIKIT, U. Melatonin antagonizes lipopolysaccharide-induced pulpal fibroblast responses. **BMC Oral Health.**, v.20, n.1, 91, 2020.

KAZLAUSKAS N. et al. Sickness Behavior in Honey Bees. **Front Physiol.**, v.7, p.261, 2016.

KESSELS, R.P.C. et al. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Research Rev**, v.35, p.295- 303, 2001.

Kim, J.; Hong, J.; Bae, S. Microglia and Autism Spectrum Disorder: Overview of Current Evidence and Novel Immunomodulatory Treatment Options. **Clin Psychopharmacol Neurosci.** v.16, n.3, p.246-252, 2018.

KIRSTEN, T.B. et al. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 4, p. 240-251, 2010.

KIRSTEN, T.B. **Lipopolissacarídeo no início do periodpre-natal como modelo experimental de autism e prejuízos dopaminérgicos estriatais**. 2012. 195f. Tese (Doutorado Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KIRSTEN, T.B. et al. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. **Life Sciences**, v. 1, n.130, p. 12-17, 2015.

KIRSTEN, T.B. et al. Lipopolysaccharide exposure induces maternal hypozincemia, and prenatal zinc treatment prevents autistic-like behaviors and disturbances in the striatal dopaminergic and mtor systems of offspring. **PLoS ONE**, v.10, n.7, p. 1-18, 2015.

KIRSTEN, T.B.; BERNARDI, M.M. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. **Behav Brain Res.**, v.28, p. 25-29,2017.

Kirsten, T. et al. Pioglitazone abolishes cognition impairments as well as BDNF and neurotensin disturbances in a rat model of autism. **Biol Open**. v.8, e.5, 2019.
KNIERIM, J.J. The hippocampus. **Curr Biol.**, v.25, n.23, p. 1116-21, 2015.

KNIERIM, J.; NEUNUEBEL, J. Tracking the flow of hippocampal computation: pattern separation, pattern completion, and attractor dynamics, **Neurobiology Learning. Memory**. v.129, p.38-49, 2016.

KNUESEL, I. et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. **Nat Publ Gr.**, v.10, 2014.

KNOWLES, W.D. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation **J Clin Neurophysiol.**, v.9, n.2, p. 252-63,1992.

KNOX, J.J. et al. T-bet+ B cells are induced by human viral infections and dominate the HIV gp140 response. **JCI Insight**, v. 2, n. 8, p.929 - 43, 2017.

KOWALEWSKA, M. et al. Melatonin from slow-release implants did not influence the gene expression of the lipopolysaccharide receptor complex in the choroid plexus of seasonally anoestrous adult ewes subjected or not to a systemic inflammatory stimulus. **Small Ruminant Research**, v.147, p.1-7, 2017.

KOBAYASHI, M.; BUCKMASTER, P.S. Reduced inhibition of dentate granule cells in a model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci.**, v.23, n.6, p.2440-52, 2003.

KONG, X. et al. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. **Cell Mol Neurobiol.**, v.28, n.4, p. 569-79, 2008.

KRIGGER, K.W. Cerebral palsy an overview. **Am Fam Physician.** v. 73, p. 91- 100, 2006.

KULLMANN, D.M. Interneuron networks in the hippocampus. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 21, n. 5, p. 709-16, 2011.

LACOSTE, B. et al. Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain. **J Pineal Res.**, v.58, p.397–417, 2015.

LALANNE, S. et al. .Melatonin: From Pharmacokinetics to Clinical Use in Autism Spectrum Disorder. **Int J Mol Sci.**, v.22, n.3, p.1490, 2021.

LALONDE, R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.26, n.1, p.91-104, 2002.

LAMÔNICA, D.A.C. et al. Sleep quality, functional skills, and communication in preschool-aged children with autism spectrum disorder. **Res Dev Disabil.**, v.116, n.104, p.024, 2021.

LANDRIGAN, P. J. What causes autism? Exploring the environmental contribution. **Current opinion in pediatrics**, v. 22, n.2, p. 219-25,2010.

LEVY, S.E.; MANDELL, D.S.; SCHULTZ, R.T. Autism. **Lancet.** v.374, n.9701), p.1627-38, 2009.

LI, D. et al. Melatonin receptor genes in vertebrates. **Int J Mol Science**, v.14, n.6, p.11208-11223, 2013.

