



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**EFEITO PROTETOR DO RESVERATROL SOBRE ALTERAÇÕES NAS VIAS
CK2/PTEN E AKT/GSK-3 β NO MODELO DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO
PRÉ-NATAL AO ÁCIDO VALPROICO**

ANDRÉ VINÍCIUS CONTRI PAZ

Porto Alegre

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

EFEITO PROTETOR DO RESVERATROL SOBRE ALTERAÇÕES NAS VIAS
CK2/PTEN E AKT/GSK-3 β NO MODELO DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO
PRÉ-NATAL AO ÁCIDO VALPROICO

ANDRÉ VINÍCIUS CONTRI PAZ

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carmem Juracy Silveira Gottfried

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

- À minha família, pelo apoio e incentivo dado;
- Aos amigos próximos e à música, que me deram o suporte pessoal e psicológico que eu necessitava em todos os momentos;
- À minha orientadora, prof^a Dr^a Carmem Gottfried, pela oportunidade, por ter me auxiliado ativamente em todas as etapas, pelo conhecimento compartilhado, e pela paciência e compreensão nos momentos difíceis;
- À prof^a Dr^a Clarissa Gama, que deu suporte e auxiliou muito na minha trajetória como pesquisador e na construção deste trabalho;
- Aos colegas dos laboratórios de Psiquiatria Molecular e de Pesquisa em Plasticidade Neuroglial, que sem os quais eu não teria conseguido executar este trabalho;
- Às pessoas incríveis que eu conheci neste período, que sem dúvidas, me ajudaram a crescer tanto em nível profissional quanto pessoal.

RESUMO

Transtorno do espectro do autismo (TEA) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por perturbações na comunicação social e pela manifestação de comportamentos, interesses e atividades repetitivos e restritos. Embora a etiologia do autismo ainda seja desconhecida, fortes evidências mostram que a causa pode residir em uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais durante o desenvolvimento. A exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA) é um dos fatores de risco ambiental mais bem estabelecidos. Por isso, o VPA é comumente utilizado para desencadear um fenótipo do tipo autista em animais. Estudos prévios do nosso grupo demonstram que o tratamento com resveratrol (RSV) aplicado a ratas prenhes foi capaz de prevenir os prejuízos no comportamento social induzidos na prole do grupo VPA. As vias de sinalização CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β estão relacionadas a processos de plasticidade celular e conectividade neuronal, que são processos que exercem grande impacto em diversos parâmetros, incluindo o comportamento social. Assim, os objetivos deste trabalho foram: 1) avaliar o impacto da exposição pré-natal ao VPA sobre as vias CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β , nas regiões da amígdala e do hipocampo de ratos machos adultos de 120 dias e 2) avaliar o possível efeito protetor da exposição intra-útero ao RSV sobre as alterações causadas pelo VPA nas vias CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β . O tratamento com RSV combinado com o VPA induziu uma inibição da PTEN e GSK-3 β na amígdala, e o RSV teve um efeito *per se*, inibindo a GSK-3 β nesta mesma estrutura. Além disso, O VPA induziu um aumento de atividade da AKT e redução dos níveis proteicos totais de AKT e PTEN no hipocampo. O RSV foi capaz de prevenir estas alterações, com exceção aos níveis proteicos de AKT. Portanto, nossos resultados indicam que a exposição pré-natal ao VPA altera vias de sinalização importantes durante o desenvolvimento neural, e o tratamento com RSV foi capaz de prevenir alguns de seus efeitos. Estes resultados são muito promissores para estudos futuros e contribuem para uma maior compreensão sobre os processos relacionados com a indução de comportamentos do tipo autista pelo VPA e o possível mecanismo de prevenção do RSV sobre o comportamento social.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by disabilities in social communication and repetitive and stereotyped behaviour, interests and activities. Although the etiology is still unknown, there is growing evidence suggesting that the cause lies on a complex interaction between genetic and environmental factors during the development. The pre-natal exposure to valproic acid (VPA) is one of the most well established environmental risk factors. Therefore, the VPA is commonly used to induce an autistic-like phenotype in animals. Previous studies from our group shows that the treatment of pregnant rats with resveratrol (RSV) prevented the social behavior deficits induced in the male offspring of the VPA group. The CK2/PTEN and AKT/GSK-3 β pathways are related to processes of cellular plasticity and neuronal connectivity, which are processes that exert a huge impact in several parameters, including the social behavior. Thus, the objectives of this work were: 1) to evaluate the impact of the pre-natal exposure to VPA in the CK2/PTEN and AKT/GSK-3 β pathways, in amygdala and hippocampus of adult male rats with 120 days old and 2) to evaluate the possible protective effect of the intra-womb exposition to RSV on VPA-induced changes in CK2/PTEN and AKT/GSK-3 β pathways. The treatment with RSV combined with VPA induced an inhibition of PTEN and GSK-3 β in amygdala, and the RSV had an effect *per se*, inhibiting GSK-3 β in the same structure. Furthermore, the VPA induced an increase in activity of AKT and a reduction in total protein levels of AKT and PTEN in hippocampus. The RSV prevented these effects, with exception of the protein levels of AKT. Thus, our results indicate that the pre-natal exposition to VPA changes important signaling pathways during the neural development, and the treatment with RSV prevented some of its effects. These findings are very promising for future studies and contribute for a better understanding about processes related to the induction of autistic-like behaviors by VPA and the possible mechanism of prevention by RSV on the social behavior.

Lista de abreviaturas e siglas

TEA – Transtornos do Espectro do Autismo

CDC – Centro de Prevenção e Controle de Doenças

VPA - Ácido Valproico

SNC – Sistema Nervoso Central

GABA - ácido γ -aminobutírico

HDAC - histona desacetilase

PTEN – Fosfatase Homóloga a Tensina

GSK-3 β – Glicogênio Sintase Cinase 3 β

CK-2 – Caseína Cinase 2

AKT – Proteína Cinase B ou PKB

RSV – Resveratrol

mTOR – Alvo da Rapamicina em Mamíferos

PIP2 - Fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato

PIP3 - Fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato

PI3K - Fosfatidilinositol-3 Cinase

PDK1 - Proteína Dependente de Fosfoinositóis 1

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

CREB - Proteína Ligante ao Elemento Responsivo a AMP Cíclico

DMSO – Dimetil-sulfóxido

BSA – Albumina bovina sérica (do inglês *bovine serum albumine*)

TBS – Tampão Tris Salina

TBS-T – Tampão Tris Salina com 0,05% de Tween-20

BLA - Núcleo Basolateral da Amígdala

CEA - Núcleo Central da Amígdala

TSC2 - Tuberina

Lista de figuras

Figura 1. Linha do tempo resumida dos tratamentos.	13
Figura 2. Níveis totais das proteínas AKT (A), PTEN (B) e GSK-3 β (C) na amígdala.	18
Figura 3. Níveis totais de CK2 (A) e razão p-PTEN/PTEN total na amígdala.....	19
Figura 4. Razões entre proteína fosforilada e total das proteínas envolvidas na via AKT/GSK-3 β na amígdala.	20
Figura 5. Níveis totais das proteínas AKT (A), PTEN (B) e GSK-3 β (C) no hipocampo.	21
Figura 6. Níveis totais de CK2 (A) e razão p-PTEN/PTEN total (B) no hipocampo	22
Figura 7. Razões entre proteína fosforilada e total das proteínas envolvidas na via AKT/GSK-3 β no hipocampo.	23

Sumário

RESUMO	II
ABSTRACT	III
Lista de abreviaturas e siglas	IV
Lista de figuras	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Transtorno do Espectro do Autismo	1
1.2 Ácido Valproico e TEA	2
1.3 Modelo animal de autismo	3
1.4 Via CK2/PTEN e TEA	5
1.5 Via AKT/GSK-3 β e TEA	6
1.6 Resveratrol	7
1.7 Resveratrol, VPA e a vias CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β	8
2. HIPÓTESES E JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo Geral	11
3.2 Objetivos específicos	11
4. METODOLOGIA	12
4.1 Modelo animal	12
4.2 Preceitos éticos	14
4.3 Cálculo do tamanho amostral	14
4.4 Western Blot	15
4.4.1 Anticorpos	16
4.6 Níveis totais e atividade de CK2 e PTEN	16
4.7 Níveis totais e atividade de AKT e GSK-3 β	17
4.8 Análise Estatística	17
4.9 Cuidados de biossegurança e descarte de materiais e resíduos	17
5. RESULTADOS	18
5.1 Efeitos do RSV e VPA na via CK2/PTEN na amígdala	18
5.2 Efeitos do RSV e VPA na via AKT/GSK-3 β na amígdala	20
5.3 Efeitos do RSV e VPA na via CK2/PTEN no hipocampo	21
5.4 Efeitos do RSV e VPA na via AKT/GSK-3 β no hipocampo	23
6. DISCUSSÃO	24
7. PERSPECTIVAS	29
8. APOIO FINANCEIRO	30
9. REFERÊNCIAS	31

CIP - Catalogação na Publicação

Contri Paz, André Vinícius

EFEITO PROTETOR DO RESVERATROL SOBRE ALTERAÇÕES NAS VIAS CK2/PTEN E AKT/GSK-3#946; NO MODELO DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁCIDO VALPROICO / André Vinícius Contri Paz. -- 2017. 49 f.

Orientadora: Carmem Juracy Silveira Gottfried.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Autismo. 2. Valproato. 3. Resveratrol. 4. CK2/PTEN. 5. AKT/GSK3. I. Gottfried, Carmem Juracy Silveira, orient. II. Título.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno do Espectro do Autismo

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é um grupo de desordens do neurodesenvolvimento que possuem como características problemas na interação e comunicação sociais recíprocas e presença de padrões restritos e repetitivos de comportamento, interesses e atividades (Baker, 2013). Pelo DSM IV, o espectro do autismo era classificado em autismo clássico (cujos indivíduos afetados apresentam a totalidade da tríade diagnóstica e a maioria das comorbidades associadas), a Síndrome de Asperger (cujos indivíduos geralmente possuem capacidade intelectual acima da média) e PPD-NOS (sigla inglesa para transtorno global do desenvolvimento não especificado). No recente DSM-5, todas estas classificações foram agrupadas como TEA. Os pacientes com TEA podem apresentar comorbidades, como por exemplo: presença de comportamento agressivo, disfunções do sistema imune, episódios epilépticos, alterações gastrointestinais, ansiedade, distúrbios do sono, déficits cognitivos e hipersensibilidade a estímulos táteis, luminosos e sonoros (Geschwind, 2009).

Por ser um tipo de transtorno com espectro variável, os pacientes com TEA possuem intensidades diferentes de sintomas, o que muitas vezes facilita ou dificulta o diagnóstico precoce. A palavra "autismo" vem do grego *autós* (αὐτός, significando "auto") e foi cunhada pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler em 1910, com o objetivo de descrever a característica dos pacientes com esquizofrenia de "retirarem-se para o mundo das suas fantasias" (Kuhn, 2004).

Entretanto, o uso desta terminologia só foi feito cerca de três décadas depois, quando Hans Asperger utilizou a palavra autismo em uma palestra no Hospital da Universidade de Viena (Asperger, 1938). Logo em seguida, Leo Kanner, do Hospital

Johns Hopkins, fez o primeiro relato detalhado de pacientes com autismo (Kanner, 1943). Kanner definia que os pacientes com autismo possuíam como principais características comportamentais a “solidão autista” e a “obsessiva insistência na preservação dos hábitos” (Baker, 2013).

