



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

GUSTAVO BRUM SCHWINGEL

**Efeitos Preventivos do Resveratrol Sobre Prejuízos Perinatais no Modelo Animal de  
Autismo Induzido pelo Ácido Valproico.**

Porto Alegre

2024

Gustavo Brum Schwingel

**Efeitos Preventivos do Resveratrol Sobre Prejuízos Perinatais no Modelo Animal  
de Autismo Induzido pelo Ácido Valproico.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Gottfried

Porto Alegre

2024

### CIP - Catalogação na Publicação

SCHWINGEL, GUSTAVO BRUM

Efeitos Preventivos do Resveratrol Sobre Prejuízos Perinatais no Modelo Animal de Autismo Induzido pelo Ácido Valproico. / GUSTAVO BRUM SCHWINGEL. -- 2024. 111 f.

Orientadora: PROFESSORA CARMEM GOTTFRIED.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. AUTISMO. 2. ÁCIDO VALPROICO. 3. RESVERATROL. 4. POLIFENOL. 5. MODELO ANIMAL. I. GOTTFRIED, PROFESSORA CARMEM, orient. II. Título.

“Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é se tornar o opressor”

**Paulo Freire**

## Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à professora Carmem por ter me orientado desde 2014 em toda a minha jornada acadêmica até aqui. Meu doutorado não foi como eu imaginava que seria, mas com certeza foi uma caminhada de muito aprendizado e de muita transformação. Tive a felicidade de poder desfrutar desse longo caminho sendo muitíssimo bem amparado. Sem dúvidas eu não teria chegado tão longe e superado todos os desafios da vida acadêmica sem ter uma orientadora que além de toda a experiência e conhecimento científico, também dá diariamente exemplos de gentileza e humanidade, sendo alguém que inspira todos à sua volta. Particularmente, no momento do início da pandemia de COVID-19, a professora prontamente ordenou que os experimentos fossem interrompidos para que preservássemos aquilo que era mais importante: As nossas vidas e as de nossos familiares. A partir desse momento, a tranquilidade, criatividade e incentivo da professora foram decisivos para que fosse possível adaptar os planos de experimentos e seguir em frente de cabeça erguida. Não foi fácil atravessar uma pandemia e lidar com a ansiedade para finalizar os experimentos e retomar à rotina. Mas sem dúvidas, fizemos o que tinha que ser feito. Outro momento crucial no qual o apoio da professora se mostrou indispensável foi quando eu resolvi trabalhar fora do meio universitário e, por isso, abri mão de minha bolsa CAPES. Em nenhum momento a professora deixou de me dar apoio, e, pelo contrário, se dedicou e adaptou nossas rotinas para que, mesmo tendo meus horários ocupados pelo trabalho, eu continuasse me dedicando ao doutorado. Foi fundamental tal compreensão e empatia.

Agradeço aos meus colegas durante o período de pós-graduação Mellanie, Iohanna, Guilherme, Júlio, Mauro e Bruna, que me acompanharam e contribuíram para esse trabalho e para a minha formação como um todo. Só consegui chegar tão longe por poder dividir tantos momentos com vocês. Que o sucesso possa sempre nos acompanhar onde quer que estejamos!

Agradeço aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e sempre me incentivaram a seguir o caminho da educação. Também agradeço a meus tios Mauro e Márcia e Jane e Marcelo e Luiza, e também os primos, Bernardo, Fred e João. Agradeço ainda a todos os meus amigos que compreenderam todas as vezes que tive que abrir mão de momentos para me dedicar ao meu doutorado.

À minha esposa, Priscilla por ser sempre meu porto seguro e por sempre estar ao meu lado em todos os desafios e na pessoa dela agradeço a todos os meus professores.

Agradeço, por fim, às agências de fomento CAPES, CNPq e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial ao Grupo de Pesquisa e Pós-graduação, e também à Unidade de Experimentação Animal do HCPA. Ao PPG Bioquímica e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós Graduação**

**Carta de Aprovação**

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 2017/0280

**Título:** ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE COMPORTAMENTO SOCIAL E SISTEMA PURINÉRGICO NO MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPRÓICO

**Pesquisador Responsável:** RUDIMAR DOS SANTOS RIESGO

**Equipe de Pesquisa:**

CARMEM GOTTFRIED    GUILHERME BAUER NEGRINI    JÚLIO SANTOS TERRA MACHADO

MELLANIE FONTES DUTRA DA SILVA    MAURO MOZEL HIRSCH    IOHANNA DECKMANN

GUSTAVO BRUM SCHWINGEL

**Data de Aprovação:** 05/12/2017

**Data de Término:** 25/05/2019

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade
RATO HETEROGÊNICO	F/60 Dia(s)	40
RATO HETEROGÊNICO	M/60 Dia(s)	10
RATO HETEROGÊNICO	M/21 Dia(s)	48
RATO HETEROGÊNICO	M/30 Dia(s)	72

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

## Resumo

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por déficits na interação social e comportamentos repetitivos/estereotipados. O modelo animal de TEA induzido pelo ácido valproico (VPA) é uma ferramenta consolidada e amplamente usada para investigar aspectos celulares, moleculares e comportamentais relacionados à essa condição. O *trans*-Resveratrol (RSV), um polifenol com efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes estudado em várias doenças, recentemente demonstrou a capacidade de prevenir déficits celulares, moleculares, sensoriais e sociais no modelo VPA. Neste estudo, examinamos os efeitos da exposição pré-natal ao VPA e os potenciais efeitos preventivos do RSV na prole. Monitoramos o peso gestacional em ratas prenhes do dia embrionário 6,5 até o dia 18,5 e avaliamos marcos de desenvolvimento e parâmetros morfométricos nas ninhadas. Utilizamos Equações Estimativas Generalizadas (GEE) para analisar dados longitudinais. A exposição ao VPA durante a gravidez resultou em prejuízo no ganho de peso nos dias embrionários 13,5 a 18,5, seguido por menor número de animais por ninhada. Além disso, descobrimos uma correlação positiva entre a variação de peso durante E15,5-E18,5 e o número de filhotes no grupo VPA. A exposição ao VPA resultou em alterações observadas no comprimento e atrasos no surgimento de marcos de desenvolvimento. Curiosamente, o tratamento pré-natal com RSV não apenas preveniu a maioria desses atrasos, mas também antecipou alguns marcos e melhorou as características morfométricas na prole. Por fim, indicamos a via gabaérgica excitatória embrionária como um possível alvo para os efeitos do VPA no gatilho do TEA. Em resumo, nossas descobertas sugerem que o RSV tem potencial para intervenção terapêutica durante a gestação, destacando sua importância em futuros estudos sobre transtornos do neurodesenvolvimento.

## Abstract

The Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition characterized by deficits in social interaction and repetitive/stereotyped behaviors. The animal model of ASD induced by valproic acid (VPA) is a well-established and widely utilized tool to investigate cellular, molecular, and behavioral aspects related to this condition. *Trans-Resveratrol* (RSV), a polyphenol with anti-inflammatory and antioxidant effects studied in various diseases, has recently demonstrated the ability to prevent cellular, molecular, sensory, and social deficits in the VPA model. In this study, we examined the effects of prenatal exposure to VPA and the potential preventive effects of RSV on offspring. We monitored gestational weight in pregnant rats from embryonic day 6.5 to day 18.5 and assessed developmental milestones and morphometric parameters in the litters. Generalized Estimating Equations (GEE) were employed for longitudinal data analysis. Exposure to VPA during pregnancy resulted in impaired weight gain on embryonic days 13.5 to 18.5, accompanied by a reduced number of animals per litter. Furthermore, we identified a positive correlation between weight variation during E15.5-E18.5 and the number of pups in the VPA group. VPA exposure led to observed changes in length and delays in the emergence of developmental milestones. Interestingly, prenatal treatment with RSV not only prevented most of these delays but also anticipated some milestones and improved morphometric characteristics in the offspring. Finally, we suggest the embryonic excitatory GABAergic pathway as a possible target for VPA effects triggering ASD. In summary, our findings suggest that RSV holds therapeutic intervention potential during gestation, underscoring its significance in future studies on neurodevelopmental disorders.



### **Lista de abreviaturas**

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSM: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

ED: Dia Embionário

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GEE: Equações Estimativas Generalizadas

LPS: Lipopolissacarídeo

PND: Dia Pós-Natal

RSV: Resveratrol

TDAH: Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TEA: Transtorno do Espectro Autista

VPA: Ácido Valproico

## Índice

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1. Transtorno do Espectro Autista.....	10
1.2. Aspectos etiológicos do TEA.....	11
1.2.1. Fatores de risco genéticos:.....	11
1.2.2. Fatores de risco ambientais:.....	12
1.3. Uso de ácido valproico (VPA) em mulheres em idade fértil com epilepsia e o Dilema Terapêutico .....	14
1.4. Modelo animal de TEA induzido pela exposição pré-natal ao VPA.....	16
1.5. Sintomas Comportamentais nas Fases Iniciais do Transtorno do Espectro Autista: Necessidade de Avaliação Precoce. ....	18
1.6. Uso do trans-resveratrol (RSV) como ferramenta de estudo no modelo VPA.....	20
2. OBJETIVOS .....	22
2.1. Objetivos Gerais .....	22
2.2. Objetivos Específicos .....	22
3. METODOLOGIA .....	23
3.1. Indução do modelo animal de autismo .....	23
3.2. Aspectos éticos .....	24
3.3. Avaliação dos Marcos do desenvolvimento.....	25
3.4. Busca de artigos para a revisão narrativa.....	27
4. CAPÍTULO I: Artigo científico publicado no periódico IBRO Neuroscience Reports.....	28
5. CAPÍTULO II: Texto do manuscrito em fase de finalização de figuras e tabelas, envolvendo os efeitos biológicos do VPA e do RSV.....	57
6. DISCUSSÃO .....	86
7. REFERÊNCIAS.....	105

## ***1. INTRODUÇÃO***

### ***1.1. Transtorno do Espectro Autista***

O Transtorno do Espectro Autista (TEA), inicialmente descrito em 1926 pela pesquisadora russa Grunya Sukhareva (Posar and Visconti, 2017), seguido por Leo Kanner em 1943 (Kanner, 1968), representa uma condição complexa que tem sido objeto de constante pesquisa e classificação ao longo do tempo. Dentre os transtornos do neurodesenvolvimento, o TEA vem aumentando a prevalência, chegando a 1:36 nos estados unidos (Maenner et al., 2023), estimando-se 1% no Brasil. (APA, 2013).

O TEA compreende uma ampla gama de manifestações clínicas e comportamentais que podem variar consideravelmente entre os indivíduos afetados, cujos sintomas tipicamente se manifestam na primeira infância, e que resultam em alterações nas habilidades sociais, acadêmicas, pessoais e ocupacionais (APA, 2013), tornando o diagnóstico e a compreensão do TEA complexo e multifacetado.

