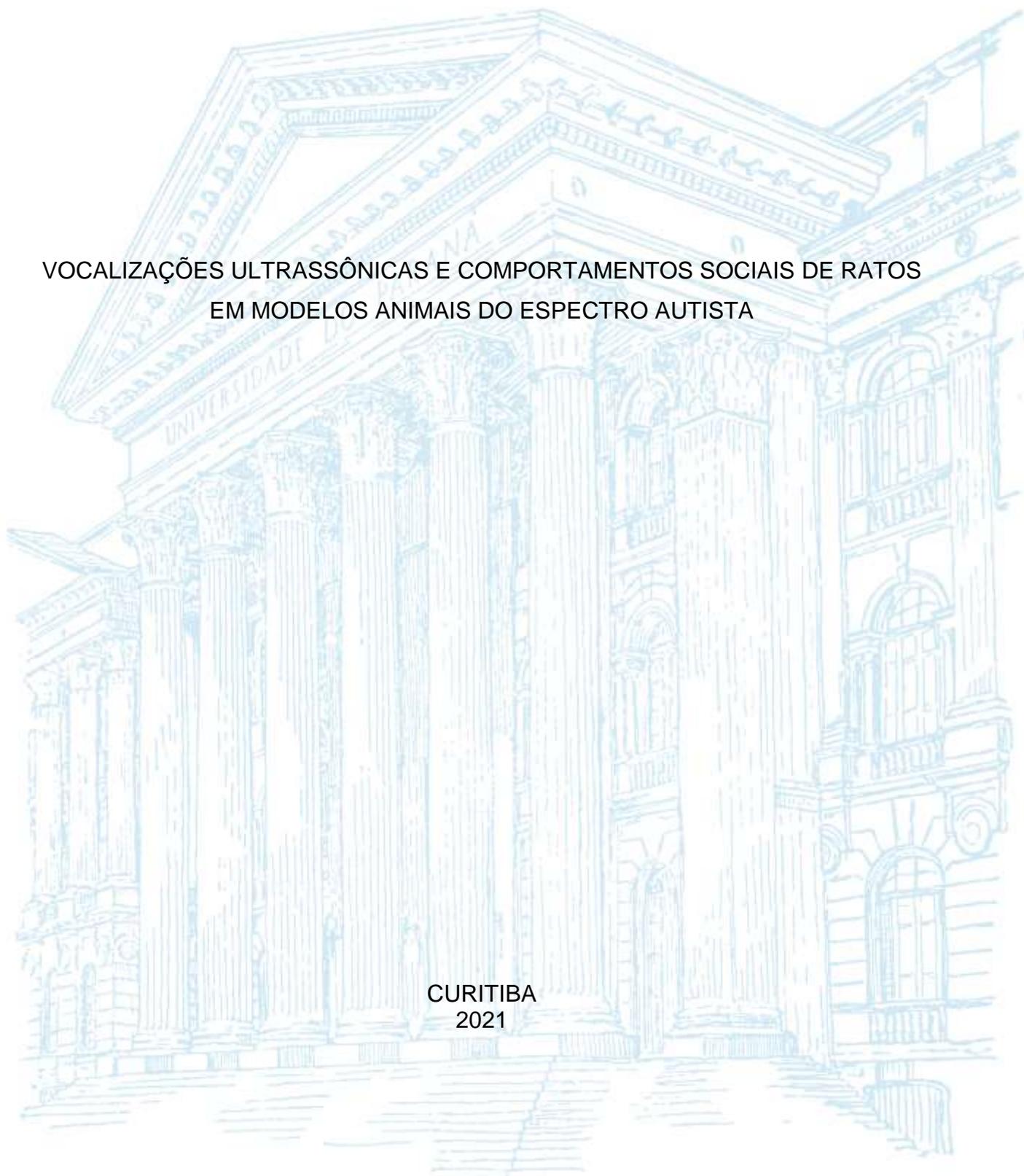


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CIBELE BATINA RABELO

VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS E COMPORTAMENTOS SOCIAIS DE RATOS
EM MODELOS ANIMAIS DO ESPECTRO AUTISTA

CURITIBA
2021



CIBELE BATINA RABELO

VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS E COMPORTAMENTOS SOCIAIS DE RATOS
EM MODELOS ANIMAIS DO ESPECTRO AUTISTA

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado
ao curso de graduação em Biomedicina, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA
2021

TERMO DE APROVAÇÃO

CIBELE BATINA RABELO

VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS E COMPORTAMENTOS SOCIAIS DE RATOS EM MODELOS ANIMAIS DO ESPECTRO AUTISTA

Trabalho de conclusão de curso II apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Prof. Dr. Roberto Andreatini
Orientador-Departamento de Farmacologia, UFPR

Prof. Dra Maria Aparecida Barbato Frazão
Departamento de Farmacologia, UFPR

Doutoranda Camila Pasquini de Souza
Departamento de Farmacologia, UFPR

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor orientador Dr. Roberto Andreatini pela oportunidade, paciência e orientações, sem o qual o tema desse trabalho de conclusão de curso não teria saído do campo das ideias.

À professora Dra. Maria Vital por participar da banca de defesa, pelo entusiasmo e credibilidade ao projeto deste trabalho de conclusão de curso.

À doutoranda Camila Pasquini por ter aceitado participar da banca de defesa, pela sua avaliação especialista sobre o tema.

Ao tutor aluno Guilherme Vendramin por sua insistência e persistência a todos os detalhes deste trabalho, mesmo durante os finais de semana.

Ao meu companheiro de todos os dias Thiago Moura, por ter suportado o meu estresse nesse primeiro ano de casamento, campo fértil para meu desenvolvimento pessoal.

Ao curso de biomedicina, coordenação e colegas que compõem a Universidade Federal do Paraná que me proporcionaram testar os limites de meu conhecimento todos os dias nos últimos cinco anos.

Muito Grata

RESUMO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) pode ser mimetizado em modelos animais de ratos com o objetivo de melhor compreensão da etiologia deste transtorno ou na procura de tratamentos eficientes para a condição. As vocalizações ultrassônicas (USV) emitidas por ratos durante a interação social podem ser um parâmetro útil no estudo de déficits comunicativos e sociais apresentados por ratos dos modelos de TEA. Neste trabalho foi realizada uma revisão sistemática dos mais prevalentes modelos de TEA, induzidos de forma genética, farmacológica, imunológica ou ambientalmente. Esta revisão visa destacar as potencialidades e vieses do uso do parâmetro das USVs nos principais modelos de TEA. Foram revisados 29 artigos publicados entre os anos de 2002 e 2021 objetivando consolidar a visibilidade do uso de USVs em modelos de TEA. Foram considerados os paralelos à clínica, assim como o dimorfismo sexual apresentado nos parâmetros de USV, os principais mecanismos fisiopatológicos e examinado se as USVs foram úteis para avaliar cada um dos principais modelos de TEA. Os modelos abordados foram os de CACNA1C, Shank3, FMR1, PAX6, ácido valpróico, vasopressina, serotonina, lipopolissacarídeo, tratamento com zinco, Poly I:C, poluição do ar e pesticida clorpirifós. Observa-se que alguns modelos encontram-se consolidados enquanto em outros destaca-se as perspectivas futuras, com grande potencialidade no uso dos estudos pré-clínicos com aplicação das USVs para elucidar os mecanismos que envolvem estes modelos. Observa-se a necessidade de explorar melhor as vantagens da utilização de USVs nos modelos de TEA.

Palavras-chave: Revisão sistemática. Vocalização ultrassônica. TEA. Modelos animais. Ratos.

ABSTRACT

Autistic Spectrum Disorder (ASD) can have a valid parallel in animal models using rats with the aim of better understand the etiology of this disorder or seek efficient treatments for the condition. Ultrasonic vocalizations (USV) emitted by rats during social interaction can be a useful parameter in the study of communicative and social deficits presented by rats in ASD models. In this work, a systematic review of the most prevalent models of ASD, induced genetically, pharmacologically, immunologically or environmentally, was carried out. This review aims to highlight the potential and biases of using the USV parameter in the main ASD models. It contains 29 articles revised and published between 2002 and 2021, aiming to consolidate the visibility of the use of USVs in ASD models. Parallels to the clinic were considered, as well as the sexual dimorphism presented in the parameters of USV, the main pathophysiological mechanisms and examined whether the USVs were useful to evaluate each of the main models of ASD. The models covered were CACNA1C, Shank3, FMR1, PAX6, valproic acid, vasopressin, serotonin, lipopolysaccharide, zinc treatment, Poly I:C, air pollution and pesticide chlorpyrifos. It is observed that some models are consolidated, while in others, the future perspectives are highlighted, with great potential in the use of pre-clinical studies with the application of USVs to elucidate the mechanisms that involve these models. There is a need to better explore the advantages of using USVs in ASD models.

Keywords: Systematic review, Ultrasonic vocalization, ASD, Animal models, Rats

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Esquema representativo das idades consideradas na revisão sistemática.....	11
FIGURA 2 – Representação espectrográfica dos subtipos de vocalização revisados.....	14
FIGURA 3 - Fluxograma das etapas de escolhas de inclusão e exclusão	17
FIGURA 4 - Distribuição (em porcentagem) dos estudos analisando vocalizações ultrassônicas de ratos nas 4 categorias de modelos de autismo.....	19
FIGURA 5 - Número de artigos utilizando vocalizações ultrassônicas de ratos nos diferentes modelos genéticos de autismo.....	19
FIGURA 6 - Número de artigos utilizando vocalizações ultrassônicas de ratos nos diferentes modelos farmacológicos de autismo.	20
FIGURA 7 - Número de artigos utilizando vocalizações ultrassônicas de ratos nos diferentes modelos imunológicos de autismo	20
FIGURA 8 - Número de artigos utilizando vocalizações ultrassônicas de ratos nos diferentes modelos ambientais de autismo.....	21
FIGURA 9 - Assuntos que encontram-se nesta revisão e número de artigos.....	22
FIGURA 10- Número de artigos revisados por ano de publicação	23
FIGURA 11 - Domínios específicos da proteína SHANK3	27
FIGURA 12 - Porcentagem das linhagens de ratos encontradas nos artigos revisados.....	67
FIGURA 13 - Porcentagem e composição do sexo dos sujeitos experimentais	68
FIGURA 14 - Composição dos experimentos analisados por idade dos ratos	69
FIGURA 15- Porcentagem das frequências de USVs analisadas nos artigos	69
FIGURA 16 - Quantidade percentual de artigos que analisaram subtipos de USVs.....	70

FIGURA 17 - Porcentagem de artigos de cada modelo em que houve alteração da USVs. 71

FIGURA 18 Alterações qualitativas (formato no espectrograma) das USVs nos modelos em que foram analisadas 72

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS E VOCAIS DOS ARTIGOS DOS MODELOS GENÉTICOS	33
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS E VOCAIS DOS ARTIGOS DOS MODELOS FARMACOLÓGICOS	45
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS E VOCAIS DOS ARTIGOS DOS MODELOS IMUNOLÓGICOS.....	57
TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS E VOCAIS DOS ARTIGOS DOS MODELOS AMBIENTAIS.....	65
TABELA 5 – RESUMO DA REVISÃO SISTEMÁTICA POR MODELO DE TEA.....	76

ÍNDICE DE ABREVIATURAS, SIGLAS OU VERNÁCULOS EM LÍNGUA
ESTRANGEIRA

TEA/ ASD	Transtorno do Espectro Autista;
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais;
kHz	<i>Quilohertz</i> (medida de frequência)
ms	Milissegundos (medida de tempo)
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde;
Poly I:C	Ácido polinossínico – policitidílico;
LPS	Lipopolissacarídeo – proteína imunogênica proveniente de bactéria;
VPA	Ácido valpróico – medicamento antiepiléptico/ estabilizador de humor;
<i>Blind</i>	Modo do aplicativo “ <i>ryyan</i> ” no qual um pesquisador analisa; cegamente os artigos segundo critérios preestabelecidos;
<i>Liking</i>	Quanto a atividade é recompensadora, relacionada a liberação de dopamina;
<i>Wanting</i>	Vontade ou estímulo antecipatório a um evento;
<i>Knockout</i>	Deleção em um único <i>locus</i> gênico relacionado ao autismo antes da concepção da roedora materna/ modificação embrionária;
5-CSRT	Teste tempo de reação à cinco escolhas seriais;
Ômega 3	Ácido graxo denominado alfa-linoléico;
FMRP	Proteína de retardo mental do X Frágil;
PDE2a	RNA traduz para fosfodiesterase 3', 5'-cíclica dependente de cGMP;
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica;
cGMP	Guanosina 3'-5' monofosfato cíclica;
PDE2a	Fosfodiesterase 2;
DNA	Ácido desoxirribonucleico;
AVP	Vasopressina – hormônio secretado pela neuro-hipófise;
5 HT	Hormônio serotonina;
NAA	N acetil aspartato;
5 MT	Agonista serotoninérgico não-específico 5-metoxipriptamina;
PND	Dia pós-natal;
GD	Dia gestacional;
TH	Tirosina hidroxilase – converte L-tyrosina em L-DOPA;
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro;

USV	Vocalização ultrassônica
NFKb	Fator de transcrição ativado pelo lipopolissacarídeo codifica para cadeia leve de imunoglobulina do linfócito B,
IFN	Interferon – proteína produzida pelos leucócitos em reação à vírus;
PM	Materiais particulados de dois tipos PM _{2,5} (menor que 2,5 micrometros) e PM ₁₀ (menor que 10 micrometros de volume);
CPF	Pesticida organofosforado clorpirifós;
AchE	Acetil colinesterase;
NA	Não analisado;
I.P.	Via de administração intraperitoneal;
<i>Sprague Dawley</i>	Linhagem de ratos criada por R.W. Dawley em 1925;
<i>Wistar</i>	Linhagem de ratos que inclui <i>Wistar Ham</i> derivados da mesma linhagem há mais de 50 anos;
ANK	Repetição múltipla de ankyrin;
SAM	Motivo estéril alfa;
PDZ	Domínio protéico derivado do nome de três proteínas PSD95, DLgA e zo-1 presentes em bactérias e animais;
Homer	Proteína neural codificada pelo gene HOMER1;
GLUR1	Receptor de glutamato;
NR1	Receptor nuclear do tipo; 1;
CA1	Área cortical do hipocampo onde encontram-se células piramidais;
WAGR	Condição comórbida caracterizada por tumor de Wilm's, distúrbios ópticos, retardo mental e malformações geniturinárias;
HAB	Linhagem de rato com predisposição ao comportamento ansioso;
AVPR	Receptor de arginina vasopressina que incluem AVPR1 e AVPR2;
SERT	Transportador de serotonina dependente de sódio;
NAAG	N acetil-aspargil-glutamato (NAA+ ácido glutâmico forma NAAG na terminação pré-sináptica cuja função é ativar receptores de glutamato);
CHARGE	O grupo de pesquisa sobre riscos associados ao autismo desde às causas genéticas à ambientais, no original, " <i>Childhood Autism Risks from Genetics and the Environment</i> ".
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 OBJETIVOS	9
2.1. Objetivos Gerais.....	9
2.2 Objetivos Específicos	9
2.3 Justificativa.....	9
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Sumário Idades	11
3.2 Sumário Comportamentos Sociais e Não-Sociais	12
3.3 Sumário Vocalizações Ultrassônicas.....	13
4 METODOLOGIA	15
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.1 CLASSIFICAÇÃO DOS ARTIGOS E FLUXOGRAMA	16
5.2 MODELOS GENÉTICOS	24
5.2.1 CACNA1C.....	24
5.2.2 SHANK 3	26
5.2.3 FMR1	29
5.2.4 PAX6	31
5.3 MODELOS FARMACOLÓGICOS.....	36
5.3.1 Ácido Valpróico (VPA).....	36
5.3.2 Vasopressina (AVP).....	38
5.3.3 Modelo serotoninérgico.....	40
5.4 MODELOS IMUNOLÓGICOS	48
5.4.1 Lipopolissacarídeos (LPS)	49
5.4.2 Poly I:C (ácido polinossínico-policitidílico)	52
5.5 MODELOS AMBIENTAIS	59
5.5.1 Poluição Ambiental.....	59
5.5.2 Pesticidas organofosforados (clorpirifós)	61
5.6 SUMÁRIO DAS ALTERAÇÕES DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS	67

6 CONCLUSÃO	74
6.1 RESUMO DOS RESULTADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA	74
6.2 VIESES METODOLÓGICOS.....	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) pode ser caracterizado segundo o DSM-5 por dois grupos principais de sintomas, que necessitam estarem presentes de forma concomitante: prejuízos persistentes na comunicação social recíproca e na interação social (critério A); e padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses ou atividades (critério B) (DSM-5) (APA, 2013).

O estudo em modelos animais de TEA tem permitido grandes avanços referentes à etiologia do transtorno e possíveis tratamentos, isto é alcançado principalmente através da observação do repertório vocal e comportamental dos roedores, que são contexto específicos e possuem paralelo à observação do quadro na clínica. Esse paralelo se dá através da validação dos modelos de acordo com critérios como a validade de construção e/ou de face e/ou preditiva.

Existem algumas diferenças na modelagem animal de TEA com ratos e camundongos, e apesar de duas décadas com predomínio quantitativo de estudos com camundongos em relação aos com ratos, os estudos com ratos na pesquisa biomédica têm ganhado atenção por suas características comportamentais e fisiológicas mais complexas. Por exemplo, em ratos as frequências de 50kHz remetem a um estado emocional positivo enquanto as frequências de 22kHz remetem a um estado emocional negativo, já em camundongos esta associação não está tão clara (BRUDZYNSKI, S. M.;2018).

Além disso, com o avanço de tecnologias de manipulação genética em ratos, estes ganharam maior espaço, pelo fato de muitos modelos terem como base a inserção ou deleção de um único gene, ampliando o potencial para a descoberta de novos genes associados ao TEA e de mecanismos para a criação de novos modelos.

No campo do autismo, por exemplo, muitos critérios diagnósticos são definidos mais por parâmetros comportamentais do que por biomarcadores, dessa forma têm-se a importância da utilização dos ratos por apresentarem um comportamento de brincadeira mais complexo e emissão de vocalizações que funcionam como sinais afetivos situação-dependentes (HOMBERG; WOHR; ALENINA, 2017). Assim, vê-se uma vantagem na revisão dos estudos com ratos com o objetivo de consolidar esse recente campo de pesquisa.

Nos ratos, as vocalizações ultrassônicas são o principal meio de comunicação intraespecífico e são contexto específicas, provendo uma oportunidade única na análise de déficits comunicativos em modelos animais de TEA principalmente quando coletadas a partir de desenhos experimentais diversos (SIMOLA, 2015).

Esses desenhos experimentais partem do rico repertório social dos ratos, como durante os experimentos de isolamento materno, situação de apreensão aos neonatos, que emitem vocalizações na faixa de frequência de 40kHz. Já em adolescentes e adultos, as situações sociais que eliciam estados apetitivos e provocam a emissão de vocalização de 50kHz são as mais utilizadas por permitirem observar alterações em modelos animais com paralelo ao critério diagnóstico A.

Em adolescentes, estes contextos são principalmente os de comportamento de brincadeira, durante o qual interagem com outros ratos, o que permite a análise de amplos comportamentos de ataque, defesa e evitação da brincadeira. Já em adultos, o contato social está mais relacionado ao reconhecimento do status social e disponibilidade sexual dos parceiros (CARUSO, A.; RICCERI, L.; SCATTONI, M. L.; 2020).

Ao contrário de momentos de interação social, a aproximação de um predador ou outro sinal de perigo gera vocalizações na faixa de frequência de 22kHz as quais denotam um estado aversivo dos ratos. Essa faixa de frequência é menos comumente encontrada nos artigos sobre TEA, já que sua caracterização como parâmetro de déficit comunicativo em TEA não é bem documentada, o que pode ser melhor explorado neste campo assim como as diferenças entre receptor e emissor de vocalizações ultrassônica e a importância dos experimentos de playback.

Dessa forma, vocalizações nas frequências de 40 kHz, 50kHz e 22kHz estão associadas à situações específicas. Elas diferem não apenas pelo fato de estarem associadas às situações de apreensão, apetitivas ou aversivas, respectivamente, mas também pelo local do cérebro do rato em que são geradas e pelo local ativado no cérebro do rato quando são recebidas por eles (BRUDZYNSKI, S. M.;2018).

Apesar de haver uma maior publicação nos últimos anos de artigos sobre vocalizações ultrassônicas em modelos de TEA, há poucos trabalhos que reúnam e correlacionem os diferentes modelos, o que faz com que o campo possua poucas padronizações que norteiam de forma geral esse tipo de pesquisa, como quais testes comportamentais são mais eficientes em denotar a alteração social e a metodologia de validação de face empregada. Dessa forma, vê-se a necessidade de uma revisão

capaz de reunir detalhes metodológicos imprescindíveis e experiências prévias, permitindo uma posterior padronização nos modelos e conseqüentemente uma maior assertividade. Alinhado a essa proposta, o objetivo deste trabalho foi a realização de uma revisão sistemática capaz de abranger as principais variáveis existentes nos mais prevalentes modelos de TEA em ratos e apontar convergências e divergências metodológicas.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Estabelecer um panorama atualizado do contexto em que são utilizadas as vocalizações ultrassônicas de ratos nos modelos animais de Transtorno do Espectro Autista.

2.2 Objetivos Específicos

- Reconhecer os principais modelos de TEA, como são caracterizados seus mecanismos de ação e validade de face e/ou preditiva e/ou de construção;
- Exemplificar como as vocalizações ultrassônicas de ratos conjuntamente com os resultados comportamentais auxiliam na consolidação ou caracterização de um modelo de TEA;
- Proporcionar reflexão sobre a utilidade das vocalizações ultrassônicas em cada modelo e como poderiam ser empregadas em futuros estudos.

2.3 Justificativa

Apesar de haver várias caracterizações sobre a etiologia do TEA nas últimas duas décadas, há um crescente número de publicações nos últimos anos apontando para mecanismos de ação complementares aos conhecidos. Isso se deve em parte à

quantidade de estudos em modelos animais de TEA. No entanto, as vocalizações ultrassônicas ainda são pouco caracterizadas nestes modelos de ratos de TEA, devendo ser melhor reiteradas sobre a importância da sua utilização e abrangência no estudo desses modelos assim como possíveis vieses de sua utilização.

A despeito de haver várias frentes de grupos de pesquisa que valem-se de metodologias anteriores para explorar lacunas em determinados modelos, falta uma padronização ao campo que permita observar a vantagem metodológica em todos os modelos de TEA, procurando uma visão unificada para uma antiga questão etiológica.

A revisão sistemática tem o potencial de esquadrihar possíveis vieses nas metodologias que perpassam todos os modelos de TEA, pois tratando-se do mesmo transtorno, muitos testes podem ser reaproveitados e padronizados, permitindo ao campo uma melhor comparação entre modelos e áreas aparentemente distantes. Dessa forma, somando esforços que têm sido empregados por vezes de formas locais, justifica-se a importância de uma revisão sistemática em um campo onde os recursos experimentais são custosos, e constantes repetições são eticamente inviáveis.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Sumário Idades

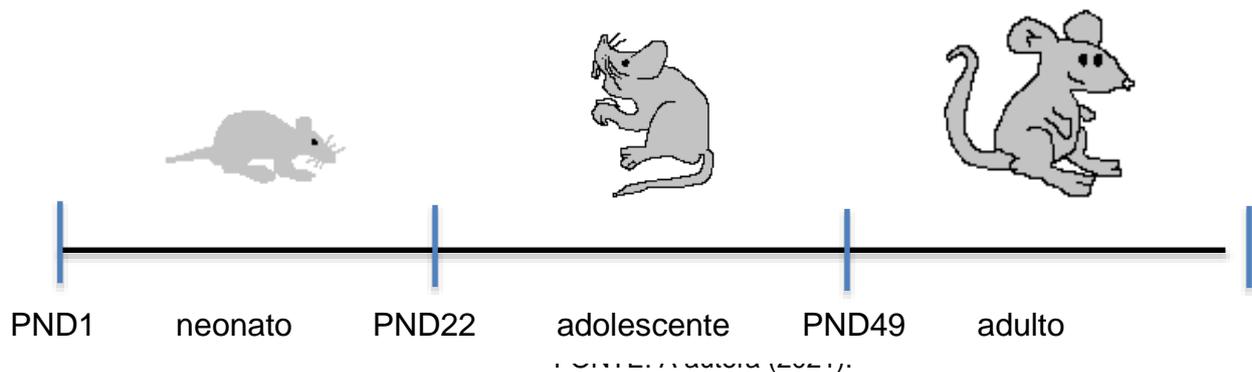
Algumas notas explicativas para melhor compreensão do conteúdo desta revisão sistemática são necessárias devido à divergência na literatura sobre alguns conceitos.

