



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

Gustavo Brum Schwingel

ANÁLISE DO EFEITO DO DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) PRÉ-NATAL NO NÚCLEO
MEDIAL PÓSTERO-DORSAL DA AMÍGDALA DE RATOS WISTAR MACHOS
ADULTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2018



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

ANÁLISE DO EFEITO DO DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) PRÉ-NATAL NO NÚCLEO
MEDIAL PÓSTERO-DORSAL DA AMÍGDALA DE RATOS WISTAR MACHOS
ADULTOS

Dissertação de mestrado apresentada ao
PPG Neurociências da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito parcial para a obtenção do título
de Mestre em Neurociências.

GUSTAVO BRUM SCHWINGEL

ORIENTADORA: Prof.^a. Dr.^a. Carmem J. S. Gottfried

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Alberto A. Rasia Filho

Porto Alegre

2018

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a professora Carmem por ter me orientado desde 2014, quando ingressei como aluno de Iniciação Científica no laboratório de Plasticidade Neuroglial, e desde então entrei para o grupo dos “filhos da Carmem”. Digo isso pois a professora tem um jeito maternal com seus alunos, protegendo, ensinando e cobrando quando é necessário. Muito obrigado por tudo que a senhora me ensinou e me ajudou a construir nesse período.

Também agradeço ao meu co-orientador, o professor Alberto Rasia, que aceitou me orientar e também muito me ensinou com sua sabedoria que é uma característica notável. Agradeço também à colega Mariana Zancan, por todo empenho e dedicação nesse projeto, sem os quais não seria possível de realizar.

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação Mauro, Mellanie, Iohanna, Guilherme, Júlio, Bruna e Matheus que me acompanham e estão sempre disponíveis para qualquer ocasião, seja tomar um café no laboratório ou assumir empreitadas e “engates” que surgem nessa vida de pós-graduação. Sem vocês eu não chegaria tão longe!

Aos alunos de iniciação científica do laboratório que nos ajudam e participam de todos os nossos projetos, Tayssa e Pedro (os “ritters”) e Giovanna, Marília e Kalunga.

Agradeço ao meu pai, que sempre acreditou em mim e apoiou todos os meus projetos, e foi desde a minha infância o melhor exemplo de homem que eu poderia ter. À minha mãe, que me educou e muito me incentivou para que eu me dedicasse aos estudos. Aos meus queridos avós, que infelizmente já faleceram e que fazem muita falta! Meus tios Mauro e Márcia e minha querida dinda Jane, que me incentivou no começo desse caminho.

À minha noiva, Priscilla por nunca ter desistido de mim, nem nos meus piores dias, e que diariamente me apoia e me ensina, com sua pedagogia única e infalível.

Agradeço, por fim, às agências de fomento, em especial ao CNPq, e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

“Um povo sem memória é um povo sem futuro”

Ferdinand Foch

Resumo

O composto dimetilsulfóxido (DMSO) é um veículo aprótico e anfipático usado em diversos estudos na pesquisa biomédica para solubilizar e carrear moléculas diferentes, podendo transportar compostos através de barreiras biológicas em administrações por via oral, intravenosa, intraperitoneal e tópica. Essa molécula também apresenta importantes propriedades analgésicas e anti-inflamatórias. No presente trabalho, avaliamos densidade, número e forma de espinhos dendríticos no subnúcleo pósterodorsal da amígdala medial (MePD) de ratos Wistar adultos expostos ao DMSO durante o período gestacional. O DMSO, nesse caso, foi empregado como veículo do antioxidante e anti-inflamatório resveratrol (RSV), utilizado por nosso grupo como uma importante estratégia preventiva de características do tipo autista no modelo animal de autismo induzido por administração pré-natal de ácido valproico (VPA, solubilizado em salina 0,9%). O desenho experimental compreende 5 grupos: (1) Nãive (animais sem nenhuma intervenção); (2) Veículos DMSO (7,2 M, 1:2 em salina 0,9% v/v - 100 µL/kg/dia por via subcutânea, durante os dias embrionários E6,5 ao E18,5) e salina 0,9% por via intraperitoneal, no dia E12,5; (3) RSV (3,6 mg/kg, uma injeção subcutânea diária do E6,5 ao E18,5) ou (4) VPA (600 mg/kg, uma injeção intraperitoneal no dia E12,5) e (5) RSV + VPA (administrados conforme indicado nos grupos 3 e 4). Para nossa surpresa, verificamos que os animais dos 4 grupos expostos aos tratamentos pré-natais apresentaram uma surpreendente e significativa diminuição na densidade e no número de espinhos dendríticos na MePD em relação ao grupo Nãive. Esses dados indicam que o efeito observado está relacionado com a administração do veículo DMSO, visto que os grupos 2-5 apresentaram o mesmo perfil, independente ou não da administração de RSV ou VPA. A vulnerabilidade do MePD a estes fatores ambientais durante o período gestacional, pode estar associada ao impacto de 13 injeções subcutâneas de DMSO em um período crítico da gestação, concomitante com um possível efeito sobre a atividade de receptores de estrogênio (ER), que sabidamente modulam densidade de espinhos dendríticos. Publicações anteriores do nosso grupo mostram que o RSV foi capaz de prevenir importantes alterações moleculares e comportamentais do tipo autista no modelo VPA. O presente trabalho indica que o mecanismo preventivo do RSV observado previamente não foi prejudicado pelas alterações encontradas na MePD. Assim, estudos futuros serão necessários para elucidar as vias biológicas envolvidas nessa drástica alteração em número e forma de espinhos dendríticos na MePD, como por exemplo o comportamento sexual. Os presentes dados também apontam para o uso cauteloso e a relevância de entender os efeitos bioativos de solventes comumente usados no campo da pesquisa.

Palavras-chave: DMSO, modelo animal, espinhos dendríticos, injeção, receptor de estrogênio, MePD

Abstract

The compound dimethyl sulfoxide (DMSO) is an aprotic and amphipathic vehicle used in a variety of studies in biomedical research to solubilize and deliver different molecules. The delivery through biological barriers is one of the most important roles which DMSO is chosen as a vehicle by oral, intravenous, intraperitoneal and transdermal administration. However, subsequent studies demonstrated important analgesic and anti-inflammatory properties of DMSO exposure. In the present work, we evaluated the density, number and shape of dendritic spines in the medial posterodorsal subnucleus of medial amygdala (MePD) from adult Wistar rats exposed to DMSO during pregnancy. The DMSO was used as vehicle of Resveratrol (RSV), which presents antioxidant and anti-inflammatory roles, established by our research group as an important strategy to prevent autistic-like behaviors induced by the prenatal administration of valproic acid (VPA, solubilized in saline 0.9%). The experimental design comprises 5 groups: (1) Näive (no intervention); (2) Vehicles DMSO (7.2 M, 1:2 in saline 0.9% v/v - 100 μ L/kg/day by subcutaneous administration from E6.5 to E18.5) and saline 0.9% by intraperitoneal administration in E12.5; (3) RSV (3.6 mg/kg by a diary subcutaneous administration from E6.5 to E18.5) and (5) RSV+VPA (administered as indicated by groups 3 and 4). Strikingly, we observed that animals from the 4 groups exposed to prenatal treatments presented an impressive and significative reduction in the density and number of dendritic spines in MePD compared to the Näive group. These data indicate that the observed effect could be possibly related to the DMSO vehicle administration, since the groups 2-4 presented the same profile, regardless the VPA or RSV administration. Besides, the vulnerability of MePD to environmental risk factors during pregnancy, associating the effect of 13 DMSO subcutaneous injections with a critical biological time, as well as the possible relationship with estrogen receptors (ER), which can modulate the density of dendritic spines. Recent studies from our research group demonstrated that RSV prevented important molecular and behavioral autistic-like feature in the VPA model. The present work showed that the preventive mechanism previously observed by RSV was not impaired by the alterations found in MePD. Therefore, future studies will be necessary to elucidate the biological pathways involved in these drastic alterations in number and shape of dendritic spines from MePD, as well as to clarify biological and behavioral aspects that could be influenced by changes in this subnucleus, for example, in sociosexual behavior. The data also highlights to a cautious use and to the relevance in understand the bioactive effects of solvents commonly used in research field.

Keywords: DMSO, animal model, dendritic spines, injection, estrogen receptors, MePD

Lista de abreviaturas

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo, do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BLA – Núcleo basolateral da amígdala

CeA – Núcleo central da amígdala

Co – Núcleo cortical da amígdala

CRF – Fator liberador de corticotrofina, do inglês *Corticotrophin Releasing Factor*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSM – Manual diagnóstico e estatístico de desordens mentais, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

ER – Receptor de estrogênio

FDA – Agência de controle de Drogas e Alimentos do Estado Unidos do inglês *Food and Drug Administration*

IP – Intraperitoneal

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada

LD-50 – Dose Letal Mediana, do inglês *Lethal Dose*

LTP – Potenciação de longa duração, do inglês *Long-Term Potentiation*

Me – Amígdala medial

MePD – Amígdala medial pósterio-dorsal

Opt – Trato óptico, do inglês *Optic Tract*

PG – Polietilenoglicol

RSV – Resveratrol

SC – Subcutâneo

SNC – Sistema nervoso central

St – *Stria terminalis*

TEA – Transtorno do Espectro Autista

tPA – Protease ativadora de plasminogênio tecidual, do inglês *Tissue plasminogen activator*.

VPA – Ácido valproico

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura química de Lewis do dimetilsulfóxido (DMSO).....	2
Figura 2. Estrutura química do Ácido Valproico	10
Figura 3. Imagem representativa da localização da MePD.	13

Lista de tabelas

Tabela 1: Dose letal mediana (DL ₅₀) de DMSO em diferentes espécies.....	3
Tabela 2: Efeitos bioativos do DMSO.....	7

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1.1 Dimetilsulfóxido (DMSO)	1
1.1.1. Propriedades químicas do DMSO	2
1.1.2. DMSO: da pesquisa básica à clínica aplicada	3
1.1.3. Efeitos bioativos do DMSO	5
1.2 Solventes orgânicos em sistemas biológicos	8
1.3 Transtorno do Espectro Autista (TEA)	9
1.3.1 Etiologia do TEA	9
1.3.2 Modelo animal de TEA	10
1.4 A importância da amígdala no TEA	12
1.4.1 Espinhos dendríticos	13
1.5 Resveratrol (RSV)	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. MANUSCRITO	17
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÕES	54
6. PERSPECTIVAS	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8. ANEXOS	72

INTRODUÇÃO

1.1 Dimetilsulfóxido (DMSO)

O dimetilsulfóxido (DMSO) foi sintetizado, pela primeira vez, no início do século XIX na indústria química alemã. Na busca por métodos mais baratos e eficientes para produzir papel a partir da polpa de madeira (processo de Kraft), foi desenvolvido um processo no qual seus subprodutos incluíam uma variedade de compostos contendo sulfeto. Estes sulfuretos, os quais eram conhecidos por um forte odor, foram convertidos em sulfóxidos menos nocivos, incluindo DMSO (Roy, 2000).

Em 1866, o pesquisador russo Alexander Zaytsev, sintetizou o DMSO e descreveu os primeiros achados em 1867 (Zaytsev, 1867). A partir dessa descoberta, o DMSO tem sido extensivamente estudado na área química. É um solvente preferido para uma série de reações, sendo rotineiramente usado como um oxidante fraco, se beneficiando das propriedades nucleofílicas de seus átomos componentes. Além disso, notou-se que o DMSO derramado sobre as mãos causava rapidamente um sabor característico do alho na língua, o que levou à investigação sistemática do DMSO como um agente de transporte que poderia ser usado para entregar pequenas moléculas através da pele e da mucosa (Capriotti & Capriotti, 2012; Horita & Weber, 1964). Dessa forma, o DMSO foi logo reconhecido como um agente capaz de transportar pequenas moléculas através de uma variedade de barreiras de tecidos dos organismos (Capriotti & Capriotti, 2012)

A partir das primeiras evidências das propriedades farmacológicas do DMSO pelo grupo de pesquisa liderado por Stanley W. Jacob nos anos 60 (Jacob et al., 1964), a história terapêutica do DMSO vem sendo considerada controversa e tem sido revisada na literatura até os dias atuais. Apesar de mais de 1.200 publicações valendo-se das propriedades do DMSO, após a descoberta dos efeitos teratogênicos da talidomida nos anos 60 e da conscientização geral sobre uso de fármacos iniciada por essa grande falha, o uso do DMSO caiu consideravelmente devido às novas orientações do *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (Capriotti & Capriotti, 2012). Nos anos 70, algumas preparações veterinárias a base de DMSO, sozinhas e em combinação com esteroides, foram aprovadas pelo FDA, sendo atualmente vendidas sob uma variedade de marcas, incluindo Domoso®, Domoso Gel®, Symsac® e Synotoc Otic®. Em 1978, o FDA aprovou uma solução de 50% de

DMSO para administração intravesicular sob a marca Rimso-50 (NDA# 017788) como tratamento para cistite intersticial em humanos (FDA, 1978; Parkin et al., 1997). Com a versão genérica aprovada em 2002, esta continua a ser a única indicação humana de DMSO aprovada pelo FDA.

1.1.1. Propriedades químicas do DMSO

O DMSO, ilustrado na Figura 1, encontra-se naturalmente na forma líquida incolor, é classificado como um composto organossulfurado de fórmula C_2H_6OS (peso molecular de 78,13 g/mol e densidade 1,1 g/cm³), com propriedades apróticas (não há um centro doador de prótons, quando colocado em solução aquosa) e anfipáticas (solúvel tanto em solventes aquosos quanto orgânicos) (Thomas et al., 1966). De acordo com a teoria dos ácidos e bases de Lewis, o DMSO apresenta núcleos com um forte ligante doador de elétrons (O) e um fraco ligante doador de elétrons (S) (Zierkiewicz & Privalov, 2005).

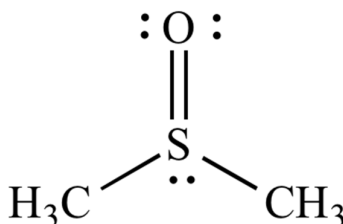


Figura 1. Estrutura química de Lewis do dimetilsulfóxido (DMSO). Retirado de Glossário Ilustrado de Química Orgânica.

<http://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/D/dmsol.html>. Data de acesso: 20/05/2018

Quanto à acidez, os grupos metil do DMSO são considerados ácidos fracos, com um pKa = 35 (Matthews et al., 1975). A desprotonação de DMSO requer bases fortes como diisopropilamida de lítio e hidreto de sódio. Por esta razão, muitos compostos orgânicos têm seus valores de acidez analisados em solução com DMSO (Heil et al., 2014). Na síntese orgânica, o DMSO é usado como um oxidante suave (Epstein & Sweat, 1967), nas reações de oxidação de Pfitzner–Moffatt e de Swern usando o DMSO em combinação com outros agentes oxidantes (Tidwell, 1990). Em termos de estrutura química, O DMSO apresenta simetria do tipo Cs.

A dose letal mediana (DL₅₀) é a dose letal mensurada em gramas de um composto por quilograma de peso corporal que resulta em 50% de mortalidade dos

animais de teste em condições padronizadas. Em termos de toxicidade, O DMSO é considerado um solvente não tóxico. A Tabela 1 reúne valores de DL₅₀ para diferentes espécies de animais.

Tabela 1: Dose letal mediana (DL₅₀) de DMSO em diferentes espécies.

Espécie	Via de administração				
	Uso tópico	Via oral	Via intravenosa	Via subcutânea	Via nasal
Camundongo	50	16,5-24,6	3,8-8,9	13,9-20,5	14,7-17
Rato	40	17,4-28,3	5,2-8,1	12-20,5	13
Coelho da índia	-	11	-	-	5,5
Galinha	-	14	-	-	-
Gato	-	-	4	-	-
Cachorro	>11	10	2,5	-	-
Macaco	>11	4	4	-	-

Os dados foram adaptados do boletim informativo da Gaylord Chemical Company, na sessão "Acute Toxicity"(Gaylord Chemical Company (L.L.C), 2014)

No entanto, um estudo prévio indica que, apesar de suas características apróticas e anfipáticas, juntamente com a sua aparente baixa toxicidade em concentrações <10%, o uso indiscriminado e aplicação generalizada do DMSO pode estar negligenciando efeitos importantes tóxicos a nível celular, principalmente quando utilizado como veículo de outros fármacos em modelos *in vivo* (injeção intravítrea) e *in vitro* (cultura celular de retina) (Galvao et al., 2014). Dessa forma, o estudo dos efeitos bioativos de solventes comumente usados, como o DMSO, se faz necessário na literatura, a fim de entender a extensão desses efeitos tanto a nível molecular, quanto a nível comportamental, em diferentes organismos.

1.1.2. DMSO: da pesquisa básica à clínica aplicada

O início da utilização do DMSO nas áreas biomédicas remonta à década de 1960 (S W Jacob & Wood, 1967), momento em que diversos cientistas passaram a explorar esse composto pouco dispendioso cujo uso até então era restrito principalmente à indústria papeleira (Swanson, 1985). Alguns usos consagrados do

DMSO derivam das descobertas realizadas nesse momento, com destaque para a criopreservação de células e tecidos (Lovelock & Bishop, 1959), veículo de drogas por via cutânea (Kolb et al., 1967) e efeito anti-inflamatório *per se* (Jacob et al., 1964). Concomitantemente, diversos estudos de toxicidade foram realizados em diferentes espécies de animais (camundongos, ratos, cobaias, hamsters, galinhas, coelhos, cães e macacos *rhesus*) (Jacob & Wood, 1967), demonstrando um nível de segurança adequado para o uso desse composto.

O amplo uso do DMSO na pesquisa básica está associado, principalmente, à sua capacidade de reduzir a formação de cristais de gelo durante a preservação de amostras em temperaturas negativas, promovendo a manutenção da estrutura e funcionalidade, algo essencial para diversas áreas como a biologia celular e molecular, bioquímica, histologia e outras (Lovelock & Bishop, 1959). Além dessa função, o DMSO também pode ser utilizado como um indutor de diferenciação celular em alguns cultivos (Chetty et al., 2013), facilitador da fusão de células e lipossomos, permeabilizador de membranas (Gurtovenko & Anwar, 2007), agente antioxidante e potencial radioprotetor (Gurtovenko & Anwar, 2007). Entretanto, um dos aspectos mais críticos envolve a utilização desse composto como veículo para fármacos com características lipossolúveis (tanto por absorção cutânea quanto para injetáveis) (Gurtovenko & Anwar, 2007), algo que foi replicado ao longo do desenvolvimento científico, porém com potenciais implicações na qualidade dos resultados encontrados em decorrência das diversas características supracitadas, as quais podem trazer vieses importantes aos dados encontrados.