Os critérios diagnósticos descritos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) 5, estabelecem uma díade de características essenciais que incluem prejuízo na comunicação e interação social em múltiplos contextos, incluindo déficits em reciprocidade social, comunicação não-verbal utilizada para interação social e em habilidades para iniciar, manter e entender relacionamentos e comportamentos repetitivos, atividades e interesses restritos (APA, 2013). Embora haja um conjunto específico de critérios diagnósticos, é fundamental compreender que o TEA é uma desordem heterogênea e multifatorial (Gottfried et al., 2013a). O transtorno pode estar presente em indivíduos com manifestações distintas e tão vastas, que dois indivíduos não compartilham o mesmo conjunto de sintomas (Gadia et al., 2004; Rapin and Tuchman, 2008). Entretanto, é importante destacar que todos os indivíduos com TEA demonstram a díade

descrita no DSM-5. A intensidade dessas alterações pode variar consideravelmente, mas elas persistem ao longo de toda a vida (Tuchman et al., 2009).

Esta diversidade intrínseca no TEA ressalta a necessidade de uma abordagem personalizada e adaptável ao diagnóstico e ao tratamento. Compreender a complexidade das manifestações do TEA é fundamental para o desenvolvimento de intervenções eficazes e para melhorar a qualidade de vida das pessoas afetadas por essa condição.

Embora o autismo seja decorrente de associação entre fatores ambientais e genéticos ainda durante a gestação, o diagnóstico somente será possível após dois ou três anos de idade. Apesar de existirem sintomas que não podem ser percebidos nesta idade, muitos pais percebem problemas no progresso social ou comunicativo das crianças. Os déficits sociais não são propriamente claros na infância, porém gradualmente se torna mais evidente (Dover & Le Couteur, 2007).

## ***1.2. Aspectos etiológicos do TEA***

### ***1.2.1. Fatores de risco genéticos:***

Estudos de famílias, gêmeos e análises de hereditariedade indicam uma forte base genética no TEA. A concordância em gêmeos monozigóticos é significativamente maior do que em gêmeos dizigóticos, sugerindo uma herança genética importante, com estimativas de herdabilidade variando de 50% a 90% (Tick et al., 2016). Além disso, familiares de primeiro grau de indivíduos com TEA apresentam um risco aumentado de manifestar traços autistas subclínicos, reforçando a influência genética na expressão fenotípica (Sandin et al., 2017).

Uma das descobertas mais robustas é a associação entre mutações *de novo*, especialmente aquelas em genes relacionados à função sináptica e ao desenvolvimento neural, e o risco de autismo. Estudos de sequenciamento completo de exoma e

sequenciamento de genoma inteiro identificaram alguns genes candidatos, incluindo CHD8, DYRK1A, SCN2A, e SHANK3, que desempenham papéis críticos na regulação da plasticidade sináptica e no desenvolvimento neuronal (De Rubeis et al., 2014; Gaugler et al., 2014; Sanders et al., 2015)

Além disso, algumas condições genéticas, como síndrome do X-frágil e esclerose tuberosa, apresentam alta correlação com TEA (Brown et al., 1982; Belmonte et al., 1995; Turk and Graham, 1997; Numis et al., 2011; Feliciano et al., 2013).

### ***1.2.2. Fatores de risco ambientais:***

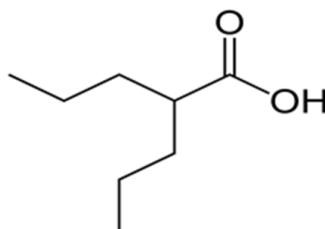
A idade avançada dos genitores, independentemente do sexo, parece estar envolvida no desencadeamento do TEA (Durkin et al., 2008). Porém, fatores como, baixa fertilidade e mudança do estilo de vida em pessoas com mais de 40 anos também são possíveis explicações para esse achado (Olsen and Zhu, 2009).

Outros componentes intimamente envolvidos com o desencadeamento do TEA são as alterações no sistema imunológico durante a gestação (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 pela prole (Korvatska et al., 2002; Croen et al., 2005; Atladóttir et al., 2010). Esses achados são corroborados por estudos envolvendo modelos animais (Malkova et al., 2012; Bauman et al., 2014) e, juntamente com as alterações imunológicas encontradas em pessoas com TEA (Ashwood et al., 2011), ajudam a estabelecer a natureza neuroimune desse transtorno.

Além disso, estudos epidemiológicos arrolaram o anti-covulsivante ácido valproico (VPA, 2 propil pentanoico) na lista de fatores ambientais de risco para o desencadeamento do TEA, (Christensen et al., 2013; Rouillet et al., 2013a; Smith and Brown, 2014). O VPA

pertence à classe dos ácidos carboxílicos com uma cadeia ramificada no carbono 2 (Figura 1). Farmacologicamente, é amplamente utilizado como um medicamento anticonvulsivante e estabilizador de humor. Atua aumentando os níveis de ácido gama-aminobutírico (GABA), contribuindo para a redução da atividade neuronal excessiva, promovendo modificações epigenéticas e modulação dos fatores neurotróficos derivados do encéfalo (BDNF) e da glia (GDNF) (Romoli et al., 2019).

O metabolismo do VPA é caracterizado principalmente por três rotas: glucuronidação (50%); beta-oxidação (40%); e oxidação mediada pelo citocromo P450 (CYP) (10%). Apenas uma pequena quantidade de VPA é excretada inalterada na urina (1–3%), com meia-vida sérica variando de 12 a 16 horas e de 8,6 a 12,3 horas para adultos e crianças, respectivamente. Isso representa que mais de 90% do VPA administrado é absorvido antes da excreção (Teixeira-Da-silva et al., 2022; Yang et al., 2017). Embora o mecanismo de glucuronidação seja uma resposta do organismo para favorecer excreção renal, tem sido descrito que alguns fármacos glucuronidados podem ampliar sua potência farmacológica (Yang et al., 2017).



**Figura 1. Estrutura química do Ácido Valproico.** Fórmula química: C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>.

Nome IUPAC: 2-propylpentanoic acid. Massa molar: 144.2 g mol<sup>-1</sup>.

O VPA foi capaz de aumentar significativamente o risco do desenvolvimento de autismo nos filhos de mães que faziam uso deste medicamento durante o primeiro trimestre de gestação (Christensen et al., 2013; Harden, 2013). Essas observações auxiliaram o estabelecimento de um modelo animal para o estudo de autismo, induzido farmacologicamente pela exposição pré-natal ao VPA (Rodier et al., 1997; Schneider & Przewłocki, 2005).

### ***1.3. Uso de ácido valproico (VPA) em mulheres em idade fértil com epilepsia e o Dilema Terapêutico***

A epilepsia representa um desafio significativo para mulheres em idade fértil, pois a necessidade de controle efetivo das convulsões deve ser conciliada com as potenciais consequências reprodutivas associadas aos medicamentos antiepilépticos. O manejo do tratamento de mulheres com epilepsia utilizando VPA é uma questão de considerável importância clínica. Estudos epidemiológicos indicam que uma proporção significativa de mulheres em idade reprodutiva com epilepsia é prescrita com VPA devido à sua eficácia no controle de crises convulsivas.

Quase 10% da população mundial irá sofrer quadros convulsivos durante a vida. (Bromley et al., 2013; Hauser & Beghi, 2008). Estudos sugerem uma maior prevalência de epilepsia em homens do que em mulheres ainda que alguns autores sugiram uma subnotificação da epilepsia em algumas localidades devido a fatores culturais, além disso, a maior parte dos pacientes encontra-se em idade jovem-adulta, sendo mais frequente nessa faixa etária do que os pacientes em idade infantil e idosos, portanto, seria razoável postular que boa parte das mulheres que sofrem com epilepsia encontra-se em idade fértil (Beghi, 2020; Devinsky et al., 2018; Fiest et al., 2017; Kishk et al., 2019)

Muitas dessas mulheres em idade fértil, podem requerer tratamento farmacológico para controle das crises convulsivas (Devinsky et al., 2018).

O VPA é frequentemente prescrito como uma opção terapêutica eficaz para o manejo da epilepsia em mulheres, devido à sua capacidade de modular os canais de íons de sódio e cálcio, bem como potencializar a neurotransmissão GABAérgica (Tomson et al., 2011). O VPA é considerado o fármaco com maior espectro de atuação e é utilizado em todos os tipos de epilepsias, sendo comumente relatado como o fármaco de primeira escolha para o tratamento, tendo melhores resultados em epilepsias sintomáticas generalizadas, parciais e focais (Aldenkamp et al., 2006; Gerstner et al., 2008; Thijs et al., 2019). Estima-se que uma proporção significativa de mulheres em idade reprodutiva com epilepsia seja tratada com VPA, devido à sua eficácia no controle das convulsões (Tomson et al., 2019).

No entanto, o uso de VPA em mulheres em idade fértil requer uma avaliação cuidadosa dos riscos potenciais para a saúde fetal, uma vez que o VPA tem sido associado a riscos teratogênicos, incluindo um aumento no risco de transtornos do espectro autista em crianças nascidas de mães que utilizaram o medicamento durante a gestação (Bromley et al., 2013; Christensen et al., 2013; Hernández-Díaz et al., 2012) Essa preocupação com os potenciais efeitos adversos sobre o desenvolvimento fetal tem levado a uma revisão das diretrizes clínicas e uma reavaliação do uso de VPA em mulheres em idade reprodutiva com epilepsia (Bromley et al., 2013).

Em face dessas considerações, é essencial que as mulheres com epilepsia em idade fértil sejam adequadamente informadas sobre os potenciais riscos e benefícios do tratamento com VPA, e que tenham acesso a opções terapêuticas alternativas que possam oferecer um perfil de segurança mais favorável durante a gravidez (Tomson et al., 2020).



Uma abordagem individualizada e multidisciplinar é fundamental para garantir o manejo adequado da epilepsia e a proteção da saúde materna e fetal nessas circunstâncias desafiadoras.

Essa dicotomia entre a necessidade de controle eficaz das convulsões e os potenciais riscos para o desenvolvimento fetal coloca mulheres e médicos em uma encruzilhada complexa ao tomar decisões sobre o tratamento. A conscientização sobre as implicações teratogênicas do VPA e outros medicamentos antiepiléticos no contexto da idade fértil feminina e eventual gestação incentivou o surgimento da nova geração fármacos para o tratamento eficaz da epilepsia, dentre eles o levetiracetam e a lamotrigina. Esses fármacos se destacam por não apresentarem associação entre seu uso na gestação e desfechos como transtornos do neurodesenvolvimento, má formação congênita e má formações cardíacas na prole. (Björk et al., 2022; Veroniki et al., 2017)

Gerenciar a epilepsia em mulheres em idade fértil demanda um equilíbrio delicado entre otimizar o controle de convulsões e mitigar possíveis danos ao feto em desenvolvimento. A relevância de considerar não apenas a saúde imediata da paciente através do controle das crises, mas também os potenciais impactos no desenvolvimento da prole, destaca a complexidade dessa decisão. (Holmes, 2002; Meador et al., 2010; Tomson et al., 2019)

#### ***1.4. Modelo animal de TEA induzido pela exposição pré-natal ao VPA.***

Entre modelos animais que simulam comportamentos do tipo autista, a exposição pré-natal ao VPA é um dos mais empregados, com validades preditivas, de face e de construto. Estudos sobre biodisponibilidade do VPA em animais, mostram que o VPA é metabolizado no fígado através de várias vias que envolvem oxidação, glucuronidação e beta-oxidação, bem como conjugação com carnitina ou glicina. O VPA é metabolizado

principalmente pela via de glicuronidação, que é mediada pela enzima UDP-glucuronosiltransferase (UGT), levando à formação de valproato glicuronídeo, o principal metabólito inativo do VPA. Os outros metabólitos principais do VPA incluem ácido 2-propil-4-pentenóico (4-eno-VPA), ácido 2-propil-2-pentenóico (2-eno-VPA), 3-ceto-VPA, 3-hidroxi-VPA e valproil-CoA. Entre estes metabolitos, alguns possuem atividade anticonvulsivante, enquanto outros apresentam toxicidade ou inatividade.