Primeiramente, a translação entre idade do rato e idade humana é contraditória mesmo devido a diferentes concepções entre os artigos sobre qual intervalo de tempo considerar o rato na fase neonato, o rato na fase adolescente ou juvenil e o rato na fase adulta (SENGUPTA, 2013.).

Alguns artigos trazem apenas o tempo em semanas, em dias ou até mesmo como época adulta durante o texto sem especificar em dias. Para fins de padronização adotou-se no presente texto três idades (FIGURA 1). Foram considerados como neonatos os ratos no intervalo do dia pós natal (PND) 1 ao 22, período em que ocorre o desmame, maior independência motora e menor número de chamados pela mãe quando no experimento de isolamento materno.

O período de adolescência nos ratos foi considerado tendo início no PND22, logo após o desmame, se estendendo até o PND49, momento em que diminuem em intensidade os comportamentos de brincadeira nos quais os ratos testam seus limites sociais. A idade adulta foi considerada como iniciada após o PND49, momento do despertar sexual. A maioria dos artigos utiliza ratos até o PND90, momento em que a atividade sexual decai e ocorre a menopausa nas fêmeas.

FIGURA 1 - Esquema representativo das idades consideradas na revisão sistemática



3.2 Sumário Comportamentos Sociais e Não-Sociais

Os ratos apresentam comportamentos complexos e muitas vezes eles são analisados dentro de um contexto de teste. Por serem complexos, podem ser interpretados de uma forma ou de outra de acordo com o objetivo do teste. Muitos desses comportamentos acontecem durante o momento de brincadeira entre os ratos e são considerados comportamentos sociais e outros ocorrem sem o objetivo de estreitar laços sociais e são considerados comportamentos não sociais (REDECKER et al., 2019).

Para auxiliar a compreensão ao longo do trabalho trazemos uma breve definição de cada comportamento:

Pinning - Quando um rato está com o dorso para cima e outro rato está em pé em cima do primeiro, na brincadeira entre juvenis tem função afiliativa e serve para reduzir a mobilidade do primeiro rato;

Poucing - O comportamento de brincadeira começa quando um dos ratos solicita (*poucing*) o outro, através do ato de farejar ou esfregar seu focinho na nuca do segundo rato;

Chasing/ Following - É definido como mover-se na direção de ou perseguir o rato companheiro enquanto o rato companheiro está se afastando;

Wrestling - Conjunto específico de comportamentos como luta livre, *boxing* e *poucing*;

Sniffing social - Quando um rato fareja a região da cabeça, nariz ou flancos do parceiro. Trata-se de uma aproximação frontal e pacífica com o objetivo de gerar laços sociais;

Sniffing não social - Quando um rato fareja a região anogenital do outro, ocorre como reconhecimento da presença do outro rato;

Social grooming - Trata-se de limpar o outro rato mordiscando-o ou lambendo-o;

Selfgrooming - Trata-se de limpar o próprio corpo em um ato de autocuidado;

Rearing (não social) - O rato fica em pé nas patas traseiras e estica o pescoço para reconhecer o ambiente ao longe, trata-se de um comportamento exploratório;

Boxing - Um rato fica em pé sobre as patas traseiras e com as patas dianteiras empurra o outro rato, pode ser considerado um comportamento agressivo;

Crawling - Um rato se aproxima do outro pela lateral, na região do flanco do outro rato;

Shaking - Coçar a parte dianteira do corpo com as patas traseiras. Pode tanto ser um sinal de estresse como de comportamento estereotipado dependendo da situação;

Freezing - Imobilidade corporal causada por um estímulo aversivo, pode ser um comportamento apreensivo e quantificado, por exemplo, quanto tempo permaneceu em congelamento após o estímulo aversivo.

3.3 Sumário Vocalizações Ultrassônicas

As vocalizações ultrassônicas (USV) emitidas por ratos em situações diversas de comunicação intraespecífico são inaudíveis ao ser humano, pois estão na faixa entre 100 Hz e 120 kHz. Essas diferenças entre espécies tem a função de evitar a predação, já que dificulta a localização interespecífica (FONSECA, A. H; et al., 2021).

As USVs são gravadas durante os experimentos de situação sociais, por exemplo. São captadas por um microfone que se situa acima do aparato experimental, e evitando-se ruídos externos, procura-se fragmentar as ondas complexas e sobrepostas captadas por ondas simples e únicas, através de transformação matemática pela equação de Fourier, sendo analisado de forma gráfica no computador. (FONSECA, A. H; et al., 2021).

Resguardando-se diferenças de softwares utilizados e análise manual ou computadorizada, em geral, as ondas sonoras são representadas em gráficos chamados espectrogramas, nos quais temos na ordenada a dimensão da frequência em quilohertz (kHz) e na abcissa a dimensão do tempo em milissegundos (ms).

As formas espectrográficas das USVs de 50kHz encontradas podem ser de 10 subtipos ou mais (WRIGHT et al, 2010). Para fins de compreensão deste trabalho serão descritos 4 desses subtipos, os quais foram mais amplamente abordados, como segue (FIGURA 2):

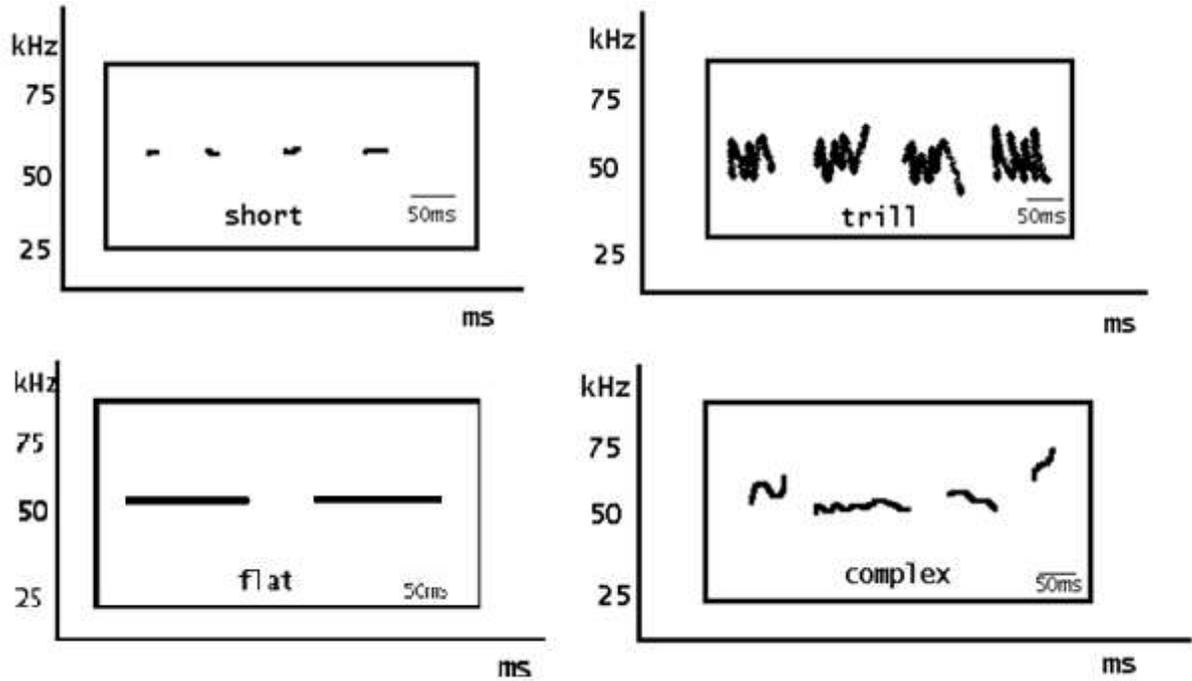
Short - duração inferior a 12 ms;

Triil - Rápidas oscilações de frequência em um intervalo de tempo superior a 15 ms;

Flat - Sem oscilação de frequência com duração superior a 100 ms;

Complex - possuem forma indeterminada, não nítida em categorias;

FIGURA 2 – Representação espectrográfica dos subtipos de vocalização revisados.



FONTE: A autora (2021).

4 METODOLOGIA

Para a construção do presente trabalho foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o tema vocalizações ultrassônicas em modelos animais de autismo. As bases de dados utilizadas foram a Pubmed, a Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), o Embase, o Scopus e a *Web of Science*. Houve um retorno de 623 artigos, dos quais 58 foram selecionados para serem incluídos na composição desta revisão sistemática.

A diferença entre os descritores de pesquisa se deveu à diversidade de índices encontrados nas bibliotecas de cada base de dados. Os descritores utilizados em cada uma dos bancos de dados foram:

1. Pubmed: ((neurodevelopmental AND disorder) OR autism OR ASD OR Autism Spectrum Disorder OR Asperger Syndrome)) AND (animal model OR rat OR rats) AND (ultrasonic AND vocalizations);
2. BVS: “autism spectrum disorder” AND “ animal model” AND “rats” and “animal vocalization”;
3. Embase e Scopus: “autism” AND “rat” AND “vocalization”;
4. Web of Science: “autism” AND “vocalization”AND “rat” AND “animal model”.

Foram excluídos artigos que não abordavam simultaneamente vocalizações ultrassônicas e autismo, sendo incluído àqueles em que esses dois temas foram abordados simultaneamente. Foram excluídas quaisquer pesquisas de revisão e artigos pré-clínicos que não utilizaram ratos como modelos experimentais, como os que usaram camundongos, outros mamíferos, aves, etc. Também não foram incluídos artigos em outras línguas que não a língua inglesa e aqueles aos quais não foi conseguido acesso ao artigo na íntegra. Resumos, comentários e capítulos de livros. Dessa forma, dos 480 artigos únicos e não duplicados restaram 58 artigos, aos quais passaram para uma etapa de leitura mais aprofundada pelos pesquisadores.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

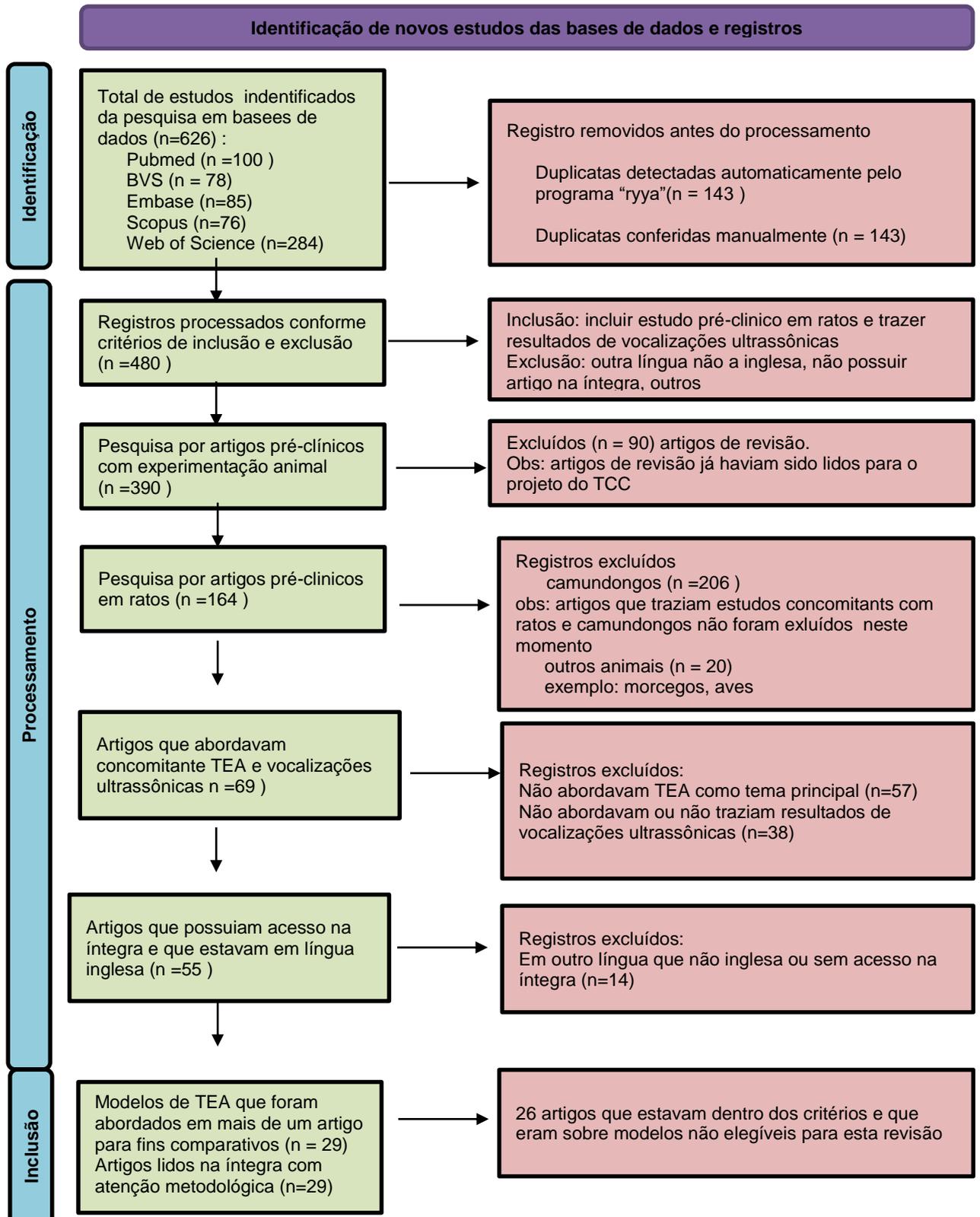
5.1 CLASSIFICAÇÃO DOS ARTIGOS E FLUXOGRAMA

Dos 623 artigos iniciais, 100 eram provenientes da base de dados Pubmed, 78 da BVS, 85 do Embase, 76 dos Scopus e 284 do *Web of Science*. Os artigos encontrados foram importados com seus dados bibliográficos e resumos para o programa Ryyan®, no qual foi feita uma detecção automática das duplicatas. Estas foram analisadas manualmente, excluindo-se as repetições e assim resultando em 143 duplicatas excluídas e 480 artigos únicos (OUZZANI et al., 2016).

Posteriormente, foi utilizado novamente o programa Ryyan® para organizar as decisões de inclusão e exclusão de cada artigo baseando-se nas decisões de dois pesquisadores independentes, de forma que um não soubesse das escolhas um do outro durante o processo. Ao final foi retirado o “*blind*” do programa e decidiu-se as divergências. À cada artigo foram adicionadas etiquetas em relação às razões do porque cada pesquisador incluiu ou excluiu o artigo, o que auxiliou nessa comparação final. O uso dessas etiquetas, assim como botões de inclusão e exclusão, entre outros, de acordo com a organização de cada pesquisador, auxiliou em todo o processo desde a importação dos dados, processamento das informações e exportação dos artigos escolhidos e também ao construir as referências bibliográficas.

Na FIGURA 3 estão representadas as etapas de importação das bases de dados para o programa Ryyan®, as etapas de inclusão estão representadas na coluna da esquerda e as etapas de exclusão estão representadas na coluna da direita. Entre parênteses estão os números de registros correspondente às descrições

FIGURA 3 - Fluxograma das etapas de escolhas de inclusão e exclusão



FONTE: Modelo; Prisma Statement, conteúdo; A AUTORA, 2021

Foi feita uma classificação dos artigos selecionados de acordo com o fluxograma (FIGURA 4) em quatro grandes grupos de acordo com a maneira pela qual o modelo de TEA foi induzido (FIGURAS 5 a 8).

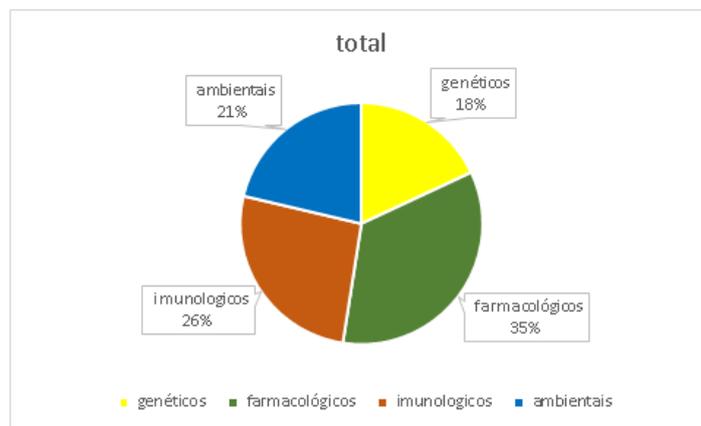
Os modelos que foram induzidos por mutação gênica a partir de um gene previamente associado ao TEA em humanos e que possuem *loci* gênico equivalentes foram enquadrados nos modelos genéticos, representados em amarelo na FIGURA 5. Aqueles modelos que foram induzidos por administração de drogas durante a gestação ou dias pós-natais foram agrupados sobre o nome de modelos farmacológicos, representados em verde na FIGURA 6.

Os modelos induzidos pela administração de pequenas quantidades de proteínas bacterianas e virais induzindo forte reação imunológica durante o período pré-natal e/ou pós-natal foram classificados como modelos imunológicos, representados em laranja na FIGURA 7. Aqueles modelos induzidos através de condições ambientais adversas interferindo indiretamente com o equilíbrio do ambiente uterino, como poluentes, suplementação alimentar, estresse e idade parental foram classificados como modelos ambientais, representados em azul na FIGURA 8.

Procurou-se realizar comparações dos parâmetros das vocalizações dentro do mesmo modelo, tendo em vista as diferenças metodológicas dos artigos, dentro do possível. Essa organização dos dados ocorreu com fins didáticos de maneira que os resultados dos artigos foram divididos em quatro tabelas (TABELAS 1 a 4).

Na FIGURA 4, observa-se a porcentagem de cada tema em relação ao total, sendo a maior parte dos artigos modelos farmacológicos (35%), seguido de imunológicos (26%), ambientais (21%) e genéticos (18%).

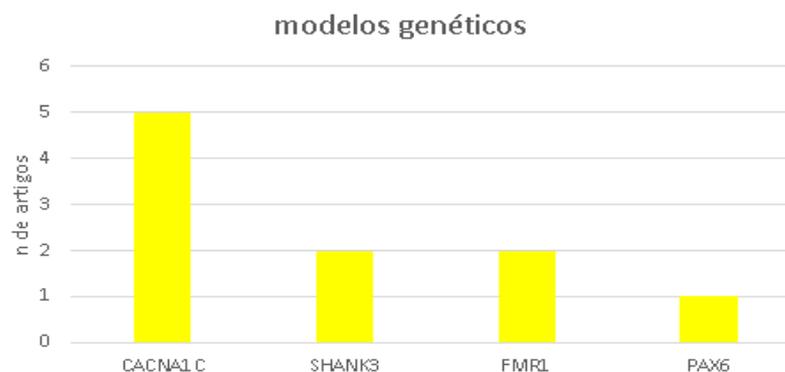
FIGURA 4 - Distribuição (em porcentagem) dos estudos analisando vocalizações ultrassônicas de ratos nas 4 categorias de modelos de autismo



FONTE: A autora (2021).

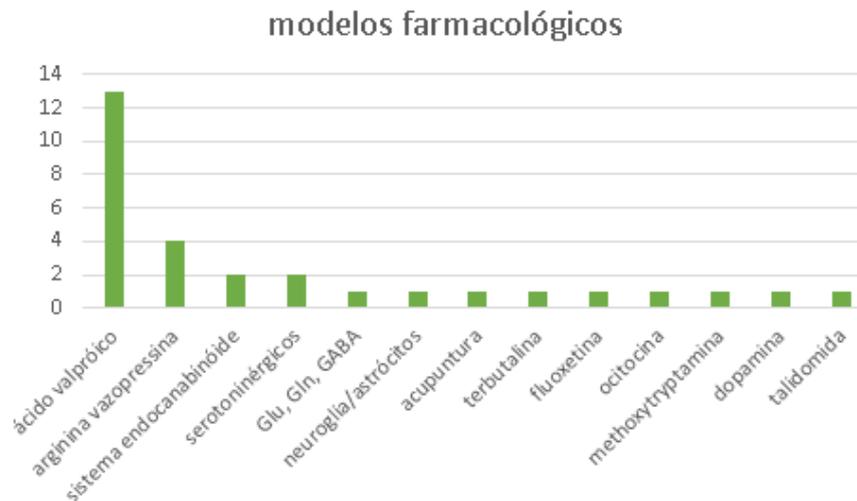
Como pode ser observado nas FIGURAS 5 a 8, os modelos de autismo que possuíam quatro ou mais artigos empregando vocalizações ultrassônicas foram Poly I:C (modelo imunológico), CACNA1C (modelo genético), Ácido Valpróico (modelo farmacológico) e arginina-vasopressina (modelo farmacológico). Os modelos que apresentaram dois artigos foram LPS:Zinco (modelo imunológico), SHANK3 e FMR1 (modelos genéticos) e poluição ambiental (modelo ambiental). Os demais modelos apresentaram um artigo apenas.

FIGURA 5 - Número de artigos utilizando vocalizações ultrassônicas de ratos nos diferentes modelos genéticos de autism



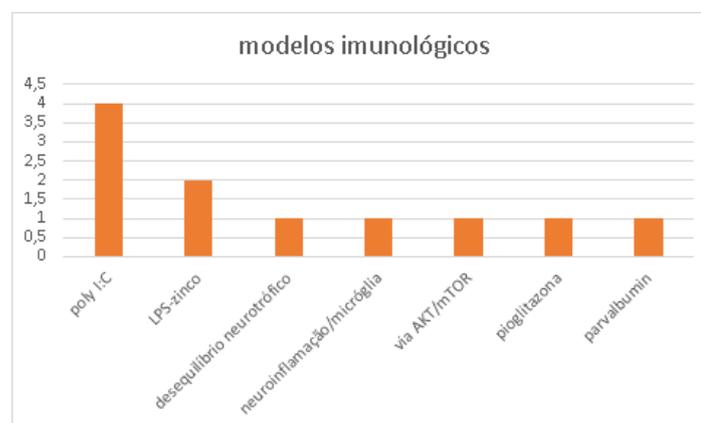
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 6 - Número de artigos utilizando vocalizações ultrassônicas de ratos nos diferentes modelos farmacológicos de autismo.



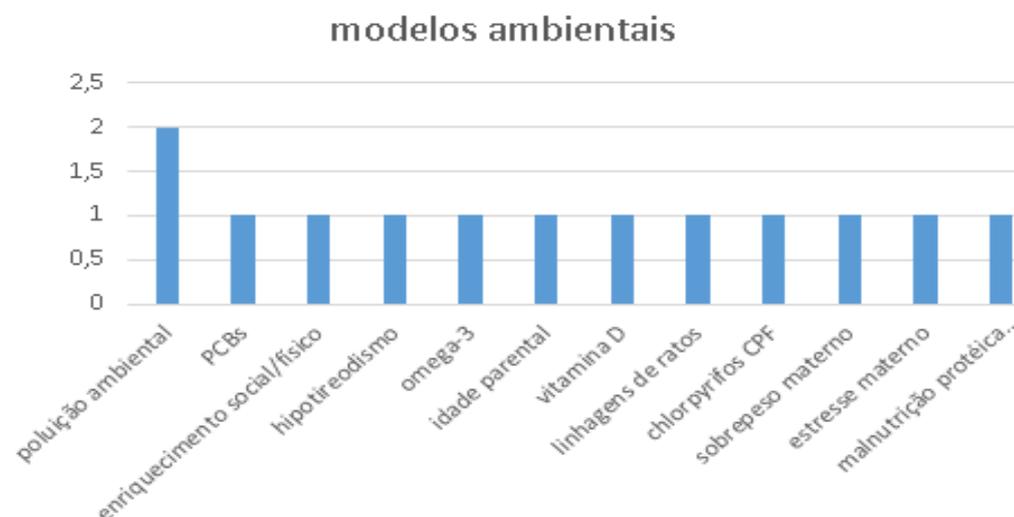
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 7 - Número de artigos utilizando vocalizações ultrassônicas de ratos nos diferentes modelos imunológicos de autismo



FONTE: A autora (2021).