Desde a década de 80, a prevalência do TEA na população vem crescendo, o que implica em alto custo social e econômico. Estima-se que, atualmente, a prevalência na população estadunidense seja de 1 em cada 68 crianças, sendo 4,5 vezes mais prevalente em indivíduos do sexo masculino, segundo o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) (Christensen et al., 2016). A evolução do diagnóstico clínico e o aumento na exposição a fatores de risco durante o período gestacional podem ser os principais fatores relacionados a este aumento na prevalência do TEA. Já foi observado em estudos epidemiológicos que o risco de desenvolvimento de TEA na prole pode ser aumentado na presença de adversidades de origem ambiental durante a gestação, como exposição materna a teratógenos (como o Ácido Valproico (VPA), o etanol e a talidomida) ou a micro-organismos (infecções virais ou bacterianas) (Arndt et al., 2005; Ingram et al., 2000).

1.2 Ácido Valproico e TEA

O VPA é um anti-convulsivante e um estabilizador de humor muito utilizado no tratamento de epilepsia e do transtorno bipolar. Estudos clínicos nos últimos 40 anos demonstram que a exposição *in utero* ao VPA está associada a prejuízos cognitivos e aumento de risco de desenvolvimento de TEA (Rouillet et al., 2013). O VPA possui diversos efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC), como por exemplo, o aumento da neurotransmissão mediada por ácido γ -aminobutírico (GABA) e a inibição de enzimas do metabolismo do GABA, como a succinato semialdeído desidrogenase, succinato semialdeído redutase e da GABA transaminase. Outra enzima que o VPA é capaz de modular é a histona desacetilase (HDAC), o que leva a alterações no padrão da

expressão de vários genes (Chiu et al, 2013). Estes efeitos podem ser importantes em seu mecanismo de ação, porém não são os únicos processos modulados pelo VPA. Sua ação se estende na regulação dos níveis de diversos hormônios, fatores de crescimento e processos celulares como apoptose, sinaptogênese, sobrevivência e resiliência celular, dentre outros (Chiu et al, 2013).

Segundo estudos epidemiológicos, o uso de VPA no primeiro trimestre de gestação aumenta significativamente a incidência de TEA nos filhos (Arndt et al., 2005; Christensen et al., 2013). Estes efeitos são observados em diversas espécies, como humanos e roedores. Esta observação possibilitou o desenvolvimento de diversos modelos animais de autismo (Patterson, 2011), que mimetizam várias características comportamentais e biológicas presentes nos pacientes com o transtorno, como por exemplo, conectividade e densidade de neurônios alterada (Roullet et al., 2013), déficits na interação social (Bambini-Junior et al., 2011), dentre outros.

1.3 Modelo animal de autismo

Existem atualmente vários tipos de modelos animais de autismo, variando quanto à forma de indução (que pode ser por lesão, manipulação genética, administração de fármacos ou indução de quadros infecciosos utilizando micro-organismos) e quanto à espécie utilizada (como roedores e peixes - neste caso, fora do útero) (Blaiss e Janak, 2009; Blundell et al., 2009; Murcia et al., 2005; Rodier et al., 1997). O uso dessa ferramenta auxilia no estudo de processos relacionados à doença que são inviáveis de analisar em humanos, como desenvolvimento embrionário, curso da patologia, plasticidade encefálica e morfologia e sinalização neural. Sendo assim, um modelo animal torna-se uma ferramenta de grande valor no estudo do TEA.

O autismo é uma condição particularmente difícil de ser mimetizada em roedores, pois estes não podem ser testados para déficits de fala e as regiões cerebrais diretamente comparáveis com aquelas que medeiam a linguagem humana

estão ausentes. Porém, os roedores são, em geral, espécies que tem altos índices de interação e comunicação social (Crawley, 2011), o que favorece a análise de mudanças no comportamento social relacionadas a fatores genéticos ou ambientais.

Um dos modelos animais que mais vem se destacando como ferramenta para estudo de autismo é o de exposição pré-natal ao VPA (Schneider e Przewlocki, 2005; Bambini-Junior et al., 2011; Silvestrin et al., 2013). O racional deste modelo se baseia em estudos clínicos que demonstram correlação do uso desse fármaco na gestação com o surgimento de TEA nos filhos (Gottfried et al., 2013).

Os animais, no qual este modelo é induzido, apresentam alterações em componentes morfológicos, neuroquímicos, nos sistemas de neurotransmissão e também déficits comportamentais correspondentes aos observados em pacientes. Este último fato é de extrema importância, visto que o diagnóstico de autismo é dado através da análise comportamental (Tsujino et al., 2007; Yochum et al., 2008).

A exposição pré-natal ao VPA, tanto em ratos quanto em camundongos, causam uma série de alterações quando comparados a animais controle (sem exposição ao VPA), como retardo no crescimento (massa corporal) e do desenvolvimento (abertura dos olhos) (Schneider e Przewlocki, 2005), déficit na discriminação olfativa (Schneider e Przewlocki, 2005; Schneider et al., 2006), menor reação a dor (Schneider et al., 2008), atividade exploratória aumentada em campo aberto (Schneider et al., 2008; Tsujino et al., 2007), padrões comportamentais estereotipados aumentados (Schneider et al., 2008), comportamentos do tipo ansioso aumentados (Markram et al., 2008; Schneider et al., 2008; Zhu et al., 2010), aumento da memória de tarefas aversivas (Markram et al., 2008) e déficits sociais (Markram et al., 2008; Schneider e Przewlocki, 2005). Outra importante semelhança do modelo animal com a clínica é de que algumas destas características só estão presentes em

machos, o que corresponde com a maior incidência de autismo em indivíduos do sexo masculino (Schneider et al., 2008; Kim et al., 2013).

Apesar de possuir mecanismos de ação complexos, sabe-se que os efeitos do VPA no SNC incluem alterações na atividade de diversos processos celulares, como sinaptogênese, apoptose, sobrevivência celular, dentre outros (Chiu et al., 2013). O estudo de vias moduladas pelo VPA no modelo é muito importante para compreender as bases do desenvolvimento e progressão do TEA. Duas das vias de sinalização celular que estão envolvidas na fisiopatologia do TEA e que podem ser alvos importantes do VPA são a via CK2/PTEN e da AKT/GSK-3 β .

1.4 Via CK2/PTEN e TEA

A via CK2/PTEN é uma via de sinalização composta basicamente pela interação de duas proteínas, a Caseína cinase 2 (CK2) e a fosfatase homóloga à tensina (PTEN), que juntas regulam a ativação de outras vias relacionadas a importantes processos celulares, como migração, divisão e, no caso de neurônios, formação de sinapses e plasticidade (Gericke et al., 2006). A PTEN é uma proteína da família das proteínas tirosina-fosfatases e é composta por dois domínios estruturais principais: o domínio C2, responsável pelo acoplamento à membrana por um mecanismo independente de cálcio, e o domínio fosfatase, que é responsável pela ligação ao fosfatidilinositol e ao domínio PDZ (Gericke et al., 2006).

Evidências sugerem o envolvimento da PTEN na fisiopatologia do TEA (McBride et al., 2010). Uma diminuição na atividade da PTEN poderia explicar algumas características presentes tanto em pacientes quanto no modelo animal de autismo induzido por VPA, tais como aumento de neuritos e alterações morfológicas neuronais em algumas regiões do SNC, uma vez que estas características estão presentes em animais *knockout* para PTEN e nos pacientes (Lugo et al., 2014). Inclusive, um estudo mostrou que variantes genéticas da PTEN associadas ao autismo exibem cerca de 1/3

da atividade da forma selvagem, sugerindo que fatores que inibam sua atividade podem ter um papel importante no desenvolvimento dos sintomas presentes no TEA (Johnston e Raines, 2015). De fato, embora não tenha sido avaliada a atividade, um estudo observou uma redução nos níveis totais de PTEN no hipocampo do modelo animal de autismo induzido pela exposição pré-natal ao VPA (Yang et al., 2016). Outro fator importante é que a PTEN é capaz de modular a atividade de outra proteína altamente associada ao TEA, a mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) (Gericke et al., 2006).

A CK2 é uma proteína serina-treonina cinase altamente expressa no SNC, onde regula a atividade da PTEN através de fosforilação, além de diversas outras proteínas, sendo que algumas destas estão relacionadas aos TEA, como o NF- κ B e a β -Catenina (Litchfield et al., 2003). Isto faz com que a CK2 tenha um papel muito amplo e importante na regulação do desenvolvimento e sobrevivência neuronal, tanto de formas dependentes da atividade da PTEN quanto independentes, através de outras proteínas efetoras. Apesar de possuir mais de 300 substratos, incluindo diversas proteínas e fatores de transcrição, ainda não há estudos avaliando seu papel no desenvolvimento dos TEA ou se o VPA exerce algum efeito sobre ela (Litchfield et al., 2003).

1.5 Via AKT/GSK-3 β e TEA

A via da AKT/GSK-3 β é outra via de sinalização celular que, juntamente com a via da CK2/PTEN, é responsável pela regulação de processos de sobrevivência celular, formação de sinapses, maturação e migração neuronal, dentre outros (Wymann et al., 2003; Downward, 2004). A ligação desta via com a da CK2/PTEN se dá pelo balanço entre os níveis de fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PIP2) e fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato (PIP3), ditado pela atividade das enzimas fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) e PTEN. Quando esta via é ativada, a enzima PI3K

fosforila o PIP2, convertendo-o em PIP3. O PIP3 formado irá interagir com o domínio pleckstrina (PH) de diversas proteínas, ancorando-as na membrana plasmática da célula. Dentre estas proteínas, podemos destacar a AKT, que possui três isoformas, sendo que a AKT-1 e AKT-3 são expressas no encéfalo. A proteína dependente de fosfoinositóis 1 (PDK1) fosforila a AKT no sítio treonina-308, o que facilita a fosforilação da AKT no sítio serina-473 por outras cinases. Estes dois sítios são fundamentais para a ativação completa da AKT. Quando ativa, a AKT fosforila várias proteínas, dentre elas a Glicogênio Sintase Cinase 3 β (GSK-3 β). A ativação da via da AKT/GSK-3 β estimula a expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), a principal neurotrofina do SNC, pois aumenta a atividade de ligação ao DNA da proteína ligante ao elemento responsivo a AMP cíclico (CREB) através da inibição da GSK-3 β (Grimes e Jope, 2001).

Sabe-se que o VPA tem a capacidade de inibir a atividade da GSK-3 β através da indução de sua fosforilação via AKT (Chiu et al., 2013). Alguns estudos também sugerem que a atividade da GSK-3 β pode ser alterada com a exposição pré-natal ao VPA, o que pode levar a diversos efeitos observados nestes animais, tanto comportamentais quanto moleculares (Caracci, Ávila e De Ferrari, 2016; Go et al., 2012; Wu et al., 2016). Estes dados ajudam a entender o possível aumento encontrado nos níveis de BDNF circulante em pacientes com TEA (Saghazadeh e Rezaei, 2017).

Por esta razão, o estudo de mecanismos celulares que regulem a via da AKT/GSK-3 β é de grande importância, visto que esta via opera em processos chave para a compreensão da fisiopatologia do TEA.

1.6 Resveratrol

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno - RSV) é um composto polifenólico de ocorrência natural, isolado de raízes da planta héleboro branca (*Veratrum grandiflorum*

O. Loes) pela primeira vez em 1940. Também é possível encontrar este composto em uvas, pinhos, amendoins e no vinho tinto. Após administração intravenosa em humanos, o RSV é convertido principalmente em conjugados de sulfatos em um período de 30 minutos, e a meia-vida total dos metabólitos do RSV é de aproximadamente 0,2 horas (Walle et al., 2004).