Os filhotes machos de fêmeas expostas ao VPA apresentaram várias características semelhantes às encontradas em pacientes com autismo, assemelhando-se tanto aos sintomas centrais quanto a algumas comorbidades observadas no TEA (Schneider & Przewlocki, 2005; Schneider et al., 2008a; Rouillet et al., 2010; Bambini-Junior et al., 2011). Os animais do modelo apresentam alguns prejuízos comportamentais correspondentes aos observados em pacientes, como prejuízo social estereotípias e rigidez comportamental (Schneider et al., 2008b; Schneider & Przewlocki, 2005) esse de extrema importância, visto que o diagnóstico de autismo é dado através da avaliação comportamental. Entre outros comportamentos alterados nesse modelo, destacam-se atividade exploratória aumentada em campo aberto (Tsujino et al., 2007a; Schneider et al., 2008b), aumento de padrões tipo ansioso (Markram et al., 2008; Schneider et al., 2008b), aumento da memória de tarefas aversivas (Markram et al., 2008) e menor sensibilidade a estímulos nocivos (Schneider et al., 2008b; Wang et al., 2016) Alterações no ciclo sono-vigília e diminuição nas interações sociais e nas respostas emocionais são características predominantes no autismo e foram também relatados no modelo animal (Tsujino et al., 2007b).

Diversas alterações envolvendo o sistema nervoso central foram observadas em modelos de TEA em roedores pela exposição pré-natal ao VPA (Baum et al., 2015; Jumah

et al., 2016; Yang et al., 2016). Os roedores expostos ao VPA expressam também alterações moleculares e imunológicas semelhantes às observadas no autismo (Gottfried et al., 2013b), incluindo o funcionamento alterado dos sistemas opioidérgicos (Schneider et al., 2007), serotoninérgicos (Tsujino et al., 2007b), dopaminérgicos (Nakasato et al., 2008), GABAérgicos (Fukuchi et al., 2009) e glutamatérgicos (Bristot Silvestrin et al., 2013). Da mesma forma, em ratos, a indução por VPA tem um efeito irreversível na migração e maturação dos neurônios serotoninérgicos (Miyazaki et al., 2005).

Uma vez que os critérios para diagnóstico do TEA são clínicos e resultam de análises comportamentais, atualmente, é impossível 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 (Favre et al., 2013; Kataoka et al., 2013). Dessa forma, surge a possibilidade de estudo e manipulação de vias biológicas para compreensão e, até mesmo, prevenção do surgimento das alterações comportamentais típicas do TEA. Uma das principais metas do nosso grupo de pesquisa é a modulação de gatilhos etiológicos por moléculas que agem em alguns sistemas de sinalização como tentativa de prevenir ou atenuar o efeito do VPA após a indução do modelo de TEA.

### ***1.5. Sintomas Comportamentais nas Fases Iniciais do Transtorno do Espectro***

#### ***Autista: Necessidade de Avaliação Precoce.***

Desde os primeiros meses de vida, bebês que mais tarde serão diagnosticados com TEA podem apresentar sinais sutis de diferenças no desenvolvimento social, comunicação e interação (Baranek et al., 2006). Eles podem não responder ao contato visual ou ao sorriso de seus cuidadores da mesma forma que outras crianças. Atrasos na

linguagem e na comunicação verbal e não-verbal também podem ser observados. Além disso, muitos bebês com TEA podem exibir comportamentos repetitivos ou restritos, como movimentos estereotipados das mãos ou fixação intensa em determinados objetos (Ozonoff et al., 2008).

A avaliação cuidadosa desses sintomas comportamentais nas fases iniciais do desenvolvimento é crucial por várias razões. Primeiramente, a intervenção precoce pode ter um impacto significativo no desenvolvimento das habilidades sociais, de comunicação e cognitivas das crianças com TEA. Quanto mais cedo os sintomas forem identificados e tratados, maior a probabilidade de melhorias a longo prazo (Dawson et al., 2010).

Além disso, a identificação precoce permite que os profissionais de saúde e os pais compreendam as necessidades específicas da criança e adaptem estratégias de intervenção de acordo. Isso pode incluir terapias comportamentais, educacionais e ocupacionais direcionadas para atender às necessidades individuais da criança.

Por fim, a avaliação precoce do TEA também é fundamental para a pesquisa e a compreensão mais aprofundada dessa condição. O estudo de sintomas comportamentais desde as fases iniciais pode lançar luz sobre as origens e os fatores de risco subjacentes ao TEA, bem como fornecer observações valiosas sobre a trajetória de desenvolvimento das crianças afetadas (Zwaigenbaum et al., 2015).

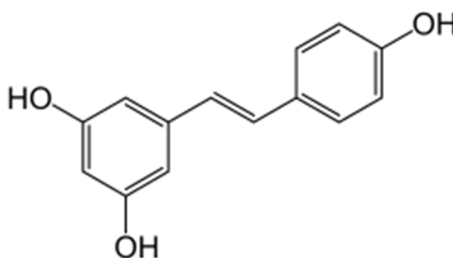
Em resumo, a identificação e a avaliação precoce dos sintomas comportamentais nas fases iniciais do TEA são cruciais para proporcionar às crianças afetadas as melhores oportunidades de intervenção e desenvolvimento. Além disso, essas práticas são essenciais para avançar a compreensão do TEA e para apoiar as famílias afetadas por essa condição complexa.

No contexto da pesquisa em TEA, os modelos animais, em particular o modelo induzido pelo VPA, têm emergido como uma ferramenta valiosa. Esses modelos permitem a investigação controlada e sistemática dos mecanismos subjacentes ao TEA e a avaliação de abordagens terapêuticas potenciais. Ao replicar características comportamentais e neurobiológicas observadas em seres humanos com TEA, os modelos animais oferecem *insights* essenciais e oportunidades para explorar intervenções precoces no transtorno. Portanto, este estudo busca contribuir para esse campo de pesquisa, investigando os efeitos do VPA como um modelo de TEA e explorando os efeitos comportamentais em um esforço contínuo para avançar na compreensão e entendimento dessa condição.

#### ***1.6. Uso do trans-resveratrol (RSV) como ferramenta de estudo no modelo***

##### ***VPA.***

O RSV, um polifenol da família dos estilbenos (Figura 2) encontrado nas uvas, é conhecido por suas propriedades clássicas anti-inflamatórias e antioxidantes, e demonstrou benefícios potenciais no tratamento de doenças cardiovasculares, tumores e distúrbios cerebrais (Vang et al., 2011).



**Figura 2. Estrutura química do RSV.** Fórmula química: C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>. Nome IUPAC: 5-[(E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethen-1-yl]benzene-1,3-diol Massa molar: 228.25 g mol<sup>-1</sup>.

Analisar o desenvolvimento precoce no período pós-natal pode oferecer perspectivas sobre como a exposição a fatores de risco pré-natais no início da gestação afeta os resultados após o nascimento. Os marcos do desenvolvimento podem ser indicadores valiosos de crescimento e maturação em indivíduos, refletindo a progressão intricada de elementos fisiológicos, cognitivos e comportamentais. Sua importância reside na capacidade de identificar atrasos potenciais no desenvolvimento neurológico em um estágio inicial, permitindo intervenções precoces.

Nosso grupo de pesquisa já demonstrou anteriormente que o RSV previne alterações sociais, sensoriais, celulares e moleculares no modelo de VPA (Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018; Hirsch et al., 2020; Deckmann et al., 2021; Santos-Terra et al., 2021). No entanto, o papel preventivo do RSV nos primeiros períodos pós-natais e seu impacto nos marcos do desenvolvimento ainda são insuficientemente compreendidos. Portanto, nosso estudo visa determinar possíveis alterações nos marcos do desenvolvimento no modelo VPA.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Analisar os efeitos gestacionais e em animais pré-púberes da indução do modelo animal de TEA induzido pela exposição pré-natal ao VPA, bem como os efeitos do tratamento pré-natal com RSV.

### **2.2. Objetivos Específicos**

a) Avaliar o impacto gestacional da indução do modelo animal de autismo, considerando os seguintes fatores: Número total de filhotes nascidos e analisar uma possível correlação desta com a variação de peso gestacional e possíveis atrasos no dia do aparecimento de marcos do desenvolvimento nos animais expostos prenatalmente ao VPA;

b) Avaliar possíveis prevenção e/ou benefícios causados pela administração gestacional do RSV subcutâneo;

c) Analisar comparativamente os efeitos biológicos do VPA e do RSV previamente descritos e estabelecer uma hipótese para os efeitos observados e sua relação;

d) Analisar atuações das moléculas VPA e RSV com relação aos receptores gabaérgicos, modulação da SIRT1 e no contexto do estresse oxidativo, avaliando hipóteses de efeitos antagônicos.

### **3. METODOLOGIA**

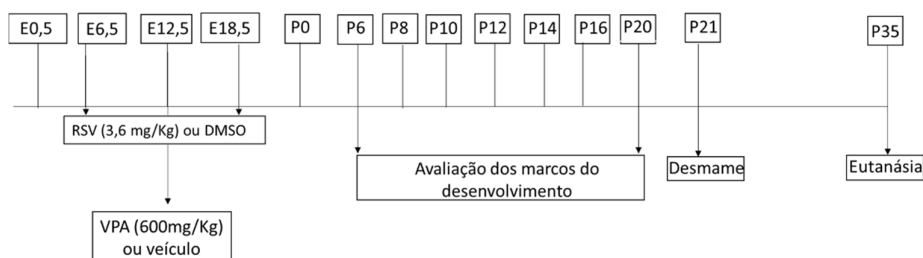
#### **3.1. Indução do modelo animal de autismo**

Foram utilizados ratos Wistar adquiridos pela Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com idade de 60 dias. Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. Sendo colocados no máximo quatro animais por caixa (machos ficarão separados das fêmeas) em alojamento específico para a espécie, com temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade (40-60%) controladas, sistema de exaustão do ar e ciclo de claro:escuro de 12:12 horas.

Na semana do acasalamento, o ciclo estral das fêmeas foi acompanhado e somente fêmeas em ciclo fértil foram acasaladas. Os pareamentos ocorreram ao final da tarde e, na manhã posterior, a verificação da prenhez se deu pela identificação da presença de espermatozoides no canal vaginal, realizada através da visualização do lavado vaginal com solução salina (NaCl 0,9%) em microscópio óptico. Após confirmado o acasalamento (determinado o dia E0,5 de gestação), as ratas foram mantidas em suas caixas de origem até o dia E19. A partir desse momento, as ratas prenhes foram individualizadas para confecção do ninho e dar à luz.

De acordo com o tratamento, as fêmeas prenhes, foram divididas em quatro grupos experimentais: Controle (somente veículos), RSV, VPA e VPA+RSV. Os animais dos grupos RSV e VPA+RSV receberam diariamente, do dia E6,5 ao dia E18,5, por via subcutânea uma dose de 3,6 mg/Kg de RSV ou de seu veículo DMSO em volume equivalente, conforme previamente descrito. (Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018). No dia E12,5 os grupos VPA e RSV+VPA receberam uma dose intraperitoneal de VPA (600 mg/kg de peso corporal), ou de solução salina 0,9%, como previamente descrito (Bambini-Junior et al., 2011)





**Figura 3: Desenho experimental elucidando a ordem cronológica dos experimentos.** E, dia embrionário; P, dia pós-natal.