LI, Q. et al. The Gut Microbiota and autism spectrum disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.11, 120, p. 1-14, 2017.

LI, X.; ZOU, H.; BROWN, W.T. Genes associated with autism spectrum disorder. **Brain Res Bull.**, v.88, n.6, p.543-52, 2012.

LIMA, J. B. A. et al. Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos induzida por sepse: estudo experimental em ratos. **ABCD, arq. bras. cir. dig.**, v.24, n.2, p.95-102, 2011.

LIN, H.Y. et al. Shared atypical brain anatomy and intrinsic functional architecture in male youth with autism spectrum disorder and their unaffected brothers. **Psychol Med.**, v.47, n.4, p.639-54, 2017.

LIU X. et al. Protective effects and regulatory mechanisms of melatonin in a neonatal mouse model of LPS-induced inflammation. **Neurosci Lett.**, v.16, n.772, p.1364-83, 2022.

LIU, Y. et al. Melatonin attenuates isoflurane-induced acute memory impairments in aged rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v.113, n.4, p.215-20., 2013.

LINS, B.R. et al. Prospective Analysis of the Effects of Maternal Immune Activation on Rat Cytokines during Pregnancy and Behavior of the Male Offspring Relevant to Schizophrenia. **eNeuro**, v.5, n.4, p.0249-18, 2018.

LORD, C. et al. Autism spectrum disorder. **Lancet**, v.392, n.10146, p.508-520, 2018.

LOTTER V. Epidemiology of autistic conditions in young children. **Social psychiatry**, v.1, n.3, p.124-35, 1966.

LYALL, K. et al. The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. **Annu Rev Public Health**. v.38, p.81-82, 2017.

MACHADO, M.G. et al. Alterações anátomofuncionais do sistema nervoso central no transtorno autístico-um estudo com RNM e SPECT. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, n. 4, p. 957-61, 2003.

MALDONADO, R.; SÁ-CORREIA, I.; VALVANO, M. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. **FEMS Microbiol Rev.**, v.40, n.4, p.480-493, 2016.

MALOW, B. et al. Melatonin for sleep in children with autism: a controlled trial examining dose, tolerability, and outcomes. **J Autism Dev Disord.**, v.8, p.1729-37, 2012.

MANGIOLA, F. et al. Gut microbiota in autism and mood disorders. **World J Gastroenterol.**, v.22, n.1, p.361-8, 2016.

MANNION, A.; LEADER, G. Comorbidity in autism spectrum disorder: A literature review. **Research in Autism Spectrum Disorders**, v.7, n.12, p.1595-1616, 2013.

MARQUEZ, DE PRADO B. et al. Melatonin disrupts circadian rhythms of glutamate and GABA in the neostriatum of the aware rat: a microdialysis study. **J Pineal Res.**, v.29, p.209–216, 2000.

MASI, A. et al. The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder. **Neuroscience Bulletin**, v.33, n.2, p.194-204, 2017.

MELKE, J. et al. Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. **Mol Psychiatry**. v.13, n.1, :p.90-8, 2008.

MIETTINEN, M. et al. Coexistence of parvalbumin and GABA in nonpyramidal neurons of the rat entorhinal cortex. **Brain Res.**, v.706, n.1, p.113-22, 1996.

MIKKONEN, M. et al. Miettinen subfield- and layer-specific changes in parvalbumin, calretinin and calbindin-D28k immunoreactivity in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v.92 , p. 515-32, 1999.

MOURÃO, J. C. A.; FARIA, N. C. Memória. **Psicologia Reflexão e Crítica**. v.28, n.4, p.780-788, 2015.

MORGAN, J.T. et al. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. , v.68, n.4, p.368-76, 2010.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicol. USP**, v.17, n.4, p. 159-74, 2006.

MOSTAFAVI, A.S. et al. Role of Melatonin in Body Weight: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Curr Pharm Des.**, v.23, n.23, p.3445-3452, 2017.

MUKDA, S. et al. Melatonin administration reverses the alteration of amyloid precursor protein-cleaving secretases expression in aged mouse hippocampus. **Neurosci Lett.**, v.621, p.39–46, 2016.

MUSSHOFF, U. et al. Melatonin receptors in rat hippocampus: molecular and functional investigations. **Hippocampus**. v.12, n.(2), p.165-73, 2022.