FIGURA 8 - Número de artigos utilizando vocalizações ultrassônicas de ratos nos diferentes modelos ambientais de autismo

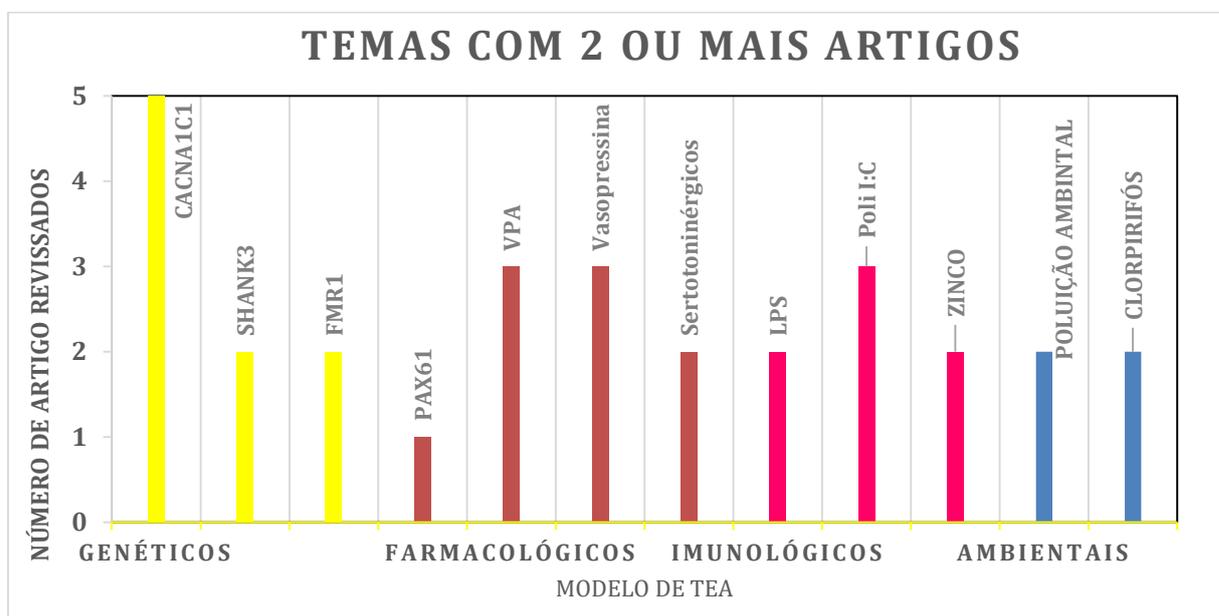


FONTE: A autora (2021).

Foram elencados para fins desta revisão todos os artigos cuja classificação dentro de tema/modelo retornou dois ou mais artigos, os quais foram CACNA1C, SHANK3, FMR1, PAX6 (exceção, com 1 artigo), ácido valpróico, vasopressina, serotoninérgico, lipopolissacarídeo (LPS), tratamento com zinco, Poly I:C (ácido polinossínico-policidídlico), poluição ambiental e o pesticida organofosforado clorpirifós. Assim, foi totalizado um montante de 29 artigos lidos na íntegra e em detalhes, com atenção especial aos princípios metodológicos e como poderiam afetar os resultados positivamente ou negativamente. Dessa forma, esta revisão não esgotou o tema de modelos animais de TEA em ratos que apresentaram parâmetros de vocalização ultrassônica em seus resultados, porém abordou todos os artigos mais representativos e prevalentes. A escolha do tema com dois ou mais artigos encontrados favoreceu o caráter exploratório, comparativo e argumentativo do trabalho, sendo que temas incipientes e que necessitam que mais pesquisa no campo de modelos animais de autismo em ratos, poderão vir a ter em um futuro próximo material adequado para outra revisão que complemente a presente.

A FIGURA 9 apresenta dentre todos os assuntos/modelos encontrados os que efetivamente compõem esta revisão bibliográfica baseando-se na classificação por modelo e submodelo proposta no trabalho, assim como o número de artigos em cada um desses grupos.

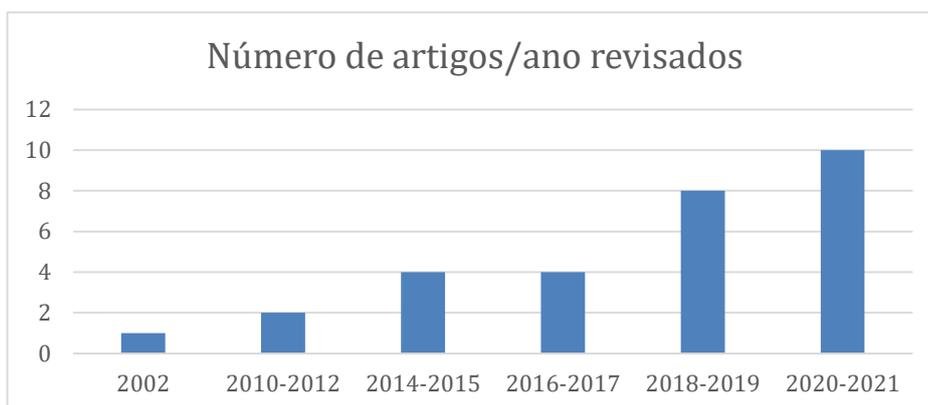
FIGURA 9 - Assuntos que encontram-se nesta revisão e número de artigos



FONTE: A autora (2021).

Observa-se o número crescente de publicações sobre o tema nos artigos selecionados, o que reflete os dados da literatura levando em consideração a representatividade dos artigos. Além disso, nota-se a escassez de artigos sobre o tema antes de 2010, um aumento médio entre os anos 2014 e 2017, e o grande aumento de publicações entre os anos 2018 e 2021, o que demonstra a relevância atual do tema (FIGURA 10).

FIGURA 10- Número de artigos revisados por ano de publicação



FONTE: A autora (2021).

5.2 MODELOS GENÉTICOS

5.2.1 CACNA1C

O gene CACNA1C codifica a subunidade A1c, um importante componente dos canais de cálcio tipo L presentes em 90% dos neurônios dependentes de cálcio no cérebro. Este canal está relacionado com a plasticidade sináptica e a despolarização sináptica no cérebro, sendo um importante alvo terapêutico no estudo de doenças neuropsiquiátricas como autismo, esquizofrenia, transtorno depressivo maior e transtorno bipolar do humor.

Alterações em apenas um nucleotídeo nesse gene são bem documentadas e reproduzíveis através de estudos amplos do genoma por estarem associadas a diversas dessas condições. Essas mutações estão associadas a mudanças na estrutura e funções cerebrais principalmente relacionadas ao reconhecimento emocional facial (KISKO et al., 2018).

Uma das mutações associadas ao gene CACNA1C é a rs1006737 que parece ser sexo dependente tendo efeitos mais proeminentes em mulheres do que em homens. Está associado à diminuição na fluência verbal agravando a produção da linguagem, reconhecimento facial emocional alterado. Em homens está associada ao sobressalto aumentado devido a processo emocional aberrante em resposta a figuras de cunho negativo. Já em mulheres está associado a uma maior hostilidade.

Um grupo de pesquisadores composto por Kisko, Wohr e Schwarting procurou avaliar o efeito sexo dependente de mutações em CACNA1C em ratos. Todos os cinco artigos analisados desse grupo utilizaram ratos *Sprague Dawley* com modificações que incluíam quatro deleções na posição 460649-460652, o que gerava uma parada precoce na leitura do éxon 6.

Em três desses artigos foi relatado que a proteína cerebral responsável pela despolarização dos neurônios através de canais de cálcio (cav1.2.) estava reduzida em pelo menos 50% comparada ao controle (REDECKER et al., 2019; KISKO et al., 2018; KISKO et al., 2020).

Enquanto em WOHR et al. (2019) os machos juvenis mutados não apresentaram alterações no tempo gasto em interações sociais típicas de brincadeira, em KISKO et al. (2018) as fêmeas juvenis mutadas passaram mais tempo brincando,

principalmente apresentando um maior comportamento de *pinning* (montagem). Essas diferenças denotam uma resposta sexo dependente a essas mutações.

Em ambos os estudos houve diminuição na emissão de vocalizações de 50kHz independente da diferença no comportamento de brincadeira. Observa-se à partir dos dados que, apesar de em algumas situações o comportamento de brincadeira estar aumentado, esse momento de socialização não parece ser tão recompensador para o cérebro com hipótese de menor liberação de dopamina no sujeito mutado em relação ao controle. Pode-se fazer uma comparação de que o componente “*liking*”, da situação está diminuído.

Quanto às variáveis acústicas das USVs de 50kHz de cada componente do comportamento de brincadeira: *pinning* (montagem), *wrestling* (luta livre) e *chasing* (perseguir), observa-se que os machos emitem menor número de *flat* e *mixed* durante os três comportamentos, tendo as fêmeas uma menor emissão de *step* e *overlap* durante os três comportamentos, principalmente no *chasing* (perseguir).

Tanto o componente *liking* na emissão das vocalizações em situações sociais como o componente *wanting*, durante a recepção da vocalização pré-gravadas, que é a expectativa de uma socialização denotada pelos experimentos de *playblack* com aproximação da fonte de 50kHz, estão apresentando déficit neste modelo.

As fêmeas mutadas apresentaram maior comportamento de aproximação às fontes de 50kHz do que machos mutados (WOHR et al., 2019; KISKO et al., 2018). Já no distanciamento às fontes de USV de 22kHz, os dois sexos apresentaram o mesmo comportamento de inibição, porém maior duração deste comportamento nas fêmeas, até mesmo depois que a gravação acabou (WOHR et al., 2020).

Dessa forma há muitas evidências de respostas sexo dependentes nos modelos de mutação de CACNA1C com déficits tanto na emissão quanto na recepção das vocalizações, como, por exemplo, elevado comportamento de *pinning* indicando maior agressividade nas fêmeas. Esses resultados vão na mesma direção da clínica nos aspectos de maior agressividade em mulheres humanas com esta mutação, à resposta emocional negativa em homens e também em relação ao déficit na linguagem em ambos os sexos em humanos com essa mutação.

5.2.2 SHANK 3

Mutações em uma única região do gene SHANK 3 resultam em uma síndrome chamada Phelan-Mc Dermid, caracterizada por deficiência intelectual, ausência ou atraso da fala, e hipotonia neonatal motora, de forma que 80% desses pacientes apresentam critérios que os incluem no transtorno do espectro autista. Além disso, 2% dos pacientes autistas com deficiência intelectual apresentam alterações em regiões do gene SHANK 3 (HARONY-NICOLAS et al., 2017). Em ambos os casos, os pacientes apresentam comorbidades como déficits de atenção, hiperatividade, além de possível insensibilidade à dor ou a presença de comportamentos autodestrutivos. Não há ainda compostos farmacológicos que inibam os sintomas principais da doença Phelan Mc-Dermid, sendo importante os modelos animais com validade de construção e de face tanto para compreender melhor o mecanismo neuronal quanto para propor novas terapêuticas.

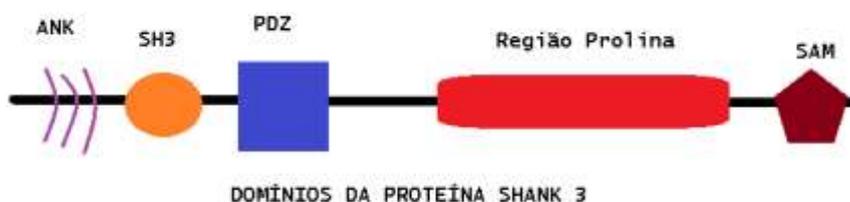
O SHANK3, juntamente com o SHANK1 e 2, pertencem à família SHANK e se localizam na região cromossômica 22q13.33. SHANK3 codifica uma proteína que está presente nas regiões pós-sinápticas glutamatérgicas, onde interage com vários tipos de receptores glutamatérgicos e a proteína actina do citoesqueleto, sendo importante para a plasticidade sináptica e sinalização glutamatérgica.

A proteína SHANK 3 apresenta vários domínios de ligação a outras proteínas; essa característica está de acordo com suas funções de ancoragem sináptica. Seus domínios são: uma região de múltiplas repetições de anquirina (ANK), um domínio SH3, um domínio PDZ, uma região rica em prolina que ocupa grande parte da proteína e um domínio SAM (FIGURA 10).

Esses domínios estão presentes em todas as proteínas provenientes dos genes SHANK (SHANK 1,2 ou 3) e possuem alguma similaridade de constituição entre roedores e humanos. O gene SHANK3 se expressa principalmente em regiões cerebrais como hipocampo, núcleo talâmico, células granulares cerebelares e putamen. Redução na expressão do domínio ANK e SH3 está relacionado a menor densidade sináptica, e alteração na plasticidade e transmissão neuronal (COSTALES; KOLEVZON, 2015). Por exemplo, Harony-Nicolas et al. (2017) realizou mutações em seus experimentos que envolviam a região ANK, já Song et al. (2019) escolheu mutações que envolviam a região SH3 em seus experimentos. Estes domínios foram

esquemáticos na FIGURA 11 para melhor compreensão da disposição destas regiões na proteína SHANK3.

FIGURA 11 - Domínios específicos da proteína SHANK3



FONTE: A AUTORA, 2021

Nos 3 artigos identificados pela revisão sistemática e que utilizaram o modelo de SHANK3 para o estudo das vocalizações ultrassônicas em modelos de TEA (TABELA 1), todos utilizaram ratos da linhagem *Sprague-Dawley*. Em HARONY-NICOLAS et al. (2017), foram feitas deleções para as regiões do éxons 4, 5 e 6 da região ANK, assim resultando em ratos *knockout* com um número bastante reduzido de transcritos da proteína SHANK3, além de ratos heterozigotos com aproximadamente 53% de proteínas SHANK3 transcritas.

Já em SONG et al. (2019) a mutação foi realizada entre os éxons 11 e 22 atingindo principalmente regiões do domínio SH3, PDZ e região rica em prolina. Os resultados mostraram que os ratos *knockout* não produziram nenhuma isoforma do SHANK3, enquanto que os ratos heterozigotos apresentaram nível de expressão aproximadamente 64%. Em BERG et al. (2018) assim como em HARONY-NICOLAS et al. (2017) a deleção foi no éxon 6 com uma parada de leitura precoce, porém não apresentou resultados do nível de expressão da proteína.

SONG et al. (2019) demonstraram a redução concomitante nas proteína Homer, GluR1 e NR1 principalmente no estriado, demonstrando uma interação bioquímica complexa entre a expressão do gene SHANK3 e de outras proteínas que se ligam a ele na região pós-sináptica. Além disso, é importante ressaltar achados anteriores mostrando a região do estriado como a de maior expressão de SHANK3 em relação à outras regiões cerebrais e a relação dessa área com componentes do comportamento social, habilidades cognitivas e sensório-motoras e comportamentos repetitivos implicados no autismo.

Além disso SONG et al. (2019) encontra uma menor densidade espinal dendrítica em neurônios do hipocampo e menor amplitude do potencial de longa duração em células piramidais CA1 o que corrobora com achados de HARONY-NICOLAS et al. 2017 de menor potencial de longa duração em neurônios CA1 do hipocampo.

HARONY-NICOLAS et al. (2017) foi mais além ao observar déficits na plasticidade sináptica tanto em regiões do próprio hipocampo quanto em projeções do hipocampo para o córtex pré-frontal (hipótese-córtex pré-frontal) região também implicada em humanos que possuem mutações no SHANK3 relacionado principalmente aos déficits de memória de trabalho e memória episódica em humanos. Utilizando um teste complexo que exige treinamento prévio do ratos do estudo, o tempo de reação serial de 5 escolhas (5-CSRT) demonstrou déficit de atenção, dificuldade de vigilância e atenção espacial, devido a respostas mais lentas, maiores taxas de omissão e maior queda da aprendizagem do teste ao longo prazo, corroborando com a hipótese hipocampo-córtex pré-frontal.

Os testes comportamentais sociais nos três artigos não demonstraram déficits sociais. Apesar de não apresentar déficits especificamente nesta área, outros déficits como os cognitivos foram encontrados em HARONY-NICOLAS et al. (2017), com menor memória social de longo prazo.

Também não foram encontrados déficits em comportamentos estereotipados, porque não houve alteração no tempo de autolimpeza em nenhum dos artigos revisados do modelo de SHANK3. Houve uma única exceção, em que foi observado comportamento estereotipado, no artigo de BERG et al. (2018), especificamente, no grupo dos machos homozigotos para a mutação em SHANK3. Porém, já era esperado que o grupo homozigoto apresenta-se alterações mais perceptíveis do que o grupo heterozigoto, como em outros modelos de TEA.

Dessa forma, o modelo de SHANK3 não apresentou déficits sociais e nem comportamentos estereotipados. De forma geral, o modelo de SHANK3 não corrobora com os principais sintomas encontrados em outros modelos de TEA.

Os testes de vocalização de 40 kHz em neonatos nos três artigos não observaram déficits comunicativos em relação ao controle a não ser em alguns parâmetros em BERG et al. (2018) que observaram menor vocalização em machos *knockout*. Esses achados corroboram com a hipótese de que SHANK3 não é um bom modelo para se estudar déficits comportamentais sociais do TEA apesar de estar

relacionado com muitas comorbidade encontradas em pacientes com TEA, como o déficit de atenção, déficits cognitivos, comportamentos de autoagressão e limiar diminuído a dor.

O paralelo com algumas dessas comorbidades observadas na clínica pode ser encontrado no trabalho de Song et al. (2019) que observaram autolesões nos ratos experimentais condizentes com comportamentos de autoagressão. Song et al. (2019) também encontra maior limiar à dor tanto em relação à estímulos térmicos quanto mecânicos nos sujeitos experimentais.

Os achados contraditórios nas USV em Berg et al. (2018) podem estar relacionados às diferenças metodológicas dos outros estudos, como um grupo experimental para cada teste, menor tempo de isolamento (30min) comparado aos demais desenhos experimentais de 24 horas antes dos testes sociais.

Seguindo o mesmo raciocínio pode-se dizer que a administração de ocitocina no ventrículo lateral em Harony-Nicolas et al. (2017) apesar de ter melhorado a memória social de longo prazo e o déficit de atenção pela melhora do potencial sináptico hipocampal-córtex prefrontal, ainda não pode ser transposto para estudos clínicos em relação à eficácia da ocitocina na melhora de comportamentos sociais, apesar de ser interessante seu estudo para pacientes da síndrome Phelan Mc-Dermic e em alguns casos de TEA.

5.2.3 FMR1

FMR1 é um gene do cromossomo X que codifica para uma proteína chamada proteína de retardo mental do X frágil (FMRP). FMRP é uma proteína que regula a expressão de outras proteínas, ou seja, é uma proteína de ligação ao RNA e é importante para o desenvolvimento do cérebro, alterando a diferenciação neuronal e plasticidade sináptica.

A mutação nesse gene é caracterizada por repetições CGG. Com baixo índice de repetições CGC, entre 5 e 40 repetições, o indivíduo apresenta o fenótipo normal. Se possuir número de repetições entre 40 e 200, o indivíduo pode não vir a apresentar os sintomas, mas possui mutação instável chamada de pré-mutação, pois com a duplicação haploide pode vir a acumular mais dessas repetições, podendo gerar filhos com a mutação completa. E acima de 200 mutações apresenta a mutação completa

com o quadro mais característico. Além disso, é mais prevalente em homens (1:4000) do que em mulheres (1:8000), sendo também um quadro mais grave em homens.

Muitos desses pacientes se enquadram no transtorno do espectro autista por possuírem sintomas/comorbidades em comum como hiperatividade, déficit de atenção, dificuldade na coordenação motora, atraso no início da fala e déficits comunicativos, dificuldade executivas e de memória, além de convulsão em 15% dos homens e 5% das mulheres (HAGERMAN et al., 2017).

Tendo em vista que não há tratamento farmacológico específico para essas doenças, duas terapêuticas propostas encontradas nos artigos analisados foram o uso de óleos ricos em ácido alfa-linoléico (ômega 3) (SCHIAVI et al., 2020) e o uso de fosfodiesterase 2a.(PDE2a) (MAURIN et al., 2018).

O ômega-3 foi utilizado durante a gestação e durante a lactação (SCHIAVI et al., 2020) enquanto o uso de compostos que atuam sobre a fosfodiesterase 2a(PDE2a) por injeção intraperitoneal 30 min antes dos testes nos ratos PND 5 e PND 9 (MAURIN et al., 2019). Nesse segundo artigo foi realizado apenas o teste de vocalização em ratos juvenis, sendo utilizados camundongos como sujeitos experimentais no restante do trabalho (MAURIN et al., 2019).

Ômega-3 constitui um conjunto de ácidos graxos poli-insaturados que podem reduzir a neuroinflamação, processo que parece estar relacionado com a gênese de diversas doenças neuropsiquiátricas (EISSA et al., 2020). O possível mecanismo pelo qual o docosahexaenóico (um tipo de ômega-3) melhora a formação neural é devido ao fato deste ácido graxo se incorporar na estrutura do neurônio, ao compor suas membranas fosfolipídicas durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (VENTURA et al., 2004). Outro mecanismo pelo qual o ômega-3 poderia estar atuando sobre o sistema nervoso é através do sistema endocanabinóide, já que alguns ácidos do grupo ômega atuam na formação de endocanabinóides, modulando a sua atuação. Nesse sistema, os endocanabinóides atuam contra a neuroinflamação, ativando receptores hipocâmpais, como o receptor canabinóide 1 (CB1) e o receptor vanilóide com potencial transiente 1 (TRVP1), que tem efeitos na memória espacial e na cognição (SCHIAVI et al., 2020).

A mutação no gene FMR1 com conseqüente diminuição nos transcritos protéicos FMRP, faz com que FMRP deixe de inibir a transcrição do RNA PDE2A, no córtex e hipocampo, envolvida com a degradação de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) e guanosina-3'-5' monofosfato cíclico (cGMP). Dessa forma há altos níveis de

PDE2A no modelo de FMR1 depletado, acarretando uma maior degradação de cAMP e cGMP, compostos importantes para a sinalização celular - levando a uma diferenciação, desenvolvimento e função neuronais inadequados. Altas taxas de PDE2A foram inibidas com administração de BAY607550 (Cayman®) nesse experimento. (MAURIN et al., 2018).

As vocalizações ultrassônicas apresentaram déficits em neonatos nos dois artigos utilizando mutações em FMR1, denotando consistência ao modelo. No estudo de Maurin et al. (2018) as vocalizações retornaram quantitativamente ao nível do controle com o tratamento com BAY607550, um inibidor seletivo da enzima PDE2A. Por outro lado, no trabalho utilizando ômega-3 (SCHIAVI et al., 2020) as vocalizações em neonatos não foram recuperadas com o tratamento, apesar de diversos parâmetros comportamentais terem sido recuperados, inclusive na adolescência e fase adulta dos ratos (ou seja, mesmo após grande período sem a alimentação com ômega-3). Nesse estudo, os parâmetros comportamentais recuperados foram, por exemplo, o interesse por situações novas tanto sociais quanto não sociais nos testes de arena de três câmeras e no teste de reconhecimento de novos objetos.

Apesar de o intervalo terapêutico ser teoricamente mais eficaz na intervenção durante a gestação e lactação, Maurin et al. (2018) observaram um efeito de recuperação das vocalizações com apenas uma dose de BAY607550 administrada pouco tempo antes do teste. Entretanto, resta saber se esse efeito também teria benefícios a longo prazo, principalmente com a administração materna com testes ao longo da vida dos filhotes. Já o tratamento com ômega 3 em (SCHIAVI et al., 2020), apesar de não apresentar resultados sobre as vocalizações em neonatos, sugere um efeito terapêutico a longo prazo na vida do animal. Nesta linha, será interessante testes com vocalizações em ratos juvenis e adultos.

5.2.4 PAX6

PAX 6 é um gene localizado na região cromossômica 11p13 e codifica para um fator de transcrição importante para o neurodesenvolvimento. Em geral mutações na região cromossômica 11p12-14, no qual a região 11p13 está inserida, ocasionam doenças sintetizadas pela sigla WAGR (tumor de Wilm's, distúrbios ópticos, malformações genitourinárias e retardo mental). De fato, tanto humanos como roedores com mutação em PAX6 apresentam distúrbios ópticos que variam de diminuição da

visão até fotofobia ao excesso de luz. Os pacientes com WARG apresentam retardo mental e problemas comportamentais e 20% deles têm características autísticas.

Mutações em PAX6 demonstram pouca expressão desse gene desde o 8,5 dia de gestação em roedores em áreas específicas como cérebro frontal, rombencéfalo e espinha dorsal. Além de estar relacionado a formação do sistema nervoso, interfere no funcionamento desse sistema na fase adulta, prejudicando outras áreas como amígdala, bulbo olfatório, córtex piriforme, astrócitos e outros.