Em relação ao potencial clínico, após a primeira aprovação pelo FDA em 1978 para tratamento de cistite intersticial (Jacqueline Parkin et al., 1997), muitos usos bastante diversos do DMSO passaram a ser avaliados, sendo um dos mais notáveis, novamente, como veículo promotor de absorção cutânea de fármacos principalmente voltados para a área dermatológica (Capriotti & Capriotti, 2012). Outros usos interessantes incluem analgesia e efeito anti-inflamatório local por uso tópico (Capriotti & Capriotti, 2012) (com baixa incidência de dermatites ou alterações cutâneas associadas), reperusão de estruturas após cirurgias plásticas (Young et al., 2005), tratamento de amiloidoses (Santos et al., 2003), melhora nos quadros de edema cerebral (Ikeda & Long, 1990) e diversas outras aplicações.

Dessa forma, é possível notar que a utilidade do DMSO está bem além do que a de um simples solvente e que seus efeitos podem ser explorados em diversas condições. Assim, é possível que, analogamente ao histórico do ácido valproico – o qual era utilizado como veículo de vários outros compostos que estavam sendo investigados quanto à atividade anticonvulsivante - (Tomson et al., 2016), o DMSO também possa passar da categoria de solvente à categoria de fármaco, porém é necessário entender melhor os mecanismo de interação desse composto nos sistemas biológicos a fim de reavaliar suas funções para adequar sua utilização.

1.1.3. Efeitos bioativos do DMSO

Como o DMSO é prontamente absorvido por animais e humanos por rotas orais e tópicas, seu uso é potencialmente interessante, principalmente para efeitos analgésicos e anti-inflamatórios rápidos. Uma característica que também é muito explorada na aplicação clínica e científica do DMSO é a propriedade de aumentar a absorção de outras substâncias (Gad & Sullivan, 2014). Em estudos com equinos, o DMSO demonstrou uma rápida absorção via oral (0,15h) e na administração intravenosa uma rápida distribuição (1,5 min) e uma fase lenta de eliminação (90 min) (Soma et al., 2018)

Algumas evidências que salientam a importância e eficácia do uso de DMSO como crioprotetor informam que DMSO demonstrou não interagir com células plasmáticas, não fazendo ligações com essas células e apresentando uma rápida fase de distribuição. Além disso, DMSO também se mostrou confinado ao espaço intersticial, tendo pouca entrada nas células (Malinin et al., 1969). Outro fato que auxilia e fortifica sua aplicação para criopreservação é a evidência de que o DMSO interage com a membrana das células. (Greiff & Seifert, 1968)

Embora já tenha sido descrito na literatura que o uso de DMSO tem funções anti-inflamatórias e analgésicas, recentemente vem emergindo alguns resultados que poderiam trazer novas perspectivas para seu uso. Seus efeitos ocorrem em praticamente todos os sistemas do organismo e vão desde alteração na permeabilidade e no fluxo de íons até hipotermia nos animais (Julien et al., 2012; Lu & Mattson, 2001), e em alguns casos, alguns tratamentos apresentam melhores resultados quando combinados ao uso do DMSO.

Por exemplo, frutose-1,6-bifosfato combinada com DMSO melhorou as funções motoras de camundongos que sofreram trauma encefálico (de la Torre, 1995). A mesma combinação de drogas (frutose-1,6-bifosfato + DMSO) também já foi testada e diminuiu prejuízos neurológicos causados após um acidente vascular encefálico (Karaça et al., 2002).

Além disso, DMSO causou prejuízos na morfologia e na função de mitocôndrias (Kang et al., 2017; Klamt et al., 2002; Ma et al., 2018; Yuan et al., 2014) estresse oxidativo em zigotos afetando o balanço entre pro- e antioxidantes (Kang et al., 2017), alterações no fluxo de íons Ca^{2+} e Cl^- (Camici et al., 2006; Nakahiro et al., 1992), induziu apoptose de células de cérebro em desenvolvimento (Hanslick et al., 2009a) e hiperfosforilação da proteína tau (Julien et al., 2012).

Dentre os efeitos do DMSO que são benéficos, se destacam a diminuição da pressão intracraniana pós trauma (Karaca et al., 1991), diminuição de edema e melhora na recuperação de membros inferiores lesionados (Colucci et al., 2008), diminuição do edema encefálico em coelhos (Camp et al., 1981) e a diminuição da trombose arterial (Camici et al., 2006).

De maneira muito interessante, o uso de DMSO também apresentou efeito antipsicótico em pacientes com esquizofrenia (Kang et al., 2017) e o uso crônico atenuou os déficits em memória espacial induzidos por isquemia (Farkas et al., 2004).

O uso de DMSO em concentrações de 10% ou mais se mostrou tóxico em estudos *in vivo*, já o efeito do DMSO em doses baixas, em modelos *in vivo* e *in vitro* é controverso (Galvao et al., 2014; Hanslick et al., 2009a), demonstrando um caráter dose-dependente dos efeitos dessa molécula. Esses resultados demonstram que o uso de DMSO é muito amplo, com importantes atuações na clínica e na veterinária, com ações analgésicas e anti-inflamatórias e em diversas outras condições patológicas de diversos sistemas corporais. No entanto, nem todos os efeitos bioativos dessa molécula são interessantes para a medicina, visto que, como citado acima, vários resultados apontam para efeitos prejudiciais em várias células, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2: Efeitos bioativos do DMSO.

Efeito Bioativo	Via de administração	Dose	Autores
Diminuição da perda de neurônios COX-2 no giro denteado	Intraperitoneal	0,25 mL	Farkas, 2004
Dano mitocondrial	<i>in vitro</i>	10%	Ma, 2018
Apoptose em cultura de células neurais de camundongo	Intraperitoneal	0,3 a 10 mg/kg	Hanslick, 2009
Melhora no edema e melhora na recuperação das patas de ratos lesionadas, efeito anti-inflamatório	Oral	10 ml/kg	Colucci, 2008
Diminuição da pressão intracranial pós trauma	Intravenoso		Karaca, 1991
Diminuição do edema encefálico em coelhos	intravenoso	1 g de solução 10%	Camp, 1981
Diminui a ativação de canais de AMPA-NMDA	<i>in vitro</i>		Lu, 2001
Diminui a morte excitotóxica de neurônios glutamatérgicos	<i>in vitro</i>		Lu, 2001
Diminui o influxo de Ca ²⁺	<i>in vitro</i>		Lu, 2001
Diminui trombose arterial	Intraperitoneal	3,8 ml/kg	Camici, 2006
Previne migração e proliferação de células do músculo liso	Intraperitoneal	3,8 ml/kg	Camici, 2006
Efeito antipsicótico em pacientes com esquizofrenia	Intramuscular	20 mL/dia	Smith, 1992
Estresse oxidativo em zigotos afetando o balanço pró- e antioxidante	<i>in vitro</i>	0,5% 1% e 2%	Kang, 2017
Dano mitocondrial	<i>in vitro</i>	0,5% 1% e 2%	Kang, 2017
Acúmulo de lipídeos hepatocelulares	<i>in vitro</i>	0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5% e 1%	Song, 2012
Hiperfosforilação da proteína Tau	<i>in vitro</i>	0,1%	Song, 2012

1.2 Solventes orgânicos em sistemas biológicos

A escolha de veículos para administração de compostos com características lipofílicas deve levar em consideração diversos parâmetros como toxicidade, capacidade de atravessar barreiras e possíveis atividades próprias em sistemas biológicos. Esse último tópico, entretanto, acaba sendo muitas vezes pouco abordado em decorrência da consolidação histórica do uso dos veículos mais comuns, situação que acaba criando um elemento de confusão nos tratamentos clínicos e na pesquisa.

Assim como o DMSO, outros compostos utilizados como veículos apresentam efeitos importantes, por exemplo: as ciclodextrinas alteram a composição de membrana (Awasthi-Kalia et al., 2001) e trazem impactos na manutenção da estrutura sináptica, já que sequestram o colesterol, promovendo alterações nos *rafts* lipídicos que auxiliam a ancorar receptores e vesículas (Rivers-Auty & Ashton, 2013). O polietilenoglicol (PG) apresenta propriedades inibitórias no sistema nervoso central (SNC) (Beckman & Crittenden, 1981) que se refletem em efeitos ansiolíticos (H. Q. Lin et al., 1998), além disso promove a ação de alguns barbitúricos principalmente pela inibição das enzimas CYP2E1 (Nishimura et al., 1999). Finalmente, o etanol demonstra efeito depressor do SNC (Valenzuela, 1997), além de ser protetor para lesão encefálica isquêmica em pequenas doses (Chen et al., 1999), porém perifericamente pode ser irritante para a mucosa gástrica (Guslandi, 1987) e potencial indutor de hepatotoxicidade (Koteish et al., 2002).

Dessa forma é importante levar em consideração o uso consciente dessas ferramentas, buscando reduzir a quantidade de veículos utilizados ou direcionar a escolha conforme as evidências já descritas a fim de minimizar esse viés.

No nosso grupo de pesquisa, temos empregado o DMSO como veículo para a administração de resveratrol (RSV), um polifenol da família dos estilbenos que apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras (Quincozes-Santos et al., 2013; Vang et al., 2011). O RSV tem apresentado importantes efeitos protetores no modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA) (Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018; Hirsch et al., 2018).

1.3 Transtorno do Espectro Autista (TEA)

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizado por prejuízos na interação social e comunicação, e por padrões de comportamentos repetitivos e estereotipados (American Psychiatric Association, 2013). Tipicamente, esses transtornos se manifestam durante a primeira infância e os déficits do desenvolvimento resultam em alterações em habilidades sociais, acadêmicas, pessoais e ocupacionais (American Psychiatric Association, 2013).

Diversas propostas foram utilizadas para categorizar os pacientes com TEA em critérios diagnósticos adequados. Atualmente, o diagnóstico é baseado nas definições do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5, do inglês *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), que agrupa dentro do TEA o autismo clássico, a síndrome de Asperger, o transtorno desintegrativo da infância e os transtornos invasivos do desenvolvimento não-especificados (American Psychiatric Association, 2013).

1.3.1 Etiologia do TEA

A etiologia do TEA permanece desconhecida; porém, acredita-se que exista uma interação entre fatores genéticos e ambientais (Ansel et al. 2017). Estudos com mais de 10.000 pacientes de diferentes países mostraram que mais da metade dos casos de autismo seriam correlacionados com alterações genéticas, deixando evidente o importante aspecto genético do transtorno (Miles, 2011)

A alta concordância em gêmeos monozigóticos é um indicativo de que a herança genética poderia ser um fator determinante no desencadeamento do autismo. Algumas condições genéticas, como síndrome do X-frágil e esclerose tuberosa, têm alta correlação com TEA (Belmonte & Bourgeron, 2006; Numis et al., 2011). Porém, essas alterações genéticas ainda não são consideradas um bom marcador para o diagnóstico do transtorno (Muhle et al., 2004).

Outros componentes intimamente envolvidos com o desencadeamento do TEA são as alterações no sistema imunológico durante a gestação (Ashwood et al., 2006; Onore et al., 2012; Patterson, 2009). Evidências epidemiológicas relacionam ativação

do sistema imunológico materno durante a gestação e alterações genéticas relacionadas ao sistema imunológico, com o desenvolvimento de TEA na prole (Atladóttir et al., 2010). Esses achados são corroborados por estudos envolvendo modelos animais (Malkova et al., 2012) e, juntamente com as alterações imunológicas encontradas em indivíduos com TEA (Paul Ashwood et al., 2011), ajudam a estabelecer a natureza neuroimunológica desse transtorno. (Gottfried et al., 2015)

Observações epidemiológicas sugerem que teratógenos também podem estar relacionados com o desencadeamento do TEA, destacando-se o VPA. O VPA aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de autismo nos filhos de gestantes que fizeram uso deste medicamento em especial durante o primeiro trimestre de gestação (Christensen et al. 2013; Harden 2013). Essas observações vieram ao encontro de diversos estudos ao longo dos anos 90 e início dos anos 2000 utilizando o VPA para o estudo de autismo em modelos animais induzidos farmacologicamente pela exposição pré-natal ao VPA (Rodier et al., 1997; Schneider & Przewlocki, 2005), dessa forma, então, consolidando o VPA como um fator de risco para o desencadeamento desse transtorno.

1.3.2 Modelo animal de TEA

O VPA é um fármaco amplamente utilizado como anticonvulsivante, estabilizador do humor e profilático em crises de enxaqueca. Ele é um conhecido inibidor das desacetilases de histonas, fato esse que pode ser importante para o desencadeamento do TEA, uma vez que a valpromida, um fármaco análogo ao VPA, porém sem esse efeito nas desacetilases de histonas, não reproduziu características do tipo autista na prole (Kataoka et al., 2013). Sua estrutura química é representada na Figura 2.

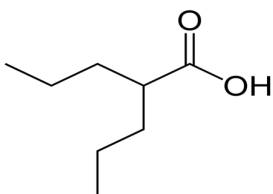


Figura 2. Estrutura química do Ácido Valproico Molécula usada no tratamento de epilepsia, transtorno de humor bipolar e enxaqueca. Fórmula química: $C_8H_{16}O_2$. Nome IUPAC: 2-propylpentanoic acid. Massa molar: 144.2 g mol^{-1} .

Inúmeras alterações comportamentais e neuromorfológicas comuns ao roedor exposto ao VPA e à pessoa com TEA já foram demonstradas. No cerebelo, mudanças na forma, no número e no volume das células de Purkinje ocorrem tanto em pessoas com TEA como no presente modelo animal (Rodier et al., 1997). Os animais do modelo apresentam também alterações comportamentais correspondentes às observadas em pacientes, fato esse de extrema importância, visto que o diagnóstico de autismo é dado através da análise comportamental (Schneider & Przewlocki, 2005).

O impacto da exposição pré-natal ao VPA em roedores é observado em diferentes trabalhos. Dentre as alterações nos marcos do desenvolvimento observadas estão o atraso no crescimento (avaliado pela medida da massa corporal) e do desenvolvimento (por exemplo, abertura dos olhos) (Schneider & Przewlocki, 2005) e prejuízo na discriminação olfativa (Schneider & Przewlocki, 2005; Schneider et al., 2006). Em testes posteriores, observou-se maior limiar nociceptivo (Schneider et al., 2008), atividade exploratória aumentada em campo aberto (Schneider et al., 2008), aumento de padrões comportamentais estereotipados (Schneider et al., 2008) e do tipo ansioso (Markram et al., 2008; Schneider et al., 2008), rigidez comportamental (Bambini-Junior et al., 2011), aumento da memória de tarefas aversivas (Markram et al., 2008) e déficits sociais (Bambini-Junior et al., 2011; Schneider & Przewlocki, 2005)

Uma vez que os critérios para diagnóstico do TEA são clínicos e resultam de análises comportamentais, torna-se difícil estudar esse transtorno em humanos antes da manifestação dos sintomas. Devido às suas peculiaridades, os modelos animais fornecem a oportunidade de análise de alterações do desenvolvimento que podem desencadear as características do TEA, incluindo análise de morfologia e função sináptica em diferentes estruturas encefálicas (Favre & Barkat, 2013; Kataoka et al., 2013). Além disso, como o uso de VPA durante a gestação passou a ser considerado um fator de risco para o desenvolvimento de TEA em filhos de mães que utilizaram VPA no primeiro trimestre gestacional, a elaboração do modelo animal de TEA com exposição pré-natal ao VPA tornou-se uma importante ferramenta de estudo para o TEA.

1.4 A importância da amígdala no TEA

Baron-Cohen e colaboradores, nos anos 2000, propuseram a Teoria da Amígdala no Autismo (*The Amygdala Theory of Autism*), com base nos estudos da época com ablação da amígdala de macacos *Rhesus*, o único modelo animal de TEA disponível para a comunidade científica até então. Esses primatas, quando liberados na natureza não demonstravam resposta aos estímulos sociais de seus grupos, evitavam a presença de outros animais e frequentemente eram mortos. O mesmo trabalho também trouxe à tona que pacientes com lesão na amígdala desenvolvem prejuízo no julgamento social, sendo atribuído na época o termo “autismo adquirido” (Baron-Cohen et al., 2000). Adolescentes com autismo demonstraram menor conectividade funcional entre a amígdala e regiões subcorticais do encéfalo, enquanto que adultos com autismo apresentaram menor volume na amígdala, o que evidencia o papel dessa estrutura na fisiopatologia do TEA (Guo et al. 2016).

Através de exames de ressonância magnética funcional observou-se que, enquanto expressões de felicidade, medo e tristeza demonstraram ativar a amígdala em pessoas com desenvolvimento típico, pacientes com lesões nessa estrutura demonstraram dificuldade e ansiedade no reconhecimento de expressões de medo (Dickie and Armony, 2008). A dificuldade no reconhecimento de expressões e o contato visual problemático são características presentes no autismo, sendo utilizadas como auxílio no diagnóstico. Ainda que o estímulo gerado pela percepção da expressão emocional em uma face possa não ser processado conscientemente em um primeiro instante, já é suficiente para ativar a amígdala com base em dados de ressonância magnética funcional (Troiani & Schultz, 2013).

Evidências em modelos animais indicam uma hiperexcitabilidade e aumento na potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *Long-Term Potentiation*) nos neurônios piramidais da amígdala, além de a LTP dos animais com características do tipo autista estar aumentado nas sinapses tálamo-amígdaloides (Markram et al., 2008). No modelo VPA, esta região também se demonstrou hiper-reativa a estímulos visuais, bem como a circuitaria envolvendo o córtex pré-frontal após exposição social em animais no modelo de macrocefalia/autismo (Huang et al. 2016).

Diversos núcleos e subnúcleos da amígdala são interessantes para o estudo do autismo, sendo considerados eixos para o processamento neuronal de forma

paralela e em série (Aincy et al., 2018). Dentre eles, se destacam: 1) o núcleo cortical da amígdala (Co), que processa informação olfativa, possuindo em sua constituição neurônios de tipo piramidal sendo considerado uma das estruturas de início do grande lobo límbico cerebral (Aggleton, 1992), além do 2) núcleo basolateral da amígdala (BLA) o qual é uma região associada ao aprendizado e extinção de memórias relacionadas ao medo (Aggleton, 1992; A. A. Rasia-Filho et al., 2012) e, finalmente, o 3) subnúcleo pósterio-dorsal da amígdala medial (MePD), o qual possui envolvimento com a modulação dos estímulos olfativos e vomeronasais com relevância social e para iniciar atividade reprodutiva ou de defesa inata ou aprendida (Rasia-Filho et al., 2012), como representado na Figura 3.