NERY, V. W. **Efeitos da probabilidade e proporção de reforço sobre o comportamento de escolha em ratos Wistar (Rattus norvegicus)**. 2015. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2015.

NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Exp Neurol.**, v. 299, p. 217-27, 2018.

NIKOLAEV, G.; ROBEVA, R.; KONAKCHIEVA, R. Membrane Melatonin Receptors Activated Cell Signaling in Physiology and Disease. **Int J Mol Sci**. 2021 Dec v.23, n.1, p.471, 2021.

NILSSON, C. et al. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. **Acta Pharmacol Sin.**, v.33, n.2, p.173-81, 2012.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Biotec Ciênc Desenv**, v.7, n.33, p.10-13, 2004.

NGO, T. et al. Identifying ligands at orphan GPCRs: current status using structure-based approaches. **Br J Pharmacol.**, v.173, n.20, p.2934-51, 2016.

OISHI, A.; GBAHOU, F.; JOCKERS, R. Melatonin receptors, brain functions, and therapies. **Handb Clin Neurol.**, v.179, p.345-356, 2021.

OSIER, N.D. et al. Brain injury results in lower levels of melatonin receptors subtypes MT1 and MT2. **Neurosci Lett.**, v.22, n.650, p.18-24, 2017.

OZTENEKECIOGLU, B. et al. Genetic and Epigenetic Alterations in Autism Spectrum Disorder. **Glob Med Genet.**, v.8, n.4, p.144-148, 2021.

PACCOLA, C.C. et al. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis Anim. **Reprod.**, v.10, n.4, p.677-83, 2013.

- PACHECO-LÓPEZ, G. et al. Priming of metabolic dysfunctions by prenatal immune activation in mice: relevance to schizophrenia. **Schizophr Bull.**, v.39, n.2,p.319-29, 2013.
- PAN, Z. et al. Role of proinflammatory cytokines in dopaminergic system disturbances, implications for anhedonic features of MDD. **Current Pharmaceutical Design**, v.23, n.14, p. 2065-2072, 2017.
- PANDI-PERUMAL, S.; ESQUIFINO, A.; CARDINALI, D.P. The role of melatonin in immunoenhancement: Potential application in cancer. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.87, p.81-87, 2006.
- PANDI-PERUMAL, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Prog Neurobiol.**, v.85, n.3, p.335-353, 2008.
- PARMEGGIANI, A.; CORINALDESI, A., POSAR A. Early features of autism spectrum disorder: a cross-sectional study. **Italy Journal Pediatr.**, v.45, n.1, p.144, 2019.
- PARREIRAS, S.S. **Avaliação comportamental de ratos submetidos a um modelo experimental de autismo e ao empobrecimento ambiental do ambiente pós-natal por isolamento.** F 136. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Alfenas, 2018.
- PARROTT, J. et al. Neurotoxic kynurenine metabolism is increased in the dorsal hippocampus and drives distinct depressive behaviors during inflammation. **Transl Psychiatry**, v.6, n.3, p.918, 2016.
- PARK, B.; LEE, J. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Exp Mol Med.**, v.45, n.66, 2013.
- PARRACHO, H.M. et al. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. **J Med Microbiol.**, v.54, n.10, p.987-991, 2005.
- PAULA, C.S. et al. Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: a pilot study. **J Autism Dev Disord.**, v. 41, n.12, p.1738-42, 2011.

- PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th dn. San Diego, CA: Academic Press., 2006.
- PENATTI, C.A.A.; SILVA, J.C. Dos modelos animais à investigação do transtorno do espectro autista: Correlação com a fonte materna? **Resbcal.**, v.2, n.3, p. 215-219, 2014.
- PEREIRA, O.C.; BERNARDI, M.M.; GERARDIN, D.C. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? **Life Sciences**, v.78, n.24, p.2767-771, 2006.
- PERMPOONPUTTANA, K. et al. Long-term administration of melatonin attenuates neuroinflammation in the aged mouse brain. **EXCLI J.** v..17, p.634-646, 2018.
- PETIT, L. et al. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. **Biochem Pharmacol.**, v.58, n.4, p.633-9, 1999.
- PETRELLI, F.; PUCCI, L.; BEZZI, P. Astrocytes and microglia and their potential link with autism spectrum disorders. **Front in Cel Neurosc.**, v.10, n. 21, p. 1-8, 2015.
- PINATO, L. et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. **Brain Struct Funct.**, v.220, n.2, p.827-40, 2015.
- PINATO, L. et al. Dysregulation of circadian rhythms in autism spectrum disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 41, p. 4379-4393, 2019.
- PIVEN, J. et al. No difference in hippocampus volume detected on magnetic resonance imaging in autistic individuals. **J Autism Dev Disord.**, v. 28, p.105-10, 1998.
- POON, D.C. et al. Sickness: From the focus on cytokines, prostaglandins, and complement factors to the perspectives of neurons. **Neurosci Biobehav Rev.** v.57, p.30-45, 2015.
- POSAR, A.; VISCONTI, P. Autism in 2016: the need for answers. **J. Pediatr.** v.93, p.111-119, 2017. QIN, L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*, v.55, p.453-462, 2007.