É digno de nota que experimentos de UMEDA et al. (2010) observaram alguns déficits condizentes com autismo no modelo com ratos. As fêmeas neonatas emitiram menos vocalizações ultrassônicas quando separadas da mãe apesar de os machos não apresentarem esse deficit, denotando diferenças sexo específicas neste modelo.

Os machos, sujeito experimental único dos demais experimentos deste estudo, demonstraram maior agressividade e menos interesse em atividades olfativas exploratórias na interação social, além disso demonstrou ser menos condicionável à situações de que causam medo em relação ao rato selvagem. Essa resposta de medo diminuída pode estar relacionada a alterações na amígdala.

Essas diferenças não se deram devido a uma maior ansiedade nestes ratos, que apresentou movimentação normal no campo aberto apenas com menor comportamento exploratório (levantar menos a cabeça e olhar adiante, “*rearing*”).

É interessante observar que estes testes só podem ser medidos em ratos heterozigotos para essa mutação, já que os ratos homozigotos morrem ao nascer devido a diversas malformações nos olhos, nariz, cérebro anterior e espinha dorsal.

Apesar de mutações em PaX6 terem se mostrado um modelo válido para mimetizar sintomas autísticos em ratos, mais experimentos são necessários principalmente para explorar as diferenças entre gêneros neste modelo.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS E VOCAIS DOS ARTIGOS DOS MODELOS GENÉTICOS

GENÉTICO	AUTOR	LINHA GEM	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMENTO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	USV MEDIDAS	RESULTADOS	SUBTIPOS DE USV	TRATAMENTO		
CACNA1C	KISKO et al, 2018-a	Sprague-Dawley	Machos adolescentes (20)	Comportamento de brincadeira	-	Emissão de 50kHz UVS; Recepção de 50kHz	↓ (emissão)	NA (Não Analisado)	NA		
			Fêmeas adolescentes (20)		↑ pinning		↓ (aproximação a fonte)				
	KISKO et al, 2018-b	Sprague-Dawley	Machos adolescentes +/- (20)	Comportamento de brincadeira	↓ wrestling	Emissão de 50kHz UVS	↓ (emissão)			↓ Flat, ↓ Mixed	NA
			Fêmeas adolescentes +/- (20)	Comportamento de brincadeira	↑ wrestling ↑ chasing	Emissão de 50kHz UVS	↓ (emissão)			↑ Step; ↑ Overlap	NA
	REDECKER et al, 2019	Sprague-Dawley	Fêmeas adultas +/- (40)	Interação social direta e recíproca	↑ contato físico passivo ↓ comportamento de seguir ↓ número de rearing ↓ comportamento agressivo ↑ tempo gasto em auto-limpeza ↓ tempo gasto em escavar	Emissão de 50kHz UVS	↓ emissão ↓ pico de frequência	- (Sem Diferença)	NA		
	WOHR et al, 2019	Sprague-Dawley	Machos adolescentes +/- (20)	Resposta a emissão de 22kHz	↓ afastamento a fonte	Emissão de 20kHz UVS;	NA	NA	NA	NA	
Fêmeas adolescentes +/- (20)			↓ afastamento a fonte ↑ duração do efeito								
SHANK 3	BERG et al, 2018	NA	Machos adolescentes +/- (9)	Comportamento de brincadeira	↓ social sniffing ↓ allogrooming	NA	NA	NA	NA		
			Machos adolescentes +/- (15)		↓ following ↓ social sniffing ↓ anogenital sniffing ↓ allogrooming						
			Fêmeas adolescentes +/- (12)		-						
			Fêmeas adolescentes +/- (10)		-						

GENÉTICO	AUTOR	LINHA GEM DOS RATOS	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMENTO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	USV MEDIDAS	RESULTADOS	SUBTIPO USV	TRATAMENTO OU INTERVENÇÃO
SHANK 3	BERG et al, 2018	NA	Machos filhotes +/- (24)	Isolamento	NA	Emissão de 40kHz USV	↓ emissão	NA	NA
			Machos filhotes -/- (14)				-		
			Fêmeas filhotes +/- (31)				-		
			Fêmeas filhotes -/- (14)				-		
	NICOLA S et al, 2017	Sprague-Dawley	Machos adolescentes +/- (5-CSRT: 12 / SRM: 37)	5-CSRT SRM longo prazo	↑ erros no teste com menor tempo ↓ memória de longo prazo nos testes sociais	NA	NA	NA	O tratamento com Ocitocina reverteu os resultados comportamentais no testes avaliados e melhorou o potencial sináptico
			Machos adolescentes -/- (5-CSRT: 12 / SRM: 25)			NA	NA		
			Machos filhotes PND9 e 15 +/- (15)	Isolamento	NA	Emissão de 40kHz USV	-	NA	NA
			Machos filhotes PND9 e 15 -/- (12)				-	NA	
	SONG et al, 2019	Sprague-Dawley	Machos adolescentes +/- (OF: 18 / NOR: 18 / VF: 11)	•Campo aberto •Reconhecimento de novos objetos •Von Frey	↑ ansiedade ↑ limiar para dor	NA	NA	NA	Ocitocina; reverteu os resultados do grupo knockout e heterozigoto a níveis similares ao do grupo controle
			Machos adolescentes -/- (OF: 10/ NOR: 17/ VF: 13)		↑ ansiedade ↓ memória social ↑ limiar para dor ↑ autolesão		NA	NA	Ocitocina; reverteu os resultados do grupo knockout e heterozigoto a níveis similares ao do grupo controle
			Machos filhotes +/- (NI)	Isolamento	NA	Emissão de 40kHz USV	-	NA	NA
			Machos filhotes -/- (NI)				-	NA	
FMR1	MAURIN et al, 2019	Sprague-Dawley	Machos filhotes -/- (HB:9 / SI:12 / USV:16)	•Comportamento de homing • Interação social	↑ Latência ↓ Tempo no ninho ↓ Interação social	NA	NA	NA	BAY607550 (Cayman); reverteu os resultados do grupo knockout a níveis similares ao do grupo controle
				Isolamento	NA	Emissão de 40kHz	↓vocalização	NA	

GENÉTICO	AUTOR	LINHA GEM	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMENTO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	USV MEDIDAS	RESULTADOS	SUBTIPOS DE USV	TRATAMENTO OU INTERVENÇÃO
FMR1	SCHIAVI et al, 2020	Sprague-Dawley	Fêmeas e machos filhotes Fmr1-Δ exon 8 (10)	Comportamento de homing	↑ Latência ↓ Tempo no ninho ↓ Locomoção	Emissão de 40kHz	↓vocalização	NA	Administração de Ômega 3 na dieta materna do período intrauterino até o desmame; reverteu os resultados do grupo Fmr1-Δ exon 8 com dieta sem Ômega 3 a níveis similares ao do grupo controle com dieta sem Ômega 3
			Fêmeas e machos adolescentes Fmr1-Δ exon 8 (3C: 8 / NOR: 9)	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de 3 câmaras • Reconhecimento de novos objetos 	↓ discriminação entre o familiar e o novo (em ambos os testes) ↓ sniffing (em ambos os testes)	NA	NA	NA	
			Fêmeas e machos adultos Fmr1-Δ exon 8 (3C: 8 / NOR: 8)		NA	NA	NA	Administração de Ômega 3 na dieta materna do período intrauterino até o desmame; não houve modificações nos resultados em relação aos grupos veículos	
PAX6	UMEDA et al, 2010	Sprague-Dawley	Fêmeas e machos heterozigotos adultos rSey2/+ (CF: 28 / LD: 28 / OF: 28 / SI: 26-32)	<ul style="list-style-type: none"> • Condicionamento ao medo • Teste da escolha entre claro-escuro • Campo aberto • Interação social 	↓ freezing ↓ Tempo na área clara ↓ transições entre claro-escuro ↓ rearing ↓ following ↑ agressividade	NA	NA	NA	NA
			Machos heterozigotos filhotes rSey2/+ (11)	Isolamento	NA	Emissão de 40kHz	-	NA	
			Fêmeas heterozigotos filhotes rSey2/+ (13)	Isolamento	NA	Emissão de 40kHz	↓vocalização	NA	

Legenda: ↑ / ↓ - aumento/diminuição do parâmetro no grupo do modelo em relação ao controle **B** - (Sex-dependent effects of Cacna1c haploinsufficiency on juvenile social play behavior and pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats); **A** - (Cacna1c haploinsufficiency leads to pro-social 50-kHz ultrasonic communication deficits in rats); **5-CSRT** - 5- choice serial reaction time ou tempo de reação à 5 escolhas seriais; **SRM**- teste de discriminação social; **3C**- teste de três câmaras; **NOR**- reconhecimento de novos objetos; **CN** - condicionamento ao medo; **LD** - light-dark box test ou teste da caixa claro escuro; **OF** - *open field* ou campo aberto; **SI** - *social interaction* ou interação social; **pinning**- comportamento de luta em que um rato com todas suas patas no chão e outro está com as patas dianteiras sobre o primeiro rato; **wrestling**-comportamento de luta livre; **chasing** - comportamento de perseguir outro rato; **rSey2/+** - linhagem de ratos com mutação natural que quando homozigotos causa a morte do neonato. **NA** - não analisado

5.3 MODELOS FARMACOLÓGICOS

5.3.1 Ácido Valpróico (VPA)

O ácido valpróico é uma droga anticonvulsivante e estabilizadora de humor que quando administrado durante a gestação da roedora materna pode causar prejuízos no desenvolvimento neuronal. Dois artigos analisam a redução na vocalização ultrassônica, Gzielo et al. (2020) utilizaram uma dosagem única de 500 mg/kg no 12,5 dia de gestação e observaram déficits tanto comunicativos quanto comportamentais ao longo de toda a vida do animal (neonato, juvenil e adultos) em ambos os sexos. Já no estudo de Raza et al.(2015) que é um complemento ao estudo anterior, a dose de valproato foi aumentada para 800mg/kg. Ao contrário do primeiro, este analisou os déficits apenas em fêmeas e em um período único da vida do animal, mais propriamente no período juvenil (29 a 34 dias de idade).

Os dois estudos trazem a validade do modelo VPA como consolidada, devido a diversos mecanismos já estabelecidos como a inibição da histona desacetilase o que se correlaciona até mesmo com reparo impróprio do DNA e outros mecanismos como diminuição da complexidade dendrítica no córtex pré-frontal consistente com a clínica. Dessa forma esses estudos não tem o objetivo de consolidar o modelo embasando-os pelos déficits na vocalização, mas sim analisar a vocalização em um modelo já consolidado.

Em Gzielo et al. (2020) os neonatos apresentaram redução no número, duração média das vocalizações, porém aumento no pico de frequência, este último consistente com a teoria da alta intensidade do choro em bebês com TEA. Já nos juvenis houve déficit na vocalização tanto em machos como em fêmeas, sendo que o tempo e episódios de comportamento social estavam diminuídos apenas em machos. Esses resultados são consistentes com Raza et al. (2015) que observaram déficit comunicativos porém não observou déficits na interação social em fêmeas. Porém Raza et al. (2015) foram mais além ao observar componentes de ataques e defesas na interação social como se vê logo em sequência. Já com os ratos adultos em Gzielo et al. (2020) apenas os machos permaneceram com déficits na vocalização e comportamento, o que poderia indicar um maior desenvolvimento dessas

características nas fêmeas na fase adulta, o que aponta a necessidade de mais aprofundados estudos que analisem esse amadurecimento vocal e comportamental dos ratos ao longo da vida.

Os dois estudos apontam que o modelo VPA não aumentou a ansiedade nos ratos. Raza et al. (2015) discutem que os ratos não apresentaram maior frequência no ato de coçar a parte anterior do corpo com as patas traseiras ou mais frequente comportamento de autolimpeza o que não demonstra estresse. No trabalho de Raza et al. (2015) não foi possível concluir se se tratou de um comportamento de estresse ou movimento estereotipado. Sua hipótese é de que esse comportamento isolado de sacudir mais o corpo estava mais associado a movimentos estereotipado, devido ao fato de que foi anteriormente associado ao efeito do VPA devido a alterações no sistema serotoninérgico após administração de VPA. Esse aumento serotoninérgico tem paralelo com a clínica, devido a pacientes com TEA apresentarem aumento nas taxas desse neurotransmissor na circulação periférica.

Os ratos fêmeas em Raza et al. (2015) apresentaram mesma intensidade no componente da vontade de brincar (“wanting”), pois exibiram o mesmo número de ataques, enquanto o componente “liking”, de gostar da atividade apresentou déficits pois houve um menor número de USV por comportamento de brincadeira. Além disso, diminuem a defesa em que rotacionam completamente o corpo, o que permite uma maior interação corporal, com muitas vezes um rato sobre o outro, preferindo outros tipos de defesa com menos contato corporal, o que é condizente com a clínica em que pacientes com TEA preferem brincadeiras com menos contato corporal.

Para isso foi necessário analisar o número de ataques e defesas, pois a diminuição no número de posições em que um rato fica sobre o outro, pode ser devido ao menor número de ataques, ao menor número de defesas, ou nesse caso, tanto o número de ataques quanto os de defesa estavam equivalentes, porém as preferências nas formas de defesa eram aqueles em que o rato rotacionava parcialmente, de forma a ficar em pé. Lembrando que, como se trata de fêmeas este comportamento não está relacionado à dominação como nos machos.

As fêmeas apresentaram maior comportamento de montagem, o que é um comportamento mais típico em machos. Uma teoria é que o maior comportamento de montagem na idade juvenil analisada pode indicar um desenvolvimento sexual precoce, um paralelo válido à clínica em que crianças com TEA apresentaram

comportamentos sociais inapropriados, como maior comportamento auto-estimulatório (RAZA et al., 2015).

5.3.2 Vasopressina (AVP)

A vasopressina é um peptídeo com 9 aminoácidos e difere da ocitocina por duas posições de aminoácidos. AVP é sintetizado nos núcleos paraventriculares (PVN) e supraópticos do hipotálamo. Na circulação periférica a VPA tem função antidiurética atuando nos receptores AVP2 no sistema renal.

Já no cérebro a vasopressina parece atuar de forma complexa em várias regiões como romboencéfalo, cérebro límbico, hipotálamo e tálamo. A atuação do AVP nessas regiões pode estar associada à presença do receptor AVPR1a e AVPR1b nessas áreas cerebrais. Em ratos a vasopressina parece modular comportamentos em diversas situações como cuidado materno, investigação social, agressão, derrota social e acasalamento (LUKAS; NEUMANN, 2013).

Apesar de déficits nesse hormônio estarem associados a pacientes com TEA, os resultados são contraditórios com alguns artigos demonstrando aumento do AVP no TEA, enquanto outros indicam uma diminuição ou ausência de alteração (WU et al, 2021). Em modelos com ratos, os três artigos incluídos na revisão (TABELA 2) relatam diminuição na vocalização ultrassônica em ratos, além de um déficit na interação social. Por isso, apesar de haverem evidências sobre a importância desse hormônio na socialização e memória, pouco se sabe sobre seu papel na neurobiologia destes processos. Os efeitos comportamentais poderiam até mesmo serem efeitos secundários da atuação desse hormônio no estresse e excitação cerebral. (PAUL et al., 2016).

Em Lucas e Worh (2015) as linhagens de ratos selecionadas com predisposição a altas taxas de ansiedade (HAB) e que possuíam altas taxas do hormônio AVP apresentaram déficits no período juvenil, na socialização e na vocalização de 50kHz ao brincar. Porém, ao testar linhagens de ratos selvagens com um tratamento central (ventrículo lateral direito) que bloqueia os receptores AVPR1a, hipoteticamente extinguindo a atuação do hormônio AVP, também apresentaram déficits sociais e comunicativos. Esses resultados são aparentemente contraditórios,

com tanto altas e baixas taxas da vasopressina levando aos déficits sociais e comunicativos.

Essas discrepâncias podem ter relação tanto à área do SNC considerada, quanto à dosagem ou esquema de administração (dose única). Por exemplo, Wu et al. (2021) demonstraram um melhor efeito a longo prazo durante toda a vida do animal com administrações repetidas por 7 dias, por via subcutânea, logo após o nascimento, embora tenha surtido pouco efeito no comportamento e socialização à curto prazo nos neonatos. Outra diferença pode ter sido nos locais de administração. Lucas e Worh (2015) restringiram a algumas regiões cerebrais, enquanto em Wu et al. (2021) pode ter ocorrido um efeito mais sistêmico, pela injeção subcutânea.

Em Wu et al 2021 os ratos apresentaram comportamentos estereotipados devido ao maior tempo gasto na auto-limpeza. Estes comportamentos não parecem estar associados ao estresse, pois os ratos não demonstrando diferença no teste da caixa-clara escura. Neste teste é esperado que o rato tenha preferência pela área escura da caixa, sendo seu tempo na área clara proporcional à aversão desta região. Deve-se lembrar que Wu et al. (2021) utilizaram como base experimental o modelo do ácido valpróico (VPA), um modelo já consolidado para TEA.

Wu et al. (2021) demonstraram que ratos tratados com VPA apresentaram alterações principalmente no número de neurônios relacionados a vasopressina na região hipotalâmica, particularmente o subtipo neuronal denominado magnocelular e, nessa mesma região, os ratos apresentaram diminuição no nível do RNAm associado ao AVP. Outra região em que a vasopressina estava diminuída foi no fluido cérebro-espinhal. Dessa forma, o AVP administrado via subcutânea passa para o fluido espinhal chegando ao fluido cérebro-espinhal, que circula por várias regiões do cérebro, o que pode ter levado ao acesso do AVP a várias regiões cerebrais. Já injeção no ventrículo lateral direito em Lucas e Worh (2015), pode ter tido um efeito local no cérebro, explicando as diferenças de resultados nos dois artigos.

Isso demonstra que apesar de não se conhecer exatamente o mecanismo de ação do AVP no cérebro, este pode ter mais relação com a região hipotalâmica do que com a região dos ventrículos laterais esquerdos e direitos.

Os resultados do tratamento com AVP em Wu et al. (2021) foram melhora na preferência social no teste de três câmaras e redução do comportamento repetitivo estereotipado.

Um dos artigos que melhor demonstra a relação do AVP com os déficits sociais e comportamentais é o experimento de Paul et al. (2016), pois utiliza como base roedores que possuem uma mutação de um único par de base no éxon 2 do gene AVP e que causa desbalanço na produção desse hormônio.

Similarmente a outros modelos genéticos, os déficits são intermediários para o rato heterozigoto e mais severos para os homozigotos. Paul et al. (2016) encontraram menos frequência da posição supina durante comportamento de brincadeira e menor número de ataques nos ratos mutados. Apesar do nível do comportamento social estar diminuído, o início temporal do comportamento de brincadeira na fase juvenil e seu declínio no final dessa fase está inalterado pela modificação gênica.

Outro resultado de Paul et al. (2016) é o predomínio do subtipo flat nas USV de 50kHz em ratos mutados durante a socialização, sendo este emitido em uma frequência menor que a do controle. Dessa forma demonstrando comportamentos e composição da vocalização específicos nesses déficits.

Apesar de trazer algumas diferenças nos parâmetros de vocalização no início, pico e declínio do comportamento de brincadeira, faltam estudos que analisem especificamente o processo de maturação vocal para ratos selvagens para fins comparativos. Não houve alteração nos parâmetros das vocalizações de 22kHz, indicando que a diminuição das vocalizações não está associado a situações aversivas e sim no valor pro-social e de recompensa das vocalizações de 50kHz associadas ao comportamento de brincadeira.

Dessa forma são necessários mais estudos para compreender os mecanismos de AVP no TEA, de forma a melhor consolidá-lo como modelo e como possível tratamento para este transtorno.

5.3.3 Modelo serotoninérgico

O uso de antidepressivos durante a gravidez é utilizado por aproximadamente 7% das mulheres grávidas nos EUA, sendo que 30% dos bebês nascidos nessas condições apresentam a “síndrome do comportamento neonatal” caracterizada por taquicardia, hipoglicemia, irritabilidade, choro fraco e convulsões. Como a depressão durante a gravidez pode levar à depressão pós-parto, e devemos lembrar que a exposição de antidepressivos no período pós-natal através da amamentação também

não está isento de levar a déficits no desenvolvimento do bebê, esta questão ética é ainda muito polêmica (RICHARDS; PAYNE, 2013)

De forma similar à vasopressina, a serotonina se enquadra tanto como modelo por estar desbalanceada nos pacientes com TEA, tanto como tratamento na tentativa de recuperar esse desbalanço. A primeira associação entre TEA e serotonina remonta ao artigo de Schain e Freedman (1961) no qual observou-se altas taxas plasmáticas de serotonina em 30% dos pacientes do estudo.

Apenas 1% de 5-HT permanece livre no plasma enquanto boa parte é transportada através do transportador SERT para dentro das plaquetas sanguíneas. Foram encontrados número elevado de transportador SERT na membrana das plaquetas em pacientes com TEA indicando que estes transportadores são importantes no papel da serotonina no TEA (MARAZZITI et al., 2015).

Como a serotonina plasmática não atravessa a barreira hematoencefálica, altas taxas plasmáticas de serotonina não são sinônimo de altos níveis desse transmissor no cérebro, onde, de fato, pode estar em baixos níveis. Nesta linha, muitos fármacos que têm como alvo o transportador SERT como inibidores da recaptação de serotonina (p. ex. fluoxetina, venlafaxina e fluvoxamina) e também a risperidona (antipsicótico atípico que tem afinidade por alguns dos receptores da serotonina), são muito utilizados na clínica para tratar sintomas obsessivos compulsivos em pacientes com TEA (SANDER-BUSH; SODHI, 2004).

Uma hipótese é que durante o desenvolvimento fetal, como a barreira hematoencefálica não está totalmente desenvolvida, as altas taxas plasmáticas de 5-HT, atuam como fator de crescimento na divisão celular, plasticidade, sinaptogênese, migração e proliferação cortical. Estas altas taxas atuam por *feedback* negativo no crescimento de terminações neuronais serotoninérgicas, diminuindo a quantidade dessas terminações no cérebro desenvolvido. As funções tróficas da serotonina precedem suas funções como neurotransmissores no cérebro adulto (YANG; TAN; DU, 2014).

Dessa forma temos que fármacos inibidores seletivos da recaptação da serotonina como a fluoxetina quando administrados aos roedores neonatos, podem gerar um modelo serotoninérgico como proposto por Zimmerberg et al. (2014). Estes autores administraram 10mg/kg de fluoxetina do dia pós-natal 2 ao dia pós-natal 7. Já o modelo proposto por Kahne et al. (2002) foi com administração do agonista

serotoninérgico não-específico 5-metoxitriptamina (5-MT) na dosagem de 1mg/kg do dia gestacional 12 até o dia pós-natal 20.

Kahne et al. (2002) avaliaram comportamentalmente os ratos no período neonatal, embora as análises fisiopatológicas tenham ocorrido no adulto. Estes autores observaram tanto um efeito a curto prazo da administração da serotonina, com déficits comunicativos, motores e sensoriais, quanto a longo prazo observando déficit em N-Acetil Aspartato (NAA), um indicador do metabolismo neuronal através do uso da ressonância magnética *in vivo*.

NAA indica um maior metabolismo neuronal e pode significar um metabolismo para mais (anabolismo) ou para menos (catabolismo). Quando é observado em neonatos, pode significar um anabolismo (crescimento) neuronal próprio do desenvolvimento. Já em adultos uma maior atividade nesse metabolismo dos aminoácidos neuronais pode indicar um catabolismo (degradação) de neurônios, o que pode indicar perda de funções cognitivas. Dessa forma a alteração dos níveis de NAA indica atividades neuronais diversas em diferentes fases da vida.

Em Zimmerberg et al. (2014) foram encontrados déficits nos testes comportamentais em neonatos, adolescentes e adultos. As duas linhagens, a naturalmente ansiosa (HAB) e a naturalmente calma (LAB), resguardando as diferenças comportamentais, foram afetadas pela administração da fluoxetina. Esses resultados levam à hipótese de que os déficits comportamentais observados não estão sendo afetados pelo comportamento ansioso, porém tendo uma relação mais estreita com alterações motoras e sensoriais vistas na clínica em pacientes com TEA.

Em Zimmerberg et al. (2014), os neonatos da linhagem HAB vocalizaram mais do que da linhagem LAB, o que já era esperado, devido a maior ansiedade na linhagem HAB. Nas duas linhagens houve uma tendência proporcional de diminuição das vocalizações ultrassônicas, porém não significativo, em relação aos grupos que receberam a administração de fluoxetina. A intenção do autor pode ter sido a de verificar a influência da ansiedade nos resultados das vocalizações nos grupos tratado, porém não houve interferência da ansiedade natural das linhagens nos resultados, indicando independência dos mecanismos de aumento da serotonina no plasma e ansiedade em ratos.