Atualmente, sabe-se que esta molécula possui diversos efeitos biológicos (Fremont, 2000; Vang et al., 2011), descobertos por meio de estudos demonstrando seus papéis protetores e terapêuticos em diversas patologias, tais como câncer (Filippi-Chiela et al., 2011; Gupta et al., 2011; Jang et al., 1997; Shukla and Singh, 2011) e diabetes (Huang et al., 2010; Ramadori et al., 2009; Szkudelska and Szkudelski, 2010; Thirunavukkarasu et al., 2007). Além disso, vários estudos já relataram que o RSV possui efeitos neuroprotetores (Han et al., 2004; Quincozes-Santos e Gottfried, 2011; Tang, 2010; Vang et al., 2011; Vieira de Almeida et al., 2008; Zamin et al., 2006) e preveniu comportamentos do tipo autista relacionados a sociabilidade quando administrado durante a gestação de ratas Wistar do modelo de autismo induzido por VPA (Bambini-Junior et al., 2014). Esses resultados sugerem o envolvimento de vias moduladas pelo RSV na fisiopatologia do TEA. Sendo assim, estudar como o RSV age e se relaciona com os efeitos do VPA é de grande importância para compreender o desenvolvimento e progressão do TEA.

1.7 Resveratrol, VPA e a vias CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β

O RSV, por ser um composto que não apresenta toxicidade em humanos, torna-se promissor para uso como tratamento para diversas patologias (Cottart et al., 2010). Entretanto, não se pode sugerir o uso do mesmo em mulheres grávidas, por ainda faltarem estudos que demonstrem segurança no uso. Mas, em modelos animais, passa a ser uma importante estratégia preventiva para desvendar aspectos envolvidos com o gatilho e/ou desenvolvimento de comportamento do tipo autista na prole,

decorrentes de fatores ambientais de risco como o VPA. Além disso, acredita-se que parte dos seus efeitos benéficos podem vir de sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória (Bjorklund et al., 2016; Rossignol e Frye, 2014; Smaga et al., 2015).

Resultados recentes do nosso grupo de pesquisa demonstram que o RSV é capaz de prevenir os efeitos comportamentais induzidos pelo VPA no modelo animal de autismo (Bambini-Junior et al., 2014). O mecanismo pelo qual o RSV previne os efeitos do VPA ainda não foi elucidado, porém sabe-se que ele atua modulando, de forma oposta ao VPA, a atividade de algumas proteínas, como a β -Catenina e mTOR (Kulkarni e Cantó, 2014). Além de estudos comportamentais, evidências sugerem que o RSV seja capaz de modular o sistema imune e defesas antioxidantes em modelos animais de autismo pós-natal (Bhandari e Kuhad, 2017) e no modelo BTBR (Bakheet et al., 2016).

Assim, é de fundamental importância verificar possíveis mecanismos protetores do RSV no modelo de autismo induzido por VPA, sobre a atividade de vias importantes de sinalização como a CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β .

2. HIPÓTESES E JUSTIFICATIVA

Apesar das diversas hipóteses sobre como a administração pré-natal do VPA induz o fenótipo do tipo autista em animais, o mecanismo pelo qual ele exerce esses efeitos permanece desconhecido. Por essa razão, o estudo de proteínas que sejam moduladas pelo VPA pode contribuir para a compreensão dos mecanismos biológicos responsáveis por estas alterações. Como os dados de estudos da literatura sugerem, uma das proteínas que o VPA poderia estar modulando é a PTEN, uma proteína previamente relacionada ao TEA (McBride et al., 2010). Esta modulação pode ser mediada, dentre várias formas, através da fosforilação da proteína em um sítio alvo da CK2. Por essa razão, a nossa hipótese é de que o VPA esteja modulando a atividade da PTEN, causando sua inibição através de um aumento em sua fosforilação, induzida por uma ativação da CK2. Dessa forma, a inibição da PTEN permitiria com que houvesse um aumento dos níveis de PIP3, permitindo o ancoramento na membrana celular e fosforilação da AKT, levando a sua ativação. Uma vez ativa, a AKT inibiria a GSK-3 β , o que poderia ser um dos mecanismos responsáveis pelas alterações de conectividade e densidade neuronal encontradas neste modelo animal de autismo (Roullet et al., 2013).

O RSV é capaz de prevenir efeitos comportamentais e moleculares presentes em modelos animais de autismo (Bambini-Junior et al., 2014; Bhandari e Kuhad, 2017; Bakheet et al., 2016). Sendo assim, acreditamos que as vias da CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β também são importantes alvos para explicar como o RSV previne os efeitos da exposição pré-natal ao VPA, uma vez que ambas são vias centrais na fisiopatologia do TEA. Os resultados deste estudo, além de aumentar o entendimento sobre o TEA, podem sugerir novos alvos terapêuticos para o tratamento da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar os efeitos da exposição pré-natal ao VPA (modelo animal de autismo) e ao RSV nas vias CK2/PTEN e AKT/GSK-3 em animais na idade adulta.

3.2 Objetivos específicos

Em animais adultos machos provenientes do modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA:

- Determinar se o VPA e o RSV modulam níveis totais e atividade da PTEN e níveis totais de CK2 nas regiões da amígdala e hipocampo;
- Determinar se o VPA e o RSV modulam níveis totais e atividade da AKT e GSK-3 β nas regiões da amígdala e hipocampo;
- Determinar se o RSV é capaz de prevenir as possíveis alterações induzidas pelo VPA em ambas as vias de sinalização nas regiões da amígdala e hipocampo;
- Discutir a relevância e os principais impactos dos resultados encontrados.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo animal

Os animais utilizados foram ratos Wistar da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. No máximo 4 animais foram colocados por caixa (machos ficaram separados das fêmeas) e mantidos em ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, bem como em condições padrão de umidade. O pareamento dos animais sempre teve início as 19 horas. A escolha desse horário reflete o horário em que ocorre a indução do modelo animal de autismo (entre 12h30min e 13h30min do dia de gestação 12,5) por exposição, via intraperitoneal, ao VPA. Os animais foram retirados do pareamento às 7 horas do dia seguinte e realocados em suas caixas de convívio. No caso das fêmeas, a fecundação foi verificada por microscopia através da investigação do lavado vaginal (Bambini-Junior et al., 2011). Quando o procedimento de verificação da fecundação indicou prenhez, estas foram alocadas em pares com outras fêmeas prenhes até o dia 18 de gestação. Após esse período, foram alojadas em caixas individuais até o nascimento da prole.

Os tratamentos a seguir descritos foram aplicados às ratas prenhes. O modelo consiste na injeção intraperitoneal de 600 mg/Kg de VPA diluído em solução salina de NaCl 0,9% no dia 12,5 de gestação, como previamente descrito (Bambini-Junior et al., 2014). Aos controles, somente salina foi aplicada neste dia. Dois grupos receberam, via administração subcutânea, 3,6 mg/Kg de RSV dissolvido em DMSO (veículo) diariamente entre os dias embrionários 6,5 e 18,5 (E6,5 e E18,5), formando assim os quatro grupos experimentais (Figura 1):

- Controle (que recebeu DMSO do dia E6,5 ao E18,5 e salina no dia E12,5);
- VPA (que recebeu DMSO do dia E6,5 ao E18,5 e VPA no dia E12,5);
- RSV (que recebeu RSV do dia E6,5 ao E18,5 e salina no dia E12,5);

- VPA+RSV (que recebeu RSV do dia E6,5 ao E18,5 e VPA no dia E12,5).

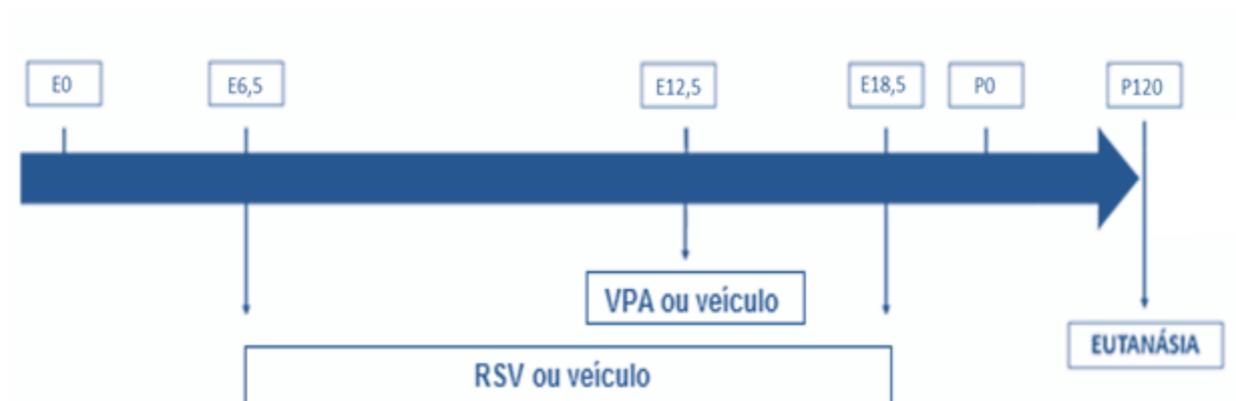


Figura 1. Linha do tempo da indução do modelo de autismo por VPA e do tratamento com RSV, no período gestacional. O RSV foi administrado na rata prenhe por via subcutânea (uma dose diária de 3,6 mg/Kg). O VPA foi administrado via intraperitoneal no dia 12,5 de gestação (uma única dose de 600 mg/Kg). E0 - concepção. P0 - nascimento.

Somente os ratos machos da prole foram objetos de estudo. Foram mantidas proles entre 4 e 8 filhotes. Em caso de ninhadas com número inferior a 4, animais de idades semelhantes e do mesmo grupo experimental foram reunidos para formar a ninhada. Em caso de ninhadas com número de animais superior a 8, os filhotes sobressalentes foram submetidos à eutanásia. Tendo em vista que somente os machos desse modelo são analisados, nos casos necessários, foram priorizadas eutanásias de fêmeas. Os filhotes do sexo masculino foram eutanasiados utilizando uma injeção letal de cetamina (300 mg/Kg) e xilasina (40 mg/Kg) seguida de um método confirmatório da morte (guilhotina). Os ratos utilizados para procriação e os filhotes do sexo feminino foram eutanasiados através da administração via inalatória de uma dose letal de isoflurano (6-9%).

4.2 Preceitos éticos

Todos os procedimentos foram realizados obedecendo aos preceitos éticos que competem à experimentação animal e estão de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institute of Health, 2011) e com as últimas resoluções do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Toda a manipulação animal foi realizada com base na Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 e na Resolução Normativa N.12 do CONCEA. De acordo com a Resolução Normativa N. 13 (20 de setembro de 2013), os animais foram anestesiados antes de qualquer procedimento doloroso, exceto durante as injeções de VPA, RSV e DMSO. O projeto foi submetido ao comitê de ética (CEUA-HCPA) em duas partes, de acordo com os procedimentos metodológicos, tendo os seguintes números de aprovação: 140367 e 140431.

4.3. Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho amostral, o software G*Power v3.0 foi utilizado. Baseando-se em dados de experimentos anteriores do laboratório e da literatura e utilizando os seguintes parâmetros ($\alpha = 0.05$; poder = 0.8; efeito de tamanho = 0.8), um cálculo de tamanho amostral *a priori* foi realizado. Assim, para os 4 grupos, o tamanho amostral total indicado foi 16 animais, ou seja, $n=4$ por grupo. Uma vez que o VPA e RSV são administrados na mãe, o tratamento estatístico adequado é considerar cada ninhada como um único “n”. Ao fim, um indivíduo de cada ninhada origina um n de 1. Então, ao total necessitamos de um mínimo de 4 ninhadas de cada grupo. Segundo dados prévios do laboratório, a média de machos por ninhada é de 4 animais. O VPA não altera este valor, mas interrompe 50% das gestações. Portanto, a realização dos pareamentos necessitou 24 fêmeas em idade fértil e 8 machos.