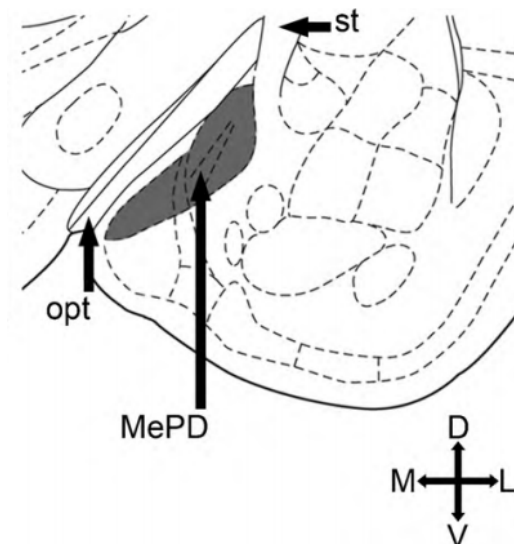


Figura 3. Imagem representativa da localização da MePD. A imagem mostra a localização do subnúcleo pósterio-dorsal da amígdala (MePD), indicado pela seta preta. Adaptado de Brusco et al. (2010).

1.4.1 Espinhos dendríticos

Espinhas são protrusões neuronais que servem como especializações pós-sinápticas encontradas preferencialmente em dendritos. São estruturas altamente plásticas que variam em número e forma de acordo com a atividade sináptica local. Em diversas doenças, como esquizofrenia, doença de Alzheimer e autismo, já se demonstrou alteração no número, forma e densidade de espinhas dendríticas

(Swanger et al. 2015; Penzes et al. 2011; Zancan et al. 2017; Hutsler & Zhang 2010; Rasia-Filho & Janaína Brusco 2010). Dentre as alterações encontradas no TEA, destaca-se o aumento na densidade de espinhos em regiões do córtex de pacientes diagnosticados com TEA em um estudo *post-mortem* (Hutsler & Zhang, 2010), indo ao encontro de estudos que sugerem que mudanças na dinâmica e na estabilidade de espinhos dendríticos durante o início da infância aumentariam a densidade dos mesmo na idade adulta. (Penzes et al., 2011).

Adicionalmente, existem evidências de que a disfunção cognitiva associada à exposição pré-natal ao VPA esteja relacionada com mudanças na morfologia dos espinhos dendríticos no hipocampo e outras estruturas límbicas (Bringas et al., 2013; Takuma et al., 2014). Conforme demonstrado em modelos nocaute, dois modelos de autismo (Wang et al., 2017) e um de Síndrome de Rett, (Xu et al., 2014), as alterações em espinhos dendríticos estão presentes em desordens do neurodesenvolvimento.

Uma arborização dendrítica mais complexa foi encontrada em dendritos apicais de neurônios piramidais de animais VPA no córtex motor, sugerindo que a poda sináptica é prejudicada nesses animais (Bringas et al., 2013). No mesmo trabalho não foram encontradas diferenças em comprimento ou volume, tanto de dendritos apicais como de basais. Os autores observaram que essa ausência de alterações no volume e comprimento mostra que a ação do VPA não induz um crescimento ou atrofia neural no córtex motor, mas altera o padrão de desenvolvimento dendrítico (Snow et al., 2000), ao contrário do estresse causado por glicocorticoides e confinamento, que causou uma atrofia dos dendritos apicais dos neurônios piramidais da camada CA3 do hipocampo (Mcewen, 1992; Watanabe et al., 1992).

1.5 Resveratrol (RSV)

O RSV é um composto polifenólico da família dos estilbenos conhecido usualmente pela sua presença na uva e no vinho tinto (Bertelli et al., 1999). Os diversos estudos realizados com o RSV demonstram efeitos benéficos no contexto das doenças cardiovasculares, dislipidemias e diabetes, além do importante efeito antioxidante e anti-inflamatório (Berman et al., 2017; Vang et al., 2011). Em decorrência da sua hidrofobicidade (solubilidade em água de 0,03 mg/mL), os

principais veículos utilizados para administração são o DMSO e o etanol (solubilidades de aproximadamente 65 mg/mL) (Bass et al., 2007; Caruso et al., 2004).

Recentemente, diversos estudos vêm avaliando o potencial neuroprotetor do RSV tanto no contexto de cultura de células e metabolismo de astrócitos (Quincozes-Santos et al., 2013) quanto no contexto de algumas desordens psiquiátricas como o autismo, onde os resultados encontrados demonstraram um papel preventivo dessa molécula (Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018; Hirsch et al., 2018). Entretanto, mais uma vez, é necessário compreender como o DMSO utilizado como solvente poderia influenciar nesse tipo de abordagem experimental a fim de otimizar seu uso para obtenção de conclusões mais precisas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito do dimetilsulfóxido no subnúcleo medial pósterodorsal da amígdala em ratos Wistar adultos do modelo animal de autismo induzido por ácido valproico tratados ou não com resveratrol

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar aspectos morfométricos e morfológicos dos espinhos dendríticos da região medial pósterodorsal da amígdala;
- b) Avaliar os espinhos dendríticos quanto ao formato e tamanho, ao tamanho e diâmetro da cabeça, tamanho e diâmetro do pescoço.

3. MANUSCRITO

Detrimental Effect of Dimethyl Sulfoxide on the Dendritic Spines of the Rat Medial Amygdala

Detrimental Effect of Dimethyl Sulfoxide on the Dendritic Spines of the Rat Medial Amygdala

Gustavo Brum Schwingel^{1,2,3*}, Mariana Zancan^{2,4*}, Mellanie Fontes-Dutra^{1,2,3}, Guilherme Bauer-Negrini^{1,2,5}, Léder Leal Xavier⁶, Victorio Bambini-Junior^{1,3,7}, Alberto A. Rasia-Filho⁴, Carmem Gottfried^{1,2,3,8}.

1. Translational Research Group in Autism Spectrum Disorder - GETTEA, Clinical Hospital of Porto Alegre, RS – Brazil
2. Graduation Program in Neuroscience, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
3. Brazilian National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Rio de Janeiro, Brazil.
4. Department of Basic Sciences/Physiology, Federal University of Health Sciences, Porto Alegre RS-90050-170, Brazil.
5. Federal University of Health Sciences, Porto Alegre RS-90050-170, Brazil.
6. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, FaBio, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.
7. School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire, Preston, UK.
8. Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

*These authors contributed equally to this work

Corresponding authors
CG (carmem.gottfried@gmail.com)
ARF (rasiafilho@pq.cnpq.br)

The authors declare no competing interests.

Abstract

The compound dimethyl sulfoxide (DMSO) is a nontoxic polar vehicle with rapid penetration across biologic membranes. We employ DMSO as a vehicle for the anti-inflammatory and antioxidant *trans*-resveratrol (RSV), to treat rat pregnant female rats in an animal model of autism spectrum disorder (ASD) induced by prenatal exposure to valproic acid (VPA). The male VPA offspring group is a robust autism model, exhibiting face, construct and predictive validity, developing autistic-like phenotype that includes sociability impairment, behavioral rigidity, sensory alterations and molecular alterations in blood. The prenatal treatment with RSV was able to prevent important behavioral, cellular and molecular alterations related to ASD in the VPA offspring. Our initial aim in the present work was to determine the number and structure of dendritic spines in the rat posterodorsal medial amygdala (MePD) in the VPA group and the possible preventive effect of RSV. Surprisingly, we found that the prenatal administration of vehicle DMSO *per se*, decreased the number of dendritic spines as well as affect spine structure in the MePD of adult rats. Despite these findings in the MePD, RSV diluted in DMSO has been able to recover VPA-induced behavioral deficits consistent with an ASD model. New efforts are needed to elucidate the change found at the MePD level. This observation raises the possibility of novel studies on sexual behavior, electrophysiological analysis, and epigenetic profile on the MePD

INTRODUCTION

The compound dimethyl sulfoxide (DMSO, C₂H₆OS, PubChem CID: 679) is widely used in industry and clinical practice as a chemical solvent (Capriotti and Capriotti, 2012) that provide rapid penetration and/or enhanced penetration of other substances across biologic membranes (Brayton, 1986). It is an amphipathic aprotic molecule with properties of highly polar domain and two non-polar methyl groups making it soluble in both aqueous and organic solutions (Santos et al., 2003). In this regard, DMSO has been used as a vehicle for the anti-inflammatory and antioxidant *trans*-resveratrol (RSV) in an animal model of autism spectrum disorder (ASD) induced by prenatal exposure to valproic acid (VPA; Bambini-Junior et al., 2011; Gottfried et al., 2013; Mabunga et al., 2015). VPA reduces place preference conditioned by conspecific and leads to no preference between exploring a wire-cage or a rat enclosed inside a wire cage, which reveal sociability impairments in rats (Victorio Bambini-Junior et al., 2014). Prenatal RSV was able to prevent these marked harmful effects of VPA (Victorio Bambini-Junior et al., 2014) as well as the neural deficits in primary somatosensory cortex (Fontes-Dutra et al., 2018) and the altered circulating levels of specific microRNA that controls dendritic spine development (Hirsch et al., 2018 and references therein).

The amygdaloid nuclei are key targets to be investigated in socio-emotional impairments in various developmental disorders (Opendak et al., 2017), such as the ASD (Zalla and Sperduti, 2013; Avino et al., 2018). These subcortical nuclei play a relevant role in the processing of memory, decision making, social interaction, and emotional responses of anxiety and fear, for example (Rasia-Filho et al., 2000; Janak and Tye, 2015; Lapate et al., 2016). The occurrence of

ASD involves the combination of genetic, epigenetic, environmental, neuroimmune, and hormonal factors (Gottfried et al., 2015; Schaafsma and Pfaff, 2014; Zou et al., 2017). A recent stereological analysis of the number of neurons in the amygdaloid nuclei of 52 human brains (24 neurotypical and 28 ASD) demonstrated that the neuron number increases from birth to adulthood, but not in ASD (Avino et al., 2018). Males have a higher preponderance of ASD than females at young children age (May and Williams, 2018). Indeed, the gene-environment interactions underlying ASD implicate early prenatal stress as being especially detrimental to boys with a vulnerable genotype (Schaafsma and Pfaff, 2014).

In this context, the posterodorsal medial amygdala (MePD), part of the “extended amygdala” (de Olmos et al., 2004), is a likely candidate to be affected in the ASD because (1) it is a sexually dimorphic area, a finding that is detected at birth (males higher than females; Mizukami et al., 1983) and persists after puberty (Cooke, 2011), (2) has a high expression of receptors for gonadal hormones and show significant differences in the number of neurons and glial complexity between sexes (Johnson et al., 2013; Morris et al., 2008), (3) recognizes socially relevant afferent sensory stimuli (Meredith and Westberry, 2004), (4) has connections with the hippocampal circuit for memory elaboration (Petrovich et al., 2001), (5) modulates male-typical juvenile rough-and-tumble social play (Cooke and Woolley, 2009) as well as (6) participates in the display of various adult social behaviors directed to conspecifics, including aggression and reproductive ones (reviewed in Newman, 1999, Rasia-Filho et al., 2012).

At the cellular level, dendritic spines are specialized postsynaptic elements connected mostly by excitatory terminals (Brusco et al., 2014; Spruston et al., 2013; Yuste, 2013). Dendritic spines are classified into different morphological types which, based on region-specific and functional characteristics, can regulate the synaptic impact, integration, and plasticity (Bourne and Harris, 2007; Hayashi-Takagi et al., 2015; Rochefort and Konnerth, 2012; Tønnesen and Nägerl, 2016). Dendritic spines in the rat MePD are notably pleomorphic (Brusco et al., 2014, 2010) and detailed morphometric studies are needed for the proper identification of changes in spine number, shape, and structure following different natural conditions or experimental manipulations (Zancan et al., 2017, 2015). There are no such data available for the dendritic spines in the MePD of rats submitted to the ASD model induced by the prenatal exposure to VPA.

Our aim was to determine whether the prenatal exposure to VPA modifies the number and structure of dendritic spines in the rat MePD and the possible beneficial effect of RSV as a neuroprotective agent in this ASD model. We used DMSO as vehicle for RSV and, surprisingly, found that it, *per se*, drastically affected the number and structure of local dendritic spines, as detailed below.

MATERIAL AND METHODS

The present work was based on the methodological procedure reported by Bambini-Junior et al. (2014, 2011) and Zancan et al. (2017).

Wistar rats were obtained from the animal facility of the Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, Brazil) and housed in groups in standard laboratory conditions, with food and water *ad*

libitum, room temperature kept at 22°C, and a 12 h light-dark cycle. All efforts were made to minimize the number of animals studied and suffering. Rats were manipulated according to the international laws for the ethical care and use of laboratory animals (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals : DHEW Publication 80-23, Revised 1985, Office of Science and Health Reports, DRR/ NIH, Bethesda, MD 20205; Nih et al., 2011) and the local Animal Ethics Committee (UFRGS, Brazil; protocol no. #33879).

Initially, adult males and females were placed into the same cage to mate overnight. Pregnancy was verified by the presence of spermatozoa in the vaginal smear in the morning, which was then considered the embryonic day 0.5 (E0.5). Pregnant rats were divided into five groups according to the treatment they received, as described below. From E6.5 to E18.5 pregnant females received a daily subcutaneous injection of RSV (Fluxome, Stenløse, Denmark) at 3.6 mg/kg or equivalent volume of DMSO at 7.2 M (100 µL/ kg/day 1:2 in 0.9% saline v/v), as previously described (Victorio Bambini-Junior et al., 2014). On E12.5 pregnant females received a single intraperitoneal injection of VPA at 600 mg/kg (Sigma-Aldrich #P4543) or equivalent volume of saline solution 0.9%.

Pregnant female were randomly assigned to the following experimental groups: (1) non-manipulated “naïve” animals, whose mothers did not receive any kind of treatment, and that served as a general control (n = 6), (2) animals prenatally exposed to both vehicles (DMSO and saline; Vehicle, n = 7), (3) animals prenatally exposed to RSV (n = 7), (4) animals prenatally exposed to VPA (n = 9), and (5) animals prenatally exposed to both RSV and VPA (RSV+VPA, n = 5).

At 120 postnatal day, all animals in the experimental groups were anesthetized with ketamine and xylazine (75 mg/kg and 10 mg/kg i.p., respectively) and were submitted to transcardiac perfusion, after injection of heparin (1000 IU), using 400 ml of 1.5% formaldehyde followed by 100 ml of 4% formaldehyde diluted in phosphate buffer solution (0.1M, pH 7.4; PBS) at room temperature (RT). Speed flow was initially rapid (50-100 ml during the first 90 s after chest opening) and slowed to last for additional 20 min (15 ml/min flow), to maintain the fine integrity of spines and synapses (Tao-Cheng et al., 2007). The brains were removed and kept in the same fixative solution for an additional 1 h at RT before being coronally sectioned (160 μ m-thick) using a vibrating microtome (VT 1000S, Leica Microsystems, Germany).

The MePD was studied from 3.0 to 3.4 mm posterior to the bregma, lateral to the optic tract, and ventral to the *stria terminalis* (ST, Franklin and Paxinos, 2008; Figure 1). Fine powdered fluorescent carbocyanine dye Dil (cat. no. D-282, Molecular Probes, USA) was applied extracellularly on the surface of the ST. Each brain slice was covered with PBS, and Dil was allowed to extracellularly diffuse to the MePD for 15-18 h at RT. Post-fixation was obtained using 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min. Then, slices were mounted with an anti-fading media (Fluoromount EMS, USA) under coverslips. Images of the MePD neurons were obtained along the next 10 days. The right and left MePD were studied separately.

The rat MePD has bitufted and stellate multipolar neurons (Rasia-Filho et al., 2004), but no difference exists for the density of proximal dendritic spines between them (de Castilhos et al., 2008). Data was gathered along 40 μ m of proximal dendritic shafts, from primary to secondary branching orders (as

previously done by de Castilhos et al., 2008; Zancan et al., 2017). Dendritic spines were imaged using a confocal microscope (LEICA TCS SP8, Germany) with a plan-apochromat 63×/1.4 numerical aperture water-immersion lens. Spectral detectors were adjusted to capture emission from Helium/Neon laser 555 nm of wavelength, sequential z-stack acquisition was performed at 0.1 μm step size using a resolution of 1024 x 1024 with 4 times zooming (providing a pixel size of ~ 140 nm), pinhole aperture set to 1 Airy Unit, and avoiding over and undersaturated pixels. This configuration was constant along all the experiment and studied groups. The 3D reconstruction of each dendritic segment was performed using the Image Pro-Plus 7.0 software (Media Cybernetics, USA). One dendritic branch was studied per neuron with a maximum of 8 neurons per hemisphere in each rat and in each group. Representative images are shown in Figure 2.

Spine images were further enhanced by 200 x. From these reconstructed 3D images, spine density was calculated as the number of spines divided by dendritic micrometers (Brusco et al., 2010; Rasia-Filho et al., 2004). This allowed us to measure the overall spine density (i.e., total number including all spine types) in the MePD of each experimental group (Figure 3A). Afterwards, we classified and counted each type of dendritic spine from these samples. As described in (Zancan et al., 2017), the morphological criteria for assigning dendritic spines to different classes were the spine length (SL, corresponding to the distance from the dendritic shaft to the top of the spine head), neck length (NL), neck diameter (ND), head diameter (HD), and the number of protrusions from a single stalk. Spines were identified as stubby/wide ($\text{HD} \geq \text{SL}$), mushroom ($\text{HD} \gg \text{ND}$), thin (when $\text{SL} > \text{HD}$ and $\text{HD} > \text{ND}$), ramified (with a single stalk

that branches in two heads) or atypical (when showing a transitional aspect between classes or an unusual shape that cannot be classified in any other classes). These criteria were based on referential data published previously (Arellano et al., 2007; Brusco et al., 2014, 2010; Fiala and Harris, 1999; González-Burgos et al., 2015; Harris et al., 1992; Peters and Kaiserman-Abramof, 1970; Zancan et al., 2015). Each spine was visualized along the z-stack planes to avoid misleading counting and classification. The number of each spine type was counted for each experimental group. Images had final fine adjustments of contrast made in Photoshop CS3 (Adobe Systems, Inc., USA) without altering spine counting or morphological classification.

Further quantitative morphometric data for the SL, NL, ND, and HD of each spine type was obtained for the differently shaped spines in all experimental groups after enhancing 400 x the above mentioned selected images. Morphological parameters were measured on the selected 'z' stack that showed the best visualization of well-defined borders and the maximal central diameter in the microscopic plane of section using the Image Pro Plus 7.0 software (Zancan et al., 2017).

Mean values were calculated per rat and data is presented as mean \pm standard deviation (SD) in each group. Data was tested for the normality distribution by the Kolmogorov-Smirnov test and for homoscedasticity using the Bartlett test. The overall density of dendritic spines was submitted to a one-way analysis of variance (ANOVA) test and the Tukey *post hoc* test. When necessary, data on the number of spines in each morphological class and respective morphometric values were log transformed to fulfill the formal requirements to be compared between groups using a one-way ANOVA and the

Tukey *post hoc* test. In those cases of higher variability in the SDs regarding the SL, NL, ND, and HD values, data was compared using the Kruskal-Wallis test corrected for ties followed by the Dunn test. Statistical level of significance was set as $P \leq 0.05$ in all cases.