No artigo de Kahne et al. (2002) foram analisadas vocalizações na PND12, PND17 e PND19. A diminuição do número de vocalizações ocorreu somente em PND 17. Já era esperado que em PND19 houvesse diminuição no número de vocalizações,

devido ao processo natural de desmame e independência materna. Dessa forma, as alterações nas USV não foram suficientemente consistentes para se chegar a uma conclusão. Futuros estudos podem avaliar as USV juntamente com o tempo que os neonatos passam com as mães e irmãos de linhagem ou reação frente a um rato não-familiar para concluir se a diminuição da serotonina tem relação à formação do laço entre neonato e roedora materna.

O déficit foi um pouco maior em machos do que em fêmeas, com maior tempo de sair da posição inicial no labirinto em T, adaptado para observar preferência para passar tempo com um coespecífico ou um objeto. Os machos passaram menos tempo com o coespecífico do que as fêmeas. Os déficits sociais foram maiores nos adolescentes do que nos adultos, o que pode ser devido a um amadurecimento natural, já que os adultos são mais conservados em relação à necessidade da quantidade de contato social e físico (ZIMMERBERG et al., 2014).

Um paralelo realizado por Kahne et al. (2002) ao comportamento obsessivo-compulsivo da clínica foi com a observação do déficit na alternância espontânea de tarefa, um teste no labirinto em T adaptado. De forma análoga para observar um paralelo da hiperatividade auditiva detectou déficits com a introdução de um som no campo aberto, que resultou em menor movimentação dos ratos 5-HT.

Outra analogia às alterações no processamento sensorial foi com a introdução do toque leve de um cotonete nas vibrissas do rato, o que levou ao menor comportamento de congelamento dos ratos, porém com mais tentativas de escapar ao estímulo e de chacoalhar o corpo. Na clínica relata-se mais técnicas defensivas nesses pacientes. Esse déficit em ratos pode ter ocorrido devido à ação da serotonina na inervação sensorial que chega às vibrissas conhecida como região do córtex somatossensorial traduzida como campos/ colunas córtex de barris (*barrel fields*). (KAHNE et al., 2002).

Os resultados fisiopatológicos indicaram diminuição da N-Acetil Aspartato (NAA) que é resultado da glicólise das mitocôndrias abundantes nas terminações neuronais, após ser produzido por essa via, o NAA se liga ao ácido glutâmico, se tornando um neurotransmissor NAAG que regula os receptores glutamatérgico, o que pode ou não estar associado com os desbalanço excitatório-inibitório com predomínio excitatório no autismo. NAA está geralmente diminuído em crianças com TEA (KAHNE et al., 2002).

Já o nível de colina estava aumentado no modelo do 5-MT. Colina é componente de membranas celulares dos neurônios, é produzida no fígado e atravessa a barreira hematoencefálica. Suas taxas reduzidas em crianças com TEA podem indicar um atraso na mielinização, já que está relacionado à taxa de renovação dos fosfolípidios nas membranas. Já o seu aumento na fase adulta de pacientes com TEA pode indicar maior catabolismo dos fosfolípidios ou uma maior taxa de desmielinização. O resultado encontrado tem paralelo válido com a clínica (FORD; CREWTER, 2016).

Esses resultados demonstram a importância da utilização da ressonância magnética in vivo para avaliar o desbalanço serotoninérgico e outros no TEA, o que poderia ser mais explorado em modelos animais de TEA.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS E VOCAIS DOS ARTIGOS DOS MODELOS FARMACOLÓGICOS

FARMA COLÓGI CO	AUTOR	LINHAGEM	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMEN TO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	USV	RESULTADOS	SUBTIPOS DE USV	TRATA MENTO
ÁCIDO VALPRÓICO	GZIELO et al, 2020	Sprague- Dawley	Machos adultos - VPA pré-natal (i.p.) (18)	Social Interaction	↓Interação ↓Tempo de interação	Emissão de 50kHz USV	↓Vocalização	NA	NA
			Fêmeas adultas - VPA pré-natal (i.p.) (15)		-		-	NA	
			Machos adolescentes - VPA pré-natal (i.p.) (19)	Social Play	↓Tempo de bricadeira ↓Pinning ↓Pouncing	Emissão de 50kHz USV	↓Vocalização ↓Duração ↑Pico de frequência	NA	
			Fêmeas adolescentes - VPA pré-natal (i.p.) (20)		-		↓Vocalização ↓Duração ↑Pico de frequência	NA	
			Machos neonatos - VPA pré-natal (i.p.) (13)	Isolamento materno	NA	Emissão de 40kHz USV	↓Vocalização ↓Duração ↑Pico de frequência	NA	
			Fêmeas neonatas - VPA pré-natal (i.p.) (17)		NA		↓Vocalização ↓Duração ↑Pico de frequência	NA	
	RAZA et al, 2015	Long- Evans	Fêmeas adolescentes - VPA pré-natal (v.o.) (16)	Social Play	-Ataques ↓Pinning ↑Mounting ↑Body shaking	Emissão de 50kHz USV	↓Vocalização por número de ataque	NA	NA
	CEZAR et al, 2017	Wistar	Machos neonatos - VPA pré-natal (i.p.) (10)	Isolamento materno	NA	Emissão de 40kHz USV	↓↓↓Vocalização	NA	NA
			Machos neonatos - VPA pré-natal (i.p.); ZnSO4 pré-natal (v.s.c.) (10)		NA		↓↓Vocalização	NA	
			Machos neonatos - ZnSO4 pré-natal (v.s.c.) (10)		NA		↓Vocalização	NA	
			Machos adolescentes - VPA pré-natal (i.p.) (10)	• Labirinto em T • Social behavior	↓Alternância ↓↓Pinning ↓Vocalização/pinning ↓↓Darts ↓Following ↓↓Sniffing Crawls	NA	NA	NA	
			Machos adolescentes - ZnSO4 pré-natal (v.s.c.) (10)		Alternância ↓pinning ↓Darts ↓Sniffing ↓Crawls	NA	NA	NA	
Machos adolescentes - VPA pré-natal (i.p.); ZnSO4 pré-natal (v.s.c.) (10)			-Alternância ↓pinning		NA	NA	NA		

FARMACO LÓGICO	AUTOR	LINHAGEM	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMENTO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	USV	RESULTADOS	SUBTIPOS DE USV	TRATAMENTO	
VASOPRESSINA	LUKAS et al, 2015	Wistar	Machos adolescentes - antagonista V1aR (i.c.v.) (18)	Social Play	↓Tempo de brincadeira	Emissão de 50kHz USV	↓Vocalizações	NA	NA	
			Machos adolescentes - AVP sintético (i.c.v.) (18)	Social Play	- Tempo de brincadeira	Emissão de 50kHz USV	- Vocalizações	NA		
	WU et al, 2021	Wistar	machos neonatos VPA (12)	NA	NA	emissão de 40 kHz isolamento materno	↓Vocalizações	↓Frequência modulares ↓curtas	NA	
			machos neonatos VPA+AVP (19)				↓Vocalizações	↓Frequência modulares ↓curtas	3ug/20uL AVP PND0-7 não reverteu vocalização	
			machos adolescentes VPA (12)	três camaras fase 1 (novo/vazio) (S.P.) fase 2 (novo/familiar) (S.N.) auto-limpeza (G.B)	↓não distinguiu novo/vazio -preferiu novo rato ↑autolimpeza	NA	NA	NA	NA	
			machos adolescentes VPA+AVP (19)		preferiu o novo ao vazio- -preferiu novo rato -autolimpeza				3ug/20uL AVP PND0-7 reverteu preferência social e movimento estereotipado	
	VASOPRESSINA (mutação exon 2/produção anormal VPA)	PAUL et al, 2016	Brattleboro (com background Long-Evans)	Machos adolescentes homocigotos (10)	Social Play Social Behavior PND21 e PND23	↓Tempo de brincadeira ↓posição supina	emissão de 50kHz durante comportamento de brincadeira	NA	NA	NA
				Fêmeas adolescentes homocigotas (10)		↓Tempo de brincadeira ↓posição supina			NA	
Machos adolescentes homocigotos (7)				Social Behavior PND34- PND44	↓Tempo de brincadeira ↓número de ataque ↓posição supina ↑amontoar-se (p44)	↓número de vocalizações (p34 e 44) -22kHz		↓ todos subtipos (PND34) ↓ step up e trill (PND44)		
Fêmeas adolescentes homocigotas (8)					↓Tempo de brincadeira ↓número de ataque ↓posição supina ↑amontoar-se (PND44)	↓número de vocalizações (p34 e 44) -22kHz		↓ todos subtipos (PND34) ↓trill (PND44)		

FARMACOLÓGICO	AUTOR	LINHAGEM	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMENTO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	USV	RESULTADOS	SUBTIPOS DE USV	TRATAMENTO
SEROTONINÉRGICO	KAHNE et al, 2002	Sprague-Dawley	Fêmeas e machos neonatos - 5-MT pré e pós-natal (v.s.c.) (20)#	<ul style="list-style-type: none"> • Desenvolvimento • Geotaxia negativa (PND7, 11) • Resposta a estímulo auditível (PND18) <ul style="list-style-type: none"> • Alternância espontânea (PND20) 	↑Atraso na abertura dos olhos ↑Atraso no posicionamento perpendicular ↓Locomoção espontânea ↓Alternância	NA	NA	NA	NA
				<ul style="list-style-type: none"> • Isolamento materno (PND12, 17, 19) 	NA	Emissão de 40 kHz isolamento materno	↓Vocalização	NA	
			Fêmeas e machos adolescentes - 5-MT pré e pós-natal (v.s.c.) (20)#	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulo tátil 	↑Shaking ↓Freezing ↑scaping	NA	NA	NA	
	ZIMMERMAN et al, 2014	N:NIH strain	Machos neonatos - pós-natal fluoxetina (v.o.) (34)	Barra horizontal	↑Queda	NA	NA	NA	NA
				Isolamento materno	NA	Emissão de 40 kHz isolamento materno	↓Vocalização	NA	
			Machos adolescentes - pós-natal fluoxetina (v.o.) (31)	<ul style="list-style-type: none"> • Teste para emergir (labirinto em "T") • Social Behavior 	↑Tempo para emergir ↓Tempo de contato social	NA	NA	NA	
			Machos adultos - pós-natal fluoxetina (v.o.) (33)	<ul style="list-style-type: none"> • Teste para emergir (labirinto em "T") • Social Behavior 	-	NA	NA	NA	

Legenda: ↑/ ↓- aumento/diminuição do parâmetro no grupo do modelo em relação ao controle; **VPA pre-natal** - ácido valpróico administrado à roedora materna antes do nascimento dos filhotes; **PND** - Dia pós-natal; **S.P** - preferência social no teste de três câmaras tempo gasto com o novo rato/tempo gasto na câmara vazia; **S.N** - novidade social tempo gasto com novo rato/tempo gasto com o rato familiar no teste de três câmaras; **AVP** - vasopressina; **NA** - não avaliado; **vs c-** via sub-cutânea; **v.o.**- via oral; ZnSO₄ - sulfato de zinco; **social behavior**- comportamento social; **shaking**-chacoalhar o corpo; **freezing**- comportamento e imobilidade frente à situação aversiva; scaping-ir em direção contrária ao estímulo, evitar algo; **pinning**- um rato sobre o outro, é uma forma de brincadeira com dominação; **APP**- atraso no posicionamento perpendicular- tempo necessário para posiciona o corpo contra a gravidade com a cabeça para cima em uma rampa de 45 °; **TAO**- tempo na abertura do olho- um atraso nesse reflexo ao nascer indica deficit nos parametros de desenvolvimento; **darts** - comportamento de andar entorno de algo/alguem; **crawls** - comportamento de estar em cima ou embaixo de outro rato; ↓↓↓ - diminuição intensa/↓↓ diminuição intermediária comparado a ↓

5.4 MODELOS IMUNOLÓGICOS

Muitos fatores que alteram o ambiente uterino podem perturbar o sistema neurológico em formação. Alguns desses fatores são as infecções bacterianas e virais durante a gestação. Infecções virais como rubéola, citomegalovírus, toxoplasmose, herpes simples, além de infecções bacterianas são fatores epidemiologicamente relacionados a maiores taxas de TEA nos indivíduos cujas mães tiveram essas infecções do que na população em geral (CHICHA et al., 2014)

A relação entre sistema imune e formação neuronal do cérebro é complexa. Um conjunto de precursores de células imunes que dão origem à micróglia no cérebro e está primeiramente alocada nos ventrículos e meninges se distribui entre os dias 9 e 18 de gestação por todo o córtex fetal. Células da micróglia são populações regionais de macrófagos que realizam fagocitose e controlam a taxa de crescimento da angiogênese, regulam a formação sináptica, mielinização e projeção axonal, além de regular interneurônios como os positivos para parvalbumina no córtex. Do total das células imunes no cérebro, 80% são populações de micróglia, o que nos dá uma noção de sua importância na formação do SNC Outras células imunes presentes no cérebro são células mieloides, células dendríticas, linfócitos B e T e células natural killer (MORIMOTO; NAKAJIMA, 2019)

Assim como no sistema nervoso os neurotransmissores são moléculas essenciais para transmitir informações neurais à todo o corpo de forma análoga temos para importância das citocinas no resultado dessa influência do sistema imune regulando processos neuronais (MORIMOTO; NAKAJIMA, 2019). Certas infecções maternas podem resultar em ativação microglial e liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1Beta e fator de necrose tumoral cujos níveis crônicos podem persistir na fase adulta (VOJTECHOVA et al., 2021). Em pacientes adultos com TEA foram encontrados níveis maiores de IL-6, IL-Beta e ativação microglial em relação à população em geral (KNUESEL et al., 2014).

Os modelos imunológicos são induzidos pela administração de partículas virais, mais especificamente RNA sintético viral (Poly I:C) ou proteínas bacterianas (LPS) em períodos específicos da gestação da roedora (VOJTECHOVA et al., 2021).

5.4.1 Lipopolissacarídeos (LPS)

O LPS é o principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* ou *Salmonella* que é extravasado para o meio extracelular durante a divisão celular ou lise levando a reações imunes como liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação microglial.

Em Vojtechova et al. (2018) foi administrado aos ratos de forma intraperitoneal uma dosagem de 2mg/Kg de LPS nos dias P5 à P9 pós natal e avaliado o comportamento na fase adulta. Os resultados trouxeram reações emocionais afetadas na fase adulta, com alterações à resposta ao estresse, o que corrobora com a clínica na qual pacientes com TEA possuem desregulação emocional e expressão emocional distinta.

No teste da exploração ao odor das fêmeas, os machos LPS analisados apresentaram maior frequência do comportamento de autolimpeza, apesar da duração de cada episódio não ter se alterado. Essa pode ser interpretada como uma reação ao estresse ou reação emocional intensa denotando estereotipia ou desregulação emocional.

As vocalizações ultrassônicas também validam esse achado. No teste do labirinto de *Carousel*, no qual uma plataforma giratória aproxima os ratos de uma sessão específica proibida na qual eles recebem choque nas patas, os ratos contam com pistas visuais que os ajudam a se afastar dessa sessão na plataforma. Os animais controle emitiram mais vocalizações aversivas quando erravam mais e entravam na sessão proibida, porém os animais LPS vocalizaram mais em todos os momentos, tanto de acertos como erros, denotando essa desregulação emocional, ainda que os parâmetros cognitivos tenham permanecidos intactos.

Porém outros parâmetros gerais em Vojtechova et al. (2018) como vocalização ultrassônica associada à comportamentos sociais e ansiedade em si não estavam alterados nesse modelo não ratificando a validade de face necessária ao modelo. Os autores se questionam se a alteração imune pós-natal conduziria a menos alterações do que a administração da mesma substância durante a gestação da roedora.

Já o artigo de Vojtechova et al. (2021) conseguiu registrar mais dados a respeito das vocalizações apetitivas e alterações na ansiedade ao administrar 1mg/kg de LPS a partir do dia gestacional 7 até o nascimento, avaliando os comportamentos na fase de adolescente (P45) e adultos (P90).

Os ratos tratados com LPS demonstraram serem mais ansiosos no teste de atravessar a viga em ambas as idades e sexos. Os adultos também demonstraram serem mais ansiosos no teste do campo aberto. Houve diferença no comportamento de contato social, sendo observados déficits nos machos e não nas fêmeas, porém com déficits nas vocalizações em ambos os sexos durante esses comportamentos. Este dado é consistente com o observado, em outros modelos de TEA, como no CACNA1C, em que ocorre diferença entre os sexos.

No entanto, ao contrário de CACNA1C a vocalização teve um efeito oposto entre os sexos na adolescência, com as fêmeas vocalizando mais que o controle e os machos menos que o controle, diferença esta que não se manteve na fase adulta. A diferença que houve entre os sexos na fase adulta foi de que as fêmeas emitiram vocalizações mais curtas que os machos. Porém ambos os sexos na fase adulta emitiram mais chamadas complexas, assim como em outros modelos de TEA.

Algumas dessas diferenças também podem ser entendidas como diferenças naturais de sexo e idade em ratos. Por exemplo o fato dos machos adolescentes terem maior número de comportamentos de brincadeira tendo como função um treinamento para comportamentos de dominância na fase adulta necessários à hierarquia social da colônia. De forma análoga, na fase adulta a exploração anogenital toma outro significado que é o de determinar o status social e reprodutivo dos parceiros. Dessa forma é necessário ter em mente a evolução e maturação natural de vocalização e comportamentos conforme a idade e sexo no momento da comparação com os indivíduos do modelo.

Os ratos do modelo LPS apresentaram área cerebral aumentada relativo a quatro áreas em conjunto relacionadas aos ventrículos e hipocampo. Referente aos interneurônios positivos para parvalbumina (PV+), esses apresentaram-se em menor quantidade nas áreas mais externas do córtex, apesar de nas áreas mais internas do córtex o seu número está preservado. A área cerebral aumentada é encontrada em algumas crianças com TEA, geralmente restritas a idades específicas. Da mesma forma, a diminuição da densidade dos interneurônios PV+ foi encontrado em alguns pacientes com TEA.

5.4.1.1 Tratamento com zinco nos modelos LPS e VPA

A deficiência do zinco tem sido associada a condições do neurodesenvolvimento e muitas crianças autistas apresentam deficiência em zinco (PFAENDER; GRABRUCKER, 2014). Mais de 300 enzimas dependem de zinco e a maioria delas tem expressão no sistema nervoso central de forma que a depleção de zinco poderia estar associado a disfunções neuronais, interferindo com crescimento fetal, reprodução celular e reparação de tecidos (CEZAR et al, 2018).

Estudos em humanos demonstram que mulheres grávidas que tiveram uma dieta pobre em zinco tiveram prejuízos em parâmetros reprodutivos, enquanto que a suplementação de zinco reduziu o prejuízo nesses parâmetros reprodutivos (Kirsten et al, 2015). Já em modelos animais a suplementação com zinco em animais normais prejudicou a vocalização da prole e o comportamento social, aparentando ter um efeito benéfico apenas no contexto da depleção induzida de zinco. (CEZAR et al, 2018).

Coyle et al. (2009) demonstraram em seu trabalho que no quadro inflamatório induzido pelo LPS as citocinas inflamatórias induzem a produção de metalotineína no fígado que, sequestram íons zinco e induzem uma depleção transitória de zinco no plasma materno. Devido ao plasma materno ser a fonte fetal de zinco, isto induz um estado transitório de zinco fetal que poderia acarretar em déficits de desenvolvimento neuronal .

Em Kirsten et al. (2015-a) observou-se diminuição no nível plasmático de zinco das ratas maternas. O tratamento com zinco reverteu alguns parâmetros comportamentais como os estereotipados e os sociais, nos testes de alternância espontânea e no labirinto em T e no teste de interação social.

No artigo de Kirsten et al. (2015-b) porém o tratamento com zinco não reverteu os principais parâmetros das alterações da vocalização ultrassônica induzidas por LPS como o tempo total de vocalização, média de duração, duração máxima e duração total do silêncio, apesar de ter revertido a média do tempo em silêncio e máxima duração de silêncio.

Apesar de não ter revertido os principais parâmetros de vocalização ultrassônica, o tratamento com zinco aumentou os parâmetros reprodutivos, como aumento do número de filhotes, aumentando o número de fêmeas nascidas em comparação com a redução causada pelo modelo do LPS (KIRSTEN et al., 2015-a).

Outro parâmetro revertido pelo tratamento com zinco no modelo LPS foi o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que pode ter relação com a via dopaminérgica em regiões mesolímbicas e com a enzima tirosina hidroxilase (TH), enzima passo limitante na síntese de dopamina. A TH também apresentou reversão de seus níveis pelo tratamento com zinco no modelo LPS em Kirsten et al. (2015-a)

Já no modelo do VPA, o tratamento com zinco não reverteu a alteração da tirosina hidroxilase (TH), demonstrando uma independência de mecanismo dopaminérgico. Entretanto, o tratamento com zinco no modelo do VPA reverteu parcialmente todos os parâmetros vocais e comportamentais analisados, o que indica a existência de um mecanismo de ação alternativo ao encontrado no modelo do LPS.

Tais mecanismos podem estar relacionados ao fato do ácido valpróico, entre outras ações, aumentar os níveis de GABA no cérebro e bloquear canais de cálcio, já que existe uma forte teoria de desbalanço inibitório/e excitatório no autismo, com hipótese de maior elevação glutamatérgica e menor índice gabaérgico, tendendo para um desbalanço excitatório. O segundo mecanismo que pode estar envolvido é o epigenético pelo fato do VPA inibir as histonas de de-acetilases alterando o nível de expressão de genes que podem estar relacionados ao neurodesenvolvimento. Mais estudos são necessários para determinar o mecanismo de ação que relaciona o efeito terapêutico do zinco ao modelo animal VPA (CESAR et al., 2018).

5.4.2 Poly I:C (ácido polinossínico-policitidílico)

Poly I:C é um RNA de fita dupla sintética capaz de induzir respostas imunes no organismo similares a de algumas infecções virais. Ao contrário do LPS que é detectado pelo sistema imune inato pelo receptor do tipo toll-4, o poly I:C é detectado pelo receptor do tipo toll-3, desencadeando uma cascata de sinalização que envolve NF-KB (fator nuclear kappa de cadeia leve) e IFN (interferon). Um dos tecidos que mais expressam receptor do tipo toll-3 é a placenta, o que acredita-se estar relacionado a esta interferência materno-fetal (HADDAD; PATEL; SCHMID, 2020).

Na maioria dos estudos de modelos animais de TEA, o Poly I:C é administrado entre GD 9.5 e GD18.5 (dia gestacional) com uma única dose, sendo a ativação imune proporcional ao efeito agudo ou crônico da infecção e levando em consideração diferentes tempos do desenvolvimento neuronal nas gestações humanas e de

roedores. Em roedores esse tempo estará um pouco antes dos humanos. Em humanos esta ativação devido a infecção ocorre no segundo e terceiro trimestre levando a maior incidência de TEA e esquizofrenia de forma sinérgica a outras predisposições, como o histórico familiar de doenças psiquiátricas (HADDAD; PATEL; SCHMID, 2020).

Serão analisados três artigos que são complementares no sentido de que cada um traz dados sobre uma das idades dos ratos no modelo Poly I:C. Potasiewicz et al. (2020) analisaram os efeitos das USV na separação materna e familiaridade ao ninho dos neonatos com administração à roedora materna de Poly I:C (5mg/kg no GD15 comparativamente aos resultados da administração de VPA (500mg/ kg no DG12.5). Já em Gzielo et al. (2021) foi avaliado as USVs paralelamente ao comportamento de brincadeira nos ratos adolescentes após a mesma dose e tempo de administração de Poly I:C (5mg/kg no GD15) que do artigo de Potasiewicz et al. (2020). Por último será revisado o artigo de Yee et al (2012) que analisa as vocalizações aversivas de ratos adultos frente ao condicionamento ao medo após injeção caudal de Poly I:C (4mg/kg em GD15).

Em Potasiewicz et al (2020) tanto no modelo de Poly I:C quanto do VPA houveram déficits nas vocalizações durante a separação materna e ao reconhecer o odor do ninho familiar, pois em ambos os casos ocorreram menor número de USVs. Apenas os machos Poly I:C não diferenciaram o ninho novo do familiar o que pode ser interpretado como um déficit maior no modelo Poly I:C do que no VPA em relação aos machos. Isto pode significar uma redução no apego social resultando em falha em detectar pistas sociais ou se ajustar a elas.