Por fim, para a realização desse projeto e, levando em consideração o número médio de 4 animais machos por ninhada anteriormente citado, 1 animal de pelo menos

4 ninhadas diferentes compuseram os grupos experimentais do presente estudo, totalizando um “n” de no mínimo 4 animais por grupo (Controle, VPA, RSV e VPA+RSV).

4.4 Western Blot

As análises foram efetuadas em 1 animal macho por ninhada. Aos 120 dias de vida, os animais receberam uma dose letal de anestésico (cetamina e xilasina) e o encéfalo foi dissecado. A região da amígdala e o hipocampo foram isolados e mantidos a -80 °C até a realização dos ensaios proteicos. A preparação do tecido consistiu em homogeneização e extração das proteínas totais utilizando um tampão de lise contendo SDS seguida de uma centrifugação a 14.000 g e coleta do sobrenadante. As proteínas foram então quantificadas pelo método de Lowry e preparadas em tampão Laemmli, tal que 40 µg de proteína fosse utilizada para cada amostra.

A seguir, as proteínas foram separadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida de 12% para posterior imunodeteção seguindo protocolo prévio (Bristot Silvestrin et al., 2013). Em resumo, após a migração, a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose foi realizada utilizando o sistema de transferência Mini-PROTEAN® Tetra Cell da BioRad. A transferência das proteínas foi averiguada utilizando o corante de Ponceau e a membrana foi então bloqueada utilizando 5% de BSA dissolvido em TBS contendo 0,05% de Tween-20 (TBS-T). A incubação com os anticorpos primários, a seguir descritos, ocorreu durante a noite em sala fria, enquanto a incubação do anticorpo secundário correspondente foi realizada durante 1h em temperatura ambiente. Após a incubação com cada anticorpo, 3 lavagens de 5 minutos utilizando TBS-T foram realizadas. O reagente SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) foi então aplicado na membrana e a quimioluminescência foi detectada utilizando o imunodetector ImageQuant LAS 4000 (GE HealthCare Life Sciences). Quando necessário, o *stripping* da membrana foi

realizado utilizando-se NaOH 1M, não excedendo o número de 3 *strippings* por membrana. A quantificação da expressão relativa foi realizada com o software Image J v.1.49 utilizando as ferramentas intrínsecas deste programa para quantificação proteica. Em cada membrana, estava uma amostra de cada tecido de cada grupo analisado. Foi utilizado como controle endógeno os níveis de β -actina.

4.4.1 Anticorpos

Os seguintes anticorpos primários produzidos em coelho (Cell Signalling Technology) foram utilizados na técnica de Western blot:

-Anti-CK2 α (#2656);

- Anti-PTEN (#9559) e anti-PTEN (Ser380, Thr382/383) (#9549);

- Anti-GSK-3 β (#9315) e anti-GSK-3 β (Ser9) (#9336);

- Anti-AKT (#4691), anti-AKT (Ser473) (#9271) e anti-AKT (Thr380) (#9275);

- Anti- β -actina (#4967);

Utilizou-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra (BioRad #1706515).

Todos os anticorpos primários foram diluídos em 5% de BSA dissolvido em TBS-T 0,05%, na proporção de 1:1000, conforme especificado pelo fabricante.

O anticorpo secundário foi diluído na proporção de 1:20000 em 5% de BSA dissolvido em TBS-T 0,05%.

4.6 Níveis totais e atividade de CK2 e PTEN

A atividade da PTEN foi inferida pela razão entre PTEN total e fosforilada, determinados pela técnica de Western Blot. A atividade da CK2 na via foi inferida pelo nível de fosforilação de seu substrato, a PTEN.

4.7 Níveis totais e atividade de AKT e GSK-3 β

A atividade da AKT foi inferida pela avaliação da razão entre a fosforilação dos sítios Ser473 e Thr308 e AKT total. Já a atividade da GSK-3 β foi inferida pela razão entre GSK-3 β fosforilada e total, determinados pela técnica de Western Blot.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do Programa SPSS versão 18.0 (SPSS, Chicago, IL). Os resultados foram avaliados pelo teste ANOVA de uma via seguido de pós-teste de Tukey. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.9 Cuidados de biossegurança e descarte de materiais e resíduos

Os profissionais designados para a experimentação animal possuíam instrução prévia sobre os cuidados de biossegurança a serem tomados. Os equipamentos e proteção individual, tais como luvas, máscaras e jalecos, foram utilizados sempre que necessários. Adicionalmente, atenção especial foi dada à utilização e descarte dos materiais perfurocortantes, assim como os cuidados de biossegurança necessários na manipulação animal e de resíduos químicos e biológicos. O descarte e tratamento dos resíduos seguiu as rotinas estabelecidas pela Comissão de Gestão Ambiental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O material biológico de descarte dos animais foi acondicionado em saco plástico e armazenado em freezer, para posterior incineração. Os materiais perfurocortantes foram descartados em coletores padronizados e os resíduos químicos foram armazenados em recipientes específicos até o recolhimento pelo serviço de higienização.

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos do RSV e VPA na via CK2/PTEN na amígdala

A exposição pré-natal ao VPA não alterou os níveis totais de CK2 (Fig. 3A) e nem a razão p-PTEN/PTEN (Fig. 3B) em relação ao grupo controle, mostrando que, ao menos na amígdala, esta via não foi alterada no modelo de autismo induzido por VPA. O RSV *per se* também não demonstrou efeitos sobre estes parâmetros, porém o tratamento com RSV no modelo aumentou a razão de p-PTEN/PTEN em relação ao controle (Fig. 3B), indicando ativação da CK2 nesta via e inibição da PTEN por fosforilação. Os níveis totais de nenhuma das proteínas da via foram alterados nos tratamentos realizados (Fig. 2B e 3A).

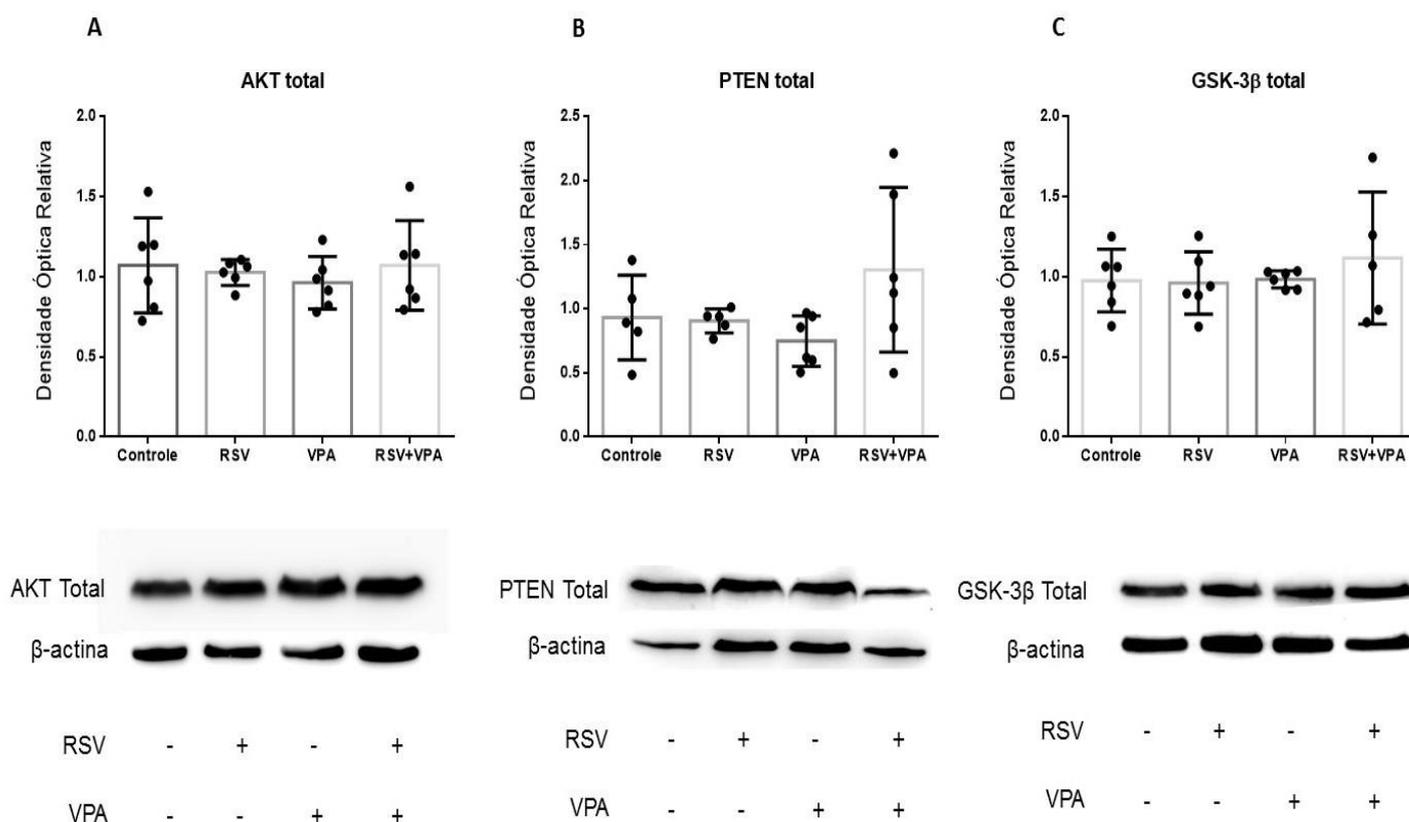


Figura 2. Níveis totais das proteínas AKT (A), PTEN (B) e GSK-3 β (C). Barras representam média \pm SD. (N=5-6; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