REBAI, R.; JASMIN, L.; BOUDAH, A. Agomelatine effects on fat-enriched diet induced neuroinflammation and depression-like behavior in rats. **Biomed Pharmacother.**, v.135, p.111-246, 2021.

REICHOW, B. Overview of meta-analyses on early intensive behavioral intervention for young children with autism spectrum disorders. **J Autism Dev Disord.**, v. 42, n.4, p. 512-20, 2012.

REITER, R. et al. Melatonin, a full service anti-cancer agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. **International Journal Molecular Science**, v.18, n.4, p.843, 2017.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; GALANO, A. Melatonin: exceeding expectations. **Physiology (Bethesda)**. v.5, p.325-33, 2014.

REISINGER, S. et al. The poly (I:C) - induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. **Pharmacol Ther.**, v. 149, p. 213-26, 2015.

RICE, D.; BARONE, S. JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect.**, v.3, n.3, p.511-33, 2000.

RICHTER, H.G. et al. Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy. **J Pineal Res.**, v.46, n.4, p.357-64, 2009.

RICHARDS, R. et al. Increased hippocampal shape asymmetry and volumetric ventricular asymmetry in autism spectrum disorder. **Neuroimage Clin.** v.26, n.102, p.207, 2020.

ROCHA, A.K.A.A. et al. Altered MT1 and MT2 melatonin receptors expression in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats. **Epilepsy Behav.**, v.71, n.Pt A, p.23-34, 2017.

RODRIGUEZ-GOMEZ, D.A. et al. A systematic review of common genetic variation and biological pathways in autism spectrum disorder. **BMC Neurosci.**, v.22, n.1, p.60, 2021.

ROSSIGNOL, D.A.; FRYE, R.E. Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. **Dev Med Child Neurol.**, v.53, n.9, p.783-792.2011.

ROSSIGNOL, A. D.; FRYE, E.R. Melatonin in autism spectrum disorders. **Current Clinical Pharmacology**. V.9, n.4, p.236-334, 2014.

RUBENSTEIN, J.L.; MERZENICH, M.M. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. **Genes Brain Behav** v.2, p.255–267, 2003.

SHAH, S.A. et al. Melatonin Stimulates the SIRT1/Nrf2 Signaling Pathway Counteracting Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Oxidative Stress to Rescue Postnatal Rat Brain. **CNS Neurosci Ther.**, v.23, n.1, p.33-44, 2017.

SALES, F. et al. Rapid Communication: Maternal melatonin implants improve fetal oxygen supply and body weight at term in sheep pregnancies. *J Anim Sci.*, V.97, N.2, P.839-845, 2019.

SANCHEZ-HIDALGO, M. et al. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. **Exp Gerontol.**, v.44, n.5, p.328-34, 2009.

SÁNCHEZ-HIDALGO, M. et al. Decreased MT1 and MT2 melatonin receptor expression in extrapineal tissues of the rat during physiological aging. **J of Pineal Res.**, v. 46, n. 1, p. 29-35, 2009.

SANCHACK, K.E.; THOMAS, C.A. Autism Spectrum Disorder: Primary Care Principles. **Am Fam Physician.**, v.94, n.12, p.972-979, 2016.

SANDERSON, D.J.; BANNERMAN, D.M. The role of habituation in hippocampus-dependent spatial working memory tasks: evidence from GluA1 AMPA receptor subunit knockout mice. **Hippocampus**, v.22, n.5, p.981-94, 2012.