Esse resultado demonstra diferenças entre os sexos no modelo Poly I:C, que pode resultar da própria diferença da resposta imune entre os sexos. Por exemplo, já foi demonstrado um aumento de fatores pró-inflamatórios em ambos os sexos; entretanto, ao contrário das fêmeas que mantiveram os fatores anti-inflamatórios, houve uma redução desses fatores anti-inflamatórios apenas nos machos (POTASIEWICZ et al.,2020).

Em ambos os artigos, citados anteriormente, houve diminuição da duração da vocalização ultrassônica emitida nos experimentos de isolamento materno e de familiaridade ao ninho. Quando o rato diminui o número de vocalizações emitidas ao estar na presença do ninho familiar, significa que ocorreu um efeito calmante da presença do odor familiar do ninho materno. Apenas em machos Poly I:C foi

observada uma reação atípica de aumento do pico de frequência da USV. Novamente demonstrando diferença entre os sexos no modelo Poly I:C com agravamento do déficit em machos.

Essa diferença da emissão da vocalização entre os sexos pode ter ocorrido com agravamento nos machos devido ao fato da diferença de mecanismos imunes, pois a falta de fatores anti-inflamatório concomitante com aumento de fatores pró-inflamatórios pode ter levado a um desbalanço em mecanismos oxidativos nos machos.

Apenas no experimento de isolamento materno no modelo Poly I:C que não houve diminuição da duração das vocalizações. Em ambos os modelos houve maior proporção do subtipo flat em relação aos demais subtipos. Isso pode ter ocorrido pela própria característica vocal dos neonatos de ainda não possuírem um repertório vocal desenvolvido e também por se tratar de vocalizações aversivas de separação que elicitam o estresse nos neonatos. No modelo Poly I:C, porém não no VPA, houve aumento das vocalizações predominantes flat em comparação ao controle.

Outro fator foi que no modelo VPA, mas não no Poly I:C houve aumento do pico de frequência das USVs emitidas durante o isolamento, o que está em concordância com Gzielo et.al. (2020), revisado no tópico de VPA.

Nos adolescentes em Gzielo et al. (2021) houve déficits comportamentais durante o comportamento de brincadeira apenas nos machos, porém não em fêmeas, com déficits no número de vocalizações emitidas em ambos os sexos com aumento do pico de frequência, como em outros modelos de TEA já revisados (p.ex., no modelo VPA, em Gzielo et al. (2020)).

O déficit comportamental em machos foi comportamento-específico já o número de solicitações de brincadeira (*pouncing*) estava preservado, denotando que não há déficit no componente de antecipação à brincadeira (*wanting*). Entretanto, o número de respostas a brincadeira estava prejudicado, demonstrado pela evitação do movimento *pinning* o que evitaria assim o contato corporal, indicando diminuição no componente gostar da brincadeira (*liking*).

O subtipo de USV mais frequente nas brincadeiras em ambos os sexos foi o componente *trill*, que confirma a teoria antecipatória (*wanting*) pois este subtipo de vocalização está prevalente antes de ações relacionadas ao comportamento de brincadeira.

Além de todas essas evidências, o que torna o modelo Poly I:C compatível com validade de face do TEA é que, além desses déficits sociais e em comunicação, também houve déficit no comportamento repetitivo e estereotipado (GZIELO et al., 2021). Uma característica mutuamente inclusiva é imprescindível ao compor as características diagnósticas estabelecida pelo DSM-5 e, como visto, tanto déficits na socialização como movimentos estereotipados devem estar presente para compor o diagnóstico em humanos.

Neste modelo de Poly I:C em ratos adolescentes em Gzielo et al. (2021) em ambos os sexos houve aumento da atividade locomotora e aumento de movimentos estereotipados no campo aberto. A hipótese de maior excitação nesse modelo explicaria a associação maior emissão de vocalizações USV do tipo trills com maior atividade locomotora. O aumento de trill também ocorreu em adolescente VPA do mesmo grupo (GZIELO et al., 2020).

No teste de enterrar objetos apenas as fêmeas apresentaram aumento na quantidade de bolinhas enterradas. E, esse modelo poderia ser um teste complementar que indicaria déficit comportamental nas fêmeas, já que o comportamento de brincadeira é mais difícil de avaliar já que, naturalmente, as fêmeas exibem menos comportamento de brincadeira que os machos.

Pode-se dizer que um aumento na frequência das vocalizações esteve presente em todas as idades (neonatos, adolescentes e adultos) dos três artigos tanto na emissão de vocalizações de 40kHz, 50kHz e 22kHz. Já a duração das vocalizações se mostraram mais curtas tanto em neonatos quanto nos adultos nas vocalizações de 22kHz, ambos em situações aversivas para os ratos o que pode ser devido à uma maior ansiedade neste modelo em relação aos controles (POTASIEWICZ et al., 2020; GZIELO et al., 2020; YEE et al., 2012).

Em Yee et al. (2012) o número de vocalizações de 22kHz aumentou muito em relação ao controle após o condicionamento, principalmente em machos para os quais houve um aumento de 300% em relação ao controle. Apesar desse aumento exponencial nas vocalizações, machos e fêmeas não apresentaram comportamento de congelamento (*freezing*) mais prolongado do que o controle.

Essa diferença se deu principalmente na forma de recepção às vocalizações de 22 kHz que foram associadas ao choque nas patas levando ao comportamento de congelamento (*freezing*) e não durante a emissão das vocalizações de 22 kHz ou 50 kHz que foram iguais ao controle durante o teste em si (YEE et al., 2012).

Se considerarmos um episódio de vocalizações (definido como porções de conjunto vocalizações separadas por intervalos maiores do que 320 milissegundos), os ratos controles possuíram uma média de 2 chamadas por episódio, sendo este episódio de comprimento médio de 1000ms enquanto os ratos Poly I:C apresentaram uma média de 6 chamadas com comprimento médio de 600ms de duração. Apesar disso o tempo total das não apresentou diferença nos grupos, pois o maior número de chamadas com menor duração acabou equivalente ao controle (YEE et al., 2012).

A menor duração de cada chamada pode indicar uma expiração mais rápida, momento no qual é emitido a chamada e por consequência uma respiração total mais rápida. Isso pode ocorrer frente a uma situação emocionalmente intensa acompanhada de maior ativação simpática com concomitante maiores taxas de batimentos cardíacos e aumento de pressão sanguínea (YEE et al, 2012).

Tanto a menor duração como o pico de frequência maior podem estar associados a quanto é aversivo a situação e quanto a situação pede uma urgência de resposta do rato, frente a um predador, por exemplo. Seria interessante realizar o experimento contrário, saber como o rato controle responde frente a gravação de USV do rato do modelo poly I:C com essas diferenças de parâmetros acústicos. (YEE et al., 2012).

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS E VOCAIS DOS ARTIGOS DOS MODELOS IMUNOLÓGICOS

IMUNOLÓGICO	AUTOR	LINHA GEM	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMENTO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	VOCALIZAÇÕES MEDIDAS	RESULTADOS	SUBTIPOS DE USV	TRATAMENTO	
LPS	VOJTECHOVA et al, 2018	Wistar/Hann	Machos adultos - LPS pós-natal (i.p.) (FB:10 / OP:11 / SI: 10 / CM: 23)	<ul style="list-style-type: none"> • Exploração odor feminino • Campo aberto • Interação Social 	↑ Maior taxa de alto limpeza - Ansiedade ↑ Rearing	NA	NA	NA	MK-801 não houve diferenças	
				• labirinto <i>Carousel</i>	-	Emissão de 22kHz USV	↓ Distinção entre erros e acertos	NA		
	VOJTECHOVA et al, 2021	Wistar	Machos adultos - LPS pré-natal (i.p.) (14)#	<ul style="list-style-type: none"> • Andar na barra (BW) • Campo aberto (OF) • Interação social (SI) 	↑ ansiedade	Emissão de 50kHz USV durante interação social	-	↓ subtipo complexo	NA	
			Fêmeas adultas - LPS pré-natal (i.p.) (14)#		↑ ansiedade		-	↓ subtipo complexo ↑ chamadas curtas		
			Machos adolescentes - LPS pré-natal (i.p.) (14)#		↑ ansiedade ↓ contato social		↓ vocalização	-		
			Fêmeas adolescentes - LPS pré-natal (i.p.) (14)#		↑ Ansiedade - contato social		↑ vocalização	-		
	KIRSTEN et al, 2015	Wistar	Machos neonatos - LPS pré-natal (i.p.) (10)	Isolamento materno	NA	Emissão de 40 kHz isolamento materno	-Vocalização ↑ Tempo médio de silêncio ↑ Tempo máximo de silêncio	NA	NA	
			Machos neonatos - LPS pré-natal (i.p.); ZnSO4 pós-natal (v.s.c.) (10)	Isolamento materno	NA	Emissão de 40 kHz isolamento materno	-Vocalização -Tempo médio de silêncio -Tempo máximo de silêncio	NA		
POLY IC/ VPA	POTASIEWICZ et al, 2020	Sprague-Dawley	machos neonatos poly i:C (18)	isolamento materno	↓vocalização+ que fêmeas	duração USV em milissegundos e pico de frequência kHz emissão de 40kHz USV durante isolamento materno e familiaridade ao ninho	-	↑ flat	N.A.	
					fêmeas neonatos poly i:C (24)		↓vocalização	-		↑ flat
					machos neonatos VPA (30)		↓vocalização	↓ duração ↑ pico		-
					fêmeas neonatos VPA (31)		↓vocalização	↓ duração ↑ pico		-
			machos neonatos poly i:C (20)	familiaridade ao ninho	-		↓ duração ↑ pico	N.A.		
			fêmeas neonatos poly i:C (20)		↓vocalização		↓ duração			
			machos neonatos VPA (31)		↓vocalização		↓ duração			
			fêmeas neonatos VPA (33)		↓vocalização		↓ duração			

IMUNOLÓGICO	AUTOR	LINHA M DOS RATOS	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMENTO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	VOCALIZAÇÕES MEDIDAS	RESULTADOS	SUBTIPOS DE USV	TRATAMENTO
POLY(I:C)	GZIELO et al, 2021	Sprague-Dawley	Machos adolescentes - poly(I:C) pré-natal (i.p) (SP: 11 / LB: 13 / MB: 13)	• Comportamento de brincadeira (SP)	↓Pinning ↓Resposta a interação ↓Tempo total de interação	Emissão de 50kHz USV durante interação social	↓ Vocalização ↑Pico de frequência	↑ Trills ↑Complexo	NA
				• Atividade Locomotora (LB) • Atividade Esteriotipada • Teste de enterrar objetos (MB)	↑Atividade locomotora ↑Atividade esteriotipada -Objetos enterrados	NA	NA	NA	
			Fêmeas adolescentes - poly(I:C) pré-natal (i.p) (SP: 18 / LB: 22 / MB: 22)	• Social Play (SB)	-	Emissão de 50kHz USV durante interação social	↓ Vocalização ↑Pico de frequência	↑ Trills ↑Short ↑Simple	
				• Atividade Locomotora (LB) • Atividade Esteriotipada • Teste de enterrar objetos (MB)	↑Atividade locomotora ↑Atividade esteriotipada ↑Objetos enterrados	NA	NA	NA	
YEE et al, 2012	Sprague-Dawley	Machos adultos - poly(I:C) pré-natal (i.p.) (7)	Condicionamento ao medo	- Freezing	Emissão de 22kHz USV	↑Vocalização ↓Duração ↑Pico de frequência	NA	NA	

Legenda: ↑/ ↓- aumento/diminuição do parâmetro no grupo do modelo em relação ao controle; **i.p.** - injeção intraperitoneal; **\$ ou #** - mesmos ratos nos dois grupos; **FB** - *female behavior* se refere ao teste exploração do odor feminino; **OP**- *open field* ou campo aberto. **SI** - social interaction ou interação social; **CM** - *Carousel Maze* ou labirinto Carousel; **SP** - social play ou comportamento de brincadeira; **LB**- *locomotion behavior* ou atividade locomotora; **MB**- *marble burying* ou enterrar objetos; **pinning**- comportamento de luta em que um rato com todas suas patas no chão e outro está com as patas dianteiras sobre o primeiro rato; **freezing**-tempo em que o rato não apresenta movimento, medida de medo; **NA**- não analisado; **v.s.c**- via sub-cutânea; **znso4**- sulfato de zinco

5.5 MODELOS AMBIENTAIS

5.5.1 Poluição Ambiental

Materiais particulados (P.M.) provenientes da poluição do ar de rodovias gerados a partir da combustão de matéria orgânica contém numerosos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, material orgânico, carbono além de alguns metais. A exposição a essa poluição durante o período gestacional e pós natal está associada em humanos ao baixo peso ao nascer, nascimentos prematuros e mortalidade infantil (RITZ; YU, 1999).

O grupo de pesquisa sobre riscos associados ao autismo desde às causas genéticas às ambientes (CHARGE) publicou um artigo em 2011 de estudo epidemiológico do tipo caso-controle demonstrando uma associação positiva (odds ratio 1,86, 95% de confiança, 1.04-3.45) entre proximidade da moradia materna à rodovias e TEA, especificamente referente à distância da moradia à rodovia de menos de 309m. Esta taxa aumenta quando considerada a proximidade à rodovia conjuntamente ao período do terceiro trimestre de gestação (odds ratio 2.22, 1.16-4.42) (VOLK et al., 2010).

Dois artigos que abordam material particulado proveniente de poluição em rodovias, mais especificamente de tamanho menores que 2,5ug (PM_{2,5}) de volume (LI et al., 2017) e entre 2,5ug e 10ug (P.M 10) de volume (BERG et al., 2020) tem metodologias bem diferentes.

Em Li et al. (2017) foi coletado através de um filtro partículas acumuladas no período de 4 meses de uma intersecção de duas rodovias movimentadas, cujo volume residual particular foi administrado aos ratos por instilação intranasal na dose de 2mg/kg (grupo de baixa dose) e 20mg/kg (grupo de alta dose) uma vez por dia por duas semanas a partir do dia pós-natal 8.

Apesar de Li et al. (2017) ter realizado um cálculo estimativo de qual deveria ser o volume expiratório diário dos ratos e a conseqüente dosagem de exposição que seria equivalente à exposição humana para quantificar a dosagem que seria instilada aos ratos, a dosagem de 20mg/kg administrada por duas semanas demonstrou-se excessiva, levando a parâmetros fisiológicos de inflamação e desempenho muito

inferior ao controle na maioria dos testes comportamentais. Apesar dessa dosagem não ser a mais adequada para avaliar parâmetros comportamentais, ela evidenciou associação do mecanismo de ação inflamatório decorrente da exposição de P.M2,5.

Os modelos animais de exposição a P.M. tem o potencial de confirmar a associação epidemiológica da exposição à P.M. ao TEA. Estes estudos pré-clínicos também permitem explorar possíveis mecanismos de ação entre a exposição à P.M. e fatores epigenéticos ou entre P.M e fatores neuro inflamatórios.

Por exemplo, Li et al. (2017) evidenciou a existência de fatores epigenéticos existentes que associam à exposição de P.M2,5 à expressão diminuída de RNA mensageiro do gene SHANK3 e consequente diminuição no nível proteico de SHANK3, um fator já anteriormente associado ao autismo (rever tópico SHANK3)

Já em Berg et al. (2020), a metodologia foi inovadora no sentido de que os ratos receberam a poluição de uma rodovia, pois foi instalada uma estação experimental perto da rodovia a qual recebia, através de ductos, a poluição da saída de um túnel nessa rodovia. A exposição foi mais próxima da realidade de forma que pode ser melhor extrapolada à exposição humana de moradores próximos a rodovias.

Dois grupos experimentais de ratos, um que recebeu à poluição da rodovia durante a gestação e período pós-natal e outro que recebeu a mesma poluição, porém por um ar filtrado no mesmo período de vida, mimetizam exposições à curtas distâncias e médias distâncias da rodovia. Um terceiro grupo controle permaneceu no laboratório, representando uma população isenta de exposição a materiais particulados. O fator confundidor de interferência de ruído e vibração próprios da proximidade da rodovia e que poderiam estressar os ratos foram minimizados com sistemas de isolamento da estação experimental (BERG et al., 2020).

As vocalizações ultrassônicas estavam diminuídas nos ratos neonatos durante o experimento de isolamento materno em PND 5 (BERG et al., 2020) e em PND16 (Li.et al., 2017). Em PND 5 foi significativa para machos e com grande tendência de diminuição nas fêmeas. Em Berg et al. (2020) também foram analisados parâmetros do desenvolvimento, havendo diminuição nesses parâmetros como predito pela literatura em humanos (RITZ; YU, 1999). Houve diminuição no peso e comprimento corporal, reflexo pressor dos membros e reflexo de contração da boca para amamentação, tendo havido um atraso na idade de desenvolvimento destes dois últimos parâmetros com quase nenhum desenvolvimento do reflexo pressor nas

fêmeas entre os dias PND5 e PND15 comparado ao controle cujo desenvolvimento se iniciou antes de PND 5.

No grupo exposto ao ar poluído, os comportamentos de perseguir e cheirar a região ano genital (não social) ficaram aumentados enquanto o cheirar social estava diminuído (BERG et al., 2020).

No estudo de Li et al. (2017) o cheirar social através de pistas olfativas no teste de habituação olfativa estava diminuído para o grupo de alta dose (20mg/kg) e o tempo de cheirar social estava aumentado para o grupo de baixa dose (2mg/kg). O tempo de exploração de novos objetos estava diminuído no teste de reconhecimento de novos objetos em Li et al. (2017) consistente com a literatura de modelos de exposição de P.M. em ratos (ZANCHI et al., 2010).

A melhor compreensão da influência dos fatores ambientais em associação aos demais fatores, por vezes subestimada pelos cientistas, é importante para a compreensão global da etiologia do TEA. Além disso, como escrito por Berg et al. (2020), ao contrário dos fatores genéticos, os fatores ambientais podem ser melhor prevenidos. Dessa forma, a compreensão da influência dos fatores ambientais pode auxiliar e alertar para medidas preventivas para a população humana durante o desenvolvimento neurológico no terceiro trimestre de gestação.

5.5.2 Pesticidas organofosforados (clorpirifós)

Um dos principais exemplos de pesticidas organofosforados, o clorpirifós (CPF) é utilizado desde 1965 para controlar pragas na agricultura embora seu uso doméstico no controle de insetos tenha sido proibido nos EUA desde 2001. Desde 2006 está em processo de desuso nos Estados Unidos e União Europeia, sendo, no entanto, muito utilizado em outras partes do mundo, inclusive no Brasil (EATON et al., 2015).

A exposição pré-natal em humanos está associada a habilidades psicomotoras alteradas, déficits em memória de trabalho, quociente de inteligência e comportamento alterados em crianças (BERG et al., 2020)

A associação entre autismo e exposição ao CPF é dada através de estudos epidemiológicos de caso-controle, tendo sido encontrado *odds ratio* de 1,13 (95% de intervalo de confiança, entre 1,03 e 1,23) O *odds ratio* maior que 1 demonstra uma

associação positiva, sendo que menor que 1 demonstra uma associação negativa (VON EHRENSTEIN et al., 2019).

O principal efeito tóxico do Clorpirifós é por inibição irreversível da acetilcolinesterase (AChE) afetando o sistema nervoso tanto central quanto periférico. No entanto, efeitos a longo prazo de exposições subcrônicas na gestação têm sido atribuídos a mecanismos independentes da atividade da acetilcolinesterase, apesar desses mecanismos não terem ainda sido completamente elucidados. (JETT; LEIN, 2006).

Por exemplo, nos dois artigos analisados sobre o tema, tanto em Berg et al. (2020) como em Morales-Navas et al. (2020) não foi encontrada alteração na atividade de inibição da acetilcolinesterase após injeção de 1mg/kg subcutânea por 4 dias tanto administrado durante a gestação no dia 12,5 (MORALES-NAVAS et al., 2020) quanto pós-natal em PND1-PND4 (BERG et al., 2020). No entanto, em ambos os artigos, apesar da independência do mecanismo de AChE foram encontrados déficits nas vocalizações ultrassônicas de neonatos.

Morales-Navas et al. (2020) procuraram comparar o seu modelo CPF com o modelo do VPA, este administrado também no GD 12,5 por administração subcutânea única na dosagem de 400 mg/kg. Os dois modelos tiveram uma diminuição comparável no número de vocalizações ultrassônicas emitidas por neonatos em PND7.

Apesar do artigo de Morales-Navas et al. (2020) ter evidenciado que existem diferenças sexuais nos parâmetros das vocalizações, essas diferenças foram, em certa medida, opostas às encontradas para o modelo VPA. Por exemplo, em CPF houve uma tendência de maior média no número de vocalizações e maior latência à primeira vocalização em machos e no modelo VPA encontrou-se o contrário, ou seja, tendência à maior média de vocalizações e maior latência à primeira vocalização em fêmeas.

O modelo do VPA de Morales-Navas et al. (2020) apresentou menor duração das chamadas como havia sido encontrado em GZIELO et al. (2020) (ver tópico sobre VPA), porém ao contrário deste não encontrou maior pico de frequência no modelo VPA. Isto não invalida o experimento, ao contrário, traz dados adicionais à latência à vocalização para o modelo VPA.

Baseado nessas diferenças sexuais comentadas pode-se prever uma maior severidade do quadro da exposição de CPF em machos, hipótese que é corroborada

por Berg et al. (2020), que também observa maior número de vocalizações em machos comparativamente às vocalizações em fêmeas em neonatos na separação materna.

Outras diferenças sexuais encontradas por Berg et al. (2020) foram que machos CPF se aproximaram da fonte da gravação de 50 kHz mais do que os machos do grupo controle. Por outro lado, as fêmeas não diferiram no tempo gasto nos braços proximais e distais no experimento de *playback* de 50 KHz.

Esses resultados não podem ser explicados por diminuição na sensação de medo ou diferenças na ansiedade, já que os resultados não diferiram em machos e fêmeas nos experimentos de comportamento de congelamento no aprendizado ao medo e no tempo gasto no centro no campo aberto. Portanto, os resultados do *playback* podem ter ocorrido por outras motivações, como os ratos não compreenderem a função afiliativa da comunicação de 50 kHz ou terem menor motivação de recompensa social. A diminuição da aproximação à fonte também ocorreu no modelo CACNA1C (KISKO et al., 2018a), porém de forma igualitária entre machos e fêmeas.

O aumento ou diminuição do volume de certas áreas cerebrais, que ocorreram de forma oposta em machos e fêmeas especificamente na dosagem de 0,3mg/kg, podem oferecer pistas para futuras pesquisas do mecanismo adjacente de ação do clorpirifós. Houve aumento do volume da região do hipocampo, diminuição no volume das fibras comissurais do hipocampo e trato espinal cortical nos machos, tendo ocorrido uma diminuição de volume no hipocampo nas fêmeas.

Ainda não se pode afirmar que baixas doses de exposição ao clorpirifós são um modelo válido de TEA, apesar haver diferenças de gênero neste modelo. Há mais evidências de ser um modelo de déficit de atenção e hiperatividade em doses mais altas. No entanto, algumas alterações foram encontradas e que não compreendem todos os critérios de paralelo à clínica, como nas vocalizações ultrassônicas não seguidas por diferenças em movimentos estereotipados. Dessa forma, o modelo preenche o requisito de déficit social, mas não de movimentos estereotipado. Como os dois requisitos são necessários, de forma concomitante, para validade de face que prevê os dois sintomas de TEA, o modelo de CPF por enquanto não possui todos os pré-requisitos de um modelo de TEA.

Ainda assim, mais estudos são necessários, pois se corroborarem com esta hipótese, serão importantes para a conscientização dos órgãos governamentais de

que doses mais baixas das consideradas aceitáveis de exposição também podem ser prejudiciais, acelerando o processo de desuso desse tipo de pesticida no Brasil.