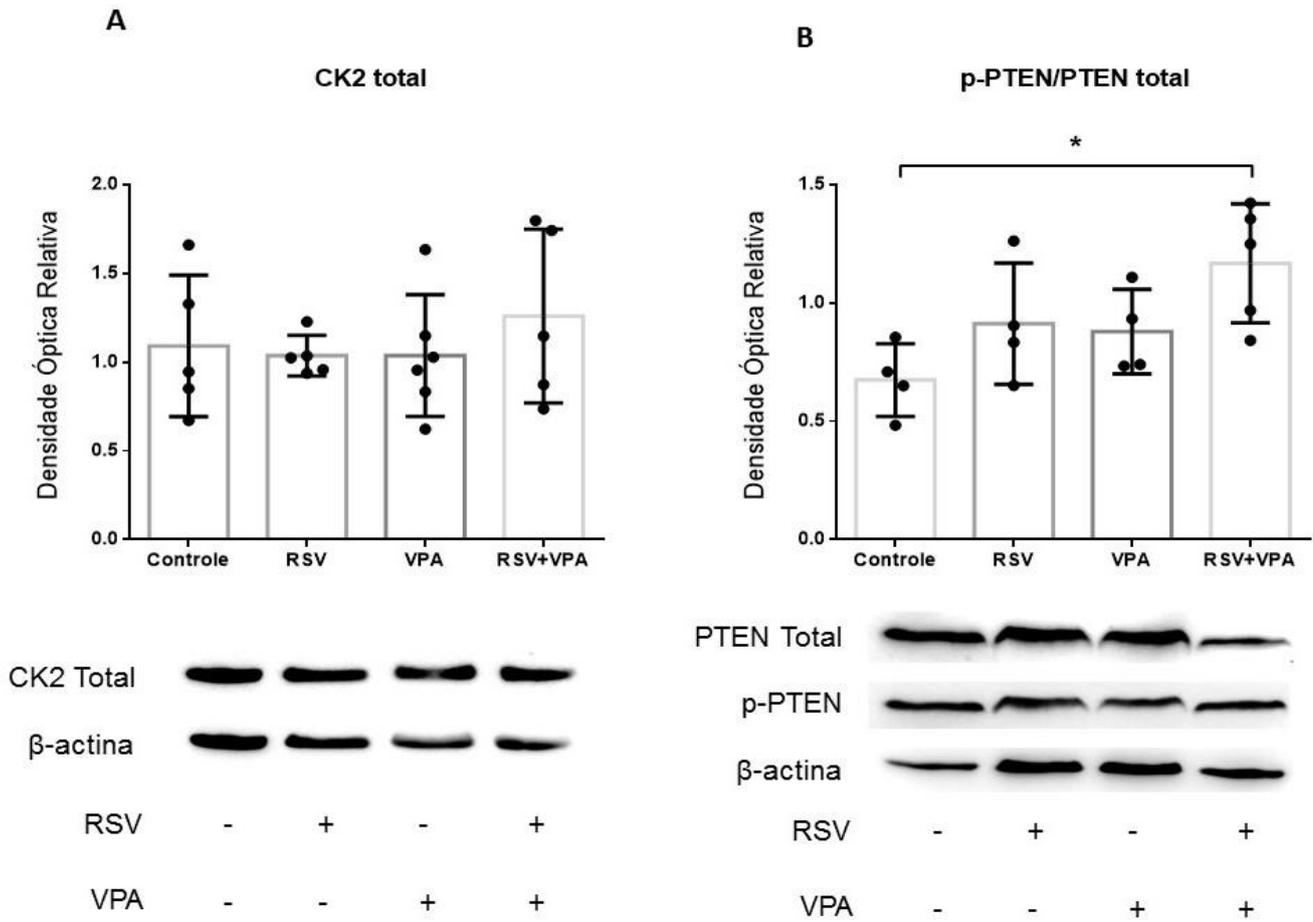


Figura 3. Níveis totais de CK2 (A) e razão p-PTEN/PTEN total (B). Barras representam média \pm SD. (N=4-6; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). *Valor significativamente diferente com $p < 0,05$.

5.2 Efeitos do RSV e VPA na via AKT/GSK-3 β na amígdala

A exposição pré-natal ao VPA não induziu alterações na razão de proteína fosforilada/proteína total das proteínas avaliadas nesta via em relação ao controle (Fig. 4). Porém, o RSV teve um efeito *per se*, aumentando a razão de p-GSK-3 β /GSK-3 β total, e manteve este efeito, mesmo em combinação com VPA (Fig. 4C). Os níveis totais de AKT e GSK-3 β não foram alterados pelos tratamentos (Fig. 2A e 2C).

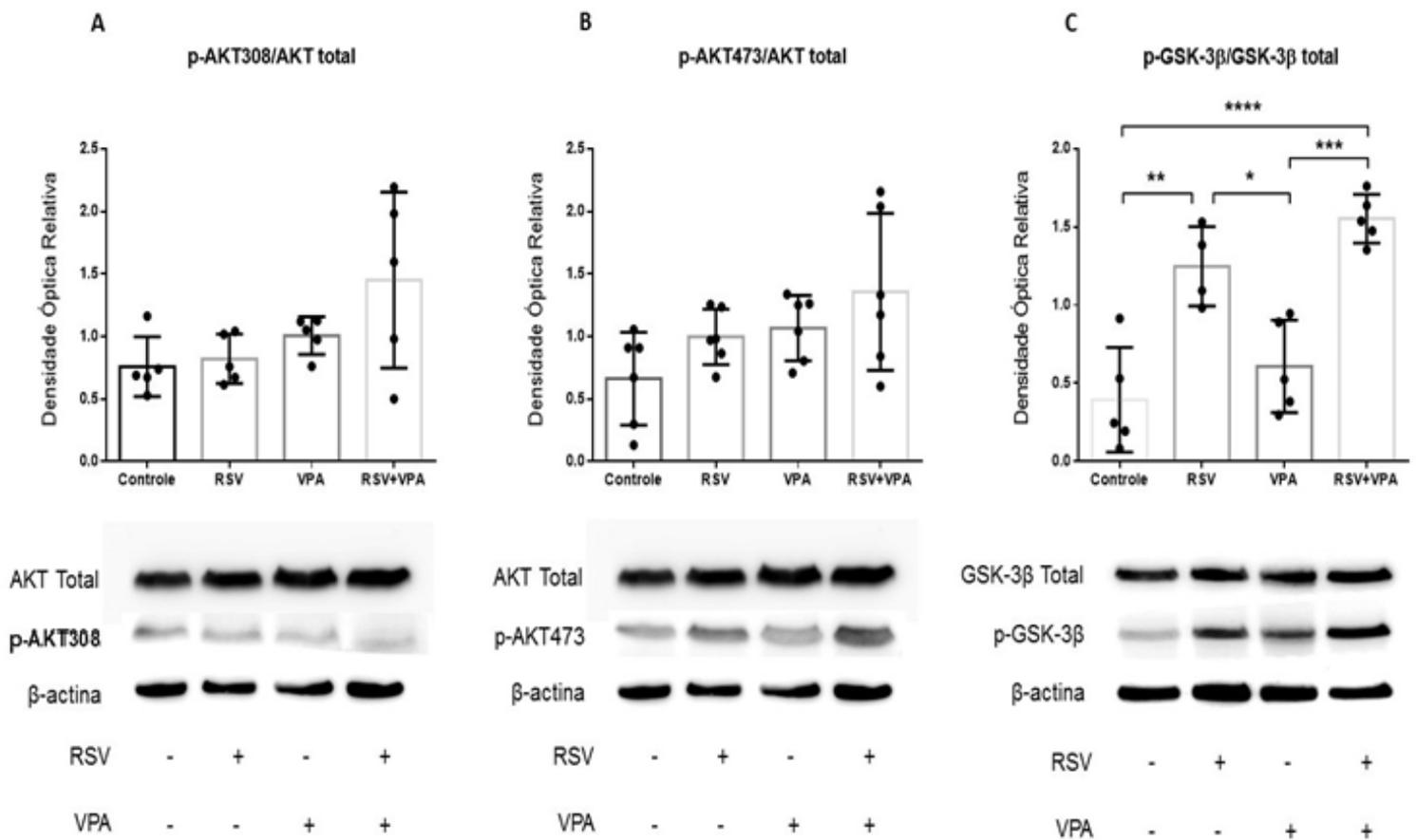


Figura 4. Razões entre proteína fosforilada e total das proteínas envolvidas na via AKT/GSK-3 β . Barras representam média \pm SD. (N=4-6; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). * Valor significativamente diferente com $p < 0,05$. ** Valor significativamente diferente com $p < 0,005$. *** Valor significativamente diferente com $p < 0,001$. **** Valor significativamente diferente com $p < 0,0001$.

5.3 Efeitos do RSV e VPA na via CK2/PTEN no hipocampo

A exposição pré-natal ao VPA induziu uma redução nos níveis de PTEN total, e o RSV foi capaz de prevenir este efeito induzido pelo VPA (Fig. 5B). Porém, nenhum tratamento foi capaz de induzir alterações na razão p-PTEN/PTEN nem nos níveis totais de CK2 (Fig. 6).

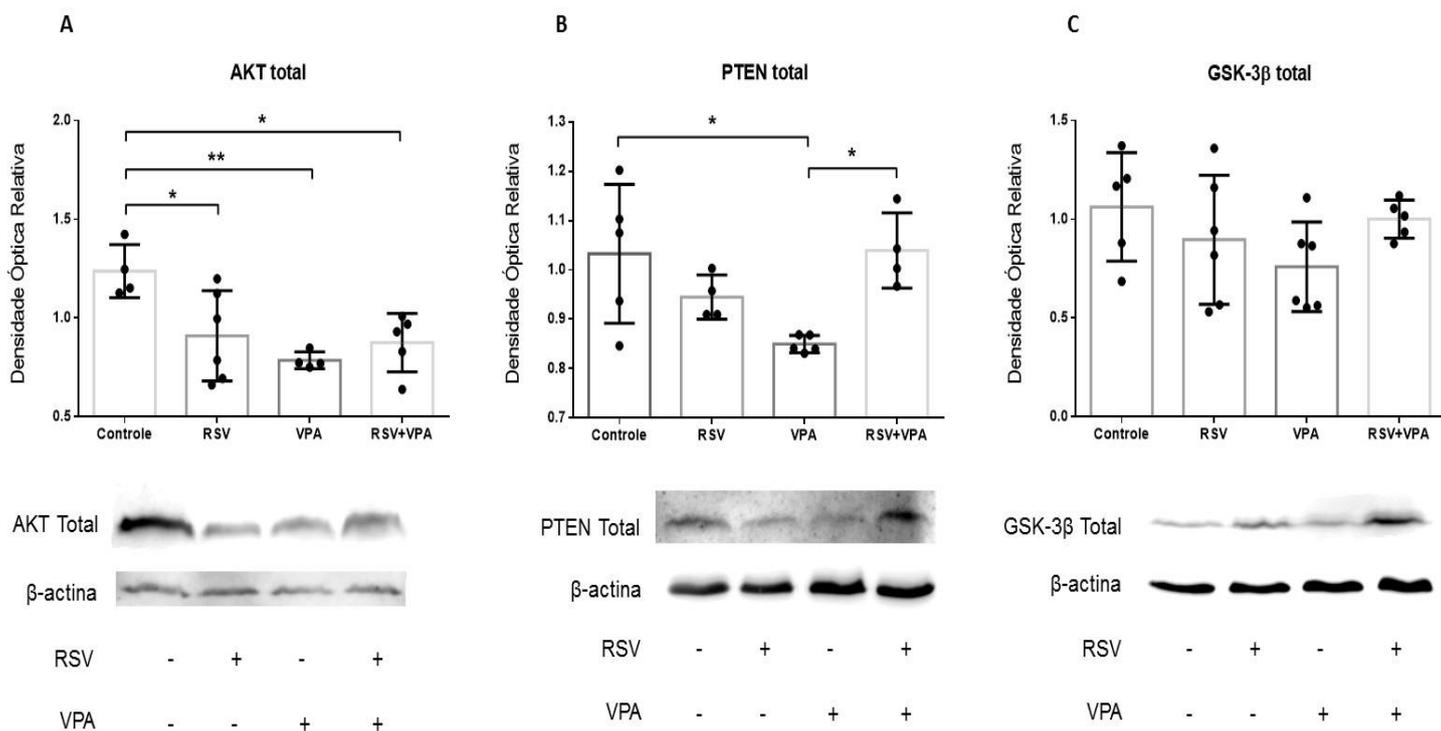


Figura 5. Níveis totais das proteínas AKT (A), PTEN (B) e GSK-3β (C). Barras representam média ± SD. * Valor significativamente diferente com $p < 0,05$. ** Valor significativamente diferente com $p < 0,005$. (N=4-6; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