### 3.2. Aspectos éticos

Todos os procedimentos foram realizados obedecendo aos preceitos éticos que competem à experimentação animal e estarão de acordo com o NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Animals, 2011). O projeto foi submetido para avaliação na Comissão de Ética no Uso de Animais (170280 CEUA/HCPA). Os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, que regulamenta a utilização de animais na pesquisa científica. Os cuidados e manipulação dos animais seguiram as Resoluções normativas 30/2016 (DBCA) e 33/2016 (Capítulo "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações) do CONCEA. A eutanásia seguiu as Diretrizes para a Prática de Eutanásia do CONCEA (RN 37/2018).

Na idade proposta pelo nosso estudo (aproximadamente aos 35 dias de vida, após realização dos testes comportamentais), os filhotes receberam uma dose letal de isoflurano. Após se observar a ausência de reflexos, a animal foi morto por decapitação, como método confirmatório de morte. O restante do corpo do animal foi devidamente descartado em sacos adequados para carcaças.

### 3.3. Avaliação dos Marcos do desenvolvimento

A fim de avaliar os aspectos do desenvolvimento, considerando que já foram observados atrasos no desenvolvimento sensoriomotor no modelo animal de autismo (Schneider & Przewłocki, 2005; Bambini-Junior et al., 2011; Fontes-Dutra et al., 2018; Hirsch et al., 2018) foi realizada a pesagem dos filhotes, bem como avaliação dos marcos do desenvolvimento descritos abaixo, conforme descrito previamente (Schuch et al., 2016):

O pesquisador observou se o animal possuía reflexos sensoriomotores (detalhados na tabela a seguir) característicos do neurodesenvolvimento, na seguinte ordem: 1) endireitamento; 2) marcha; 3) geotaxia negativa; 4) reflexo de aversão ao penhasco; 5) preensão de membro; 6) reflexos sensoriais; 7) sobressalto.

Teste	Descrição	Turno	Desfecho Observado
<b>1) Reflexo de endireitamento</b>	Os ratos foram colocados em decúbito dorsal e foi observado a capacidade de retornar para a posição prona	Tarde	Avaliou-se o momento em que o animal foi capaz de se virar para a posição de prona.
<b>2) Marcha</b>	Os animais foram colocados no centro de um círculo de papel (13 cm de diâmetro) e o dia em que começarem a sair do círculo com ambas as patas dianteiras foi registrado. Um tempo máximo foi atribuído (30 s) quando o animal não foi capaz de sair do círculo.	Tarde	Avaliou-se o tempo para o animal evadir-se do círculo.

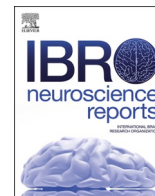
<p><b>3) Geotaxia negativa</b></p>	<p>Os animais foram posicionados em uma rampa inclinada (45°) de 30 cm com a cabeça para baixo. Foi registrado o dia em que eles começarem a se virar 180° e subir a prancha;</p>	<p>Tarde</p>	<p>Avaliou-se o momento que o animal foi capaz de perceber a inclinação da rampa e conseguiu se deslocar em direção ao topo da rampa.</p>
<p><b>4) Reflexo de aversão ao penhasco</b></p>	<p>Os animais foram colocados com suas patas dianteiras na borda da bancada. A capacidade do animal virar-se 180° foi avaliada. Foi atribuído um tempo máximo de observação de 30 s.</p>	<p>Tarde</p>	<p>Avaliou-se o momento em que o animal percebeu a proximidade dele mesmo em relação à bancada e conseguiu se mover no sentido contrário.</p>
<p><b>5) Preensão do membro</b></p>	<p>Os membros anteriores e posteriores serão tocados com uma haste fina, e o primeiro dia de agarrar a haste será anotado;</p>	<p>Tarde</p>	<p>Avaliou-se o momento em que o animal foi capaz de apreender a haste quando seus membros foram estimulados pela mesma, demonstrando reflexo motor.</p>
<p><b>6) Reflexos sensoriais</b></p>	<p>As orelhas e pálpebras foram gentilmente tocadas com pincel e o primeiro dia de contração da orelha e contração da pálpebra foram registrados;</p>	<p>Tarde</p>	<p>Avaliou-se em que momento o animal foi capaz de contrair os músculos responsáveis pela contração de orelhas e pálpebras, demonstrando reflexo sensorial.</p>

<b>7) Sobressalto auditivo</b>	Resposta de sobressalto ao som de palmas foi observada;	Tarde	Avaliou-se em que momento o animal foi capaz de ouvir e reagir ao som.
------------------------------------	--	-------	--

#### ***3.4. Busca de artigos para a revisão narrativa.***

Foi realizada uma revisão da literatura empregando os seguintes termos de pesquisa: 'autism', 'autism spectrum disorder', 'ASD', 'risk genes', 'resveratrol', 'valproate' and 'VPA' com as combinações AND e OR. Esta revisão narrativa, realizada entre dezembro de 2022 e junho de 2023, abrange uma ampla gama de estudos clínicos e pré-clínicos, bem como ensaios observacionais e de intervenção.

**4. *CAPÍTULO I: Artigo científico publicado no periódico IBRO Neuroscience Reports.***



Research paper

## Preventive effects of resveratrol against early-life impairments in the animal model of autism induced by valproic acid

Gustavo Brum Schwingel<sup>a,b,c,d,\*</sup>, Mellanie Fontes-Dutra<sup>a,b,c,d</sup>, Bárbara Ramos<sup>a,b</sup>, Rudimar Riesgo<sup>a,c,d,e</sup>, Victorio Bambini-Junior<sup>c,d,f</sup>, Carmem Gottfried<sup>a,b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Translational Research Group in Autism Spectrum Disorders-GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM), Brazil

<sup>d</sup> Autism Wellbeing and Research Development (AWARD) Initiative, BR-UK-CA, Brazil

<sup>e</sup> Child Neurology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil

<sup>f</sup> Division of Biomedical and Life Sciences, Faculty of Health and Medicine, Lancaster University, Lancaster, United Kingdom



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Autism  
VPA  
Resveratrol  
Milestones  
Animal model  
Morphometric parameters  
Rodent  
Rat

### ABSTRACT

**Background:** Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition characterized by social interaction deficits and repetitive/stereotyped behaviors. Its prevalence is increasing, affecting one in 36 children in the United States. The valproic acid (VPA) induced animal model of ASD is a reliable method for investigating cellular, molecular, and behavioral aspects related to the disorder. *Trans*-Resveratrol (RSV), a polyphenol with anti-inflammatory and antioxidant effects studied in various diseases, has recently demonstrated the ability to prevent cellular, molecular, sensory, and social deficits in the VPA model. In this study, we examined the effects of prenatal exposure to VPA and the potential preventive effects of RSV on the offspring.

**Method:** We monitored gestational weight from embryonic day 6.5 until 18.5 and assessed the onset of developmental milestones and morphometric parameters in litters. The generalized estimating equations (GEE) were used to analyze longitudinal data.

**Results:** Exposure to VPA during rat pregnancy resulted in abnormal weight gain fold-changes on embryonic days 13.5 and 18.5, followed by fewer animals per litter. Additionally, we discovered a positive correlation between weight variation during E15.5-E18.5 and the number of rat pups in the VPA group.

**Conclusion:** VPA exposure led to slight length deficiencies and delays in the onset of developmental milestones. Interestingly, the prenatal RSV treatment not only prevented most of these delays but also led to the early onset of certain milestones and improved morphometric characteristics in the offspring. In summary, our findings suggest that RSV may have potential as a therapeutic intervention to protect against the negative effects of prenatal VPA exposure, highlighting its importance in future studies of prenatal neurodevelopmental disorders.

### 1. Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental condition characterized by impairments in two primary domains: deficits in social communication and interaction, as well as the presence of repetitive and stereotyped behaviors (American Psychiatry Association (APA), 2013). Over recent years, the prevalence of ASD among children in the general population has risen, with one in 36 children being diagnosed with ASD in the United States (Maenner et al., 2023). Diagnosis is primarily clinical and typically occurs when children exhibit traits associated with these

two domains, meeting diagnostic criteria. However, tools facilitating the early identification of developmental milestones have gained increasing importance.

Unusual sensory responses have been reported in up to 69–90% of children with ASD (Baranek et al., 2006), indicating atypical sensory development in this disorder. These sensory impairments have been described as early as 6 months of age in children later diagnosed with autism at 24 months, persist to postnatal life, and can predict social communication impairments and repetitive behaviors (American Psychiatry Association (APA), 2013), potentially aiding ASD diagnosis

\* Corresponding authors at: Translational Research Group in Autism Spectrum Disorders-GETTEA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail addresses: [brumschwingel@gmail.com](mailto:brumschwingel@gmail.com) (G.B. Schwingel), [cgottfried@ufrgs.br](mailto:cgottfried@ufrgs.br) (C. Gottfried).

<https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2023.09.008>

Received 11 May 2023; Received in revised form 2 September 2023; Accepted 21 September 2023

Available online 23 September 2023

2667-2421/© 2023 Published by Elsevier Ltd on behalf of International Brain Research Organization. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(Robertson and Baron-Cohen, 2017). Before 24 months of age, children with ASD may exhibit behavioral alterations such as hypo-responsiveness to novel stimuli, atypical motor behaviors, and impairments in social, communication, and play behaviors. While a definitive diagnosis from 18 to 24 months is rare, these early observations contribute to a better understanding of sensory development and its relevance for early ASD detection and interventions (Siemann et al., 2020). Motor disturbances are a common feature in these patients, with prevalence rates exceeding 50% depending on the parameter assessed. Deficits in fine motor skills and altered movement planning are also frequently noted and these impairments may emerge as early as six months of age, predicting language outcomes manifesting around 3 years of age (Bradley et al., 2016). Investigating motor impairments in ASD is pivotal for early intervention and improved outcomes.

The gestational period and disruptions during this phase are linked to an elevated risk of neurodevelopmental disorders in offspring. Prenatal risk factors such as maternal infections (Jiang et al., 2016), advanced parental age (Wu et al., 2017), and maternal use of the anti-convulsant and mood stabilizer valproate (VPA) during the first trimester of gestation (Modabbernia et al., 2017) have been associated with ASD outcomes in offspring (Christensen et al., 2013; Modabbernia et al., 2017).

VPA has been shown to induce ASD-like impairments in rodents, establishing a reliable animal model of ASD (Rodier et al., 1997; Schneider and Przewlocki, 2005). This model replicates social and repetitive/stereotypical behaviors observed in ASD individuals, demonstrating face, construct, and predictive validity (Mabunga et al., 2015). These animals also exhibit developmental delays in the onset of behavioral milestones, highlighting global dysfunctions and supporting the hypothesis of general sensorimotor impairments early in life (Ruhela et al., 2019; Schneider and Przewlocki, 2005), along with immune system impact, increased oxidative stress and pro-inflammatory responses (Deckmann et al., 2019; Gottfried et al., 2015).