RESULTS

At random sampling, bitufted neurons accounted for most (~88%) of the studied neurons in the five experimental groups. Dil labelling provided the visualization of cell bodies, dendritic shafts of variable lengths, and pleomorphic spines in both brain hemispheres. Dendritic spines showed a *continuum* of different shapes and sizes (Figure 2). In the naïve group, stubby/wide spines were the most abundant type (~60%) followed by thin and mushroom spines (~22% and 16%, respectively). Other spine shapes, including ramified or atypical ones, accounted for the remaining values, although at very low percentual values.

Data regarding the overall density of dendritic spines in the MePD of the experimental groups are shown in Figure 3A. There was a statistically significant difference between groups ($F_{4,27} = 4.02$, $P = 0.01$), but no effect of hemispherical laterality ($F_{1,27} = 0.04$, $P = 0.84$) or due to the interaction of these two factors ($F_{4,27} = 1.05$, $P = 0.39$). Because data were not different between hemispheres, results from the right and left MePD were pooled together and compared between groups. The Tukey *post hoc* test revealed that naïve rats had a significant higher density of spines than the other four experimental groups (ranging 24-34% more spines, $P < 0.05$ compared to the RSV group and $P < 0.01$ compared to Vehicle, VPA, and RSV+VPA groups). No statistically significant difference was found between the Vehicle, VPA, RSV, and

RSV+VPA groups ($P > 0.05$ in all cases).

Spine-specific changes occurred in the MePD of the experimental groups. Data are shown in Figure 3B. That is: (1) stubby/wide spines showed a statistically significant difference between groups ($F_{4,57} = 5.13$, $P = 0.001$) and naïve rats had higher values (~24%) than the Vehicle and RSV+VPA groups (Tukey post hoc test, $P < 0.01$ and 0.05 , respectively) but not when compared to the RSV and the VPA groups ($P > 0.05$ in both cases). In addition, the RSV group showed a significant higher number of stubby/wide spines than the Vehicle group ($P < 0.05$). (2) The number of mushroom spines was higher in naïve rats than in the other four experimental groups (~45-72%; $F_{4,57} = 11.01$, $P < 0.001$; Tukey post hoc test, $P < 0.001$). (3) Naïve rats also showed more thin spines than the other four experimental groups (~62-75%; $F_{4,51} = 4.99$, $P < 0.002$; Tukey post hoc test, $P < 0.05$ when comparing naïve to Vehicle and RSV+VPA groups, and $P < 0.01$ when comparing naïve to RSV and VPA groups). (4) Ramified and atypical spines were absent or accounted for a very low number in all groups that precluded statistical comparisons.

Dendritic spine morphometric data are shown in Figure 4A-D. Results showed that: (1) for stubby/wide spines, SL did not differ between groups [Kruskal-Wallis test, $H(4) = 4.12$, $P = 0.38$] whereas HD showed a statistically significant difference between groups [$H(4) = 13.05$, $P = 0.01$] and the naïve group had higher values than the Vehicle one (Dunn test, $P < 0.05$). (2) For mushroom spines, SL and ND showed significant differences between groups [$F_{4,55} = 2.90$, $P = 0.02$; and, $H(4) = 13.49$, $P = 0.009$, respectively] and naïve rats showed higher values of SL than the VPA group ($P < 0.05$) and higher values of ND than the RSV group ($P < 0.01$). No differences were found for NL ($F_{4,55} =$

1.82, $P = 0.13$) and HD ($F_{4,55} = 0.72$, $P = 0.57$) between groups. (3) Thin spines did not differ between groups regarding SL ($F_{4,55} = 0.58$, $P = 0.67$), NL ($F_{4,55} = 0.47$, $P = 0.75$), ND ($F_{4,55} = 0.14$, $P = 0.96$), and DC ($H(4) = 4.89$, $P = 0.29$). All the other comparisons did not reach the statistical level of significance set *a priori*.

DISCUSSION

The present data provide three important novel findings: (1) the rat MePD is a vulnerable area to prenatal damage and evidence lasting morphological effects during adulthood; (2) the prenatal exposure to the vehicle DMSO, *per se*, decreased the number of dendritic spines as well as affect spine structure in the MePD of adult rats; and, (3) considering that RSV diluted in DMSO has been able to recover VPA-induced behavioral deficits consistent with an ASD model (Victorio Bambini-Junior et al., 2014), our results indicate that other areas than the MePD “bypass” the damaging effects of DMSO and are susceptible of RSV actions in parallel circuits of the social behavior brain network of rats, as depicted below.

First, the exposure to DMSO occurred along E6.5 to E18.5 and hindered further detrimental effects of VPA or rescuing properties of RSV in the present model of ASD. DMSO, as a recommended and currently used as vehicle for RSV, was administered to the experimental groups, except the naïve one, for 13 days during pregnancy (Victorio Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018; Hirsch et al., 2018). Various evidence suggests that environmental challenges during pregnancy can alter placental function and correlate to low birth weight, intrauterine growth restriction, as well as have lasting effects on neuronal development and behavioral display in adult hood (Bazer et al., 2014;

Triche and Hossain, 2007). This is in line with the report that prenatal progesterone levonorgestrel exposure induces autism-like behavior in male offspring through estrogen receptor suppression in the amygdala (Zhou et al., 2017). Our findings further indicate that early insult to the MePD can promote a long-term structural effect on dendritic spines with likely connectional and functional disrupting effects. The density of thin and mushroom spines was severely affected whereas stubby/wide spines were the type of spine most resistant to number reduction following DMSO administration, although showing reduced HD when compared to non-manipulated control rats. One possible explanation for the capacity of DMSO to affect MePD spine number and structure involves glutamate receptor modulation. Dendritic spines are contacted by excitatory axon terminals, and thin and mushroom spines express AMPA and NMDA glutamate receptors in different proportions at the postsynaptic density (Matsuzaki et al., 2004; Yuste, 2013). DMSO suppresses NMDA- and AMPA-induced ion currents and calcium influx in hippocampal neurons (Lu and Mattson, 2001). This is a possibility to be also investigated in the rat MePD.

Second, previous work used the same protocol of VPA-induced brain insult and RVS diluted in DMSO to prevent social behavioral impairments (V. Bambini-Junior et al., 2014); altered localization of GABAergic parvalbumin neurons in primary sensory cortex and amygdala (Fontes-Dutra et al., 2018) and blood increase of miR134-5p (Hirsch et al., 2018) related to ASD. As recently reviewed by Matias et al. (2018 and references therein), “DMSO has become the solvent of choice to dissolve potential neuroprotective and neurotoxic hydrophobic substances used in pharmaco-toxicological research... that generally do not solubilize in aqueous vehicles. Some DMSO advantages

include its capacity to dissolve compounds with a wide range of chemical properties, low volatility, miscibility with water, relatively low toxicity to both tissue culture and technicians, and limited deleterious effects at low concentration upon bioassays... In addition, it has been suggested that DMSO can be safely used, being generally well-tolerated by the experimental animals...”.

However, it is now clear that DMSO can promote different effects on the brain, showing a dose-dependent and subregion- and genotype-specific modulatory actions on the neuronal structure (Matias et al., 2018). For example, DMSO had a beneficial effect on neural function in a preclinical model of Alzheimer's disease in mice (Penazzi et al., 2017). Chronic treatment with a low, non-toxic DMSO dose modulates spine density in hippocampus, reflecting on animal behavior, that was able to abolish the differences observed between the Alzheimer's disease-like and wild-type male mice (Penazzi et al., 2017). Other *in vitro* effects of DMSO includes the modulation of Ca^{2+} -influx at 2-4% (282–563 mM; (Galvao et al., 2014); disruption of cation channels at 14.2% (0.1–2 M; (Nardid et al., 2013), cytoskeletal proteins at 10% (1.4 M; Sanger et al., 1980) and albumin at 20% (2.82 M; (Batista et al., 2014), and promotes the formation of water-filled membrane pores at 30.6% (4.3 M; (de Ménorval et al., 2012). Also, DMSO induced phenotypic changes in embryonic stem cells altering the genome-wide DNA methylation profiles (Thaler et al., 2012). DMSO at 100% led to significant motor impairment of adult male mice in the rotarod performance test (Matias et al., 2018). Here, we used DMSO at 7.2 M, as previously done by Bambini-Junior et al. (2014) and Fontes-Dutra et al. (2018). Other alternatives to dilute RSV would be the use of ethanol or

dimethylformamide, but both are irritant, painful, and can generate toxic side-effects. These pitfalls would disturb pregnant females by inducing stressful unpredictable consequences and affect offspring development.

Third, the MePD showed an impaired structural synaptic and neuronal organization following DMSO exposure as evidenced by the spine number and shape drastic changes in the four manipulated experimental groups compared to the naïve one. In spite of these findings in the MePD, RSV can still generate regenerative effects on the social behavior display of adult rats (Bambini-Junior et al., 2014). Therefore, it is important to consider that the MePD is part and modulates the social brain network of rats (Newman, 1999; Rasia-Filho et al., 2012), but it is not crucial for the occurrence of all of its activity and behavioral displays. Interestingly, other circuits in parallel can be “bypassing” the damaged MePD to provide the rescuing effects of RSV on the social behavior of VPA-induced ASD-like symptoms. Putative candidates for target sites for RSV actions include cortical areas where, again, spiny synapses are important substrates for the pathogenesis of ASD (Penzes et al., 2011). For example, synaptic changes occur in pyramidal neurons in the cortical somatosensory area of offspring following maternal immune activation as a mouse model of ASD (Coiro et al., 2015). I.e., in these young animals, there were a reduction in number and turnover rates of stubby, mushroom, and thin dendritic spines, an alteration in the interaction between presynaptic boutons and dendritic spines, and deficits in excitatory and inhibitory synaptic transmission (Coiro et al., 2015). Furthermore, prenatal VPA-treated mice showed dysregulation of synapse connectivity in pyramidal neurons of the mice somatosensory cortex, including a reduced proportion of Golgi-impregnated filopodium-type and stubby

spines and increased proportions of thin and mushroom spines, along with a decreased spine head size (Mahmood et al., 2017). Pyramidal neurons should be viewed as target cells for both the vulnerability to neurodevelopmental disorders and neuroprotective drugs. This is another research line that deserves further attention.

In conclusion, our data indicate that prenatal administration of the vehicle DMSO modulates number and shape of dendritic spines in the MePD of rats. This highlights that DMSO should be used with caution and its effects should be carefully considered as vehicle for therapeutically purposes. On the other hand, the synaptic impairment of the MePD does not impede the rescue of social behavior display promoted by RSV in the same VPA-induced ASD model, as recently reported (Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018; Hirsch et al., 2018). New efforts are needed to elucidate the change found at the MePD level. This observation raises the possibility of novel studies on sexual behavior, electrophysiological analysis, and epigenetic profile on the MePD.

Acknowledgements

Brazilian National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Rio de Janeiro, Brazil; National Council of Technological and Scientific Development (CNPq); Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Clinical Hospital of Porto Alegre (FIPE-HCPA).

- Arellano, J.I., Benavides-Piccione, R., Defelipe, J., Yuste, R., 2007. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front. Neurosci.* 1, 131–43. doi:10.3389/neuro.01.1.1.010.2007
- Avino, T.A., Barger, N., Vargas, M. V., Carlson, E.L., Amaral, D.G., Bauman, M.D., Schumann, C.M., 2018. Neuron numbers increase in the human amygdala from birth to adulthood, but not in autism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 3710–3715. doi:10.1073/pnas.1801912115
- Bambini-Junior, V., Della Flora Nunes, G., Schneider, T., Gottfried, C., 2014. Comment on “Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring.” *Science* (80-.). 346. doi:10.1126/science.1255679
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G.A., Moreira, J.C.F., Riesgo, R., Gottfried, C., 2011. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. *Brain Res.* 1408, 8–16. doi:10.1016/j.brainres.2011.06.015
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., Nogueira Freire, V., Riesgo, R., Gottfried, C., 2014. Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neurosci. Lett.* 583, 176–81. doi:10.1016/j.neulet.2014.09.039
- Batista, A.N.L., Batista, J.M., Ashton, L., Bolzani, V.S., Furlan, M., Blanch, E.W., 2014. Investigation of DMSO-Induced Conformational Transitions in Human Serum Albumin Using Two-Dimensional Raman Optical Activity Spectroscopy. *Chirality* 26, 497–501. doi:10.1002/chir.22351
- Bazer, F.W., Wu, G., Johnson, G.A., Wang, X., 2014. Environmental factors affecting pregnancy: Endocrine disrupters, nutrients and metabolic pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 398, 53–68. doi:10.1016/J.MCE.2014.09.007
- Bourne, J., Harris, K.M., 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 381–386.

doi:10.1016/j.conb.2007.04.009

Brayton, C.F., 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.* 76, 61–90.

Brusco, J., Dall'Oglio, A., Rocha, L.B., Rossi, M.A., Moreira, J.E., Rasia-Filho, A.A., 2010. Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neurosci. Lett.* 483, 152–156.

doi:10.1016/j.neulet.2010.07.083

Brusco, J., Merlo, S., Ikeda, É.T., Petralia, R.S., Kachar, B., Rasia-Filho, A.A., Moreira, J.E., 2014. Inhibitory and multisynaptic spines, and hemispherical synaptic specialization in the posterodorsal medial amygdala of male and female rats. *J. Comp. Neurol.* 522, 2075–2088. doi:10.1002/cne.23518

Capriotti, K., Capriotti, J.A., 2012. Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 5, 24–6.

Coiro, P., Padmashri, R., Suresh, A., Spartz, E., Pendyala, G., Chou, S., Jung, Y., Meays, B., Roy, S., Gautam, N., Alnouti, Y., Li, M., Dunaevsky, A., 2015. Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain. Behav. Immun.* 50, 249–258. doi:10.1016/j.bbi.2015.07.022

Cooke, B.M., Woolley, C.S., 2009. Effects of prepubertal gonadectomy on a male-typical behavior and excitatory synaptic transmission in the amygdala. *Dev. Neurobiol.* 69, 141–52. doi:10.1002/dneu.20688

de Castilhos, J., Forti, C.D., Achaval, M., Rasia-Filho, A.A., 2008. Dendritic spine density of posterodorsal medial amygdala neurons can be affected by gonadectomy and sex steroid manipulations in adult rats: A Golgi study. *Brain Res.* 1240, 73–81. doi:10.1016/j.brainres.2008.09.002

de Ménorval, M.-A., Mir, L.M., Fernández, M.L., Reigada, R., 2012. Effects of Dimethyl Sulfoxide in Cholesterol-Containing Lipid Membranes: A Comparative Study of Experiments In Silico and with Cells. *PLoS One* 7, e41733. doi:10.1371/journal.pone.0041733

de Olmos, J., Beltramino, C., Alheid, G., 2004. Amygdala and extended

- amygdala of the rat: a cytoarchitectonical, fibroarchitectonical, and chemoarchitectonical survey, in: George Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*. Elsevier Science, pp. 509–603.
- Fiala, J.C., Harris, K.M., 1999. Dendrite structure, in: Greg Stuart, Nelson Spruston, Michael Hausser (Eds.), *Dendrites*. Oxford University Press, pp. 1–34.
- Fontes-Dutra, M., Santos-Terra, J., Deckmann, I., Brum Schwingel, G., Della-Flora Nunes, G., Hirsch, M.M., Bauer-Negrini, G., Hedin-Pereira, C., Bambini-Junior, V., Riesgo, R.S., Gottfried, C., 2018. Resveratrol prevents cellular and behavioral sensory alterations in the animal model of autism induced by valproic acid. *Front. Synaptic Neurosci.* 10, 9. doi:10.3389/FNSYN.2018.00009
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 2008. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Boston.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M.R., Cordeiro, M.F., 2014. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* 28, 1317–1330. doi:10.1096/fj.13-235440
- González-Burgos, I., Velázquez-Zamora, D.A., González-Tapia, D., Cervantes, M., 2015. A Golgi study of the plasticity of dendritic spines in the hypothalamic ventromedial nucleus during the estrous cycle of female rats. *Neuroscience* 298, 74–80. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.04.019
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Baronio, D., Zanatta, G., Silvestrin, R.B., Vaccaro, T., Riesgo, R., 2013. Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model, in: Fitzgerald, M. (Ed.), *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders*. IntechOpen, London, pp. 143–163. doi:10.5772/54824
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., Savino, W., 2015. The impact of neuroimmune alterations in autism spectrum disorder. *Front. Psychiatry* 6, 121. doi:10.3389/fpsy.2015.00121
- Harris, K.M., Jensen, F.E., Tsao, B., 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day

15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci.* 12, 2685–705.

- Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y.I., Loshbaugh, A.L., Kuhlman, B., Hahn, K.M., Kasai, H., 2015. Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature* 525, 333–338. doi:10.1038/nature15257
- Hirsch, M.M.M.M., Deckmann, I., Fontes-Dutra, M., Bauer-Negrini, G., Della-Flora Nunes, G., Nunes, W., Rabelo, B., Riesgo, R., Margis, R., Bambini-Junior, V., Gottfried, C., 2018. Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. *Food Chem. Toxicol.* 115, 336–343. doi:10.1016/j.fct.2018.02.061
- Hollins, S.L., Cairns, M.J., 2016. MicroRNA: Small RNA mediators of the brains genomic response to environmental stress. *Prog. Neurobiol.* 143, 61–81. doi:10.1016/J.PNEUROBIO.2016.06.005
- Johnson, R.T., Breedlove, S.M., Jordan, C.L., 2013. Androgen receptors mediate masculinization of astrocytes in the rat posterodorsal medial amygdala during puberty. *J. Comp. Neurol.* 521, 2298–2309. doi:10.1002/cne.23286
- Lapate, R.C., Rokers, B., Tromp, D.P.M., Orfali, N.S., Oler, J.A., Doran, S.T., Adluru, N., Alexander, A.L., Davidson, R.J., 2016. Awareness of Emotional Stimuli Determines the Behavioral Consequences of Amygdala Activation and Amygdala-Prefrontal Connectivity. *Sci. Rep.* 6, 25826. doi:10.1038/srep25826
- Lu, C., Mattson, M.P., 2001. Dimethyl Sulfoxide Suppresses NMDA- and AMPA-Induced Ion Currents and Calcium Influx and Protects against Excitotoxic Death in Hippocampal Neurons. *Exp. Neurol.* 170, 180–185. doi:10.1006/exnr.2001.7686
- Mahmood, U., Ahn, S., Yang, E.-J., Choi, M., Kim, H.H.-S., Regan, P., Cho, K., Kim, H.H.-S., 2017. Dendritic spine anomalies and PTEN alterations in a mouse model of VPA-induced autism spectrum disorder. *Pharmacol. Res.* doi:10.1016/j.phrs.2017.08.006

- Matias, M., Silvestre, S., Falcão, A., Alves, G., 2018. Considerations and Pitfalls in Selecting the Drug Vehicles for Evaluation of New Drug Candidates: Focus on in vivo Pharmacotoxicological Assays Based on the Rotarod Performance Test. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 21, 110–118.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., Kasai, H., 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766. doi:10.1038/nature02617
- May, T., Williams, K., 2018. Brief Report: Gender and Age of Diagnosis Time Trends in Children with Autism Using Australian Medicare Data. *J. Autism Dev. Disord.* doi:10.1007/s10803-018-3609-7
- Meredith, M., Westberry, J.M., 2004. Distinctive Responses in the Medial Amygdala to Same-Species and Different-Species Pheromones. *J. Neurosci.* 24, 5719–5725. doi:10.1523/JNEUROSCI.1139-04.2004
- Mizukami, S., Nishizuka, M., Arai, Y., 1983. Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. *Exp. Neurol.* 79, 569–75.
- Morris, J.A., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., 2008. Sexual dimorphism in neuronal number of the posterodorsal medial amygdala is independent of circulating androgens and regional volume in adult rats. *J. Comp. Neurol.* 506, 851–859. doi:10.1002/cne.21536
- Nardid, O.A., Schetinskey, M.I., Kucherenko, Y. V., 2013. Dimethyl sulfoxide at high concentrations inhibits non-selective cation channels in human erythrocytes. *Gen. Physiol. Biophys.* 32, 23–32. doi:10.4149/gpb_2013004
- Newman, S.W., 1999. The Medial Extended Amygdala in Male Reproductive Behavior A Node in the Mammalian Social Behavior Network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 242–257. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x
- Nih, Od, Oer, Olaw, 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Academies Press. Natl. Acad. Sci.
- Opendak, M., Gould, E., Sullivan, R., 2017. Early life adversity during the infant sensitive period for attachment: Programming of behavioral neurobiology of threat processing and social behavior. *Dev. Cogn. Neurosci.* 25, 145–159.

doi:10.1016/j.dcn.2017.02.002

- Penazzi, L., Lorengel, J., Sündermann, F., Golovyashkina, N., Marre, S., Mathis, C.M.B., Lewejohann, L., Brandt, R., Bakota, L., 2017. DMSO modulates CNS function in a preclinical Alzheimer's disease model. *Neuropharmacology* 113, 434–444.
doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2016.10.020
- Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., VanLeeuwen, J.-E., Woolfrey, K.M., 2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat. Neurosci.* 14, 285–93. doi:10.1038/nn.2741
- Peters, A., Kaiserman-Abramof, I.R., 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* 127, 321–355. doi:10.1002/aja.1001270402
- Petrovich, G.D., Canteras, N.S., Swanson, L.W., 2001. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 38, 247–89.
- Rasia-Filho, A., Fabian, C., Rigoti, K., Achaval, M., 2004. Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience* 126, 839–847.
doi:10.1016/j.neuroscience.2004.04.009
- Rasia-Filho, A.A., Haas, D., de Oliveira, A.P., de Castilhos, J., Frey, R., Stein, D., Lazzari, V.M., Back, F., Pires, G.N., Pavesi, E., Winkelmann-Duarte, E.C., Giovenardi, M., 2012. Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats. *Mini Rev. Med. Chem.* 12, 1090–106.
- Rochefort, N.L., Konnerth, A., 2012. Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Rep.* 13, 699–708. doi:10.1038/embor.2012.102
- Sanger, J.W., Sanger, J.M., Kreis, T.E., Jockusch, B.M., 1980. Reversible translocation of cytoplasmic actin into the nucleus caused by dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 5268–72.
- Santos, N.C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., Saldanha, C., 2003.

- Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1035–41.
- Schaafsma, S.M., Pfaff, D.W., 2014. Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. *Front. Neuroendocrinol.* 35, 255–271. doi:10.1016/j.yfrne.2014.03.006
- Spruston, N., Häusser, M., Stuart, G., 2013. Information Processing in Dendrites and Spines, in: *Fundamental Neuroscience*. Elsevier, pp. 231–260. doi:10.1016/B978-0-12-385870-2.00011-1
- Tao-Cheng, J.-H., Gallant, P.E., Brightman, M.W., Dosemeci, A., Reese, T.S., 2007. Structural changes at synapses after delayed perfusion fixation in different regions of the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 501, 731–740. doi:10.1002/cne.21276
- Thaler, R., Spitzer, S., Karlic, H., Klaushofer, K., Varga, F., 2012. DMSO is a strong inducer of DNA hydroxymethylation in pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Epigenetics* 7, 635–51. doi:10.4161/epi.20163
- Tønnesen, J., Nägerl, U.V., 2016. Dendritic Spines as Tunable Regulators of Synaptic Signals. *Front. psychiatry* 7, 101. doi:10.3389/fpsy.2016.00101
- Triche, E.W., Hossain, N., 2007. Environmental factors implicated in the causation of adverse pregnancy outcome. *Semin. Perinatol.* 31, 240–2. doi:10.1053/j.semperi.2007.07.013
- Yuste, R., 2013. Electrical Compartmentalization in Dendritic Spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 36, 429–449. doi:10.1146/annurev-neuro-062111-150455
- Zancan, M., Dall'Oglio, A., Quagliotto, E., Rasia-Filho, A.A., 2017. Castration alters the number and structure of dendritic spines in the male posterodorsal medial amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 45, 572–580. doi:10.1111/ejn.13460
- Zancan, M., Dall'Oglio, A., Sarzenski, T.M., Maher, M.I., Garcia-Segura, L.M., Rasia-Filho, A.A., 2015. Glial and axonal perikaryal coverage and somatic spines in the posterodorsal medial amygdala of male and cycling female rats. *J. Comp. Neurol.* 523, 2127–2137. doi:10.1002/cne.23782

- Zhou, Z.C., McAdam, D.B., Donnelly, D.R., 2017. Endophenotypes: A conceptual link between anorexia nervosa and autism spectrum disorder. *Res. Dev. Disabil.* doi:10.1016/j.ridd.2017.11.008
- Zou, Y., Lu, Q., Zheng, D., Chu, Z., Liu, Z., Chen, H., Ruan, Q., Ge, X., Zhang, Z., Wang, X., Lou, W., Huang, Y., Wang, Y., Huang, X., Liu, Z., Xie, W., Zhou, Y., Yao, P., 2017. Prenatal levonorgestrel exposure induces autism-like behavior in offspring through ER β suppression in the amygdala. *Mol. Autism* 8, 46. doi:10.1186/s13229-017-0159-3

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1. Schematic view of the rat posterodorsal medial amygdala (MePD).

Diagram of the ventral aspect of a coronal brain section showing the MePD (in this case at -3.30 mm posterior to bregma) close to the optic tract (opt) and the stria terminalis (st). Spatial coordinates are: D, dorsal; L, lateral; M, medial; V, ventral.

Figure 2. Digitized fluorescent images of posterodorsal medial amygdala neurons labeled with Dil and reconstructed by confocal microscopy. Dendritic spines were studied in proximal branches and representative data are shown for the groups Naïve, Vehicle, RSV, VPA, and RSV+VPA. Spines were classified as stubby (s), wide (w), thin (t), and mushroom (m). Other spine classes were rarely observed in our samples.

Figure 3. (A) The overall density of spines per dendritic segment in the posterodorsal medial amygdala (MePD) was significantly reduced in all experimentally treated-groups when compared to the naïve, non-manipulated group. $*P < 0.05$ compared to the RSV group and $**P < 0.01$ compared to Vehicle, VPA, and RSV+VPA groups. **(B)** Reduction was also observed in the three main classes of dendritic spines (stubby/wide, mushroom, and thin) in the MePD of experimentally treated-groups. $**P < 0.01$ and $*P < 0.05$ compared to naïve group, and $\#P < 0.05$ when comparing RSV to Vehicle group.

Figure 4. Morphometric analyses of dendritic spines in the posterodorsal medial amygdala showed that **(A)** spine length (SL) was not significantly different between groups when compared the three main spines classes, with the exception of the higher values in the naïve group compared to the VPA one ($*P < 0.05$). **(B)** Neck length (NL) was not significant differences between groups. **(C)** Neck diameter (ND) was not significantly different between groups, with the exception of the higher values in the naïve group compared to the RSV one ($**P < 0.01$). And, **(D)** head diameter (HD) was not significantly different between groups when compared the three main spines classes, with the exception of the higher value for the stubby/wide spines in the naïve group compared to the Vehicle one ($*P < 0.05$).

Figure 1

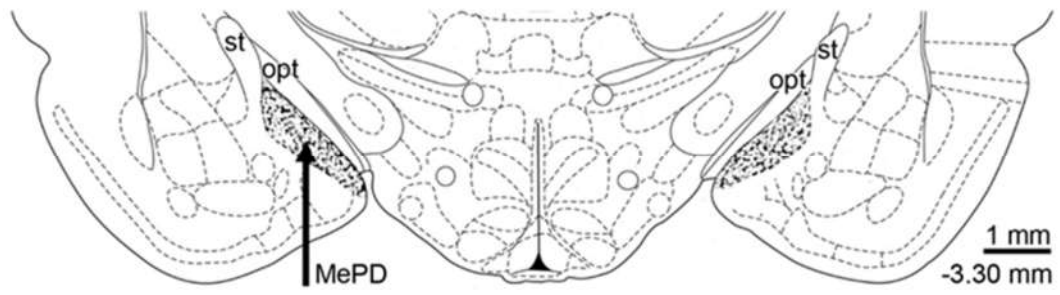


Figure 2

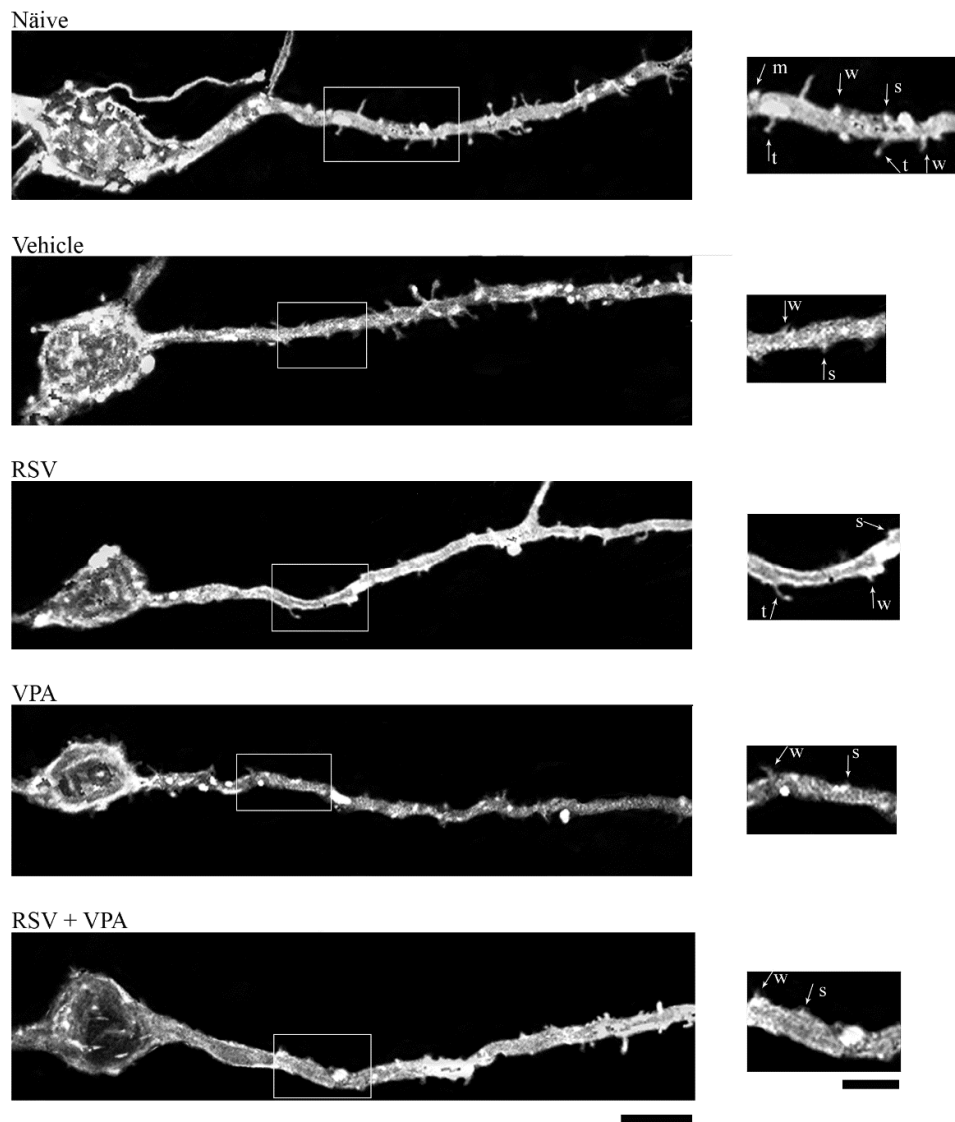


Figure 3

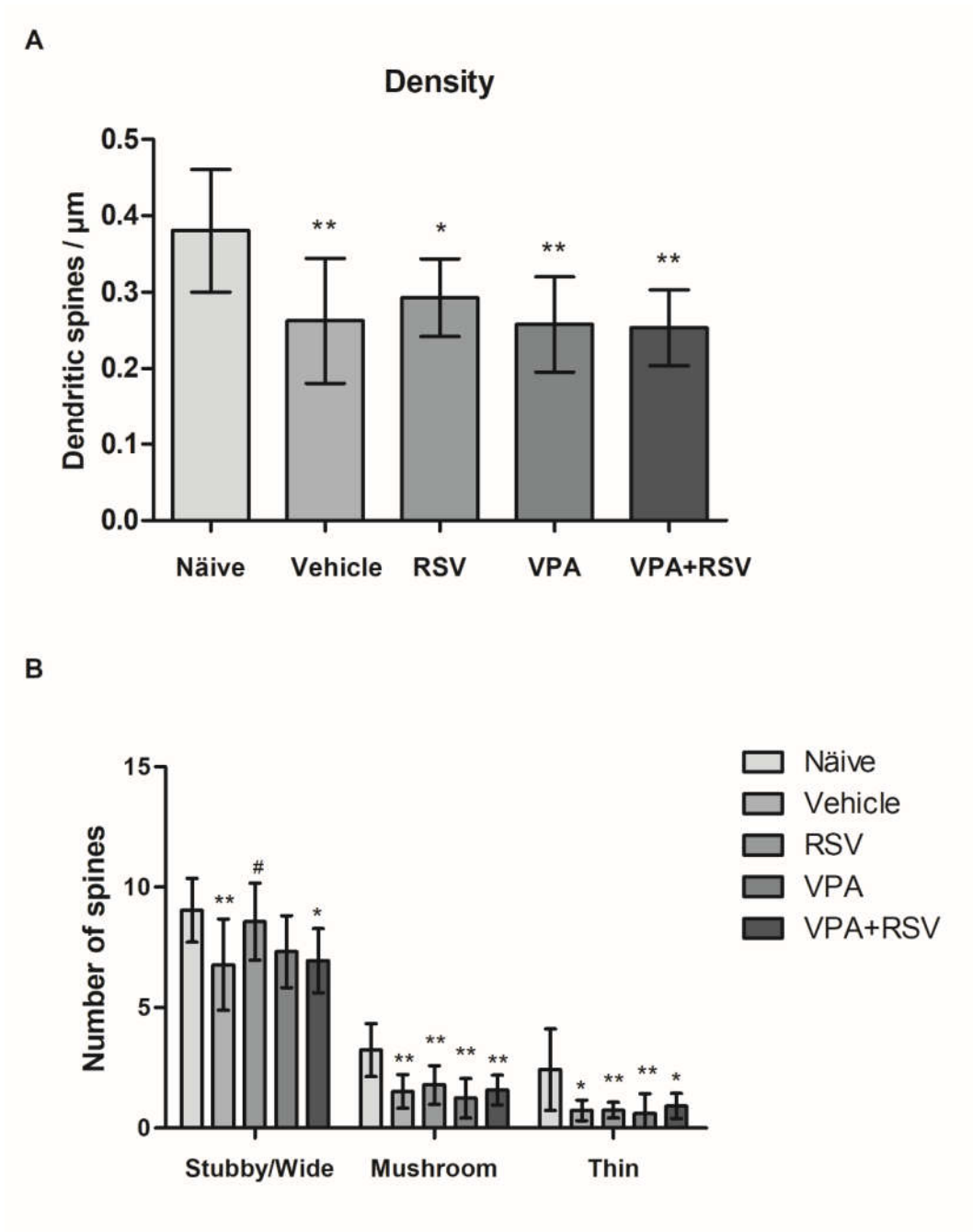
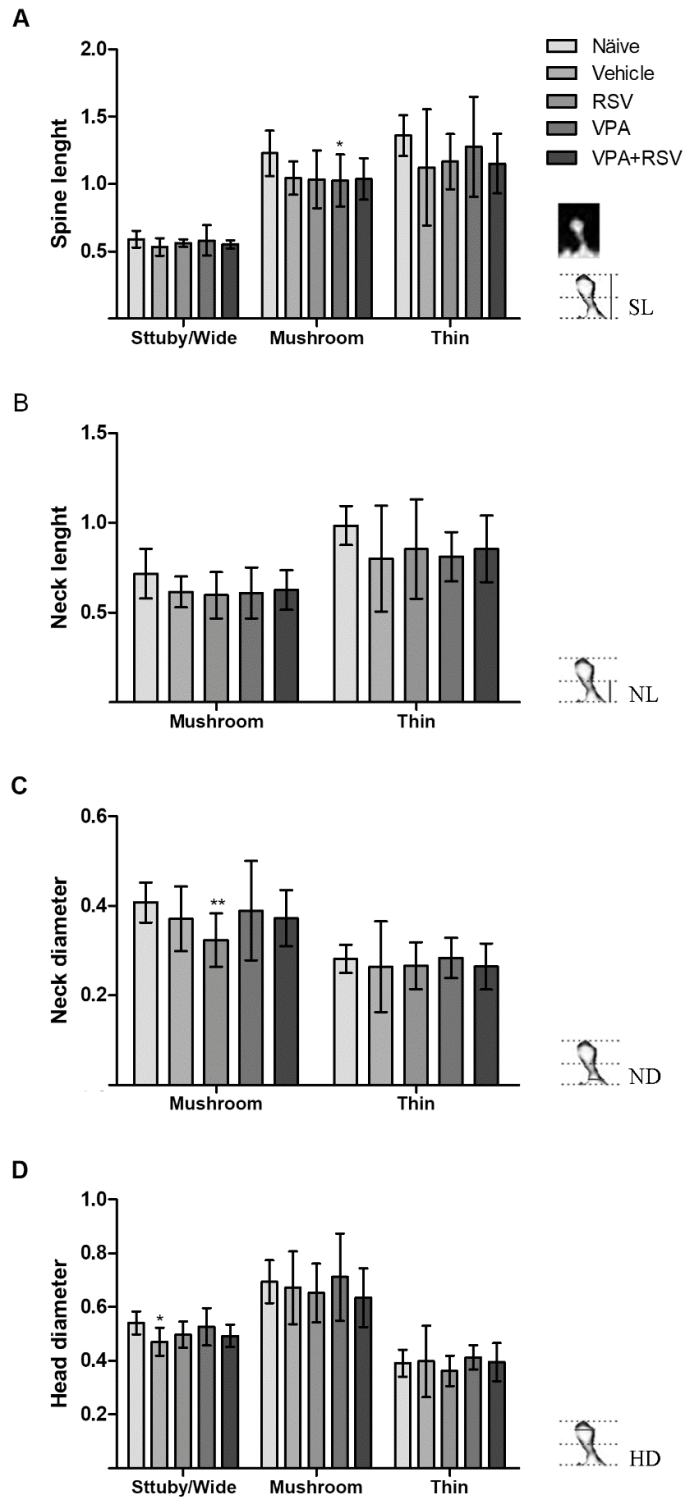


Figure 4



4. DISCUSSÃO

Esse trabalho apresenta dados inéditos e elucidativos, dando contribuição ao entendimento dos mecanismos envolvidos em alterações no período gestacional que levam a alterações que duram até a idade adulta. Essas alterações podem acontecer com diversos fatores iniciais, incluindo-se infecções, obesidade, exercício físico, drogas, entre outras. No entanto, esses dados expõem a fragilidade da MePD mediante a exposição pré-natal ao DMSO, diminuindo consideravelmente a densidade dos espinhos dendríticos nessa região, considerando o perfil diferente de espinhos dendríticos entre os animais expostos ao DMSO e o grupo nãive. Essas alterações, entretanto, não foram capazes de impedir a prevenção, tanto a nível comportamental (Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018; Hirsch et al., 2018), quanto a nível celular (Fontes-Dutra et al., 2018) e molecular (Hirsch et al., 2018) já observada pelo nosso grupo de pesquisa que o RSV causa nos animais expostos ao VPA.