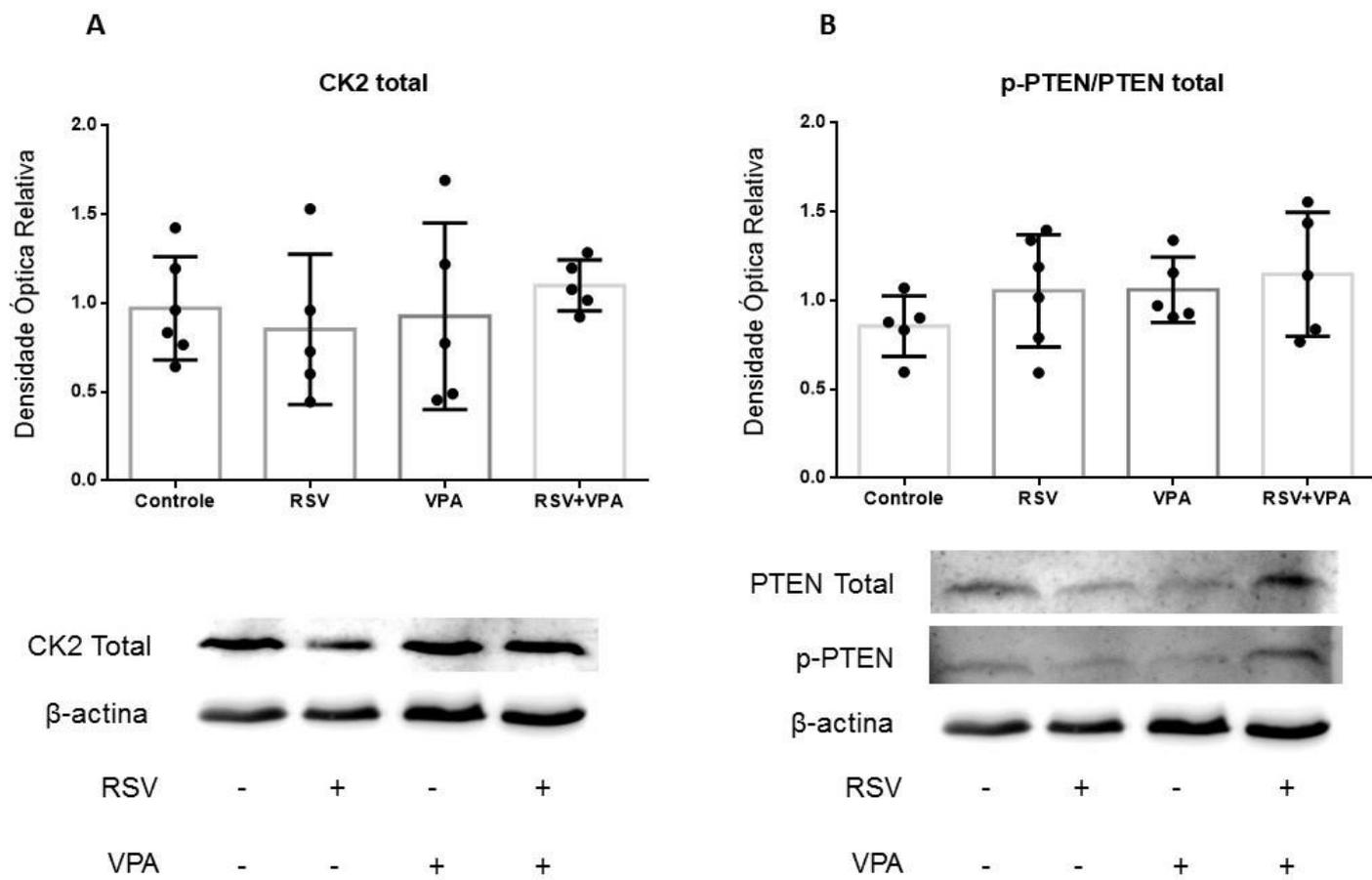


Figura 6. Níveis totais de CK2 (A) e razão p-PTEN/PTEN total (B). Barras representam média \pm SD. (N=5-6; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey).

5.4 Efeitos do RSV e VPA na via AKT/GSK-3 β no hipocampo

A exposição pré-natal ao VPA induziu um aumento na razão p-AKT308/AKT total, indicando ativação desta proteína. O tratamento com RSV foi capaz de prevenir este efeito (Fig. 7A). As demais razões de proteína fosforilada/proteína total desta via não foram alteradas pelos tratamentos (Fig. 7B e 7C). Os níveis totais de AKT foram reduzidos por todos os tratamentos (Fig. 5A), enquanto os níveis totais de GSK-3 β não foram alterados por nenhum tratamento (Fig. 5C).

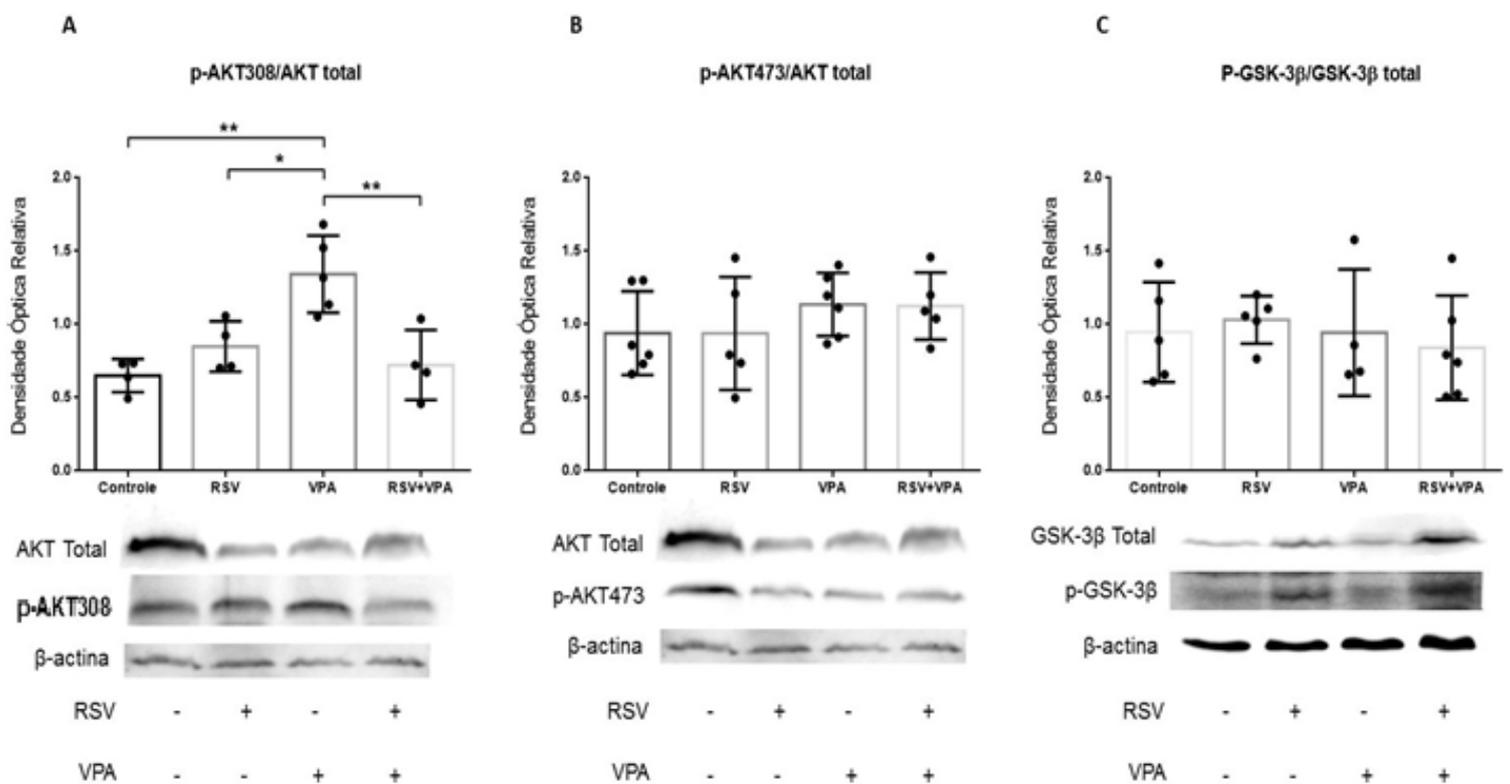


Figura 7. Razões entre proteína fosforilada e total das proteínas envolvidas na via AKT/GSK-3 β . Barras representam média \pm SD. (N=4-6; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey). * Valor significativamente diferente com $p < 0,05$. ** Valor significativamente diferente com $p < 0,005$.

6. DISCUSSÃO

O TEA é um grupo complexo e heterogêneo de desordens que afeta o neurodesenvolvimento. Através de estudos epidemiológicos, se chegou à conclusão de que uma série de eventos durante a gestação podem aumentar o risco de desenvolvimento de TEA nos filhos (Christensen et al., 2013). Um desses eventos é a exposição pré-natal ao VPA, um fármaco utilizado regularmente no tratamento de epilepsia e transtorno bipolar. Esta observação possibilitou o desenvolvimento de uma das melhores ferramentas de estudo do TEA atualmente disponíveis, um modelo animal que mimetiza várias características comportamentais e moleculares da doença (Roullet et al., 2013; Schneider e Przewlocki, 2005). No presente estudo, utilizamos desta ferramenta para avaliar duas vias de sinalização celular que estão envolvidas no TEA: as vias CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β , que foram avaliadas em duas regiões do SNC que estão associadas à doença, a amígdala e o hipocampo.

A amígdala é formada por um complexo de núcleos no telencéfalo basal, consistindo anatomicamente no núcleo lateral e núcleo basal, sendo eles referidos conjuntamente como núcleo basolateral da amígdala (BLA) e o núcleo central (CEA) (Krettek and Price, 1978). Por estar integrado ao sistema límbico, os núcleos da amígdala estão envolvidos em processamentos de informações com conteúdo emocional e na aquisição, armazenamento e extinção de memórias oriundas de experiências ativadas pelo medo (Ehrlich et al., 2009; LeDoux, 2003).

Estudos em pacientes com autismo demonstraram redução no número de neurônios na amígdala (Schumann and Amaral, 2006) bem como conectividade atípica e redução da habituação da amígdala correlacionada com escala de responsividade social (Murphy et al., 2012; Swartz et al., 2013). Resultados do modelo animal de autismo, com prole de ratas expostas ao VPA durante o período gestacional,

demonstram uma menor interação social, aumento da ansiedade e aumento do aprendizado e extinção prejudicada de memórias de medo (Baron-Cohen et al., 2000).

Neste estudo, encontramos um aumento da fosforilação inibitória da PTEN e da GSK-3 β na região da amígdala dos animais do grupo RSV+VPA em relação aos demais grupos. Este resultado traz novas informações e mostra o quão complexo podem ser os mecanismos de prevenção dos comportamentos do tipo autista promovidos pelo RSV. Embora a exposição pré-natal ao VPA não tenha alterado nenhum parâmetro analisado nessa região, isso não significa que as alterações presentes no grupo RSV+VPA não sejam relevantes na prevenção dos sintomas induzidos no modelo animal. Por exemplo, estudos sugerem que pacientes com autismo possuem uma redução no número de neurônios na amígdala (Schumann e Amaral, 2006), que poderia ser prevenida através de uma modulação na atividade da PTEN e da GSK-3 β , pois ambas quando inibidas estimulam a expressão de fatores anti-apoptóticos e promotores de sobrevivência e plasticidade celular (Gericke et al., 2006; Grimes e Jope, 2001). Outro importante fato é que já foi relatada uma redução no número de espinhos dendríticos no núcleo BLA deste modelo animal na idade adulta (Bringas et al., 2013). Sabe-se que a inibição da PTEN e da GSK-3 β promove na região da amígdala o aumento da maturação e do tamanho dos espinhos dendríticos do tipo *mushroom*, que é uma morfologia presente em espinhos mais ativos e maduros, o que poderia assim compensar esta redução do número de espinhos dendríticos (Haws et al., 2014).