SANGCHART P. et al. Anti-Inflammatory Comparison of Melatonin and Its Bromobenzoylamide Derivatives in Lipopolysaccharide (LPS)-Induced RAW 264.7 Cells and Croton Oil-Induced Mice Ear Edema. **Molecules**, v.26, n.14, p.4285, 2021.

SANTOS, B.F. Modelo animal. in. animais de laboratório criação e experimentação. **Editora FioCruz**, p. 33, 2002.

SCHUMANN, C.M. et al. Amygdala enlargement in toddlers with autism related to severity of social and communication impairments. **Biol Psychiatry**- v.66, p.942–949,2009.

SCHWARTZER, J. et al. Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice. **Transl Psychiatry**, v.3, 2013.

SILVA, J. G. **Caracterização de subpopulações de interneurônios imunorreativos para proteínas ligante de cálcio no córtex pré-frontal do Saguí (Callithrix jacchus): distribuição e morfologia.** 2011. 113f. Tese (Doutorado Psicobiologia) Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2011.

SINGH, G. et al. Fetal inflammation induces acute immune tolerance in the neonatal rat hippocampus. **J Neuroinflammation**, v.18, n.1, p.69, 2021.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol Rev.**, v.55, n.2, p.325-95, 2003.

SMITH, S.E.P. et al. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v.27, n.40, p.10695-702, 2007.

SOUDERS, M. et al. Sleep in Children with Autism Spectrum Disorder. **Current Psychiatry**, v.19, p.34, 2017.

SOUSA, A.B.; SALGADO, T.D.M. Memória, aprendizagem, emoções e inteligência. **Revista Liberato**, v.16, n.26, p.101-220, 2015.

SPENCER, S.J. et al. Neonatal immune challenge does not affect body weight regulation in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.293 n.2, p.581-9, 2007.

SPILLA, C.G.S. **Memória espacial e neuroquímica do hipocampo em modelo animal de autismo**, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Filosofia e Ciência, Universidade Estadual Paulista, 2018.

SULKAVA, S. et al. Melatonin receptor type 1A gene linked to Alzheimer's disease in old age. **Sleep**, v.41, n.7, p.103, 2018.

SULLIVAN, K.; STONE, W.L.; DAWSON, G. Potential neural mechanisms underlying the effectiveness of early intervention for children with autism spectrum disorder. **Research in developmental disabilities**, v.35, n.11, p.2921-32, 2014.

TALAEI, S.A.; AZAMI, A.; SALAMI, M. Developmental effect of light deprivation on synaptic plasticity of rats' hippocampus: implications for melatonin. **Iran J Basic Med Sci.**, v.19, n.8, p.899-909, 2016.

TARICANO, M. **Efeitos da administração pré-natal de LPS no aprendizado e/ou memória na prole de ratas.** 2010. 104f. Dissertação (Mestrado Instituto de Psicologia) Universidade de São Paulo, 2010.

TERRÓN, M.P. et al. Melatonin reduces body weight gain and increases nocturnal activity in male Wistar rats. **Physiol Behav.**, v.118, p.8-13, 2013.

TIMOFEEVA, A.O.A. et al. Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, n. 1, p. 38-45, 2008.

TOCHARUS, C. et al. Melatonin enhances adult rat hippocampal progenitor cell proliferation via ERK signaling pathway through melatonin receptor. **Neuroscience.**, v.275, p.314–321, 2014.

TORDJMAN, S. et al. Advances in the research of melatonin in autism spectrum disorders: literature review and new perspectives. **Int J Mol Sci.**, v. 14, n.10, p. 20508-42, 2013.

TORDJMAN, S. et al. Reframing autism as a behavioral syndrome and not a specific mental disorder: Implications of genetic and phenotypic heterogeneity. **Neurosci Biobehav Rev.**, v.80, p.210, 2017.

TORDJMAN, S. et al. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. **Curr Neuropharmacol.** v.15, n.3, p.434–443, 2017.

TRAN, N.Q.V.; MIYAKE, K. Neurodevelopmental Disorders and Environmental Toxicants: Epigenetics as an Underlying Mechanism. **Int J Genomics**, 2017.

VAN BEUSECUM, J.P. et al. Antagonism of major histocompatibility complex class II invariant chain peptide during chronic lipopolysaccharide treatment rescues autoregulatory behavior. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v.317, n.4, 957-966, 2019.

PEARSON, G.L. et al. Circadian desynchronization alters metabolic and immune responses following lipopolysaccharide inoculation in male mice. **Brain Behav Immun.** v.88, p.220-229, 2020.