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS DOS RESULTADOS COMPORTAMENTAIS E VOCAIS DOS ARTIGOS DOS MODELOS AMBIENTAIS

AMBIENTAL	AUTOR	LINHA GEM	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMENTO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	VOCALIZAÇÕES MEDIDAS	RESULTADOS	SUBTIPOS DE USV	TRATAMENTO	
POLUIÇÃO DO AR	BERG et al, 2020-c	Sprague-Dawley	Machos neonatos - TRAP (20)#	<ul style="list-style-type: none"> • Desenvolvimento • Isolamento Materno 	↑ Atraso no desenvolvimento	Emissão de 40 kHz isolamento materno	↓ Vocalização	NA	NA	
			Fêmeas neonatas - TRAP (19)#				-	NA		
			Machos neonatos - FA (20)#				-	NA		
			Fêmeas neonatas - FA (20)#				-	NA		
			Machos adolescentes - TRAP (SI: 16 / OP: 16 / NOR: 15 / CF: 16)#	<ul style="list-style-type: none"> • Interação social (SI) • Campo aberto (OP) • Reconhecimento de Novos Objetos (NOR) • Condicionamento ao medo (CF) 	↑ Following/Chasing (SI) ↑ Autolimpeza (SI) - (NOR) - (CF)	NA	NA	NA		
			Fêmeas adolescentes - TRAP (SI: 16 / OP: 16 / NOR: 13 / CF: 16)#			↑ Following/Chasing (SI) ↑ Sneffing anogenital (SI) - (NOR) - (CF)	NA	NA		NA
			Machos adolescentes - FA (SI: 15 / OP: 14 / NOR: 16 / CF: 16)#			↑ Autolimpeza (SI) ↑ locomoção (OF) ↓ Tempo no centro (OF) - (NOR) - (CF)	NA	NA		NA
Fêmeas adolescentes - FA (SI: 16 / OP: 16 / NOR: 13 / CF: 16)#	↑ Sneffing anogenital (SI) ↓ Social sneffing (SI) ↑ locomoção(OF) ↓ Tempo no centro (OF) - (NOR) - (CF)	NA	NA			NA				
POLUIÇÃO DO AR	LI et al, 2017	Sprague-Dawley	Machos neonatos - PM _{2.5} 2 mg/kg (v.i.n.) (9-11)	<ul style="list-style-type: none"> • Isolamento materno • Teste de três câmaras • Enterrar objetos • Reconhecimento de Novos Objetos (NOR) • Olfactory habituation/dishabituation test 	↓ Objetos enterrados ↓ Preferência ao objeto novo	Emissão de 40 kHz isolamento materno	↓ Vocalização	NA	NA	
			Machos neonatos - PM _{2.5} 20 mg/kg (v.i.n.) (9-11)				↓ Preferência ao rato novo ↓ Objetos enterrados ↓ Preferência ao objeto novo ↓ Sniffing ao primeiro contato social	↓ Vocalização		NA
CLORPIRÍFOS	MORALES-NAVAS et al, 2020	Wistar	Machos neonatos - CPF 1 mg/kg (v.s.c.) (7)	Isolamento materno	NA	Emissão de 40 kHz isolamento materno	↓ Vocalização	NA	NA	
			Fêmeas neonatas - CPF 1 mg/kg (v.s.c.) (7)		NA		↓ Vocalização ↑ Latência na primeira vocalização	NA		
			Machos neonatos - VPA 400 mg/kg (v.s.c.) (7)		NA		↓ Vocalização ↑ Latência na primeira vocalização	NA		
			Fêmeas neonatas - VPA 400 mg/kg (v.s.c.) (7)		NA		↓ Vocalização	NA		

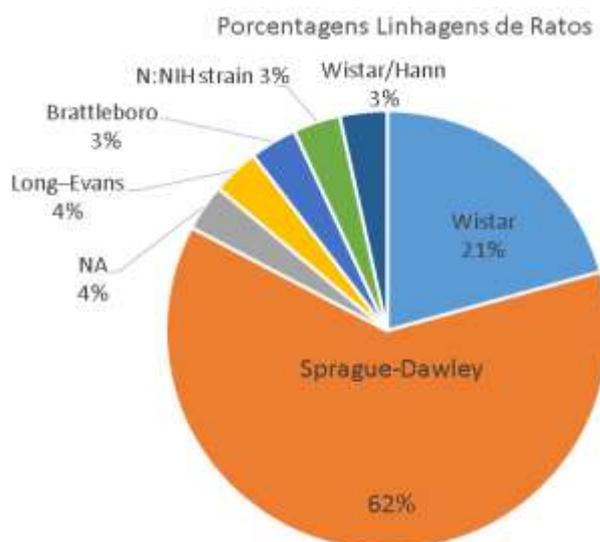
AMBIENTAL	AUTOR	LINHA GEM	SUJEITOS EXPERIMENTAIS (n)	EXPERIMENTO	RESULTADOS COMPORTAMENTAIS	USV	RESULTADOS	SUBTIPOS DE USV	TRATAMENTO
CLORPIRIFÓS	BERG et al, 2020-d	Sprague-Dawley	Machos neonatos - CPF 0,1 mg/kg (v.s.c.) (12)#	<ul style="list-style-type: none"> • Isolamento materno (PND = 8, 12, 16) • Desenvolvimento (PND = 8, 12, 16) • Campo aberto (OF) (PND = 19) 	- (OF) - Desenvolvimento - Atividade motora	Emissão de 40 kHz isolamento materno	↓ Vocalização	NA	NA
			Machos neonatos - CPF 0,3 mg/kg (v.s.c.) (12)#		- (OF) - Desenvolvimento - Atividade motora		↓ Vocalização	NA	
			Machos neonatos - CPF 1,0 mg/kg (v.s.c.) (12)#		- (OF) - Desenvolvimento - Atividade motora		↓ Vocalização	NA	
			Fêmeas neonatas - CPF 0,1 mg/kg (v.s.c.) (12)#		- (OF) - Desenvolvimento - Atividade motora		↓ Vocalização	NA	
			Fêmeas neonatas - CPF 0,3 mg/kg (v.s.c.) (12)#		- (OF) - Desenvolvimento - Atividade motora		↓ Vocalização	NA	
			Fêmeas neonatas - CPF 1,0 mg/kg (v.s.c.) (12)#		- (OF) - Desenvolvimento - Atividade motora		↓ Vocalização	NA	
			Machos adolescentes - CPF 0,1 mg/kg (v.s.c.) (12)#	<ul style="list-style-type: none"> • Playback 50kHz (PB) • Condicionamento ao medo (CN) 	- tempo braços proximal/distal(PB) - (CN)	NA	NA	NA	
			Machos adolescentes - CPF 0,3 mg/kg (v.s.c.) (12)#		- tempo braços proximal/distal(PB) - (CN)	NA	NA	NA	
			Machos adolescentes - CPF 1,0 mg/kg (v.s.c.) (12)#		- tempo braços proximal/distal(PB) - (CN)	NA	NA	NA	
			Fêmeas adolescentes - CPF 0,1 mg/kg (v.s.c.) (12)#		- tempo braços proximal/distal(PB) - (CN)	NA	NA	NA	
			Fêmeas adolescentes - CPF 0,3 mg/kg (v.s.c.) (12)#		↓ tempo braços proximal/distal(PB) - (CN)	NA	NA	NA	
			Fêmeas adolescentes - CPF 1,0 mg/kg (v.s.c.) (12)#		↓ tempo braços proximal/distal(PB) - (CN)	NA	NA	NA	

Legenda: ↑/ ↓- aumento/diminuição do parâmetro no grupo do modelo em relação ao controle **TRAP** - poluição do ar relacionado ao tráfego; **FA** - ar filtrado; **SI**- interação social; **OP** - campo aberto; **NOR** - reconhecimento de novos objetivos; **PM2,5**- material particulado proveniente de poluição de tamanho menor que 2,5 microgramas; CPF- clorpirifós; **v.s.c.**- via subcutânea; **v.i.n.**- via intranasal, #- mesmos animais utilizados em mais de uma idade ou em mais de um experimento; **PB** - experimento de vocalização gravada que elicitava uma reação ao receptor; **CN**- condicionamento ao medo; **SI**- interação social; **sniffing ao primeiro contato social**- olfação de reconhecimento de coespecífico; **olfactory habituation/disabituatation test**- teste aos estímulos olfatórios sociais e não sociais e análise em 3 sessões na qual espera-se que com o passar das sessões o estímulo se torna familiar; #- mesmos ratos em mais de um experimento ou em idades diferentes; **NA**- não analisado

5.6 SUMÁRIO DAS ALTERAÇÕES DAS VOCALIZAÇÕES ULTRASSÔNICAS

Das linhagens de ratos utilizadas nos experimentos de vocalização em modelos animais de TEA, 62% foram *Sprague Dawley* seguida de 21% da linhagem *Wistar*. Conhecer as linhagens utilizadas é importante para a análise dos resultados se levarmos em consideração que cada linhagem possui predisposições e características próprias. Segue gráfico comparativo das linhagens utilizadas encontradas nos trabalhos (FIGURA 12).

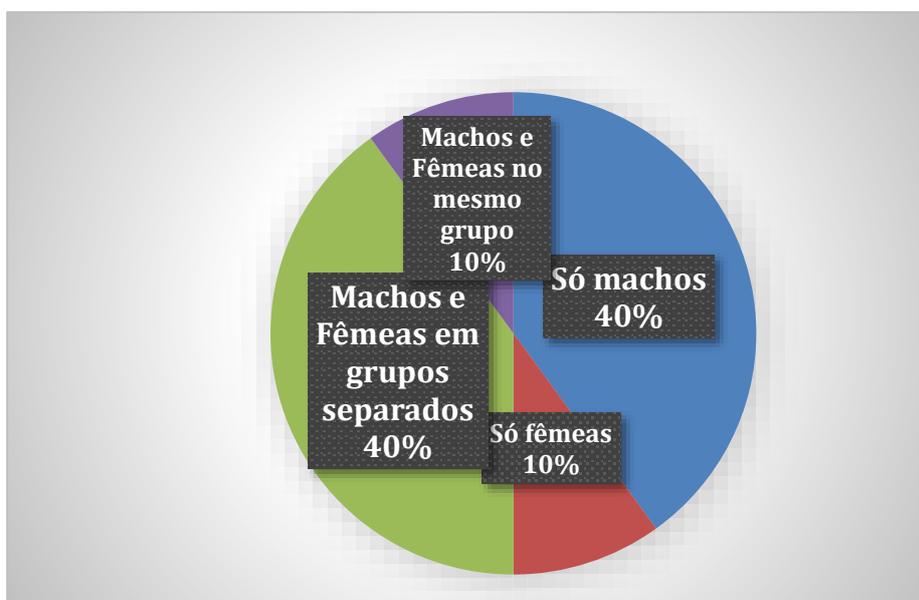
FIGURA 12 - Porcentagem das linhagens de ratos encontradas nos artigos revisados



FONTE: A autora (2021).

Percebe-se uma cisão na preferência dos pesquisadores pelo sexo a ser escolhido para se estudar modelos de TEA, com 40% comparando os resultados de machos e fêmeas e 40% optando pelo uso apenas de machos em seus experimentos (FIGURA 13). Mesmo que haja uma tendência no aumento de artigos que consideram como os modelos de TEA afetam diferencialmente machos e fêmeas, 20% dos artigos que analisaram machos e fêmeas apresentaram juntos os resultados nos mesmos gráficos, como um grupo unificado.

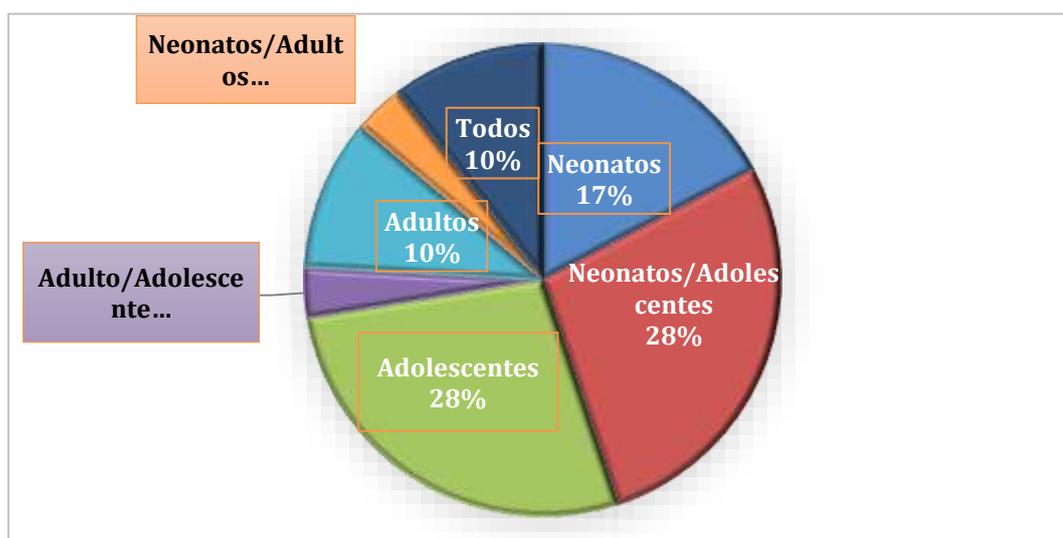
FIGURA 13 - Porcentagem e composição do sexo dos sujeitos experimentais



FONTE: A autora (2021).

As idades mais analisadas nos experimentos revisados foram adolescentes sendo que 28% dos artigos utilizaram apenas ratos nesta idade, o que se deve provavelmente à importância da investigação do comportamento de brincadeira conjuntamente com a análise das vocalizações ultrassônicas em modelos de TEA. Também de grande relevância é o estudo das USV emitidas durante o isolamento materno na fase neonatal que pode ser associada à emissão de USV durante o comportamento de brincadeira na fase de adolescência, sendo que 28% dos artigos exploram a combinação das idades neonatais e juvenis. Muitos artigos se limitam a pesquisa da vocalização ultrassônica em neonatos por considerar essa fase a que possui maiores alterações considerando o caráter de neurodesenvolvimento do transtorno e as alterações na infância. Em modelos animais utilizar apenas neonatos é controverso, já que a combinação das idades reforça as alterações do modelo, sendo que 17% dos artigos utilizaram apenas neonatos. A associação dos resultados das três idades, apesar de ser enriquecedora para os modelos animais de TEA, foi utilizada em apenas 10% dos artigos (FIGURA 14).

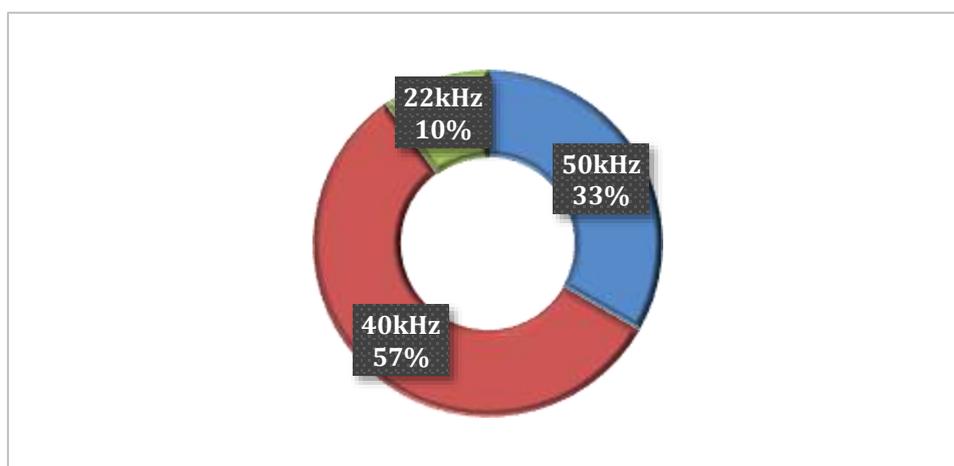
FIGURA 14 - Composição dos experimentos analisados por idade dos ratos



FONTE: A autora (2021).

A frequência das vocalizações ultrassônicas mais estudada nos artigos foi a de 40 kHz durante o experimento de isolamento materno (57% dos artigos), seguida das frequências de USV de 50 kHz durante situações apetitivas como o comportamento de brincadeira (33% dos artigos). Já as vocalizações emitidas de 22 kHz em situações aversivas foram analisadas em apenas 10% dos artigos. Como o sintoma mais prevalente do TEA é o déficit social, este é melhor avaliado durante momentos de interação social, seja entre a mãe e o filhote, ainda que durante a ausência da roedora materna ou durante interação com coespecífico (FIGURA 15).

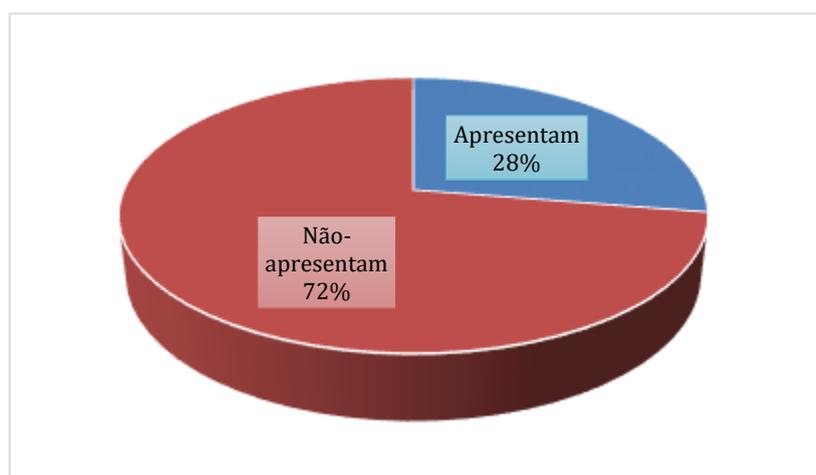
FIGURA 15- Porcentagem das frequências de USVs analisadas nos artigos



FONTE: A autora (2021).

Quase três quartos dos artigos não analisaram os sub-tipos das vocalizações (FIGURA 16), apesar de alguns estudos analisarem a duração das vocalizações e pico de frequência, apenas 28% analisaram os subtipos flat, composite e trill, os quais apresentaram alterações em alguns modelos de TEA e seriam interessantes de serem mais abordados nos animais de TEA. Neste sentido, é importante que os estudos futuros analisem os subtipos das USVs para estabelecer um padrão de alteração de acordo com a idade, auxiliando na identificação de seu significado, assim como de eventuais dimorfismos sexuais. Essa revisão se preza para melhor suporte de como ocorrem alterações levando em consideração esses parâmetros em modelos animais de TEA.

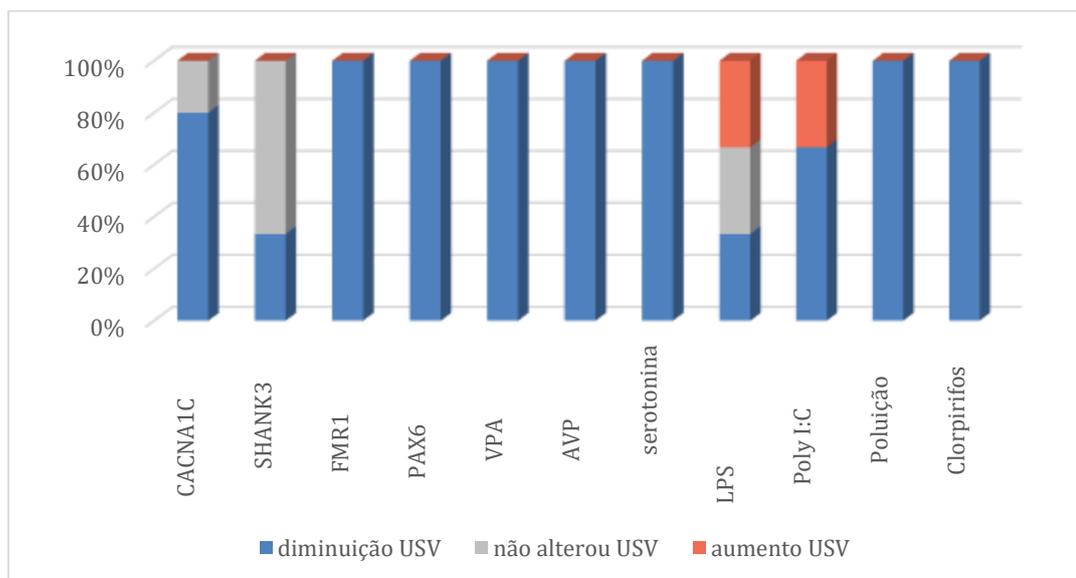
FIGURA 16 - Quantidade percentual de artigos que analisaram subtipos de USVs



FONTE: A autora (2021).

Observa-se que em todos os modelos de TEA houve diminuição das vocalizações ultrassônicas nos ratos, mas com diferenças entre os modelos na porcentagem em que ocorreu essa diminuição. Por exemplo, em 100% dos artigos dos modelos FMR1, PAX6, VPA, AVP, serotonina, poluição do ar e clorpirifós ocorreu uma diminuição no modelo em relação ao controle (FIGURA 17).

FIGURA 17 - Porcentagem de artigos de cada modelo em que houve alteração da USVs.



Legenda: No eixo das ordenadas, 100% refere-se a quantidade de artigos analisados

FONTE: A autora (2021).

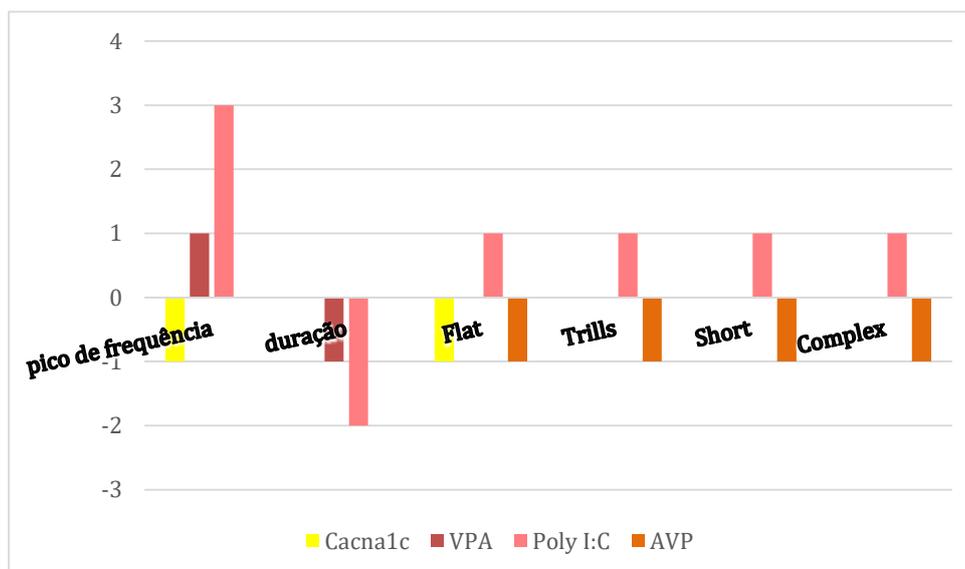
Porém alguns resultados contraditórios e discrepâncias ocorreram entre os artigos, o que é natural. Por exemplo, no modelo SHANK3, dois terços dos artigos não observaram alteração das USVs o que pode indicar que a análise das vocalizações ultrassônicas pode não ser um bom parâmetro para avaliar esse modelo ou que este modelo não seja adequado para estudar os déficits comunicativos do TEA.

Já nos modelos imunológicos de LPS e Poly I:C, um terço dos artigos apresentaram resultados contraditórios de aumento das vocalizações em relação ao controle. Em Poly I:C isto ocorreu em Yee et al. (2021) especificamente durante o condicionamento ao medo. Esse resultado apenas corrobora com o modelo, pois neste caso, uma reação acentuada de medo junto com outros parâmetros do estudo podem vir a acrescentar detalhes das alterações próprias do modelo.

Já no modelo do LPS o aumento ocorreu mais especificamente nas fêmeas adolescentes (VOJTECHOVA et al.,2021), enquanto nos machos houve uma diminuição nas USVs. Estes resultados podem indicar a necessidade da análise de diferenças sexuais neste modelo de TEA.

A FIGURA 18 traz sobre alterações no espectrograma das USV e das alterações em relação ao subtipos nos modelos de TEA que analisaram esses dados.

FIGURA 18 Alterações qualitativas (formato no espectrograma) das USVs nos modelos em que foram analisadas



Legenda: O eixo das ordenadas refere-se a quantidade de artigos, considerar o número absoluto. O número negativo refere-se ao número de artigos em determinado modelo de TEA em que o parâmetro estava abaixo do encontrado no controle, e o reverso para os números positivos.

FONTE: A autora (2021).

O que é esperado nos modelos de TEA é um paralelo ao choro alto dos bebês deste transtorno, sendo representado nos modelos animais por um aumento no pico de frequência das USV no experimento de isolamento materno. No entanto, não houve um consenso sobre a alteração do pico de frequência nos modelos CACNA1C, VPA e Poly I:C (FIGURA 18). Essa tendência foi melhor consolidada no modelo Poly I:C (três artigos com variações positivas). Já sobre a duração das chamadas, os bebês com TEA possuem choros curtos e nos modelos animais é esperado uma duração mais curta das USV. Em relação à duração das vocalizações ultrassônicas, todos os artigos analisados mostram uma menor duração de tempo das USV em modelos de TEA.