Resveratrol (RSV), a polyphenol found in grapes, is known for its classical anti-inflammatory and antioxidant properties, and has demonstrated potential benefits in treating cardiovascular diseases, tumors, and brain disorders (Vang et al., 2011). Our research group has previously shown that RSV prevents social, sensory, cellular, and molecular alterations in the VPA model (Bambini-Junior et al., 2014; Deckmann et al., 2019; Fontes-Dutra et al., 2018; M. M. Hirsch et al., 2020; Santos-Terra et al., 2021). However, the preventive role of RSV in early postnatal periods and its impact on developmental milestones remains insufficiently understood.

Investigating early development in postnatal life can offer insights into the effects of prenatal risk factor exposure during early gestation on postnatal outcomes. Developmental milestones can be valuable indicators of growth and maturation in individuals, reflecting the intricate progression of physiological, cognitive, and behavioral elements. Their importance lies in the ability to identify potential delays in neurological development at an early stage, enabling early interventions.

Therefore, our study aims to analyze the effects of prenatal exposure to VPA on pregnant female rats, as well as their litters' early postnatal life, evaluating behavioral hallmarks commonly performed in the literature. We also aim to observe if prenatal treatment with RSV can have a preventive effect on VPA-induced abnormalities in both pregnant female rats and their VPA-exposed litters.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Animals

Sixty-day-old primiparous female Wistar rats were obtained from the Center of Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals (CREAL) at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The rats were housed in plastic cages (410 mm/340 mm/160 mm – length/width/height) without environmental enrichment, accommodating four

to five rats per cage. Rats were grouped based on similar weight and individually marked on the tail. Cage dimensions provided a total inside area of 1110 cm<sup>2</sup> with an area of above 277.5 cm<sup>2</sup> per animal. For reproduction animals, cages were arranged with alternating female and male cages to expose females to the male scent. The animals were maintained under a standard 12/12-h light/dark cycle (light cycle 7 am to 7 pm), and at a constant temperature of 22 ± 1°C in the Unity of Animal Experimentation (UEA) at the Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA). The handling of animals followed the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) of Brazil, with ad libitum access to food and water. The ethics committee at HCPA approved this project (HCPA-FIPE #170280 and #160477).

Estrous cycles of female rats were assessed by fresh vaginal lavage under a tenfold optical microscope magnification. Primiparous females in pro-estrous and early estrous phases were monogamously mated overnight with slightly larger males from neighboring cages during the dark cycle. Pregnancy was confirmed by the presence of spermatozoa in the vaginal smear the following morning. The confirmation day was designated Embryonic day 0.5 (E0.5). A total of 38 pregnant rats were randomly assigned to one of four groups: Control, RSV, VPA, or RSV+VPA.

### 2.2. Prenatal weighing and administration of RSV and VPA

Pregnant females were weighed daily on a rodent weighing balance at E0.5 and from E6.5 to E18.5. RSV administration: female received a daily subcutaneous injection of 3.6 mg/kg RSV (Fluxome, Stenløse, Denmark), freshly dissolved at 36 mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO) or received an equivalent volume of the vehicle DMSO, as previously described (Bambini-Junior et al., 2014; Fontes-Dutra et al., 2018). VPA administration: On Embryonic day 12.5 (E12.5), pregnant rats received a single intraperitoneal injection of 600 mg/kg VPA (Acros Organics, NJ, USA), dissolved in 0.9% saline to attain a concentration of 250 mg/mL or received an equivalent volume of 0.9% saline solution. Experimental groups: Control (subcutaneous DMSO from E6.5 to E18.5 and intraperitoneal saline solution at E12.5), RSV (subcutaneous RSV from E6.5 to E18.5 and intraperitoneal saline solution at E12.5), VPA (subcutaneous DMSO from E6.5 to E18.5 and intraperitoneal VPA at E12.5), and RSV+VPA (subcutaneous RSV from E6.5 to E18.5 and intraperitoneal VPA at E12.5).

Pregnant rats were isolated on E19.5 to give birth and all dams gave birth on E22.5 and the litters enter at postnatal development at the same stage of maturity. The birth day was considered postnatal day 0 (P0). The number of pups per litter was counted immediately after birth, with no reports of miscarriages or stillbirths. To maintain gender balance, an equal number of males and females per litter were used for evaluations.

### 2.3. Developmental milestones evaluations

Behavioral milestones were assessed at P6, P8, P10, P12, P14, P16, P18, and P20. After these evaluations, animals were weaned at P21. All assessments were conducted in a specialized room, with animals weighed using a rodent weighing balance and their length measured with a sanitized ruler (excluding the tail length). We carefully observed the emergence of expected developmental milestones, which encompassed criteria such as *Eyes Opening*, *Incisor Teeth Appearance*, and *Ear Reflex*. Instances where the defined milestones did not manifest adequately or where there was an absence of expected progression were not taken into consideration. All apparatuses were sanitized after each test, and observations were carried out on individual animals. To minimize maternal stress, evaluations were conducted on one litter at a time, with gentle handling and minimal manipulation. As the development of each pup was evaluated individually, comparisons were performed individually to better represent performance within groups.

To ensure objectivity, two trained observers conducted all evaluations individually. Observers were unaware of the litter and

experimental group. Measurements were registered only when both observers reached a consensus. *Ear reflex* and *Eyelid reflex* were elicited using a cotton swab stimulus near the ear and eye. The day of appearance of the ear unfolding twitch and eye muscular contraction (blink) was recorded. Incisor teeth appearance was noted when the teeth crown emerged in the hard palate (Mammel et al., 2020).

*Cliff Avoidance* was evaluated by placing animals on an 80 cm high platform and recording the day they exhibited the ability to turn 180 degrees (Fox, 1965; Hou et al., 2018; Ruhela et al., 2019; Schuch et al., 2016; Wolf et al., 1996).

*Negative Geotaxis* was assessed by placing pups on a 45-degree inclined platform with a slightly roughened surface, with their heads pointing downwards. The first day on which the animal successfully completed a full rotation, with its head facing upward, was recorded. If the animal fell during the task, it was not considered (Hou et al., 2018; Ruhela et al., 2019; Schuch et al., 2016).

*Righting Reflex* was evaluated by placing the animal on its back on a paper towel, with the first appearance of a coordinated torsional move using the limbs and/or trunk considered the appearance day. This test is dependent on the intact vestibular and somatosensory system (Wolf et al., 1996). A typical response occurs almost immediately, in one second, with the behavior considered absent if the reflex was absent for more than 30 s (Hayashiuchi et al., 2017; Ogawa et al., 2020; Oka et al., 1992; Wolf et al., 1996).

*Startle Reflex* was evaluated by generating a loud handclap (approximately 80 dB) (Papadakis and Stavroulakis, 2020) about 30–45 cm from the animal. The rapid contraction of skeletal muscles was considered a startle reflex response (Hou et al., 2018; Koch, 1999).

*Limb Positioning and Grip* were assessed using a 2.5 mm covered wire installed in a plate; Gently stimulating the back of fore and hind limbs, extension and hyperextension of the limbs were considered positive for positioning reflex. The first appearance of grasping behavior upon placing the limbs on the wire was recorded (Schönfeld et al., 2017).

The *March Reflex* was assessed by gently placing each pup in the center of a plastic circle with a radius of 6.5 cm. The day of appearance of the reflex was recorded when the animal exited the circle within 30 s (Lubics et al., 2005).

## 2.4. Statistical analysis

The longitudinal data (maternal weight, pups' weight, and length) were analyzed using generalized estimating equations (GEE) after confirming normality through a Shapiro-Wilk test. GEE extends generalized linear models for analyses of repeated measurements, accommodating time-varying covariates. The working correlation matrix was set to the exchangeable matrix for the compound symmetry structure of the data. Inference tests were conducted using Wald Chi-Square Test, followed by post-hoc Bonferroni correction for determining statistical significance. The correlation between relative weight variation (adjusted by initial pregnancy weight) and the number of pups per litter was analyzed using Spearman Rank Correlation Coefficient. Additionally, the number of pups and the developmental milestone onset were analyzed using two-way ANOVA, followed by a post-hoc Tukey test ( $p < 0.05$ ). All statistical analyses were conducted by the Biostatistics Unity of the Research and Post-Graduation Group of Clinical Hospital of Porto Alegre (GPPG/HCPA) using IBM SPSS software (version 28.0.0). Graphs and figures were created using GraphPad Prism software (version 8.0.1 (244)). The data were reported as mean  $\pm$  SD.

## 3. Results

### 3.1. Maternal weight variation and pup numbers

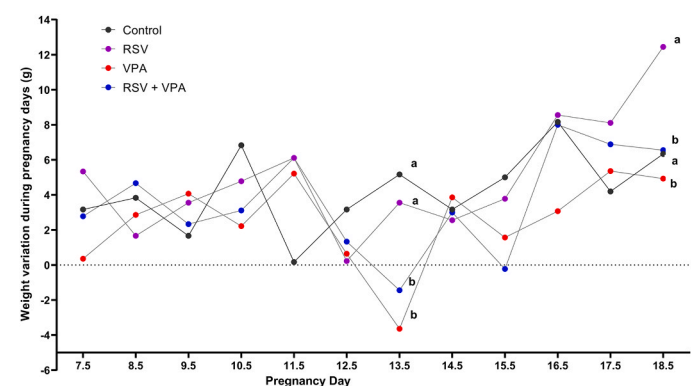
The gross gestational weights are detailed in Table 1A. The weights recorded on pregnancy days 0.5 and 6.5 did not differ among groups ( $p = 0.8530$  and  $p = 0.6490$ , respectively). Delving into the analysis of

maternal weight fluctuations during gestation (Fig. 1 and Tables 1A–1D), we observed a significant weight loss in dams that received VPA on both day 13.5 and day 18.5 ( $P < 0.05$ ). Moreover, as depicted in Fig. S1, a tail kink was observed in the VPA-exposed group, a prevalent trait among VPA-exposed animals. Furthermore, as illustrated in Fig. S1, the VPA-exposed group exhibited a tail kink (A), a prominent characteristic present across all VPA-exposed animals, varying in degrees of curvature. Notably, the administration of RSV did not exhibit efficacy in mitigating these morphological changes (B).

Starting from day 6.5, which marked the initiation of RSV treatment, we aligned subsequent data points with the measurements taken on the preceding day. To explore the potential implications of this weight variation on postnatal outcomes, we subsequently investigated the pup count per litter (Fig. 2 and Table S2). The VPA group exhibited a lower number of pups per litter compared to the Control and RSV groups ( $p < 0.05$ ). Correlation analysis between relative pregnancy fold-change weight variation and total pup count (Fig. 3 and Table S3) revealed a significant correlation in the VPA group from pregnancy days 15.5–18.5 ( $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ), indicated by Spearman Rank Correlation coefficients and corresponding p-values of 0.635 ( $p < 0.05$ ), 0.666 ( $p < 0.01$ ), 0.736 ( $p < 0.01$ ), and 0.780 ( $p < 0.01$ ) on pregnancy days 15.5, 16.5, 17.5, and 18.5, respectively. In contrast, the Control, RSV, and RSV+VPA groups displayed no significant correlation between fold-change weight variation and total pup count during the analyzed pregnancy period.