VIANA, A.C.V. et al. Autismo. **Saúde Dinâmica**, v.2, n.3, p.1-18, 2020.

VIEIRA, I.Z. **Expressão de receptores de melatonina em um modelo animal com aumento na interação social**, 64 f, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista, 2019.

VIEIRA, P.R. Memória espacial em macacos-prego (*Cebus apella*) e humanos, 136 F, Dissertação (mestrado) Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, 2006.

VOICULESCU, S. et al. Role of melatonin in embryo fetal development. **J Med Life**, v.7, n.4, p.488-92, 2014.

VOLK, H.E. et al. Residential proximity to freeways and autism in the CHARGE study. **Environ Health Perspect.** v.119, n.6, p.873-7, 2011.

VOJTECHOVA, I. et al. Neonatal immune activation by lipopolysaccharide causes inadequate emotional responses to novel situations but no changes in anxiety or cognitive behavior in Wistar rats. **Behav Brain Res.**, v.349, p.42-53, 2018.

WALLACE, K.S.; ROGERS, S.J. Intervening in infancy: implications for autism spectrum disorders. **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v.51, n.12, p.1300-20, 2010.

WANG, K. C. et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. **Neuroscience**, v.234, p.146-157, 2013.

WANG, Y.; KASPER, L.H. The role of microbiome in central nervous system disorders. **Brain Behav Immun.**, v.38,p.1-12, 2014.

WANG, L.M. et al. inhibits hippocampal long-term potentiation. **Eur J Neurosci.**, v.22, n.9, p.2231-2237, 2005.

WAYE, M.M.Y.; CHENG, H.Y. Genetics and epigenetics of autism: A Review. **Psychiatry Clin Neurosci.**, v.72, n.4, p.228-244, 2018.

WING L. Asperger's syndrome: a clinical account. **Psychol Med.**, v.11, n.1, p.115-29, 1987.

WISCHHOF, L. et al. Prenatal LPS-exposure--a neurodevelopmental rat model of schizophrenia- differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.3, n.57, p.17-30, 2015.

WOUTERLOOD, F.G.; GROSCHE, J; HÄRTIG, W. Co-localization of calretinin and calbindin in distinct cells in the hippocampal formation of the rat. **Brain research**, v. 922, n. 2, p. 310-314, 2001.

WUO, A.S. Educação de pessoas com transtorno do espectro do autismo: estado do conhecimento em teses e dissertações nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (2008-2016). **Saúde e Sociedade [online]**, v. 28, n. 3, p.210-223, 2019.

WU, Y.H. et al. Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**. v.8, p.1239-47, 2007.

YANG, Y.; WANG, J.Z. From Structure to Behavior in Basolateral Amygdala-Hippocampus Circuits. **Front Neural Circuits**. v.11, p.86, 2017.

YENKOYAN, K. et al. Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. **Behav Brain Res.**, v.28, n.331, p.92-101, 2017.

YOUNG. J.; DAVID, B.; NUNZIO, P. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder. **Journal of Affective Disorders**, v.169, p. 15-20, 2014.

ZAKAR, T., MENON, R., LAPPAS, M. The Role of the Fetal Membranes in Pregnancy and Birth. Lausanne: **Frontiers Media SA**, 2021.

ZAKARIA R. et al. Lipopolysaccharide-induced memory impairment in rats: a model of Alzheimer's disease. **Physiol Res.**, v.22, n.66, p.553-565, 2017.

ZAWILSKA JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. **Pharmacol Rep.**, v.61, n.3, p.383-410.2009.

ZEIDAN, J. et al. Global prevalence of autism: A systematic review update. **Autism Research**, v.15, n.5, p.778– 790, 2022.

ZHANG, T. et al. Alcohol suppresses IL-2–Induced CC Chemokine Production by Natural Killer Cells. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.29, n.9, p.1559-567, 2005.

ZHAO, J. et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. **Sci Rep.**, v.9, p.5790, 2019.

ZIMMERMANN, B. et al. Expression of the calcium binding proteins Necab-1,-2 and -3 in the adult mouse hippocampus and dentate gyrus. **Brain Res.**, v.1528, p.1-7, 2013.

ZUCULO, G.M. et al. Melatonin and circadian rhythms in autism: Case report. **Chronobiol Int.**, v.34, n.4, p.527-30, 2017.