Outro estudo realizado em roedores já demonstrou que o RSV, mesmo em baixos níveis como os obtidos na dieta, é capaz de aumentar a fosforilação inibitória da GSK-3 β no SNC, o que está de acordo com nosso resultado, pois mesmo quando administrado sozinho, o RSV teve este efeito (Varamini et al., 2013). A inibição da GSK-3 β também estimula a síntese e liberação de BDNF, o que aumenta a resiliência

neuronal e promove sobrevivência celular (Grimes e Jope, 2001). Sendo assim, mesmo que as alterações morfológicas e comportamentais exibidas pelo modelo não possam ser explicadas por uma alteração na atividade destas vias de sinalização, não está descartada sua relevância na prevenção das características do tipo autista, pois a modulação tanto da PTEN quanto da GSK-3 β na amígdala podem estar atuando como mecanismos compensatórios para outras vias alteradas pelo VPA que sejam determinantes na indução das alterações presentes na amígdala, mas que não foram abordadas nesse estudo.

O hipocampo é uma estrutura do sistema límbico localizada no lobo temporal de ambos os hemisférios encefálicos. Suas principais funções são a formação e consolidação de memórias de curto prazo em memórias de longo prazo e memória espacial. Nas últimas décadas, esta região vem recebendo cada vez mais atenção, pois é uma área muito plástica e sensível a estressores, além de também ser uma área onde ocorre neurogênese na idade adulta, tanto em roedores quanto em humanos (Gonçalves et al., 2016).

Como os nossos resultados sugerem, houve um aumento na ativação da AKT no modelo animal em relação ao controle, conforme determinado pela razão entre AKT fosforilada no sítio Thr380 e AKT total, e o RSV foi capaz de prevenir esta alteração. Como havia sido proposto em estudos anteriores, esse aumento de atividade da AKT pode explicar a maior densidade neuronal encontrada no hipocampo deste modelo animal (Edalatmanesh et al., 2013; Yang et al., 2016). Embora a atividade da GSK-3 β não tenha sofrido alteração, sabe-se que a AKT pode modular outras proteínas efetoras com a finalidade de induzir proliferação ou evitar morte celular, tais como ativar CREB, IKK α e YAP (proteínas com propriedades anti-apoptóticas), e inibir p53, BAD e a Caspase-9 (proteínas com propriedades pró-apoptóticas) (Manning e Cantley, 2007; Du e Montminy, 1998; Song et al., 2005; Basu et al., 2003).

Outra importante proteína regulada pela AKT é a mTOR. Diversos estudos mostram o envolvimento desta proteína com o TEA, e acredita-se que a modulação da atividade dela pode ser útil no tratamento (Crino, 2016). A mTOR é responsável por processos como poda neuronal (*pruning*), autofagia, plasticidade sináptica, síntese proteica, dentre outros. A AKT fosforila a proteína Tuberina (TSC2), levando a ativação da mTOR. Uma vez ativa, a mTOR causa uma série de alterações celulares, tais como laminação desorganizada de células, citomegalia e hiperexcitabilidade neuronal (Nguyen et al., 2015; Meikle et al., 2008). As consequências comportamentais também mostram que a ativação da mTOR causa sintomas do tipo autista, tais como anormalidades em interação social, comportamentos repetitivos e vocalizações anormais. Interessantemente, o tratamento com rapamicina, um inibidor da mTOR, é capaz de prevenir estas alterações (Ehninger et al., 2009; Tsai et al., 2012). Assim, o fato de haver esta ativação da AKT no hipocampo do modelo animal induzido por exposição pré-natal ao VPA sugere que possa estar ocorrendo uma ativação da mTOR, levando ao desenvolvimento de alguns comportamentos do tipo autista.

Os resultados deste trabalho sugerem também que o RSV previne esta ativação da AKT induzida pelo VPA. Um dos comportamentos que o RSV é capaz de prevenir no modelo são os déficits de interação social (Bambini-Junior et al., 2014), que poderiam estar sendo induzidos, por exemplo, por uma ativação da mTOR, secundária a ativação da AKT que este estudo encontrou no modelo. Assim, estes dados sugerem um possível mecanismo pelo qual o RSV poderia estar prevenindo características do tipo autista no modelo animal e adiciona mais uma evidência de potencial terapêutico do RSV no tratamento do TEA.

Outro resultado encontrado foi a redução dos níveis totais de AKT e PTEN. Há um estudo sugerindo que pode haver alterações nos níveis totais de AKT no SNC tanto em pacientes com autismo quanto no modelo animal de exposição pré-natal ao

VPA (Nicolini et al., 2015). Também neste modelo, foi reportado níveis reduzidos de PTEN no hipocampo, porém não havia sido avaliada a atividade desta proteína (Yang et al., 2016). No nosso estudo demonstramos que, apesar de haver redução nos níveis de PTEN total no hipocampo, a atividade está inalterada. Essas alterações foram prevenidas pelo RSV, sugerindo que talvez sejam relevantes na prevenção dos comportamentos do tipo autista induzidas pelo VPA. O RSV é capaz de modular algumas proteínas com papel na regulação de síntese proteica e expressão gênica, sendo o principal exemplo as proteínas da família das Sirtuínas (Freemont, 2000). Assim, ao modular uma destas proteínas, o RSV pode estar antagonizando os efeitos do VPA.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que o RSV pode antagonizar a ação do VPA na atividade e níveis de expressão proteica de algumas proteínas intimamente relacionadas ao TEA, como a PTEN, CK2, AKT e GSK-3 β , em duas estruturas cerebrais relevantes na fisiopatologia da doença, a amígdala e o hipocampo. O fato dos animais deste estudo serem adultos sugere que estas alterações podem surgir tardiamente na doença ou serem duradouros ao longo da vida dos animais. Embora a hipótese deste trabalho tenha sido comprovada parcialmente, estes resultados abrem novas perspectivas para o entendimento da fisiopatologia do TEA. Mais estudos serão necessários para explorar o impacto destes achados no desenvolvimento desta doença.

7. PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho incluem:

- Avaliar a via da mTOR no modelo animal, uma vez que existem relatos na literatura de que esta via pode ser importante para o TEA, e nossos resultados levantam a forte possibilidade desta proteína estar envolvida no mecanismo de indução de comportamentos do tipo autista no modelo animal de exposição pré-natal ao VPA;
- Avaliar fatores relacionados à síntese proteica que podem estar sendo modulados pelo VPA e pelo RSV, pois o tratamento com ambos, separados ou combinados, alterou o nível de expressão proteica de PTEN e AKT. Bons alvos incluem as proteínas da família das Sirtuínas e HDACs;
- Verificar se as alterações induzidas nas proteínas da via CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β encontradas neste estudo são consequências tardias à exposição ao VPA ou se aparecem em idades mais jovens;
- Avaliar as vias CK2/PTEN e AKT/GSK-3 β em outras estruturas encefálicas relacionadas ao TEA, como o córtex pré-frontal e o cerebelo.

8. APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido primariamente devido ao aporte financeiro fornecido pelos projetos FIPE-HCPA 14-0367 e 14-0431. Além disso, foi apoiado pelo Edital Universal - CNPq 14/2013 no processo 484145/2013-4 e por recursos do PROAP da PROPG-UFRGS, e os estudantes envolvidos com sua realização receberam bolsas de estudo do CNPq, CAPES ou PROPESQ-UFRGS.

9. REFERÊNCIAS

ARNDT, T.L.; STODGELL, C.J.; RODIER, P.M., (2005) The teratology in autism. *Int JDev Neurosci.* Apr-May;23(2-3):189-99.

BAKER, J.P., (2013) Autism at 70--redrawing the boundaries. *N Engl J Med*, 369(12):p. 1089-91.

BAKHEET, S.A., ALZAHRANI, M.Z., ANSARI, M.A., et al., (2016) Resveratrol Ameliorates Dysregulation of Th1, Th2, Th17, and T Regulatory Cell-Related Transcription Factor Signaling in a BTBR T + tf/J Mouse Model of Autism. *Mol Neurobiol.* Aug 30.

BAMBINI-JUNIOR, V., et al., (2014) Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci Lett.* Vol. 583, pag 176-181.

BAMBINI-JUNIOR, V.; et al., (2011) Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Res.*, Vol. 1408, pag 8-16.

BARON-COHEN, S., RING, H.A., BULLMORE, E.T., WHEELWRIGHT, S., ASHWIN, C., WILLIAMS, S.C., (2000). The amygdala theory of autism. *Neurosci Biobehav Rev.* 24, 355-64.

BASU, S., TOTTY, N.F., IRWIN, M.S., SUDOL, M., DOWNWARD, J. (2003) Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell.* Jan;11(1):11-23.

BEN-AMI BARTAL, I., DECETY, J., MASON, P., (2011). Empathy and pro-social behavior in rats. *Science.* 334, 1427-30.

BHANDARI, R., KUHAD, A. (2017) Resveratrol suppresses neuroinflammation in the experimental paradigm of autism spectrum disorders. *Neurochem Int.* Feb;103:8-23.

BINKERD, P. E., et al., (1988) Evaluation of Valproic Acid (VPA) Developmental Toxicity and Pharmacokinetics in Sprague—Dawley Rats. *Fundam Appl Toxicol*, vol 11, pag 485-593.

BJORKLUND, G., SAAD, K., CHIRUMBOLO, S., KERN, J.K., GEIER, D.A., GEIER, M.R., URBINA, M.A. (2016) Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*;76(4):257-268.

BLAISS, C.A., JANAK, P.H., (2009). The nucleus accumbens core and shell are critical for the expression, but not the consolidation, of Pavlovian conditioned approach. *Behav Brain Res.* 200, 22-32.

BLUNDELL, J., TABUCHI, K., BOLLIGER, M.F., et al., (2009). Increased anxiety-like behavior in mice lacking the inhibitory synapse cell adhesion molecule neuroligin 2. *Genes Brain Behav.* 8, 114-26.

BRINGAS, M.E., CARVAJAL-FLORES, F.N., LÓPEZ-RAMÍREZ, T.A., ATZORI, M., FLORES, G. (2013) Rearrangement of the dendritic morphology in limbic regions and altered exploratory behavior in a rat model of autism spectrum disorder. *Neuroscience.* Jun 25;241:170-87.

BRISTOT SILVESTRIN, R., BAMBINI-JUNIOR, V., GALLAND, F., et al., (2013) Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus. *Brain Res.* 1495, 52-60.

CARACCI, M.O., ÁVILA, M.E., DE FERRARI, G.V. (2016) Synaptic Wnt/GSK3 β Signaling Hub in Autism. *Neural Plast.*;2016:9603751.

CHIU, C.T., et al., (2013) Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. *Pharmacol Rev.* 8;65(1):105-42.

CHRISTENSEN, D.L., BAIO, J., BRAUN, K.V., et al. (2012) Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States. *MMWR Surveill Summ* 2016;65(No. SS-3)(No. SS-3):1–23.

CHRISTENSEN, J., GRØNBORG, T.K., SØRENSEN, M.J., et al., (2013) Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA.* Apr 24;309(16):1696-703.

COTTART, C.H., NIVET-ANTOINE, V., LAGUILLIER-MORIZOT, C., BEAUDEUX, J.L. (2010) Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res.* Jan;54(1):7-16.

CRAWLEY, J.N., (2011). Galanin impairs cognitive abilities in rodents: relevance to Alzheimer's disease. *EXS.* 102, 133-41.

CRINO, P.B. (2016) The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease. *Nat Rev Neurol.* Jul;12(7):379-92.

DOWNWARD, J. (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol;* 15:177–182

DU, K., MONTMINY, M. (1998) CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem.* Dec 4;273(49):32377-9.

EDALATMANESH, M.A., NIKFARJAM, H., VAFAEE, F., MOGHADAS, M. (2013) Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain Res.* Aug 14;1526:15-25.

EHNINGER, D., DE VRIES, P. J. & SILVA, A. J. (2009) From mTOR to cognition: molecular and cellular mechanisms of cognitive impairments in tuberous sclerosis. *J. Intellect. Disabil. Res.* 53, 838–851.