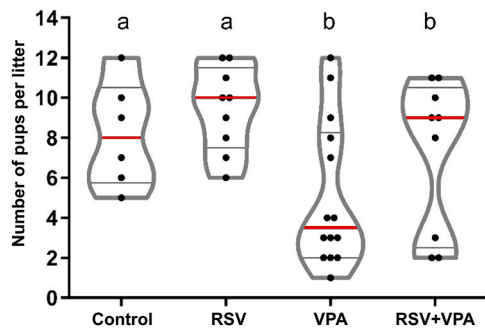
### 3.2. Pup weight and length

Evaluating pup weight and length from postnatal day 6–20, we observed significantly increased weight ( $p < 0.05$  in the RSV group during all assessed periods for both female (Fig. 4A and Table S4) and male (Fig. 4B and Table S5) cohorts. The statistical analysis of weight variation of pups is demonstrated at Table S6. Likewise, RSV-treated animals exhibited greater length compared to other experimental groups ( $p < 0.05$ ) throughout all observed periods in both females (Fig. 4C and Table S7) and males (Fig. 4D and Table S8). The statistical analysis of length variation of pups is demonstrated at Table S9.

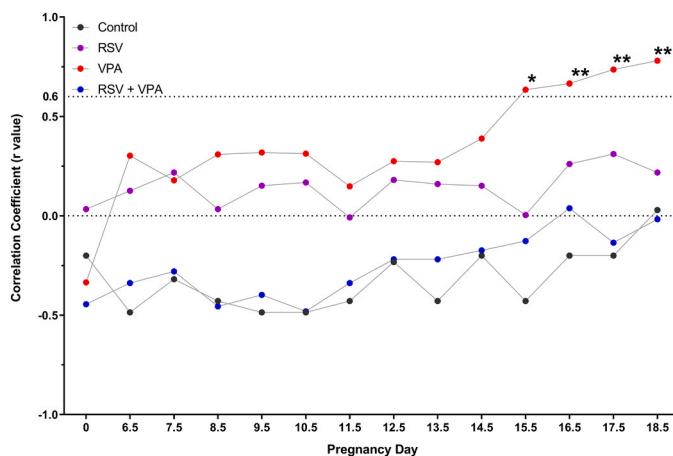


**Fig. 1.** Weight variation among pregnant rats. Weight variation during pregnancy days 6.5–18.5 at each time point. Control = Gray dot ( $n = 6$ ), RSV = Purple dot ( $n = 9$ ), VPA = Red dot ( $n = 14$ ) and RSV+VPA = Blue dot ( $n = 9$ ). Different letters indicate significant statistical difference for non-VPA x VPA groups from generalized estimating equations (GEE), followed by Bonferroni test ( $p < 0.05$ ): day 13.5 (one day after VPA injection) - mean  $\pm$  SD Control:  $5.167 \pm 3.76$ , RSV:  $3.555 \pm 2.01$ , VPA:  $-3.643 \pm 7.00$ , RSV+VPA:  $-1.444 \pm 5.83$ ; VPA: Wald Chi-Square= 29.080 and day 18.5 (Control:  $6.333 \pm 5.24$ , RSV:  $12.444 \pm 3.81$ , VPA:  $4.929 \pm 4.89$ , RSV+VPA:  $6.556 \pm 5.72$ ; VPA: Wald Chi-Square= 29.080). For additional information, refer to Tables 1A–1D.





**Fig. 2.** Number of pups per litter. Control (n = 6 dams, 49 pups), RSV (n = 9 dams, 85 pups), VPA (n = 14 dams, 71 pups) and RSV+VPA (n = 9 dams, 65 pups). Different letters indicate significant statistical differences for non-VPA x VPA groups by two-way ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Values are shown as mean  $\pm$  standard deviation: Control:  $8.167 \pm 2.63$ , RSV:  $9.444 \pm 2.12$ , VPA:  $5.071 \pm 3.62$ , RSV+VPA:  $7.222 \pm 3.80$ ; VPA:  $F = 5.841$ ;  $p = 0.0212$ . For additional information, refer to [Table S2](#).



**Fig. 3.** Correlation between the relative weight variation during pregnancy and number of pups. Control = Gray dot (n = 6 dams n = 49 pups), RSV = Purple dot (n = 9 dams n = 85 pups), VPA = Red dot (n = 14 dams n = 71 pups) and RSV+VPA = Blue dot (n = 9 dams n = 65 pups). Values are shown as Spearman correlation coefficient,  $r_s$ . \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ . For additional information, refer to [Supplementary Table 3](#).

### 3.3. Developmental hallmarks evaluations

The results of developmental hallmarks evaluations (Figs. 5–7) are presented alongside raw data and statistical analysis results in [Tables S10–S13](#). The VPA group demonstrated a significant delay in *Eyes Opening* onset (Fig. 5A–B) compared to the control group in both females (5A,  $p = 0.0007$ ) and males (5B,  $p = 0.006$ ). The RSV treatment was able to prevent this delay. We also noted delayed incisor teeth onset in both female (5C) and male (5D) VPA-exposed groups in comparison to the control group ( $p = 0.008$ ,  $p = 0.0001$ ) and RSV groups ( $p = 0.0013$ ,  $p = 0.0001$ ). Additionally, RSV demonstrated an effect toward earlier *Incisor Teeth* onset in both females ( $p = 0.045$ ) and males ( $p = 0.0285$ ). Analyzing *Ear Reflex* in females (5E), we observed that RSV-treated groups exhibited an earlier onset compared to the control and VPA groups ( $p < 0.0001$ ), and the RSV+VPA group displayed an earlier onset compared to the control group ( $p < 0.05$ ). However, no significant difference was found in males (5F).

Regarding sensorimotor achievements (Fig. 6), the *Cliff Avoidance* onset in females (6A) occurred earlier in RSV-treated groups than in the control and VPA groups ( $p = 0.0071$ ). In contrast, males exposed to VPA demonstrated a delayed onset in *Cliff Avoidance* (6B) compared to the

control group ( $p = 0.007$ ), with this delay being mitigated by RSV. In *Negative Geotaxis*, only males from the VPA group exhibited a delayed onset (Fig. 6D) compared to the control group ( $p = 0.0073$ ). In females, the *Startle Reflex* (6E) displayed an earlier onset in the RSV group compared to the control, VPA, and RSV+VPA groups ( $p = 0.0012$ ,  $p = 0.0017$ , and  $p = 0.0017$ , respectively). Conversely, in males (6F), the VPA-exposed groups exhibited a delayed onset compared to the non-exposed groups ( $p = 0.0007$ ).

*Righting Reflex* (Fig. 7A) showed delayed onset in female VPA-exposed groups compared to the control group ( $p = 0.0394$ ). Similarly, in males (Fig. 7B), both VPA and RSV+VPA groups demonstrated a delayed onset compared to the control ( $p = 0.0093$ ) and RSV ( $p = 0.0087$ ) groups.

For *Lower Limb Grip*, the VPA effect was absent in females compared to the control group (Fig. 7C). In males (Fig. 7D), the VPA group exhibited a delayed onset compared to the control ( $p = 0.0076$ ), RSV ( $p = 0.0004$ ), and RSV+VPA ( $p = 0.0054$ ) groups, which RSV effectively prevented.

*Lower Limb Positioning* (Fig. 7E), showed delayed onset in the female VPA group compared to the Control group ( $p = 0.0079$ ), a delay mitigated by RSV. For males, (Fig. 7F), RSV-treated groups exhibited an earlier onset compared to non-treated groups ( $p = 0.0365$ ).

Regarding *Upper Limb Grip*, females in the VPA group displayed a delayed onset ( $p = 0.0214$ ) compared to the Control group, whereas no significant effect was observed in males ([Tables S11 and S13](#)).

No statistically significant differences were noted in the *Eyelid Reflex*, *March Reflex*, and *Upper Limb Positioning* in both female and male animals ([Tables S11 and S13](#)).

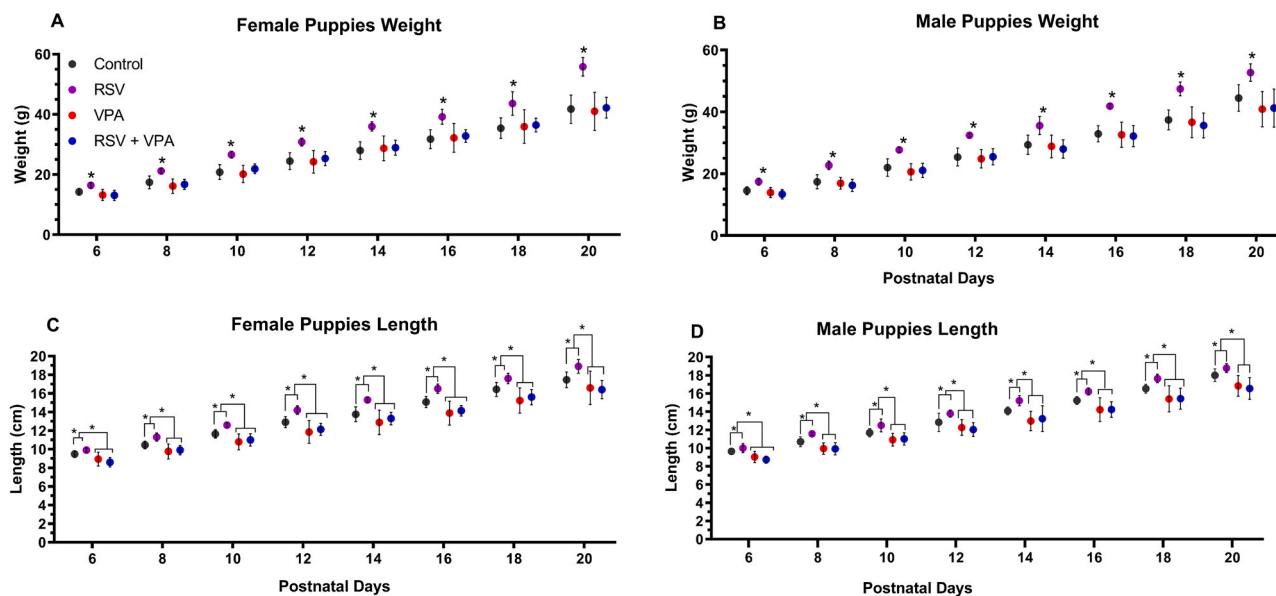
## 4. Discussion

In this study, we observed impaired gestational weight variation at E13.5 and E18.5 in dams exposed to VPA. Additionally, a positive correlation emerged between fold-change weight variation at E15.5, E16.5, E17.5, and E18.5, and the number of pups in the VPA group. Interestingly, the VPA group exhibited fewer pups per litter compared to the other groups. Following VPA injection, pregnant females experienced immediate contractions in the lower abdomen, inducing transient alterations in locomotor behavior and breathing patterns. This acute discomfort likely disrupted eating patterns and potentially interfered with embryonic development. Despite its swift absorption profile, the exact mechanisms underlying this phenomenon remain unclear. Previous studies have shown that VPA, when administered intraperitoneally, is swiftly absorbed by rat metabolism, with detectable presence in the brain, liver, and kidney within ten minutes. Within thirty minutes, VPA reaches peak concentrations in these organs, followed by a subsequent decline, with 97% of VPA radioactivity lost within 24 h (Aly and Abdel-Latif, 1980). Although the rapid absorption pattern of VPA is well-documented, the immediate occurrence of abdominal cramps post-injection suggests that VPA might have been present in the intraperitoneal fluid at the time of discomfort. Intraperitoneal saline injection did not elicit any observable reaction.