Os efeitos altamente diversos do DMSO tanto em estudos com modelos animais quanto com humanos refletem a multiplicidade de suas funções, porém poucos estudos foram capazes de elucidar as possíveis vias e mecanismos alterados por esse composto (Jacob & Torre, 2015). Um dos aspectos mais relevantes dentre os identificados é o caráter analgésico e anti-inflamatório do DMSO (Jacob et al., 1964), bem como a sua livre passagem pelas barreiras biológicas (Capriotti & Capriotti, 2012), característica que permite uma ampla gama de interações não só a nível periférico como também no SNC. Comumente, estudos de muitas áreas utilizam DMSO como veículo para moléculas orgânicas hidrofóbicas em decorrência da relativa inocuidade desse composto, entretanto é necessário trazer à tona o questionamento do possível viés introduzido por esse solvente, principalmente quando em altas concentrações.

A redução importante na densidade de espinhos dendríticos na MePD em animais adultos pode ser um reflexo dos 13 dias de tratamento subcutâneo com DMSO durante a gestação, entretanto o maior questionamento situa-se no motivo que levaria à vulnerabilidade específica desse núcleo, uma vez que estudos já demonstraram alterações em outras estruturas (Bringas et al., 2013; Mahmood et al., 2018). A modulação da plasticidade sináptica na amígdala é de extrema importância para o desenvolvimento de memórias aversivas (Maren, 2017), tendo implicações

importantes nos transtornos de ansiedade (Mahan & Ressler, 2012), porém não há evidências dos possíveis impactos de alterações sinápticas na MePD isoladamente, a qual tem uma relação mais direta com a puberdade e a regulação do comportamento sexual (Li et al., 2015). Um estudo utilizando DMSO em culturas organotípicas de hipocampo em modelo de Alzheimer demonstrou uma importante regeneração dos contatos sinápticos (Penazzi et al., 2017) após o tratamento com esse composto, porém os mecanismos envolvidos nesse efeito não foram conhecidos. Interessantemente, o DMSO apresenta uma atividade moduladora em processos de autofagia em hepatócitos através de uma redução na expressão de AKT1 (Homólogo de oncogene viral timoma murino V) fosforilada mediada por ATF4 (fator de ativação da transcrição 4) (Song et al., 2012), via que, em neurônios, possui papel importante no *pruning* sináptico e nas modificações morfológicas em espinhos dendríticos (Liu et al., 2014; Tang et al., 2014), sendo portanto um possível mecanismo alterado pelo DMSO na MePD.

No contexto do TEA, especificamente do modelo animal induzido por exposição pré-natal ao VPA nos estudos do nosso grupo, o DMSO vem sendo utilizado como solvente do RSV. Entretanto, não foi possível observar influências do DMSO tanto em análises de comportamentos clássicos do tipo autista como sociabilidade (Bambini-Junior et al., 2014) e estereotipias (Hirsch et al., 2018) quanto em outros experimentos de histologia, análise proteica (Fontes-Dutra et al., 2018) biologia molecular e outros (Hirsch et al., 2018). Dessa forma, o DMSO não foi capaz de alterar de forma geral o desenvolvimento esperado dos animais do modelo, indicando que as alterações em espinhos dendríticos na MePD, apesar de extremamente relevantes, não se refletem em prejuízos que poderiam desqualificar a validade e translacionalidade do referido modelo de estudo bem como do tratamento com RSV.

Assim, levando em consideração a hipótese do DMSO como indutor de alterações em espinhos dendríticos é necessário observar um impacto a nível de desenvolvimento embrionário e fetal cujas consequências puderam ainda ser observadas na idade adulta. Possivelmente essas alterações possuem uma relação importante com os comportamentos sexuais, ainda que não existam dados da literatura demonstrando esse tipo de relação. De forma geral, esse dado ressalta a importância da escolha consciente de veículos e demonstra a necessidade de

repensar a escolha de DMSO em estudos voltados para modelos que de alguma forma possam ser diretamente influenciados por mudanças na MePD.

Por outro lado, além do efeito devastador da administração de DMSO durante o período embrionário nesse núcleo específico da amígdala, outro ponto a ser considerado é o efeito do tratamento diário de RSV diluído em veículo DMSO através de injeções subcutâneas (s.c.) durante os 13 dias de tratamento previamente padronizado pelo nosso grupo de pesquisa.

A escolha da forma de administração de um fármaco é uma etapa chave do tratamento que é proposto. A forma s.c. de administração é muito utilizada quando se faz um tratamento medicamentoso a longo prazo ou crônico (Richter & Jacobsen, 2014), pois possibilita uma maior tolerância ao fármaco (devido à sua absorção lenta, diminui os efeitos colaterais de uma exposição prolongada às altas concentrações séricas), além de que essa absorção lenta leva a uma exposição sistêmica prolongada, pois o fármaco, após ser injetado no espaço extracelular do tecido subcutâneo, é transportado para capilares sanguíneos ou linfáticos para absorção, antes de atingir a circulação sistêmica (Richter & Jacobsen, 2014). Além disso, a administração s.c. representa um método conveniente considerando a facilidade do manuseio dos animais no momento do tratamento.

Porém, diversos estudos evidenciam o efeito estressor de injeções tanto intraperitoneais (i.p.) quanto s.c., sendo esse estresse um gatilho para diversas alterações neuroquímicas observadas. Embora um trabalho recente demonstre que não há efeito estressor, nem dor ou sofrimento da injeção i.p. crônica ao final de 30 dias de experimento em camundongos fêmeas (Davis et al., 2014), ele mostra que, nos primeiros 15 dias, existe um aumento nos níveis de cortisol em resposta à punção com agulha e não em resposta à injeção i.p. com salina, chamando atenção para o efeito estressor dessa prática. Além disso, já foi demonstrado que a injeção i.p. com solução salina foi capaz de induzir estresse agudo e leve em um estudo que validou a coleta de corticosterona urinária como uma medida não invasiva de estresse agudo em camundongos (Meijer et al., 2005).

Sabe-se que regiões límbicas e corticais específicas desempenham um papel fundamental na integração das respostas comportamentais e fisiológicas tanto durante um evento estressor quanto na adaptação à estressores subsequentes, e que

respondem de forma diferente a esses estímulos: enquanto que hipocampo e córtex pré-frontal apresentam atrofia dendrítica e perda de sinapses excitatórias, núcleos como o BLA - rico em neurônios piramidais -, apresentam crescimento de espinhos dendríticos (Radley & Morrison, 2005). Já no núcleo central da amígdala (CeA), não foi observada qualquer atrofia dendrítica em resposta ao estresse por imobilização crônica (Ajai Vyas et al., 2003). Outro aspecto de plasticidade estrutural em que a amígdala se diferencia é a permanência das alterações mesmo após períodos de recuperação de estresse induzido (A. Vyas et al., 2004). Ainda não é descrito de que forma essas alterações contribuem em transtornos funcionais, como o TEA, e o envolvimento de outras estruturas encefálicas, como a MePD, local em que, curiosamente, não foram observados neurônios piramidais.

Esses efeitos induzidos por estresse na morfologia da amígdala podem ser explicados, em parte, por algum mecanismo de ação dos glicocorticóides, hormônios esteróides cujos receptores são abundantemente expressos na amígdala (Leuner & Shors, 2013). Além dos glicocorticóides e dos receptores de aminoácidos excitatórios, há uma lista crescente de mediadores implicados no remodelamento dendrítico induzido pelo estresse; entre eles, pode-se destacar fatores tróficos como fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e a protease ativadora de plasminogênio tecidual (tPA), fator liberador de corticotrofina (CRF) e endocanabinóides (Bruce S Mcewen et al., 2015).

Outro fator que pode ser levado em conta é a ativação da microglia em regiões cortico-límbicas (Bollinger et al., 2017). Um estudo recente demonstrou a remodelação neuronal mediada por microglia de espinhos dendríticos induzida por estresse crônico no córtex pré-frontal medial em machos, mas não em fêmeas (Wohleb et al., 2018), demonstrando que o fator estressor ainda pode ser modulado pelo sexo do animal, resultando em maior ou menor disfunção a nível de circuitos cortico-límbicos. Porém, ainda não se pode afirmar quais são, de fato, os mecanismos subjacentes envolvidos na reorganização da morfologia e plasticidade da região da amígdala.

Dessa forma, nesse estudo, levantamos também a hipótese da injeção prolongada como um fator estressor durante o período embrionário, podendo esse estresse por si só ser o responsável pelos resultados obtidos nesse estudo ou atuar em um sinergismo com a administração crônica do veículo DMSO, com atenção especial à vulnerabilidade da MePD.

Ao longo dos anos, a região da amígdala tem se mostrado uma estrutura relevante para entender tanto as características comportamentais determinantes para o TEA (Amaral et al., 2003; Baron-Cohen et al., 2000; Sweeten et al., 2002), quanto na elucidação de mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse transtorno, com o estudo em modelos animais (Markram et al., 2008; Sosa-Díaz et al., 2014; Truitt et al., 2007). No entanto, a maior parte dos estudos envolvendo a região da amígdala concentram dados ao redor do núcleo BLA, onde mostram importantes alterações na conectividade dessa região, envolvida com ansiedade (Truitt et al., 2007) e na formação de memórias aversivas e de medo (Markram et al., 2008).

Essa hiperconectividade evidenciada possui uma relação íntima com o aumento do número de sinapses excitatórias (Lin et al., 2013) e/ou o prejuízo da inibição nesta região (Markram et al., 2008). O presente trabalho demonstra pela primeira vez uma vulnerabilidade da MePD para fatores ambientais durante o período gestacional.

A amígdala medial (Me) apresenta relações importantes para o controle do comportamento sociossexual de roedores (L. W. Swanson, 2000), tendo uma vasta sensibilidade e expressão de receptores para hormônios esteroides (Pardo-Bellver et al., 2012; A. A. Rasia-Filho et al., 2012; Sano et al., 2016). Esse núcleo recebe importantes projeções sensoriais tanto do bulbo olfatório principal, quanto acessório e, estudos vêm demonstrando que a MePD contém a maior densidade de receptores androgênicos e estrogênicos (Cooke, 2006; Pardo-Bellver et al., 2012; Simerly et al., 1990). A íntima sensibilidade que o núcleo MePD apresenta com flutuações hormonais é evidenciada por estudos em que se realizou a técnica de gonadectomia em ratos adultos. Enquanto que estudos têm demonstrado uma importante redução na densidade de espinhos dendríticos em ratos que sofreram gonadectomia dessa região específica da amígdala (Zancan et al., 2017), outros estudos mostram que a gonadectomia apresenta um efeito importante em diversas estruturas encefálicas, elevando os níveis de subunidades de receptores esteroides (ER) em ratos submetidos a mesmo procedimento, ainda que não tenha sido avaliado na MePD, mas em estruturas que apresentam funções similarmente importantes (Nomura et al., 2003). Ainda, outros estudos mostraram importantes diferenças na densidade de espinhos dendríticos no núcleo MePD em diferentes estágios do desenvolvimento, em

que há variações dos hormônios esteróides sexuais circulantes, entre ratos machos e fêmeas (A. . Rasia-Filho et al., 2004).

Surpreendentemente, os dados do presente trabalho apontam não para um efeito dos tratamentos VPA e RSV, mas sim para um efeito global com a administração do veículo DMSO, reduzindo a densidade de espinhos dendríticos no núcleo MePD da amígdala, levantando importantes questões não só sobre sua bioatividade, como também quais mecanismos fisiológicos poderiam estar envolvidos. Atualmente, os efeitos bioativos do DMSO, usado extensivamente como veículo para diversas moléculas, têm sido levantados pela literatura, mostrando que este composto em situações específicas pode ter um efeito biológico relevante a ser considerado (Hanslick et al., 2009b; Yuan et al., 2014). Em 1975, foi demonstrado que macacos tratados com DMSO apresentaram um achatamento no número de espinhos dendríticos (de la Torre JC, Kanawaga HM, Hill PK, Crockard HA, Surgeon JW, 1975).

Desde então, poucos estudos buscaram entender os possíveis mecanismos consequentes desta observação. No entanto, um estudo de 2006 avaliando o efeito do DMSO sobre diversos parâmetros, entre eles, sobre o RNA mensageiro de ER mostrou que essa molécula é um potente modulador da expressão desses receptores em cultura celular de hepatócitos (Mortensen & Arukwe, 2006), células conhecidamente sensíveis ao hormônio estrogênio. Dessa forma, os dados deste trabalho levantam a hipótese de uma possível modulação do DMSO sobre os níveis de receptores de estrogênio na MePD, tendo como efeito um possível aumento desses receptores, o que poderia estar, em parte, sendo consequência para a redução da densidade de espinhos dendríticos nos grupos tratados com DMSO. Como discutido anteriormente, a gonadectomia é capaz de reduzir o número de espinhos dendríticos via aumento da presença de receptores do tipo estrogênio. Da mesma forma, o DMSO poderia estar induzindo essa redução por mecanismos similares a esse procedimento. É importante considerar que o núcleo MePD é extremamente sensível aos hormônios sexuais circulantes devido à elevada expressão de receptores para esses hormônios esteróides, como os ER. Isso poderia tornar vulnerável a agentes químicos que são capazes de modular não só os níveis circulantes destes hormônios, mas também a expressão gênica de seus receptores. Este é o primeiro trabalho, até então, que não somente coloca o DMSO como um potente agente indutor de alterações na densidade de espinhos dendríticos do MePD, como também traz à tona a possível conexão entre

a possível modulação do DMSO sobre ER neste núcleo. Estudos futuros poderão comprovar e elucidar especificamente por quais mecanismos o DMSO pode estar induzindo essas alterações.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho levanta considerações importantes a respeito do uso de DMSO como solvente. De forma surpreendente, os dados aqui obtidos sugerem um efeito bioativo importante global do DMSO, em todos os grupos experimentais expostos a esse composto, na redução da densidade de espinhos dendríticos num importante subnúcleo da amígdala. Ainda que alguns aspectos comportamentais, celulares e moleculares até então avaliados por trabalhos prévios não tenham sido modificados pela presença do veículo DMSO, o presente trabalho ressalta a vulnerabilidade a longo prazo de regiões frente a possíveis papéis bioativos do DMSO. Sabendo que o DMSO é um importante modulador dos níveis de receptores de estrogênio e, sabendo que a administração pode modular eventos inflamatórios em períodos críticos da gestação, ambos estes aspectos podem estar contribuindo para a alteração remodelamento sináptico dessa região.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, serão necessários estudos para elucidar, de fato, quais mecanismos o DMSO está utilizando para promover essas alterações e quais aspectos diferenciais a MePD apresenta para ser tão vulnerável. Além disso, é necessário realizar análises com comportamento sóciosexual, a fim de verificar se essa alteração em espinhos dendríticos observada nessa região, reflete em prejuízos comportamentais. Estudos avaliando a expressão de receptores de estrogênio nessa região são necessários em grupos expostos ou não ao DMSO para confirmar a possível ligação levantada no presente trabalho, entre o efeito modulador comprovado do DMSO sobre esses receptores e a alteração dos espinhos dendríticos nesta região. Também será necessário realizar um grupo fêmeas prenhes que recebem injeções de salina 0,9% durante 13 dias para isolar um possível efeito de um quadro inflamatório provocado pelas picadas da agulha sobre os espinhos dendríticos da MePD. O uso de ligantes específicos de receptores de estrogênio, em comparativo com os possíveis

efeitos do DMSO, também podem acrescentar importantes evidências para auxiliar na elucidação dessa possível relação.

Ademais, o trabalho reitera a necessidade do uso consciente e da expansão das análises investigando os efeitos bioativos do DMSO e de outros solventes orgânicos usualmente utilizados e recomendados por fornecedores de diferentes moléculas para o uso na prática acadêmica e clínica.