EHRlich, I., HUMEAU, Y., GRENIER, F., CIOCCHI, S., HERRY, C., LUTHI, A., (2009). Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron.* 62, 757-71.

FILIPPI-CHIELA, E.C., VILLODRE, E.S., ZAMIN, L.L., LENZ, G., (2011). Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells. *PLoS One.* 6, e20849.

FREMONT, L., (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 66, 663-73.

GANDAL, M.J., et al., (2010) Validating gamma oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry,* 68(12): p. 1100-6.

GERICKE, A.; MUNSON, M.; ROSS, A.H., (2006) Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene;*374:1-9.

GESCHWIND, D.H., (2009) Advances in autism. *Annu Rev Med,* 60: p. 367-80.

GO, H.S., KIM, K.C., CHOI, C.S., JEON, S.J., et al., (2012) Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat

brain via a mechanism involving the GSK-3 β / β -catenin pathway Neuropharmacology. Nov;63(6):1028-41.

GONÇALVES, J.T., SCHAFFER, S.T., GAGE, F.H. (2016) Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. Cell. Nov 3;167(4):897-914.

GOTTFRIED, C. J., BARONIO, D., ZANATTA, G., BRISTOT SILVESTRIN, R., VACCARO, T., RIESGO, R., (2013). Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model. In: Recent Advances in Autism Spectrum Disorders Vol. I, M. Fitzgerald, ed. eds. InTech.

GRIMES, C.A., JOPE, R.S. (2001) CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. J Neurochem; Sep;78(6):1219-32.

GUPTA, S.C., KANNAPPAN, R., REUTER, S., KIM, J.H., AGGARWAL, B.B., (2011). Chemosensitization of tumors by resveratrol. Ann N Y Acad Sci. 1215, 150-60.

HAN, Y.S., ZHENG, W.H., BASTIANETTO, S., CHABOT, J.G., QUIRION, R., (2004). Neuroprotective effects of resveratrol against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons: involvement of protein kinase C. Br J Pharmacol. 141, 997-1005.

HAWS, M.E., JARAMILLO, T.C., ESPINOSA, F., WIDMAN, A.J., et al., (2014) PTEN knockdown alters dendritic spine/protrusion morphology, not density. J Comp Neurol. Apr 1;522(5):1171-90.

HUANG, J.P., HUANG, S.S., DENG, J.Y., CHANG, C.C., DAY, Y.J., HUNG, L.M., (2010). Insulin and resveratrol act synergistically, preventing cardiac dysfunction in diabetes, but the advantage of resveratrol in diabetics with acute heart attack is antagonized by insulin. Free Radic Biol Med. 49, 1710-21.

INGRAM, J.L., et al., (2000) Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. Neurotoxicol Teratol, 22(3): p. 319-24.

JANG, M., CAI, L., UDEANI, G.O., SLOWING, K.V., et al., (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science. 275, 218-20.

JOHNSTON, S. B., RAINES, R. T. (2015) Conformational stability and catalytic activity of PTEN variants linked to cancers and autism spectrum disorders. Biochemistry. Feb

24;54(7):1576-82 KIM, K.C., et al., (2013) Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *J Neurochem*, 124(6): p. 832-43.

KRETTEK, J.E., PRICE, J.L., (1978). A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol*. 178, 255-80.

KUHN, R. (2004). Eugen Bleuler's concepts of psychopathology. *Hist. Psychiatry* 15, 361–366.

KULKARNI, S. S.; CANTÓ, C., (2014) The molecular targets of resveratrol. *Biochim Biophys Acta (BBA)*. doi:10.1016/j.bbadis.

LEDOUX, J., (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol*. 23, 727-38.

LITCHFIELD, D. W., (2003) Protein Kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J*. Vol. 369, pag 1-15.

LUCCHINA, L. e DEPINO, A. M. (2013) Altered Peripheral and Central Inflammatory Responses in a Mouse Model of Autism. *Autism Res*.

LUGO, J. N., et al., (2014) Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins. *Front Mol Neurosci*. Vol. 16, pag 7-27.

MANNING, B.D., CANTLEY, L.C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. Jun 29;129(7):1261-74.

MARKRAM, K., RINALDI, T., LA MENDOLA, D., SANDI, C., MARKRAM, H., (2008). Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 33, 901-12.

MCBRIDE, K. L., et al., (2010) Confirmation study of PTEN mutations among individuals with autism or developmental delays/mental retardation and macrocephaly. *Autism Res*, Vol 3, pag 137-141.

MEIKLE, L. et al. (2008) Response of a neuronal model of tuberous sclerosis to mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors: effects on mTOR and Akt signaling lead to improved survival and function. *J. Neurosci*. 28, 5422–5432

MURCIA, C.L., GULDEN, F., HERRUP, K., (2005). A question of balance: a proposal for new mouse models of autism. *Int J Dev Neurosci.* 23, 265-75.

MURPHY, E.R., FOSS-FEIG, J., KENWORTHY, L., GAILLARD, W.D., VAIDYA, C.J., (2012). Atypical Functional Connectivity of the Amygdala in Childhood Autism Spectrum Disorders during Spontaneous Attention to Eye-Gaze. *Autism Res Treat.* 2012, 652408.

NAZEER, A., GHAZIUDDIN, M., (2012). Autism spectrum disorders: clinical features and diagnosis. *Pediatr Clin North Am.* 59, 19-25, ix.

NGUYEN, L. H. et al. (2015) mTOR inhibition suppresses established epilepsy in a mouse model of cortical dysplasia. *Epilepsia* 56, 636–646.

NICOLINI, C., AHN, Y., MICHALSKI, B., RHO, J.M., FAHNESTOCK, M. (2015) Decreased mTOR signaling pathway in human idiopathic autism and in rats exposed to valproic acid. *Acta Neuropathol Commun.* 2015 Jan 20;3:3.

PATTERSON, P.H., (2011) Modeling autistic features in animals. *Pediatr Res,* 69(5 Pt 2): p. 34R-40R.

QUINCOZES-SANTOS, A., GOTTFRIED, C., (2011). Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1215, 72-8.

RAMADORI, G., GAUTRON, L., FUJIKAWA, T., et al., (2009). Central administration of resveratrol improves diet- induced diabetes. *Endocrinology.* 150, 5326-33.

RODIER, P.M., et al., (1997) Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod Toxicol,* 11(2-3): p. 417-22.

ROSSIGNOL, D.A., FRYE, R.E. (2014) Evidence linking oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and inflammation in the brain of individuals with autism. *Front Physiol.* 2014 Apr 22;5:150.

ROULLET, F. I.; LAI, J. K.; FOSTER, J. A., (2013) In utero exposure to valproic acid and autism – a current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol. and Teratol.,* Vol. 36, pag 47-56.

SAGHAZADEH, A., REZAEI, N. (2017) Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Autism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Autism Dev Disord.* Jan 30.

SCHMITZ, C., et al., (2005) Autism: neuropathology, alterations of the GABAergic system, and animal models. *Int Rev Neurobiol*, 71: p. 1-26.

SCHNEIDER, T., et al., (2008) Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, 33(6): p. 728-40.

SCHNEIDER, T., PRZEWLOCKI, R., (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*. 30, 80-9.

SCHNEIDER, T., TURCZAK, J., PRZEWLOCKI, R., (2006). Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology*. 31, 36-46.

SCHUMANN, C.M., AMARAL, D.G., (2006). Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. *J Neurosci*. 26, 7674-9.

SHUKLA, Y., SINGH, R., (2011). Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci*. 1215, 1-8.

SILVER, W.G., RAPIN, I., (2012). Neurobiological basis of autism. *Pediatr Clin North Am*. 59, 45-61, x.

SMAGA, I., NIEDZIELSKA, E., GAWLIK, M., MONICZEWSKI, A., et al., (2015) Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol Rep. Jun;67(3):569-80.*

SONG, G., OUYANG, G., BAO, S. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. Jan-Mar;9(1):59-71

SWARTZ, J.R., WIGGINS, J.L., CARRASCO, M., LORD, C., MONK, C.S., (2013). Amygdala habituation and prefrontal functional connectivity in youth with autism spectrum disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 52, 84-93.

SZKUDELSKA, K., SZKUDELSKI, T., (2010). Resveratrol, obesity and diabetes. *Eur J Pharmacol*. 635, 1-8.

TANG, B.L., (2010). Resveratrol is neuroprotective because it is not a direct activator of Sirt1-A hypothesis. *Brain Res Bull*. 81, 359-61.

THIRUNAVUKKARASU, M., PENUMATHSA, S.V., KONERU, S., et al., (2007). Resveratrol alleviates cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetes: Role of nitric oxide, thioredoxin, and heme oxygenase. *Free Radic Biol Med.* 43, 720-9.

TSAI, P. T. et al. (2012) Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature* 488, 647–651

TSUJINO, N., NAKATANI, Y., SEKI, Y., NAKASATO, A., NAKAMURA, M., SUGAWARA, M., ARITA, H., (2007). Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. *Neurosci Res.* 57, 289-95.

VANG, O., AHMAD, N., BAILE, C.A., BAUR, J.A., et al., (2011). What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One.* 6, e19881.

VANG, O., AHMAD, N., BAILE, C.A., BAUR, J.A., et al., (2011). What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One.* 6, e19881.

VARAMINI, B., SIKALIDIS, A.K., BRADFORD, K.L. (2013) Resveratrol increases cerebral glycogen synthase kinase phosphorylation as well as protein levels of drebrin and transthyretin in mice: an exploratory study. *Int J Food Sci Nutr.* 2014 Feb;65(1):89-96.

VIEIRA DE ALMEIDA, L.M., PINEIRO, C.C., LEITE, M.C., et al., (2008). Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures. *Neurochem Res.* 33, 8-15.

WALLE, T., HSIEH, F., DELEGGE, M.H., OATIS, J.E., JR., WALLE, U.K., (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 32, 1377-82.

WU, H.F., CHEN, P.S., CHEN, Y.J., LEE, C.W., CHEN, I.T., LIN, H.C. (2016) Alleviation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Dependent Long-Term Depression via Regulation of the Glycogen Synthase Kinase-3 β Pathway in the Amygdala of a Valproic Acid-Induced Animal Model of Autism. *Mol Neurobiol.* Aug 30.

WYMANN, M.P., et al.. (2003) Phosphoinositide 3-kinase signaling - which way to target? *Trends Pharmacol Sci;* 24:366–376

YANG, E. J., AHN, S., LEE, K., MAHMOOD, U., KIM, H. S. (2016) Early Behavioral abnormalities and Perinatal Alterations of PTEN/AKT Pathway in Valproic Acid Autism Model Mice. PLoS One. Apr 12;11(4):e0153298.

YANG, E.J., AHN, S., LEE, K., MAHMOOD, U., KIM, H.S. (2016) Early Behavioral Abnormalities and Perinatal Alterations of PTEN/AKT Pathway in Valproic Acid Autism Model Mice. PLoS One. Apr 12;11(4):e0153298.

YOCHUM, C.L., DOWLING, P., REUHL, K.R., WAGNER, G.C., MING, X., (2008). VPA-induced apoptosis and behavioral deficits in neonatal mice. Brain Res. 1203, 126-32.

ZAMIN, L.L., DILLENBURG-PILLA, P., ARGENTA-COMIRAN, R., HORN, A.P., et al., (2006). Protective effect of resveratrol against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice cultures: Involvement of PI3-K pathway. Neurobiol Dis. 24, 170-82.

ZHU, H., MINGLER, M.K., MCBRIDE, M.L., et al. (2010) Abnormal response to stress and impaired NPS- induced hyperlocomotion, anxiolytic effect and corticosterone increase in mice lacking NPSR1. Psychoneuroendocrinology. 35, 1119-32.