It is important to note that the gestational period in humans is particularly vulnerable to environmental risk factors, especially during fetal brain development. Insufficient weight gain during gestation increases the risk of developmental delays in communication, motor skills, and social domains in children (Modabbernia et al., 2017).

Animal models exposed to environmental risk factors during prenatal development, such as lipopolysaccharide (LPS), have demonstrated adverse effects on placental weight, embryo count, and subsequent neurodevelopmental abnormalities in postnatal life (Straley et al., 2014). Maternal immune activation, which induces a proinflammatory status during gestation, has been linked to neurodevelopmental abnormalities in offspring (Deckmann et al., 2019; Fontes-Dutra et al., 2020).

An acute high dose of VPA can hyperactivate biological pathways associated with inflammation, potentially contributing to abnormalities



**Fig. 4.** Weight and length variation of pups during the evaluated period of experimental groups. Weight variation of female (A) and male (B) pups and length measures of females (C) and male (D) pups between postnatal days 6–20. Control = Gray dot ( $n = 39$ ), RSV = Purple dot ( $n = 12$ ), VPA = Red dot ( $n = 40$ ) and RSV+VPA = Blue dot ( $n = 28$ ). Values are shown as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis: Generalized Estimating Equations (GEE), followed by Bonferroni test. \*  $p < 0.05$ . For additional information, refer to Tables S4–S6 for weight variation and Tables 7, 8 and 9 for length variations.

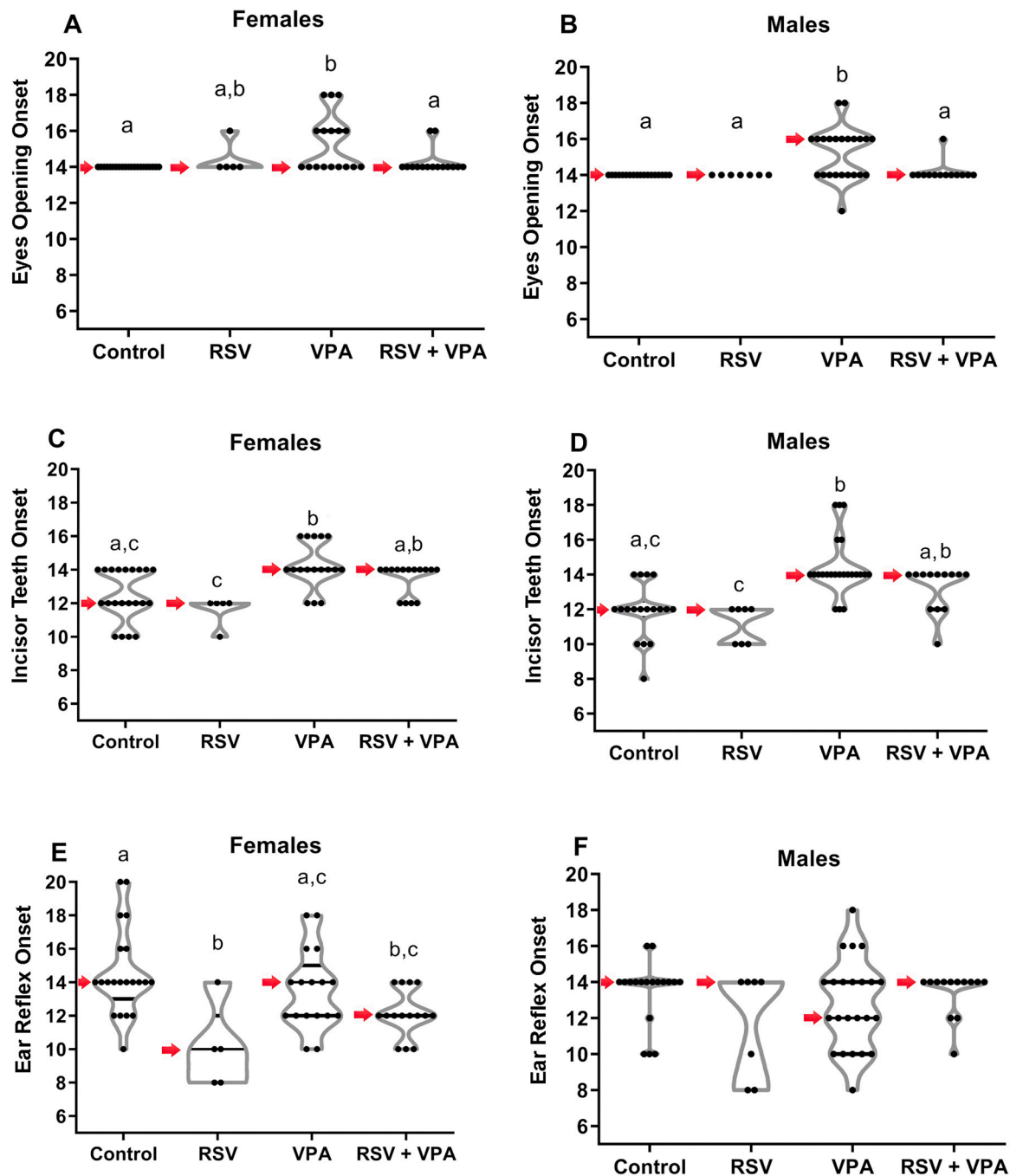
observed in postnatal life (J.-Y. Huang et al., 2016). Despite the anti-inflammatory effects of VPA at low doses in non-pregnant animals (Amirzargar et al., 2017; Tian et al., 2019), elevated doses like 600 mg/kg, have been reported to induce inflammation in pregnant mice (Lucchina and Depino, 2014). Furthermore, high doses of prenatal VPA exposure in humans are linked to congenital malformations and language impairments, including worse verbal comprehension in children with ASD (Nadebaum et al., 2011; Roulet et al., 2013). Prenatal VPA exposure in humans is also associated with a heightened risk of ASD development in children (Christensen et al., 2013). Moreover, it is noteworthy that children who were exposed to high doses of valproate (>800 mg daily) during pregnancy exhibited a substantial reduction of 9.7 points in their IQ scores compared to those who were not exposed (Baker et al., 2015).

Thus, the correlation between fold-change weight variation during the E15.5–E18.5 period and the reduced number of pups in the VPA group could be related to the high VPA concentration (600 mg/kg) administered. Elevated VPA concentrations can lead to fetal reabsorption and abnormal development, potentially resulting in fewer pups. In an ASD animal model involving pregnant rats exposed to 600 mg/kg VPA, higher than the 500 mg/kg exposure in other models, over 50% of gestations showed complete reabsorption (Favre et al., 2013). Notably, we observed a tail kink, a recurring feature in VPA-exposed offspring, which prenatal RSV treatment was unable to mitigate.

The RSV molecule modulates metabolic mechanisms like mitochondrial biogenesis and activates sirtuin (SIRT) 1, a deacetylase enzyme (Zhao et al., 2020). Previous rodent studies have demonstrated that gestational RSV administration can prevent developmental anomalies in neurodevelopmental disorders models (Chen et al., 2020; Ferreira et al., 2020; Xie et al., 2018; Zhao et al., 2020). Moreover, subcutaneous RSV injection in pregnant ewes increased fetal weight, promoting better fetal oxygenation and growth (Darby et al., 2019). Building on these findings, we postulate that RSV fosters a more favorable gestational environment that aids in recovery from potential insults. The observed increase in fetal weight and length in the RSV group may be attributed to improved uterine conditions supporting enhanced prenatal and postnatal development. Consequently, the weight variation impairments observed in VPA-exposed pregnant rats could be a consequence of an aberrant uterine environment impacting early-life

offspring development, akin to the outcomes seen in humans (Mamun et al., 2014; Mayer and Joseph, 2013). The effects of VPA exposure span both early and late postnatal life, with various studies demonstrating social impairments in adulthood (Bambini-Junior et al., 2011; Deckmann et al., 2019; Favre et al., 2013; Schneider and Przewlocki, 2005). Although RSV could not entirely mitigate VPA-induced weight variation and reductions in pup count, it effectively countered developmental hallmark impairments induced by VPA. Notably, RSV facilitated an earlier appearance of certain developmental milestones, while positively influencing weight and length outcomes. This suggests that the RSV effects extend beyond mere prevention, potentially involving enhanced cellular metabolism and tissue development (Vang et al., 2011), as evidenced by increased weight and length compared to the other groups. Prenatal RSV treatment prevented delayed onset of *Eyes Opening*, *Cliff Avoidance*, and *Lower Limb Grip* induced by VPA in males. Although the limbs' development was affected, there was no alteration in the March reflex, indicating that while the motor functional-mechanic works typically, the limbs alterations may be related to sensorimotor integration.

Sensory integration refers to the process of consolidating information from one or multiple sensory domains, channeling these inputs to the brain (Camarata et al., 2020). Eye-tracking assessments in individuals with ASD, including children and infants, have unveiled challenges in maintaining typical eye contact, suggesting that neural networks involved in sensory integration might contribute to atypical behaviors (Black et al., 2017). Reduced responses to vestibulo-ocular stimuli integration are observed in children with ASD and attention-deficit/hyperactive disorder (ADHD) (Carson et al., 2017). This deficit could potentially arrive from delayed visual information processing, rather than an isolated impairment in the vestibular system. A potential repercussion of disturbances in vestibular-visual integration could manifest in the delayed *Eye-Opening* milestone among prenatally VPA-exposed animals. This milestone is pivotal for processing and integrating visual stimuli, potentially affected by disrupted visual wiring patterns that emerge prior to eye opening (Huberman et al., 2008). Therefore, we hypothesize that delays in eye-opening could arise as a consequence of disturbances in vestibular-visual integration, possibly influenced by the early development of visual wiring patterns that occur before eye opening. This perspective suggests a potential interplay