Além disso, estamos realizando experimentos com animais de 30 dias que não receberam DMSO, a fim de comparar esses dados com dados de animais de outra idade sem a administração de DMSO (dados Anexos).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H., & Damasio, A. R. (1995). Fear and the human amygdala. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(9), 5879–91. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2008.06.006>
- Aggleton, J. P. (1992). *The Amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction*. Wiley-Liss.
- Aincy, M., Meziane, H., Herault, Y., & Humeau, Y. (2018). Synaptic dysfunction in amygdala in intellectual disorder models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *84*(Pt B), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.028>
- Amaral, D. G., Bauman, M. D., & Schumann, C. M. (2003). The amygdala and autism: implications from non-human primate studies. *Genes, Brain, and Behavior*, *2*(5), 295–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14606694>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. Arlington. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>
- Ansel, A., Rosenzweig, J. P., Zisman, P. D., Melamed, M., & Gesundheit, B. (2017). Variation in Gene Expression in Autism Spectrum Disorders: An Extensive Review of Transcriptomic Studies. *Frontiers in Neuroscience*, *10*, 601. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00601>
- Ashwood, P., Krakowiak, P., Hertz-Picciotto, I., Hansen, R., Pessah, I., & Van de Water, J. (2011). Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain, Behavior, and Immunity*, *25*(1), 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.08.003>
- Ashwood, P., Wills, S., & Van de Water, J. (2006). The immune response in autism: a new frontier for autism research. *Journal of Leukocyte Biology*, *80*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1189/jlb.1205707>
- Atladóttir, H. Ó., Thorsen, P., Østergaard, L., Schendel, D. E., Lemcke, S., Abdallah, M., & Parner, E. T. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *40*(12), 1423–1430. <https://doi.org/10.1007/s10803-010-1006-y>
- Awasthi-Kalia, M., Schnetkamp, P. P. M., & Deans, J. P. (2001). Differential Effects of

- Filipin and Methyl- β -cyclodextrin on B Cell Receptor Signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287(1), 77–82. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5536>
- Bambini-Junior, V., Rodrigues, L., Behr, G. A., Moreira, J. C. F., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2011). Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. *Brain Research*, 1408, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.015>
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., Nogueira Freire, V., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neuroscience Letters*, 583, 176–81. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>
- Baron-Cohen, S., Ring, H. A., Bullmore, E. T., Wheelwright, S., Ashwin, C., & Williams, S. C. R. (2000). The amygdala theory of autism. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00011-7](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00011-7)
- Bass, T. M., Weinkove, D., Houthoofd, K., Gems, D., & Partridge, L. (2007). Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(10), 546–52. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.07.007>
- Beckman, D. L., & Crittenden, D. J. (1981). Protection from oxygen-induced seizures by clonazepam and propylene glycol. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 168(1), 45–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6798572>
- Belmonte, M. K., & Bourgeron, T. (2006). Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1221–1225. <https://doi.org/10.1038/nn1765>
- Berman, A. Y., Motechin, R. A., Wiesenfeld, M. Y., & Holz, M. K. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *Npj Precision Oncology*, 1(1), 35. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0038-6>
- Bertelli, A. A., Ferrara, F., Diana, G., Fulgenzi, A., Corsi, M., Ponti, W., Ferrero, M. E., & Bertelli, A. (1999). Resveratrol, a natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in human promonocytes: a co-factor in antiinflammatory and anticancer chemopreventive activity. *International Journal of Tissue Reactions*, 21(4), 93–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10761539>

- Bollinger, J. L., Collins, K. E., Patel, R., & Wellman, C. L. (2017). Behavioral stress alters corticolimbic microglia in a sex- and brain region-specific manner. *PLOS ONE*, *12*(12), e0187631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187631>
- 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*, *241*, 170–187. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.03.030>
- Brusco, J., Dall'Oglio, A., Rocha, L. B., Rossi, M. A., Moreira, J. E., & Rasia-Filho, A. A. (2010). Descriptive findings on the morphology of dendritic spines in the rat medial amygdala. *Neuroscience Letters*, *483*(2), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.083>
- Camici, G. G., Steffel, J., Akhmedov, A., Schafer, N., Baldinger, J., Schulz, U., Shojaati, K., Matter, C. M., Yang, Z., Luscher, T. F., & Tanner, F. C. (2006). Dimethyl Sulfoxide Inhibits Tissue Factor Expression, Thrombus Formation, and Vascular Smooth Muscle Cell Activation: A Potential Treatment Strategy for Drug-Eluting Stents. *Circulation*, *114*(14), 1512–1521. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638460>
- Camp, P. E., James, H. E., & Werner, R. (1981). Acute dimethyl sulfoxide therapy in experimental brain edema: Part I. Effects on intracranial pressure, blood pressure, central venous pressure, and brain water and electrolyte content. *Neurosurgery*, *9*(1), 28–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7279169>
- Capriotti, K., & Capriotti, J. A. (2012). Dimethyl sulfoxide: history, chemistry, and clinical utility in dermatology. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, *5*(9), 24–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23050031>
- Caruso, F., Tanski, J., Villegas-Estrada, A., & Rossi, M. (2004). Structural Basis for Antioxidant Activity of *trans*-Resveratrol: Ab Initio Calculations and Crystal and Molecular Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(24), 7279–7285. <https://doi.org/10.1021/jf048794e>
- Chen, C. H., Gray, M. O., & Mochly-Rosen, D. (1999). Cardioprotection from ischemia by a brief exposure to physiological levels of ethanol: role of epsilon protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(22), 12784–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10536000>
- Chetty, S., Pagliuca, F. W., Honore, C., Kweudjeu, A., Rezanian, A., & Melton, D. A.

- (2013). A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation. *Nature Methods*, *10*(6), 553–556. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2442>
- Christensen, J., Grønberg, T. K., Sørensen, M. J., Schendel, D., Parner, E. T., Pedersen, L. H., & Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, *309*(16), 1696–703. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>
- Colucci, M., Maione, F., Bonito, M. C., Piscopo, A., Di Giannuario, A., & Pieretti, S. (2008). New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. *Pharmacological Research*, *57*(6), 419–425. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2008.04.004>
- Cooke, B. M. (2006). Steroid-dependent plasticity in the medial amygdala. *Neuroscience*, *138*(3), 997–1005. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.018>
- Davis, J. N., Courtney, C. L., Superak, H., & Taylor, D. K. (2014). Behavioral, clinical and pathological effects of multiple daily intraperitoneal injections on female mice. *Lab Animal*, *43*(4), 131–139. <https://doi.org/10.1038/labana.433>
- de la Torre, J. C. (1995). Treatment of head injury in mice, using a fructose 1,6-diphosphate and dimethyl sulfoxide combination. *Neurosurgery*, *37*(2), 273–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477779>
- de la Torre JC, Kanawaga HM, Hill PK, Crockard HA, Surgeon JW, M. S. (1975). Experimental therapy after middle cerebral artery occlusion in monkeys. *Surg Forum*.
- Dickie, E. W., & Armony, J. L. (2008). Amygdala responses to unattended fearful faces: Interaction between sex and trait anxiety. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, *162*(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2007.08.002>
- Epstein, W. W., & Sweat, F. W. (1967). Dimethyl Sulfoxide Oxidations. *Chemical Reviews*, *67*(3), 247–260. <https://doi.org/10.1021/cr60247a001>
- Farkas, E., Inostóris, Á., Domoki, F., Mihály, A., Luiten, P. G. ., & Bari, F. (2004). Diazoxide and dimethyl sulphoxide prevent cerebral hypoperfusion-related learning dysfunction and brain damage after carotid artery occlusion. *Brain Research*, *1008*(2), 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.02.037>
- Favre, M., & Barkat, T. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Frontiers in*

- FDA, F. and D. A. (1978). Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products (DMSO). Retrieved May 20, 2018, from <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=017788>
- Fontes-Dutra, M., Santos-Terra, J., Deckmann, I., Brum Schwingel, G., Della-Flora Nunes, G., Hirsch, M. M., Bauer-Negrini, G., Hedin-Pereira, C., Bambini-Junior, V., Riesgo, R. S., & Gottfried, C. (2018). Resveratrol prevents cellular and behavioral sensory alterations in the animal model of autism induced by valproic acid. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10, 9. <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2018.00009>
- Gad, S. E., & Sullivan, D. W. (2014). Dimethyl Sulfoxide (DMSO). In *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 166–168). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00839-3>
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*, 28(3), 1317–1330. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
- Gaylord Chemical Company (L.L.C). (2014). Dimethyl Sulfoxide: Health and Safety Information. Retrieved May 20, 2018, from <http://www.gaylordchemical.com/wp-content/uploads/2015/07/GC-Literature-106.pdf>
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., & Savino, W. (2015). The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Psychiatry*, 6, 121. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00121>
- Greiff, D., & Seifert, P. (1968). Cryotolerance of selected sites on the surfaces of membranes of cells. I. Mucopolysaccharides of erythrocytes. *Cryobiology*, 4(6), 295–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4247376>
- Guo, X., Duan, X., Long, Z., Chen, H., Wang, Y., Zheng, J., Zhang, Y., Li, R., & Chen, H. (2016). Decreased amygdala functional connectivity in adolescents with autism: A resting-state fMRI study. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 257(March), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2016.10.005>
- Gurtovenko, A. A., & Anwar, J. (2007). Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(35), 10453–10460. <https://doi.org/10.1021/jp073113e>
- Guslandi, M. (1987). Effects of Ethanol on the Gastric Mucosa. *Digestive Diseases*,

- 5(1), 21–32. <https://doi.org/10.1159/000171159>
- Hanslick, J. L., Lau, K., Noguchi, K. K., Olney, J. W., Zorumski, C. F., Mennerick, S., & Farber, N. B. (2009a). Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of Disease*, *34*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.006>
- Hanslick, J. L., Lau, K., Noguchi, K. K., Olney, J. W., Zorumski, C. F., Mennerick, S., & Farber, N. B. (2009b). Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of Disease*, *34*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.006>
- Harden, C. L. (2013). In utero valproate exposure and autism: long suspected, finally proven. *Epilepsy Currents / American Epilepsy Society*, *13*(6), 282–4. <https://doi.org/10.5698/1535-7597-13.6.282>
- Heil, J., Tomazic, D., Egbers, S., & Kast, S. M. (2014). Acidity in DMSO from the embedded cluster integral equation quantum solvation model. *Journal of Molecular Modeling*, *20*(4), 2161. <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2161-4>
- Hirsch, M. M., Deckmann, I., Fontes-Dutra, M., Bauer-Negrini, G., Della-Flora Nunes, G., Nunes, W., Rabelo, B., Riesgo, R., Margis, R., Bambini-Junior, V., & Gottfried, C. (2018). Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. *Food and Chemical Toxicology*, *115*, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.061>
- Horita, A., & Weber, L. J. (1964). SKIN PENETRATING PROPERTY OF DRUGS DISSOLVED IN DIMETHYLSULFOXIDE (DMSO) AND OTHER VEHICLES. *Life Sciences* (1962), *3*, 1389–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14248627>
- Huang, W.-C., Chen, Y., Page, D. T., Laplante, M., Sabatini, D. M., Ma, X. M., Blenis, J., Meyuhas, O., Ruvinsky, I., Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D. P., Hoogenraad, C. C., Sheng, M., Kumar, V., Zhang, M. X., Swank, M. W., Kunz, J., Wu, G. Y., Gong, X., ... Kremer, E. J. (2016). Hyperconnectivity of prefrontal cortex to amygdala projections in a mouse model of macrocephaly/autism syndrome. *Nature Communications*, *7*, 13421. <https://doi.org/10.1038/ncomms13421>
- Hutsler, J. J., & Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Research*, *1309*, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.120>
- Ikeda, Y., & Long, D. M. (1990). Comparative effects of direct and indirect hydroxyl

- radical scavengers on traumatic brain oedema. *Acta Neurochirurgica. Supplementum*, 51, 74–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2128587>
- Jacob, S. W., Bischel, M., & Herschler, R. J. (1964). DIMETHYL SULFOXIDE (DMSO): A NEW CONCEPT IN PHARMACOTHERAPY. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 6, 134–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14135298>
- JACOB, S. W., BISCHEL, M., & HERSCHLER, R. J. (1964). DIMETHYL SULFOXIDE (DMSO): A NEW CONCEPT IN PHARMACOTHERAPY. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 6, 134–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14135298>
- Jacob, S. W., & Torre, J. C. de la. (2015). *Dimethyl Sulfoxide (DMSO) in Trauma and Disease*. Retrieved from [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Opm9BwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Dimethyl+Sulfoxide+\(DMSO\)+in+Trauma+and+Disease&ots=gwYScqjTT&sig=ueAUSIPvm2EKds_C850H5XUhCwY#v=onepage&q=Dimethyl+Sulfoxide+\(DMSO\)+in+Trauma+and+Disease&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Opm9BwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Dimethyl+Sulfoxide+(DMSO)+in+Trauma+and+Disease&ots=gwYScqjTT&sig=ueAUSIPvm2EKds_C850H5XUhCwY#v=onepage&q=Dimethyl+Sulfoxide+(DMSO)+in+Trauma+and+Disease&f=false)
- Jacob, S. W., & Wood, D. C. (1967). Dimethyl sulfoxide (DMSO). Toxicology, pharmacology, and clinical experience. *American Journal of Surgery*, 114(3), 414–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5340064>
- Julien, C., Marcouiller, F., Bretteville, A., El Khoury, N. B., Baillargeon, J., Hébert, S. S., & Planel, E. (2012). Dimethyl Sulfoxide Induces Both Direct and Indirect Tau Hyperphosphorylation. *PLoS ONE*, 7(6), e40020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040020>
- Kang, M.-H., Das, J., Gurunathan, S., Park, H.-W., Song, H., Park, C., & Kim, J.-H. (2017). The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: a mechanistic study. *Theranostics*, 7(19), 4735–4752. <https://doi.org/10.7150/thno.21662>
- Karaca, M., Bilgin, U. Y., Akar, M., & de la Torre, J. C. (1991). Dimethyl sulphoxide lowers ICP after closed head trauma. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 40(1), 113–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2060538>
- Karaça, M., Kiliç, E., Yazici, B., Demir, S., & de la Torre, J. (2002). Ischemic stroke in elderly patients treated with a free radical scavenger–glycolytic intermediate solution: A preliminary pilot trial. *Neurological Research*, 24(1), 73–80.

<https://doi.org/10.1179/016164102101199567>

- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>
- Klamt, F., Gottfried, C., Tramontina, F., Dal-Pizzol, F., Da Frota Jr., M. L., Moreira, J. C., Dias, R. D., Moriguchi, E., Wofchuk, S., & Souza, D. O. (2002). Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. *Neuroreport*, 13(12), 1515–1518. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12218696
- Kolb, K. H., Jaenicke, G., Kramer, M., & Schulze, P. E. (1967). Absorption, distribution and elimination of labeled dimethyl sulfoxide in man and animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 141(1), 85–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5232278>
- Koteish, A., Yang, S., Lin, H., Huang, X., & Diehl, A. M. (2002). Chronic Ethanol Exposure Potentiates Lipopolysaccharide Liver Injury Despite Inhibiting Jun N-terminal Kinase and Caspase 3 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), 13037–13044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101632200>
- Leuner, B., & Shors, T. J. (2013). Stress, anxiety, and dendritic spines: What are the connections? *Neuroscience*, 251, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.021>
- Li, X. F., Hu, M. H., Hanley, B. P., Lin, Y. S., Poston, L., Lightman, S. L., & O'Byrne, K. T. (2015). The Posterodorsal Medial Amygdala Regulates the Timing of Puberty Onset in Female Rats. *Endocrinology*, 156(10), 3725–3736. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1366>
- Lin, H. C., Gean, P. W., Wang, C. C., Chan, Y. H., & Chen, P. S. (2013). The Amygdala Excitatory/Inhibitory Balance in a Valproate-Induced Rat Autism Model. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055248>
- Lin, H. Q., Burden, P. M., & Johnston, G. A. (1998). Propylene glycol elicits anxiolytic-like responses to the elevated plus-maze in male mice. *The Journal of Pharmacy*

- and *Pharmacology*, 50(10), 1127–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9821659>
- Liu, J., Pasini, S., Shelanski, M. L., & Greene, L. A. (2014). Activating transcription factor 4 (ATF4) modulates post-synaptic development and dendritic spine morphology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 177. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00177>
- Lovelock, J. E., & Bishop, M. W. H. (1959). Prevention of Freezing Damage to Living Cells by Dimethyl Sulphoxide. *Nature*, 183(4672), 1394–1395. <https://doi.org/10.1038/1831394a0>
- Lu, C., & Mattson, M. P. (2001). Dimethyl Sulfoxide Suppresses NMDA- and AMPA-Induced Ion Currents and Calcium Influx and Protects against Excitotoxic Death in Hippocampal Neurons. *Experimental Neurology*, 170(1), 180–185. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7686>
- Ma, L., Dong, J.-X., Fu, W.-R., Li, X.-Y., Chen, J., & Liu, Y. (2018). Mitochondrial morphology and function impaired by dimethyl sulfoxide and dimethyl Formamide. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9759-7>
- Mahan, A. L., & Ressler, K. J. (2012). Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. *Trends in Neurosciences*, 35(1), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.06.007>
- Mahmood, U., Ahn, S., Yang, E.-J., Choi, M., Kim, H., Regan, P., Cho, K., & Kim, H.-S. (2018). Dendritic spine anomalies and PTEN alterations in a mouse model of VPA-induced autism spectrum disorder. *Pharmacological Research*, 128, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.006>
- Malinin, G. I., Fontana, D. J., & Braungart, D. C. (1969). Distribution of C14-labeled dimethyl sulfoxide in tissues of intact animals. *Cryobiology*, 5(5), 328–35. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(69\)80461-X](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(69)80461-X)
- Malkova, N. V., Yu, C. Z., Hsiao, E. Y., Moore, M. J., & Patterson, P. H. (2012). Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(4), 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.011>
- Maren, S. (2017). Synapse-Specific Encoding of Fear Memory in the Amygdala. *Neuron*, 95(5), 988–990. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.020>
- 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: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(4), 901–12. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301453>
- Matthews, W. S., Bares, J. E., Bartmess, J. E., Bordwell, F. G., Cornforth, F. J., Drucker, G. E., Margolin, Z., McCallum, R. J., McCollum, G. J., & Vanier, N. R. (1975). Equilibrium acidities of carbon acids. VI. Establishment of an absolute scale of acidities in dimethyl sulfoxide solution. *Journal of the American Chemical Society*, 97(24), 7006–7014. <https://doi.org/10.1021/ja00857a010>
- Mcewen, B. S. (1992). Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons, 588, 341–345.
- Mcewen, B. S., Nasca, C., & Gray, J. D. (2015). Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology Reviews*, 41, 3–23. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.171>
- Meijer, M. K., Lemmens, A. G., Van Zutphen, B. F. M., & Baumans, V. (2005). Urinary Corticosterone Levels in Mice in Response to Intraperitoneal Injections With Saline. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 8(4), 279–283. https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0804_4
- Miles, J. H. (2011). Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 13(4), 278–294. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181ff67ba>
- Mortensen, A. S., & Arukwe, A. (2006). Dimethyl sulfoxide is a potent modulator of estrogen receptor isoforms and xenoestrogen biomarker responses in primary culture of salmon hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 79(1), 99–103. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2006.05.009>
- Muhle, R., Trentacoste, S. V., & Rapin, I. (2004). The genetics of autism. *Pediatrics*, 113(5), e472-86.
- Nakahiro, M., Arakawa, O., Narahashi, T., Ukai, S., Kato, Y., Nishinuma, K., & Nishimura, T. (1992). Dimethyl sulfoxide (DMSO) blocks GABA-induced current in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Letters*, 138(1), 5–8. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90459-K](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90459-K)
- Ng, M., de Montigny, J. G., Ofner, M., & Do, M. T. (2017). Environmental factors associated with autism spectrum disorder: a scoping review for the years 2003-2013. *Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada: Research,*

- Policy and Practice*, 37(1), 1–23.
- Nishimura, Y., Kurata, N., Iwase, M., Li, H., & Yasuhara, H. (1999). The effects of organic solvents on trimethadione n-demethylation in rats. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, 104(2), 229–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10634315>
- Nomura, M., Korach, K. S., Pfaff, D. W., & Ogawa, S. (2003). Estrogen receptor β (ER β) protein levels in neurons depend on estrogen receptor α (ER α) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner. *Molecular Brain Research*, 110(1), 7–14. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00544-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00544-2)
- Numis, a L., Major, P., Montenegro, M. a, Muzykewicz, D. a, Pulsifer, M. B., & Thiele, E. a. (2011). Identification of risk factors for autism spectrum disorders in tuberous sclerosis complex. *Neurology*, 76(11), 981–7. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182104347>
- Onore, C., Careaga, M., & Ashwood, P. (2012). The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism. *Brain, Behavior, and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.007>
- Pardo-Bellver, C., Cádiz-Moretti, B., Novejarque, A., Martínez-García, F., & Lanuza, E. (2012). Differential efferent projections of the anterior, posteroventral, and posterodorsal subdivisions of the medial amygdala in mice. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6, 33. <https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00033>
- Parkin, J., Shea, C., & Sant, G. R. (1997). Intravesical dimethyl sulfoxide (DMSO) for interstitial cystitis—a practical approach. *Urology*, 49(5A Suppl), 105–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9146010>
- Parkin, J., Shea, C., & Sant, G. R. (1997). Intravesical dimethyl sulfoxide (DMSO) for interstitial cystitis—a practical approach. *Urology*, 49(5), 105–107. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(97\)00181-7](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(97)00181-7)
- Patterson, P. H. (2009). Immune involvement in schizophrenia and autism: Etiology, pathology and animal models. *Behavioural Brain Research*, 204(2), 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.12.016>
- Penazzi, L., Lorengel, J., Sündermann, F., Golovyashkina, N., Marre, S., Mathis, C. M. B., Lewejohann, L., Brandt, R., & Bakota, L. (2017). DMSO modulates CNS function in a preclinical Alzheimer's disease model. *Neuropharmacology*, 113, 434–444. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2016.10.020>
- Penzes, P., Cahill, M. E., Jones, K. A., VanLeeuwen, J.-E., & Woolfrey, K. M. (2011).

- Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 14(3), 285–93. <https://doi.org/10.1038/nn.2741>
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., & Gottfried, C. (2013). Resveratrol Protects C6 Astrocyte Cell Line against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress through Heme Oxygenase 1. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064372>
- Radley, J. J., & Morrison, J. H. (2005). Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Research Reviews*, 4(2), 271–287. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.03.004>
- Rasia-Filho, A. ., Fabian, C., Rigoti, K. ., & Achaval, M. (2004). Influence of sex, estrous cycle and motherhood on dendritic spine density in the rat medial amygdala revealed by the Golgi method. *Neuroscience*, 126(4), 839–847. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.009>
- Rasia-Filho, A. A., Haas, D., de Oliveira, A. P., de Castilhos, J., Frey, R., Stein, D., Lazzari, V. M., Back, F., Pires, G. N., Pavesi, E., Winkelmann-Duarte, E. C., & Giovenardi, M. (2012). Morphological and functional features of the sex steroid-responsive posterodorsal medial amygdala of adult rats. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(11), 1090–106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22827219>
- Rasia-Filho, A., & Janaína Brusco, L. R. & J. M. (2010). Dendritic spines observed by extracellular Dil dye and immunolabeling under confocal microscopy : Protocol Exchange. *PROTOCOL EXCHANGE*.
- Richter, W. F., & Jacobsen, B. (2014). Subcutaneous absorption of biotherapeutics: knowns and unknowns. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 42(11), 1881–9. <https://doi.org/10.1124/dmd.114.059238>
- Rivers-Auty, J., & Ashton, J. C. (2013). Vehicles for lipophilic drugs: implications for experimental design, neuroprotection, and drug discovery. *Current Neurovascular Research*, 10(4), 356–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23937198>
- Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., & Croog, V. J. (1997). Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod Toxicol*, 11(2–3), 417–422. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9100317

- Rojas, D. C., Smith, J. A., Benkers, T. L., Camou, S. L., Reite, M. L., & Rogers, S. J. (2004). Hippocampus and amygdala volumes in parents of children with autistic disorder. *Am J Psychiatry*, *161*(11), 2038–2044. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.11.2038>
- Roy, K.-M. (2000). Sulfones and Sulfoxides. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. https://doi.org/10.1002/14356007.a25_487
- Sano, K., Nakata, M., Musatov, S., Morishita, M., Sakamoto, T., Tsukahara, S., & Ogawa, S. (2016). Pubertal activation of estrogen receptor α in the medial amygdala is essential for the full expression of male social behavior in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(27), 7632–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524907113>
- Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., & Saldanha, C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, *65*(7), 1035–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663039>
- Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *30*(1), 80–9. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., & Przewłocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, *33*(6), 728–740. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.011>
- Schneider, T., Turczak, J., & Przewłocki, R. (2006). Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *31*(1), 36–46. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300767>
- Simerly, R. B., Swanson, L. W., Chang, C., & Muramatsu, M. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, *294*(1), 76–95. <https://doi.org/10.1002/cne.902940107>

- Snow, W. M., Hartle, K., & Ivanco, T. L. (2000). Altered Morphology of Motor Cortex Neurons in the VPA Rat Model of Autism, 3. <https://doi.org/10.1002/dev.20337>
- Soma, L. R., Robinson, M. A., You, Y., Boston, R. C., & Rudy, J. (2018). Pharmacokinetics, disposition, and plasma concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) in the horse following topical, oral, and intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 41(3), 384–392. <https://doi.org/10.1111/jvp.12476>
- Song, Y. M., Song, S.-O., Jung, Y.-K., Kang, E.-S., Cha, B. S., Lee, H. C., & Lee, B.-W. (2012). Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. *Autophagy*, 8(7), 1085–1097. <https://doi.org/10.4161/auto.20260>
- Sosa-Díaz, N., Bringas, M. E., Atzori, M., & Flores, G. (2014). Prefrontal cortex, hippocampus, and basolateral amygdala plasticity in a rat model of autism spectrum. *Synapse*, 68(10), 468–473. <https://doi.org/10.1002/syn.21759>
- Swanger, S. A., Mattheyses, A. L., Gentry, E. G., & Herskowitz, J. H. (2015). ROCK1 and ROCK2 inhibition alters dendritic spine morphology in hippocampal neurons. *Cellular Logistics*, 5(4), e1133266. <https://doi.org/10.1080/21592799.2015.1133266>
- Swanson, B. N. (1985). Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharm*, 5(1–2), 1–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3916302>
- Swanson, L. W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research*, 886(1–2), 113–164. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119693>
- Sweeten, T. L., Posey, D. J., Shekhar, A., & McDougle, C. J. (2002). The amygdala and related structures in the pathophysiology of autism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71, 449–455. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00697-9](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00697-9)
- Takuma, K., Hara, Y., Kataoka, S., Kawanai, T., Maeda, Y., Watanabe, R., Takano, E., Hayata-takano, A., Hashimoto, H., Ago, Y., & Matsuda, T. (2014). Chronic treatment with valproic acid or sodium butyrate attenuates novel object recognition deficits and hippocampal dendritic spine loss in a mouse model of autism ☆. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 126, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.08.013>

- Tang, G., Gudsruk, K., Kuo, S.-H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., Sonders, M. S., Kanter, E., Castagna, C., Yamamoto, A., Yue, Z., Arancio, O., Peterson, B. S., Champagne, F., Dwork, A. J., Goldman, J., & Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron*, *83*(5), 1131–43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.040>
- Thomas, R., Shoemaker, C. B., Eriks, K., & IUCr. (1966). The molecular and crystal structure of dimethyl sulfoxide, (H₃C)₂SO. *Acta Crystallographica*, *21*(1), 12–20. <https://doi.org/10.1107/S0365110X66002263>
- Tidwell, T. T. (1990). Oxidation of Alcohols by Activated Dimethyl Sulfoxide and Related Reactions: An Update. *Synthesis*, *1990*(10), 857–870. <https://doi.org/10.1055/s-1990-27036>
- Tomson, T., Battino, D., & Perucca, E. (2016). The remarkable story of valproic acid. *The Lancet Neurology*, *15*(2), 141. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00398-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00398-1)
- Troiani, V., & Schultz, R. T. (2013). Amygdala, pulvinar, and inferior parietal cortex contribute to early processing of faces without awareness. *Frontiers in Human Neuroscience*, *7*, 241. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00241>
- Truitt, W. A., Sajdyk, T. J., Dietrich, A. D., Oberlin, B., McDougale, C. J., & Shekhar, A. (2007). From anxiety to autism: spectrum of abnormal social behaviors modeled by progressive disruption of inhibitory neuronal function in the basolateral amygdala in Wistar rats. *Psychopharmacology*, *191*(1), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0674-y>
- Valenzuela, C. F. (1997). Alcohol and neurotransmitter interactions. *Alcohol Health and Research World*, *21*(2), 144–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15704351>
- Vang, O., Ahmad, N., Baile, C. A., Baur, J. A., Brown, K., Csiszar, A., Das, D. K., Delmas, D., Gottfried, C., Lin, H. Y., Ma, Q. Y., Mukhopadhyay, P., Nalini, N., Pezzuto, J. M., Richard, T., Shukla, Y., Surh, Y. J., Szekeres, T., Szkudelski, T., Walle, T., & Wu, J. M. (2011). What is new for an old molecule? systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS ONE*.
- Vyas, A., Bernal, S., & Chattarji, S. (2003). Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Research*, *965*(1–2), 290–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591150>
- Vyas, A., Pillai, A. G., & Chattarji, S. (2004). Recovery after chronic stress fails to

- reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior. *Neuroscience*, 128(4), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.013>
- Wang, M., Li, H., Takumi, T., Qiu, Z., Xu, X., Yu, X., & Bian, W.-J. (2017). Distinct Defects in Spine Formation or Pruning in Two Gene Duplication Mouse Models of Autism. *Neuroscience Bulletin*, 33(2), 143–152. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0111-8>
- Watanabe, Y., Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., & McEwen, B. S. (1992). Phenytoin Prevents Stress- and Corticosterone-induced Atrophy of CA3 Pyramidal Neurons, 2(4), 1985–1989.
- Wohleb, E. S., Terwilliger, R., Duman, C. H., & Duman, R. S. (2018). Stress-Induced Neuronal Colony Stimulating Factor 1 Provokes Microglia-Mediated Neuronal Remodeling and Depressive-like Behavior. *Biological Psychiatry*, 83(1), 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.05.026>
- Xu, X., Miller, E. C., & Pozzo-Miller, L. (2014). Dendritic spine dysgenesis in Rett syndrome. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 97. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00097>
- Young, V., Boswell, C., Centeno, R., & Watson, M. (2005). DMSO: Applications in plastic surgery. *Aesthetic Surgery Journal*, 25(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.asj.2005.01.015>
- Yuan, C., Gao, J., Guo, J., Bai, L., Marshall, C., Cai, Z., Wang, L., & Xiao, M. (2014). Dimethyl Sulfoxide Damages Mitochondrial Integrity and Membrane Potential in Cultured Astrocytes. *PLoS ONE*, 9(9), e107447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107447>
- Zancan, M., Dall'Oglio, A., Quagliotto, E., & Rasia-Filho, A. A. (2017). Castration alters the number and structure of dendritic spines in the male posterodorsal medial amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 45(4), 572–580. <https://doi.org/10.1111/ejn.13460>
- Zaytsev, A. (1867). Ueber die Einwirkung von Salpetersäure auf Schwefelmethyl und Schwefeläthyl. *Annalen Der Chemie Und Pharmacie*, 144(2), 148–156. <https://doi.org/10.1002/jlac.18671440205>
- Zierkiewicz, W., & Privalov, T. (2005). A Theoretical Study of the Essential Role of DMSO as a Solvent/Ligand in the Pd(OAc)₂/DMSO Catalyst System for Aerobic Oxidation. <https://doi.org/10.1021/OM0506217>

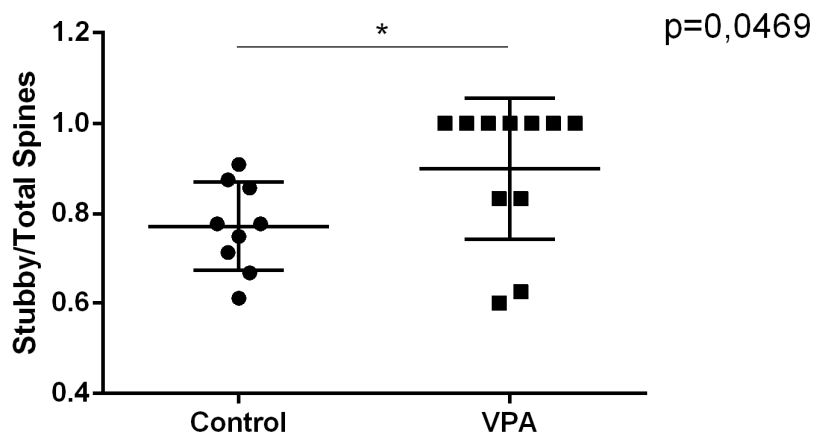
8. ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta universidade.

O Projeto: 33879 - ANÁLISE DE ESPINHOS DENDRÍTICOS EM NÚCLEOS DA AMÍGDALA NO MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO ÁCIDO VALPROÍCO, coordenado pela Professora Doutora Carmem Gottfried, como parte da dissertação de seu orientado de mestrado, Gustavo Brum Schwingel. Serão empregados 24 fêmeas em idade fértil e 8 machos, totalizando 32 animais genitores. O cálculo amostral estimou um ?n? de 8 animais por grupo e considerando a existência de 2 grupos analisados, e levando em consideração uma média de 4 machos por ninhada, estima-se a utilização de 64 filhotes machos. Serão utilizados ratos Wistar provenientes do biotério setorial do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. os animais serão anestesiados profundamente por administração de lidocaina (7 mg/Kg) para analgesia e tiopental (120 mg/Kg) para anestesia profunda. Após a administração de heparina (1000 IU), serão submetidos à uma perfusão transcardíaca rápida (90 segundos desde abertura da caixa torácica). Os progenitores e as fêmeas serão eutanasiados com sobredose de isoflurano com posterior decapitação confirmatória. O projeto atendeu as recomendações da CEUA-UFRGS e encontra-se aprovado.

CEUA/UFRGS

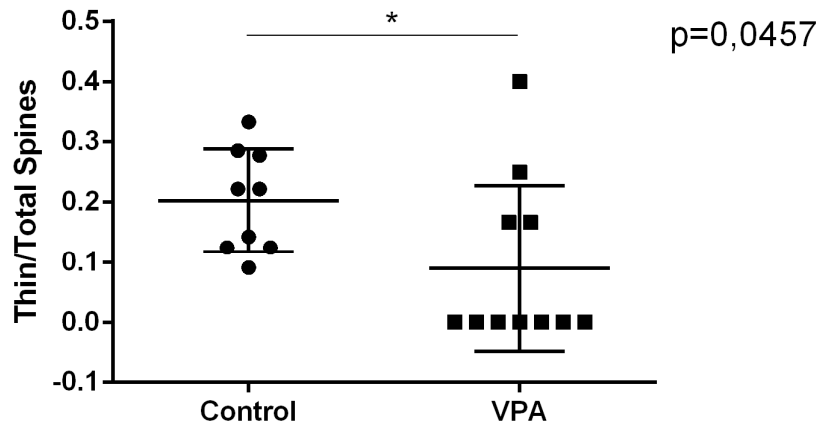
ANEXO 2



p.s.: correcting by dendro-somatic distance (40 μm)

Figura 1 – anexo: análise da densidade de espinhos dendríticos do tipo *Stubby* em relação ao total de espinhos dendríticos em animais de 30 dias na região Cortical da amígdala. Os animais VPA tiveram um aumento em relação aos animais do grupo controle ($p=0,0469$). Teste *t* de Student.

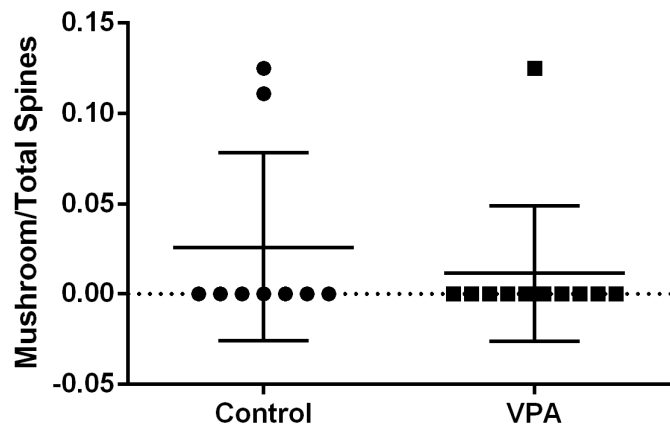
ANEXO 3



p.s.: correcting by dendro-somatic distance (40 μm)

Figura 2 – anexo: análise da densidade de espinhos dendríticos do tipo *Thin* em relação ao total de espinhos dendríticos em animais de 30 dias na região Cortical da amígdala. Os animais VPA tiveram um redução em relação aos animais do grupo controle ($p=0,0457$). Teste *t* de Student.

ANEXO 4



p.s.: correcting by dendro-somatic distance (40 μm)

Figura 3 – anexo: análise da densidade de espinhos dendríticos do tipo *Mushroom* em relação ao total de espinhos dendríticos em animais de 30 dias na região Cortical da amígdala. Não foi verificada nenhuma diferença entre os grupos. Teste *t* de Student.

ANEXO 5

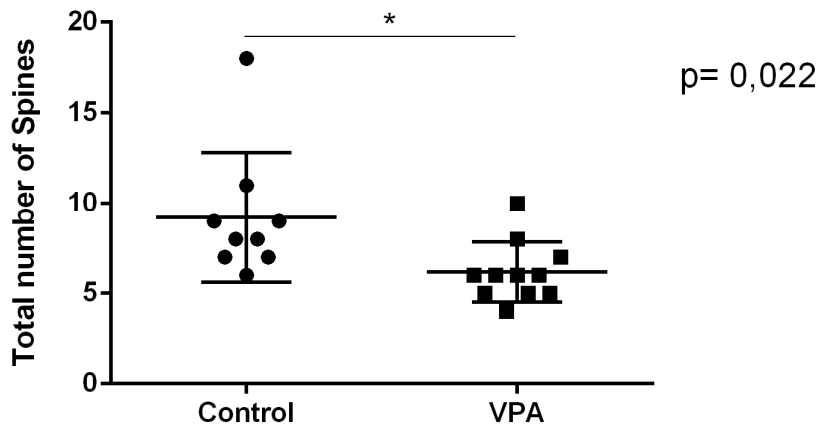


Figura 4 – anexo: análise da quantidade total de espinhos dendríticos em animais de 30 dias na região Cortical da amígdala. Os animais do grupo VPA tiveram uma redução no número total de espinhos dendríticos dessa região ($p=0,022$). Teste *t* de Student.