Já para os subtipos em geral não há um padrão definido de alterações, o que pode ocorrer por, como descrito acima, poucos artigos fazerem análise dos subtipos. Por outro lado, pode ser decorrente de diferentes alterações induzidas em cada modelo. Ainda assim, observa-se uma prevalência de diminuição da vocalização do tipo flat em modelos de TEA, o que pode estar relacionado ao aspecto de sinalização social deste subtipo de USV.

Como nesses experimentos houve uma diminuição em alguns comportamentos de brincadeira, como em Kisko et al.(2018-b), em que houve diminuição no componente “wrestling” e em Paul et al. (2016), em que houve diminuição no tempo de brincadeira e na posição supina, é esperado haja uma diminuição nos parâmetros da vocalização.

A diminuição em flat denota ainda uma possível diminuição concomitante no componente “liking” da brincadeira, tornando o comportamento de brincadeira menos recompensador para os ratos do modelo TEA. No entanto a análise da quantidade de USV por cada evento único de componentes do comportamento de brincadeira pode fornecer dados mais precisos se realmente houve diminuição das USVs por evento durante a interação.

6 CONCLUSÃO

6.1 RESUMO DOS RESULTADOS DA REVISÃO SISTEMÁTICA

As vocalizações ultrassônicas ganham força como parâmetro para validade de modelos de TEA quando analisadas juntamente com parâmetros comportamentais. Isso porque parâmetros comportamentais isolados podem ser insuficientes para avaliar a complexidade comportamental dos modelos de TEA. Quando em conjunto outras variáveis comportamentais, as USV podem ser úteis tanto quantitativa quanto qualitativamente.

A TABELA 5 apresenta de forma concisa os principais resultados encontrados com a revisão sistemática. Observa-se que apenas 3 dos 11 revisitados analisaram os parâmetros da recepção das vocalizações ultrassônicas e que 7 dos 11 modelos poderiam explorar mais as diferenças dos parâmetros entre os sexos no modelo, tendo até mesmo 3 deles indicado uma possível diferença que não foi possível de ser comprovada apenas com os dados existentes.

Dessa forma, percebe-se lacunas que poderiam ser aproveitadas para estudos futuros. Constata-se que os estudos pré-clínicos analisados auxiliaram a desvendar o mecanismo de ação de muitos desses modelos no TEA, apesar de que muito ainda pode ser realizado neste sentido tendo como base e meio de comparação os estudos apresentados neste trabalho.

Observa-se que em 3 dos 11 modelos não foi possível concluir se se trata de um modelo válido de TEA baseando-se apenas nos artigos analisados, e que futuros estudos são necessários para que se possa chegar a um consenso.

Apercebe-se que 10 dos 11 modelos analisados apresentam alguma correlação válida com os achados clínicos em humanos, apenas para vasopressina não houve dados suficientes para fazer esta correlação.

Os artigos sobre vasopressina não mediram o nível do hormônio AVP na circulação dos modelos animais o que seria uma correlação direta com a clínica e metodologicamente viável.

Reconhece-se que em 7 dos 11 modelos foi proposto um tratamento ou intervenção na tentativa de reverter os déficits sociais e comunicativos encontrados. Desses 7 tratamentos propostos 2 não obtiveram êxito (marcação negativa na tabela

5). A suplementação com ômega 3 no modelo FMR1 foi parcialmente eficaz (notação +/- na tabela), pois ao ser injetada durante a gestação e lactação, reverteu os déficits dos ratos do modelo na adolescência porém não reverteu todos os parâmetros na idade adulta.

TABELA 5 – RESUMO DA REVISÃO SISTEMÁTICA POR MODELO DE TEA

	modelos genéticos				modelos farmacológicos			modelos imunológicos			modelos ambientais	
	Cacna1c	Shank3	FMR1	PAX6	VPA	AVP	serotonina	LPS	zinco	Poly I:C	poluição	clorpirifós
aspectos clínicos	fêmeas ↑agressivas	↓atenção, ↑hiperatividade, auto destrutivo	↑homens ↓atenção, ↑hiperatividade ↑convulsão	↓ópticos ↓genitúrinaria retardo mental	↓densidade dendrítica	Contraditório ↑AVP ou ↓AVP	↑colina ↓NAA ↑obsessivo-compulsivo ↑ sensorial	↓inter-neurônios PV ↑regulação emocional	deficiência em zinco ↓reprodutivo	↑NF-KB ↑interferon	↓reprodutivo como peso ao nascer	↓memória ↓QI
sexo-dependente	fêmeas ↑pinning	machos ↑ansiedade	Dados insuficientes	fêmeas ↓vocalização machos ↓medo	machos ↓brincadeira	só foi analisado em machos	Dados insuficientes	diferente em machos e fêmeas	só foi analisado em machos	machos ↑emissão 22kHz ↓pinning ↓interação	Pode ser mais grave em fêmeas	Pode ser mais grave em machos
patofisiologia	↓proteína cav1.2	↓proteína shank ↓densidade sináptica ↓transmissão neuronal	↑PDE2A ↓cAMP ↓cGMP ↓sinalização celular	formação SNC e funcionamento na fase adulta	↓histona deacetilase ↓reparo DNA	↓magno celular no hipotálamo ↓RNAm (AVP)	↑colina ↓NAA N acetil aspartato	↑áreas cerebrais ventrículos e hipocampo	↑metalotoneína fígado ↓zinco plasma ↓BDNF ↓TH	↑taxa respiração ↑batimentos cardíacos	↓RNAm de Shank3	↑ volume hipocampo machos ↓ volume hipocampo fêmeas
Emissor/receptor	↓recepção ↓emissão	↓emissão	↓emissão	↓emissão fêmeas	↓emissão	↓emissão	↓emissão	↓recepção ↓emissão	↓emissão	↓emissão	↓emissão	↓emissão
clínica & modelo	Sim	Sim. ↓cognição ↑autolesão ↑limiar a dor	Não hipo locomoção	↓ópticos	↓contato corporal ↑choro (kHz) ↑serotonina	faltam dados	↑obsessivo (labirinto T) ↑ sensorial	↓interneurônios PV ↑regulação emocional	tratamento ↑BDNF-LPS ↑TH -VPA	↑choro(kHz) faltam outros dados	↓reprodutivo como peso ao nascer	relação com deficit memória
modelo de autismo	Sim. ↓social ↑autolimpieza	Apenas aspectos de déficit atenção	Sim ↓social ↑rigidez	Sim ↓social ↑rigidez	Sim. ↓social ↑autolimpieza	Sim. ↓social ↑autolimpieza	Sim. ↓social ↑autolimpieza	modelo de TEA ou ansiedade	possível mecanismo TEA	Sim. ↓social ↑autolimpieza	Sim. ↓social ↑autolimpieza	Não ↓vocalização =comportamento
tratamento	-----	ocitocina +	omega 3 +/- PDE2a +	----- ----	-----	↓ AVPR1a - AVP i.c.v +	-----	mk801 (-)	suplementação Zn +LPS+VPA	-----	----- -	-----

6.2 VIESES METODOLÓGICOS

Alguns artigos se abstém da comparação entre os sexos, avaliando apenas ratos machos, com o argumento de que o TEA é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino. Entretanto, pode ser visto que os artigos que comparam os sexos fornecem um acréscimo de dados úteis para validade dos modelos, assim como permitem estender à clínica os resultados observados com novos tratamentos em modelos animais.

Da mesma forma, a análise tanto em neonatos, juvenis e adultos se tornam complementares na avaliação de cada modelo. Características de cada faixa etária devem ser levados em conjunto e comparativamente para se ter uma noção mais abrangente do modelo.

Para fins de comparação com o modelo da doença são necessários mais artigos que caracterizam o amadurecimento normal do sistema vocal em ratos. Como por exemplo, uma análise mais aprofundada de como os subtipos de vocalizações se apresentam em cada faixa etária.

Mesmo os comportamentos em si dos ratos são complexos e temos pistas da sua importância social, porém esse valor utilitário das vocalizações para os ratos são dados a partir de experimentos comparativos em diversos contextos, sendo sua essência mais complexa do que se pode avaliar. Dessa forma, experimentos de fundamentação teórica são bem-vindos.

Além disso, pode-se acrescentar alguns pontos de alerta e cuidados metodológicos que são observadas pela maioria dos artigos, mas é bom lembrar que a falta de alguns desses cuidados que se seguem podem interferir nos resultados:

- alguns poucos artigos não trouxeram nota sobre se os experimentos foram realizados de forma totalmente cega aos experimentadores, os mecanismos mais utilizados foram marcas de caneta marca-texto no rabo dos ratos, pequenas tatuagens à tinta e até mesmo um artigo trouxe o mecanismo de uma tatuagem em formato de código de barras.

- muitos artigos se preocuparam com parâmetros de desenvolvimento típico, trazendo até mesmo a vocalização em neonatos como um parâmetro de desenvolvimento apropriado, porém muitos artigos deixaram de realizar testes

controle para parâmetros locomotores, auditivos e visuais, sendo que os testes comportamentais requeriam que muitos desses parâmetros estivessem preservados

- A maioria dos artigos já utilizam alguma forma automatizada de conferir os parâmetros espectrográficos das vocalizações, apenas um ou outro realizou uma contagem manual duplo cego. Cabe destacar a tendência do surgimento de novas tecnologias como o emprego de ferramentas de inteligência artificial para os próximos anos.

- Apenas um dos artigos mudou de estratégia na apresentação dos resultados, devido ao fato de a variável principal ter dado resultados negativos, utilizando então dados secundários como forma de encontrar um resultado positivo.

Dessa forma, tem-se destacado os pontos forte e lacunas a serem preenchidas no campo dos mais prevalentes e promissores modelos animais do Espectro Autista, evidenciando aspectos da utilização conjunta das vocalizações ultrassônicas e parâmetros comportamentais no estudo pré-clínico e como podem auxiliar esclarecendo novos aspectos dos mecanismos de ação nestes modelos e na proposição de novos tratamentos e intervenções.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**: DSM-5. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.p50-53

BAHARNOORI, M.; BHARDWAJ, S. K.; SRIVASTAVA, L. K. Neonatal Behavioral Changes in Rats With Gestational Exposure to Lipopolysaccharide: A Prenatal Infection Model for Developmental Neuropsychiatric Disorders. **Schizophrenia Bulletin**, v. 38, n. 3, p. 444–456, 2012.

BERG, E. L.; CHING, T. M.; BRUUN, D. A.; et al. Translational outcomes relevant to neurodevelopmental disorders following early life exposure of rats to chlorpyrifos. **Journal of Neurodevelopmental Disorders**, v. 12, n. 1, p. 40, 2020.

BERG, E. L.; COPPING, N. A.; RIVERA, J. K.; et al. Developmental social communication deficits in the *Shank3* rat model of phelan-mcdermid syndrome and autism spectrum disorder: Social communication in the *Shank3* rat. **Autism Research**, v. 11, n. 4, p. 587–601, 2018.

BERG, E. L.; PEDERSEN, L. R.; PRIDE, M. C.; et al. Developmental exposure to near roadway pollution produces behavioral phenotypes relevant to neurodevelopmental disorders in juvenile rats. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 289, 2020.

BRUDZYNSKI, S. M. Handbook of ultrasonic vocalization: window into the mammalian brain. 1st edition ed. Waltham, MA: Elsevier, 2018.

CARUSO, A.; RICCERI, L.; SCATTONI, M. L. Ultrasonic vocalizations as a fundamental tool for early and adult behavioral phenotyping of Autism Spectrum Disorder rodent models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 116, p. 31–43, 2020.

CEZAR, L. C.; KIRSTEN, T. B.; DA FONSECA, C. C. N.; et al. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 84, p. 173–180, 2018.

COSTALES, J. L.; KOLEVZON, A. Phelan–McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. **Neurotherapeutics**, v. 12, n. 3, p. 620–630, 2015.

EATON, D. L.; DAROFF, R. B.; AUTRUP, H.; et al. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 38, n. sup2, p. 1–125, 2008.

VON EHRENSTEIN, O. S.; LING, C.; CUI, X.; et al. Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: population based case-control study. **BMJ**, p. l962, 2019a.

VON EHRENSTEIN, O. S.; LING, C.; CUI, X.; et al. Prenatal and infant exposure to ambient pesticides and autism spectrum disorder in children: population based case-control study. **BMJ**, p. l962, 2019b.

EISSA, N.; SADEQ, A.; SASSE, A.; SADEK, B. Role of Neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder and the Emergence of Brain Histaminergic System. Lessons Also for BPSD? **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 886, 2020.

FONSECA, A. H; et al. Analysis of ultrasonic vocalizations from mice using computer vision and machine learning. (T. Kimchi & A. J. King, Orgs.)eLife, v. 10, p. e59161, 2021. eLife Sciences Publications, Ltd.

FORD, T. C.; CREWETHER, D. P. A Comprehensive Review of the 1H-MRS Metabolite Spectrum in Autism Spectrum Disorder. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, 2016.

GZIELO, K.; POTASIEWICZ, A.; HOŁUJ, M.; et al. Valproic acid exposure impairs ultrasonic communication in infant, adolescent and adult rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 41, p. 52–62, 2020.

GZIELO, K.; POTASIEWICZ, A.; LITWA, E.; et al. The Effect of Maternal Immune Activation on Social Play-Induced Ultrasonic Vocalization in Rats. **Brain Sciences**, v. 11, n. 3, p. 344, 2021.

HADDAD, F. L.; PATEL, S. V.; SCHMID, S. Maternal Immune Activation by Poly I:C as a preclinical Model for Neurodevelopmental Disorders: A focus on Autism and Schizophrenia. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 113, p. 546–567, 2020.

HAGERMAN, R. J.; BERRY-KRAVIS, E.; HAZLETT, H. C.; et al. Fragile X syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2017.

HAMILTON, S. M.; GREEN, J. R.; VEERARAGAVAN, S.; et al. Fmr1 and Nlgn3 knockout rats: Novel tools for investigating autism spectrum disorders. **Behavioral Neuroscience**, v. 128, n. 2, p. 103–109, 2014.

HARONY-NICOLAS, H.; KAY, M.; DU HOFFMANN, J.; et al. Oxytocin improves behavioral and electrophysiological deficits in a novel Shank3-deficient rat. **eLife**, v. 6, p. e18904, 2017.

HOMBERG, J. R.; WÖHR, M.; ALENINA, N. Comeback of the Rat in Biomedical Research. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 900–903, 2017.

JETT, D. A. Noncholinesterase Mechanisms of Central and Peripheral Neurotoxicity: Muscarinic Receptors and Other Targets. , p. 13.

KAHNE, D. Behavioral and magnetic resonance spectroscopic studies in the rat hyperserotonemic model of autism. **Physiology & Behavior**, v. 75, n. 3, p. 403–410, 2002.

KIRSTEN, T. B.; CASARIN, R. C.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Pioglitazone abolishes autistic-like behaviors via the IL-6 pathway. (M. Bader, Org.) **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0197060, 2018.

KIRSTEN, THIAGO BERTI; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; BERNARDES, S.; 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. (C. M. McCormick, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0134565, 2015 (a)

KIRSTEN, THIAGO B.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; BERNARDI, M. M.; FELICIO, L. F. Prenatal zinc prevents communication impairments and BDNF disturbance in a rat model of autism induced by prenatal lipopolysaccharide exposure. **Life Sciences**, v. 130, p. 12–17, 2015 (b)

KIRSTEN, T. B.; CHAVES-KIRSTEN, G. P.; CHAIBLE, L. M.; et al. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, n. 10, p. 1903–1912, 2012a.

KISKO, T. M.; BRAUN, M. D.; MICHELS, S.; et al. *Cacna1c* haploinsufficiency leads to pro-social 50-kHz ultrasonic communication deficits in rats. **Disease Models & Mechanisms**, p. dmm.034116, 2018.

KISKO, T. M.; BRAUN, M. D.; MICHELS, S.; et al. Sex-dependent effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on juvenile social play behavior and pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats. **Genes, Brain and Behavior**, v. 19, n. 2, 2020 Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gbb.12552>>. Acesso em: 30/11/2021.

KISKO, T. M.; SCHWARTING, R. K. W.; WÖHR, M. Sex differences in the acoustic features of social play-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations: A detailed spectrographic analysis in wild-type Sprague–Dawley and *Cacna1c* haploinsufficient rats. **Developmental Psychobiology**, v. 63, n.2, p. 262–276, 2021.

KNUESEL, I.; CHICHA, L.; BRITSCHGI, M.; et al. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 11, p. 643–660, 2014.

LI, K.; LI, L.; CUI, B.; et al. Early Postnatal Exposure to Airborne Fine Particulate Matter Induces Autism-like Phenotypes in Male Rats. **Toxicological Sciences**, v. 162, n. 1, p. 189–199, 2018.

LUKAS, M.; NEUMANN, I. D. Oxytocin and vasopressin in rodent behaviors related to social dysfunctions in autism spectrum disorders. **Behavioural Brain Research**, v. 251, p. 85–94, 2013.

LUKAS, M.; WÖHR, M. Endogenous vasopressin, innate anxiety, and the emission of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations during social play behavior in juvenile rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 56, p. 35–44, 2015.

MARAZZITI, D.; ABELLI, M.; BARONI, S.; et al. Neurobiological correlates of social anxiety disorder: an update. **CNS Spectrums**, v. 20, n. 2, p. 100–111, 2015.

MAURIN, T.; MELANCIA, F.; JARJAT, M.; et al. Involvement of Phosphodiesterase 2A Activity in the Pathophysiology of Fragile X Syndrome. **Cerebral Cortex**, v. 29, n. 8, p. 3241–3252, 2019.

MORALES-NAVAS, M.; CASTAÑO-CASTAÑO, S.; PÉREZ-FERNÁNDEZ, C.; et al. Similarities between the Effects of Prenatal Chlorpyrifos and Valproic Acid on Ultrasonic Vocalization in Infant Wistar Rats. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6376, 2020.

MORIMOTO, K.; NAKAJIMA, K. Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 916, 2019a.

MORIMOTO, K.; NAKAJIMA, K. Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 916, 2019b.

MOUSAVIYAN, R.; DAVOODIAN, N.; ALIZADEH, F.; et al. Zinc Supplementation During Pregnancy Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Glial Activation and Inflammatory Markers Expression in a Rat Model of Maternal Immune Activation. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 11, p. 4193–4204, 2021.

Oxytocin and vasopressin in rodent behaviors related to social dysfunctions in autism spectrum disorders - ScienceDirect. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432812005293?casa_token=-VHAxzMMVe8AAAAA:qLMXrPmNLM01TpigkQ8s2y5Hhzof98vFG7erysLJypFtnTkD DNT3mxVmfH71ESde5Gzm-v_GFg. Acesso em: 30/11/2021.

OUZZANI et al. Rayyan — a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Reviews*. 2016 5:210, DOI: 10.1186/s13643-016-0384-4. Acesso em: 20 de nov. de 2021.

PAGE MJ et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021;372:n71. doi: 10.1136/bmj.n71

PAUL, M. J.; PETERS, N. V.; HOLDER, M. K.; et al. Atypical Social Development in Vasopressin-Deficient Brattleboro Rats. **eneuro**, v. 3, n. 2, p. ENEURO.0150-15.2016, 2016.

PFAENDER, S.; GRABRUCKER, A. M. Characterization of biometal profiles in neurological disorders. **Metallomics**, v. 6, n. 5, p. 960–977, 2014.

POTASIEWICZ, A.; GZIELO, K.; POPIK, P.; NIKIFORUK, A. Effects of prenatal exposure to valproic acid or poly(I:C) on ultrasonic vocalizations in rat pups: The role of social cues. **Physiology & Behavior**, v. 225, p. 113113, 2020.

RAZA, S.; HIMMLER, B. T.; HIMMLER, S. M.; et al. Effects of prenatal exposure to valproic acid on the development of juvenile-typical social play in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 26, n. 8, p. 707–719, 2015.

REDECKER, T. M.; KISKO, T. M.; SCHWARTING, R. K. W.; WÖHR, M. Effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 367, p. 35–52, 2019.

RICHARDS, E. M.; PAYNE, J. L. The management of mood disorders in pregnancy: alternatives to antidepressants. **CNS Spectrums**, v. 18, n. 5, p. 261–271, 2013.

RITZ, B.; YU, F. The Effect of Ambient Carbon Monoxide on Low Birth Weight among Children Born in Southern California between 1989 and 1993. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 1, p. 9, 1999.

SCHAIN, J. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. , v. 58, n. 3, p. 6, 1961.

SCHAIN, R. J.; FREEDMAN, D. X. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. **The Journal of Pediatrics**, v. 58, n. 3, p. 315–320, 1961. Elsevier.

SCHIAVI, S.; CARBONE, E.; MELANCIA, F.; et al. Perinatal supplementation with omega-3 fatty acids corrects the aberrant social and cognitive traits observed in a

genetic model of autism based on FMR1 deletion in rats. **Nutritional Neuroscience**, p. 1–14, 2020.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 6, p. 624–630, 2013.

SERVADIO, M.; MANDUCA, A.; MELANCIA, F.; et al. Impaired repair of DNA damage is associated with autistic-like traits in rats prenatally exposed to valproic acid. **European Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 85–96, 2018.

SHENG, M.; KIM, E. The Shank family of scaffold proteins. , p. 6.

SODHI, M. S. K.; SANDERS-BUSH, E. Serotonin and brain development. **International Review of Neurobiology**, v. 59, p. 111–174, 2004.

SONG, T.-J.; LAN, X.-Y.; WEI, M.-P.; et al. Altered Behaviors and Impaired Synaptic Function in a Novel Rat Model With a Complete Shank3 Deletion. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, p. 111, 2019.

UMEDA, T.; TAKASHIMA, N.; NAKAGAWA, R.; et al. Evaluation of Pax6 Mutant Rat as a Model for Autism. (K. Ikeda, Org.) **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15500, 2010.

VENTURA, R.; PASCUCCI, T.; CATANIA, M. V.; MUSUMECI, S. A.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Object recognition impairment in Fmr1 knockout mice is reversed by amphetamine: involvement of dopamine in the medial prefrontal cortex. **Behavioural Pharmacology**, v. 15, n. 5–6, p. 433–442, 2004a.

VENTURA, R.; PASCUCCI, T.; CATANIA, M. V.; MUSUMECI, S. A.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Object recognition impairment in Fmr1 knockout mice is reversed by amphetamine: involvement of dopamine in the medial prefrontal cortex. **Behavioural Pharmacology**, v. 15, n. 5, p. 433–442, 2004b.

VOJTECHOVA, I.; MALENINSKA, K.; KUTNA, V.; et al. Behavioral Alterations and Decreased Number of Parvalbumin-Positive Interneurons in Wistar Rats after Maternal Immune Activation by Lipopolysaccharide: Sex Matters. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3274, 2021.

VOJTECHOVA, I.; PETRASEK, T.; MALENINSKA, K.; 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. **Behavioural Brain Research**, v. 349, p. 42–53, 2018.

VOLK, H. E.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; DELWICHE, L.; LURMANN, F.; MCCONNELL, R. Residential Proximity to Freeways and Autism in the CHARGE Study. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 6, p. 873–877, 2011.

WÖHR, M.; WILLADSEN, M.; KISKO, T. M.; SCHWARTING, R. K. W.; FENDT, M. Sex-dependent effects of Cacna1c haploinsufficiency on behavioral inhibition evoked by conspecific alarm signals in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 99, p. 109849, 2020.

WU, J.; DAI, Y.-C.; LAN, X.-Y.; et al. Postnatal AVP treatments prevent social deficit in adolescence of valproic acid-induced rat autism model. **Peptides**, v. 137, p. 170493, 2021.

WRIGHT, J. M.; GOURDON, J. C.; CLARKE, P. B. S. Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. **Psychopharmacology**, v. 211, n. 1, p. 1–13, 2010.

YANG, C.-J.; TAN, H.-P.; DU, Y.-J. The developmental disruptions of serotonin signaling may involved in autism during early brain development. **Neuroscience**, v. 267, p. 1–10, 2014.

YEE, N.; SCHWARTING, R. K. W.; FUCHS, E.; WÖHR, M. Increased affective ultrasonic communication during fear learning in adult male rats exposed to maternal immune activation. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 9, p. 1199–1205, 2012.

ZIMMERBERG, B.; GERMEYAN, S. C. Effects of neonatal fluoxetine exposure on behavior across development in rats selectively bred for an infantile affective trait: Effects of Neonatal Fluoxetine Exposure. **Developmental Psychobiology**, v. 57, n. 2, p. 141–152, 2015.