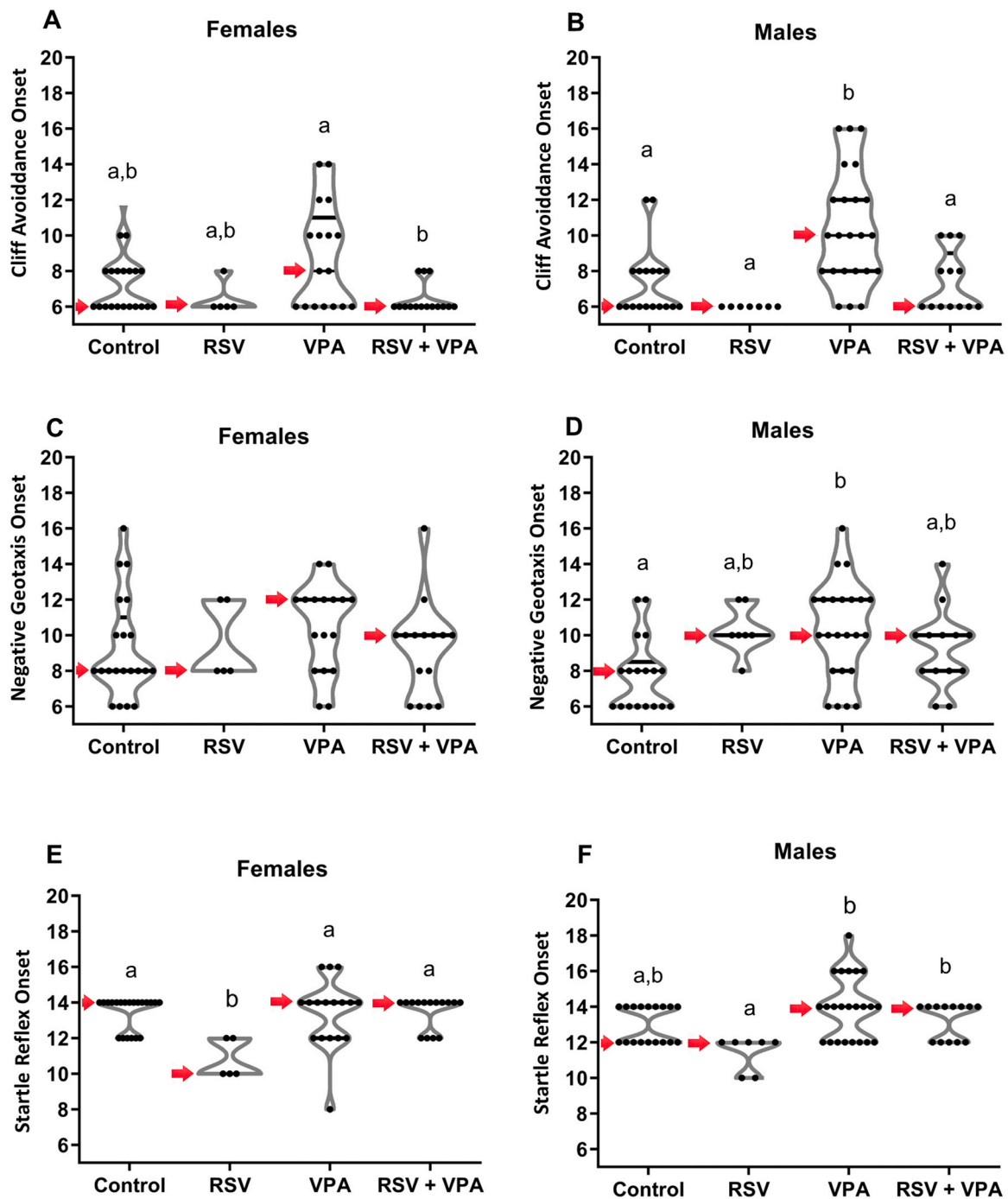
**Fig. 5.** Onset of hallmarks Eye-Opening, Incisor Teeth Appearance and Ear Reflex. Onset of Eye-Opening in females (A) and in males (B), Incisor Teeth in females (C) and in males (D) and Ear Reflex in females (E) and in males (F). Control (n = 39), RSV (n = 12), VPA (n = 40) and RSV+VPA (n = 28). Horizontal lines represent values, with the median indicated by the thin line and quartiles by the thick lines. The red arrow points to the median (middle quartile). Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Different letters indicate significant statistical differences. For additional information, refer to [Tables S10 and S11](#) for females and [Tables 12 and 13](#) for males.

between disruptions in sensory integration and the timing of eye-opening. While our hypothesis leans towards the notion that delays in eye opening are influenced by disturbances in sensory integration, we also recognize the alternate interpretation that disruptions in vestibular-visual integration might contribute to delayed eye opening. This complex relationship underscores the need for further investigation to elucidate the intricate mechanisms that underlie these developmental changes.

Although our study did not uncover alterations in the *Eyelid Reflex* or its neural underpinnings, abnormalities in the integration of sensory-motor domains, reminiscent of ASD patterns, could be present (Wang

et al., 2021). Distinct connectivity patterns, particularly in the integration of frontal-posterior inputs have been documented in individuals with ASD (Just et al., 2004, 2012). Studies suggest a spectrum of connectivity alterations in ASD, encompassing under-connectivity, over-connectivity, or both, portraying a diffuse pattern of disrupted connectivity (Cheng et al., 2015; Di Martino et al., 2014).

ASD subjects exhibit difficulty in filtering auditory information from noisy stimuli, rather than a direct auditory impairment (Rotschafer, 2021), similar to the processing of visual stimuli. The delay in *Startle Reflex* response, as well as *Negative Geotaxis*, *Cliff Avoidance* and *Righting*, induced by prenatal exposure to VPA, might partly result from abnormal



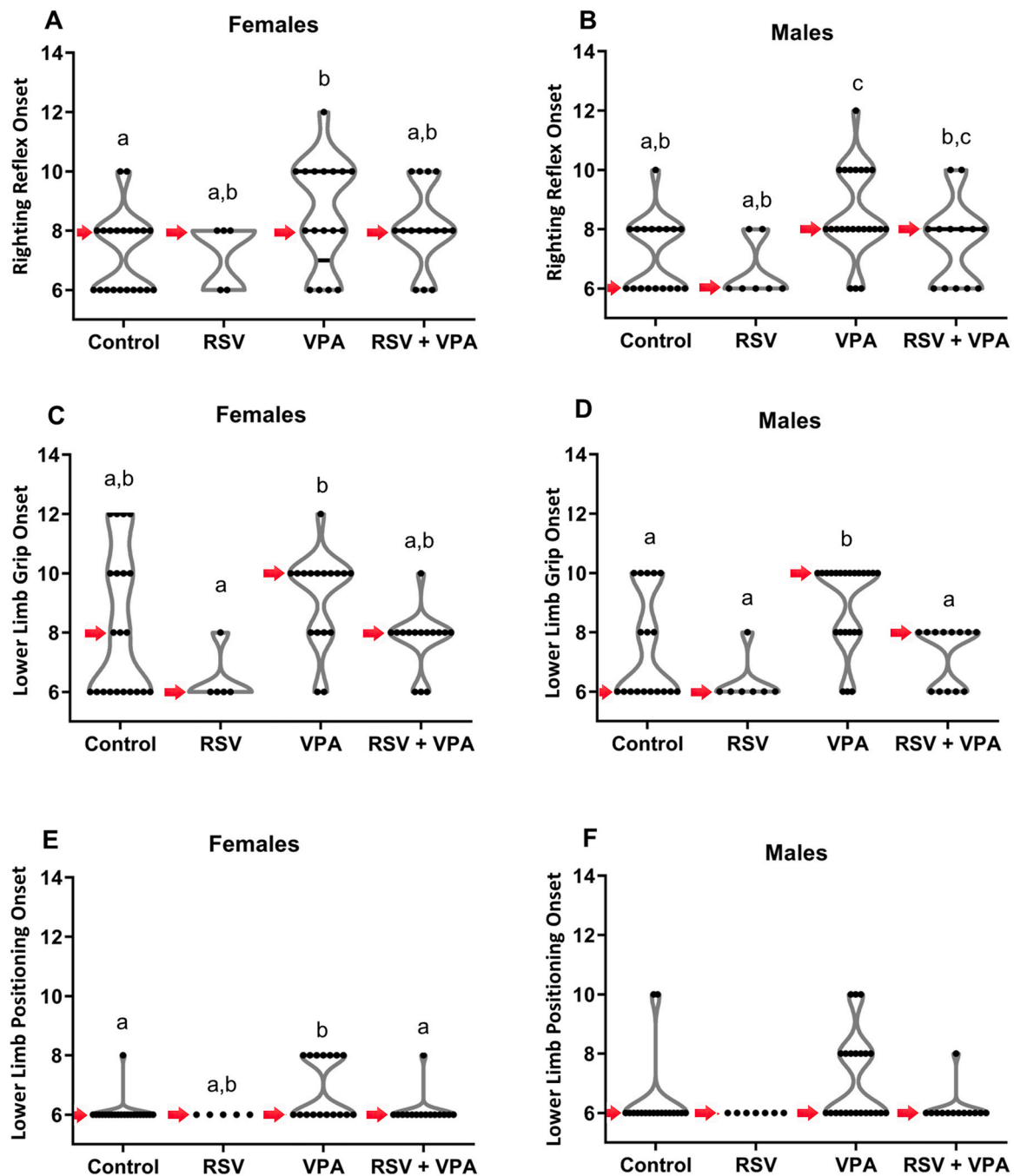
**Fig. 6.** Onset of hallmarks Cliff Avoidance, Negative Geotaxis and Startle Reflex. Onset of Cliff Avoidance in females (A) and in males (B), Negative Geotaxis in females (C) and in males (D) and Startle Reflex in females (E) and in males (F). Control (n = 39), RSV (n = 12), VPA (n = 40) and RSV+VPA (n = 28). Horizontal lines represent values, with the median indicated by the thin line and quartiles by the thick lines. The red arrow points to the median (middle quartile). Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Different letters indicate significant statistical differences. For additional information, refer to [Tables S10 and S11](#) for females and [Tables 12 and 13](#) for males.

processing within the auditory-vestibular axis.

Impairments in the somatosensory system, responsible for processing tactile, proprioceptive, and nociceptive stimuli, are commonly observed in individuals with ASD offering potential diagnostic value (Thye et al., 2018). In the VPA animal model of ASD, somatosensory stimulus processing impairments have been observed, including the whisker nuisance task, and irregular distribution of GABAergic parvalbumin-containing neurons in the primary somatosensory area (Fontes-Dutra et al., 2018). The inhibitory system plays a pivotal role in mitigating sensory information noise, contributing to sensory

integration in both primary and secondary somatosensory areas. The maturation of these neurons is also regarded as a marker of early sensory development timing (Reha et al., 2020).

Considering the disrupted interneuron distribution in somatosensory layers and the importance of the secondary somatosensory cortex in functions like tactile discrimination, object manipulation, grasp, and release (Wolff and Shepard, 2013), we posit that compromised somatosensory input integration contributes to the delays observed in accurate *Limb Grip* and *Positioning* in VPA-exposed rats. The literature extensively documents somatosensory-vestibular-visual integration



**Fig. 7.** Onset of hallmarks Righting Reflex, Lower Limb Grip and Lower Limb Positioning. Onset of Righting Reflex in females (A) and in males (B), Lower Limb Grip in females (C) and males (D) and Lower Limb Positioning in females (E) and in males (F). Control (n = 39), RSV (n = 12), VPA (n = 40) and RSV+VPA (n = 28). Horizontal lines represent values, with the median indicated by the thin line and quartiles by the thick lines. The red arrow points to the median (middle quartile). Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ). Different letters indicate significant statistical differences. For additional information, refer to Tables S10 and S11 for females and Tables 12 and 13 for males.

(Cheung and Lau, 2020), and impairment in this complex interplay could directly affect development of behaviors like *Cliff Avoidance*, *Negative Geotaxis*, and *Righting* in VPA-exposed animals.

While our study provides valuable insights into the developmental consequences of prenatal VPA exposure and the potential benefits of RSV intervention, we recognize the critical importance of further literature and clinical evidence to bridge the gap between rat model findings and their potential implications for individuals with ASD. The translation of findings from animal models to clinical contexts requires careful consideration of species differences, as well as the multifaceted nature of ASD.

In summary, our study underscores the harmful consequences of prenatal exposure to VPA on gestational weight variation and pup count in an animal model. The immediate discomfort and altered behavior exhibited in pregnant rats followed by VPA injection further emphasize the potential impact of this teratogen on embryonic development. The association of VPA with inflammatory and immune responses suggests plausible mechanisms behind these outcomes. Additionally, we identified significant deficits in behaviors encompassing both sensory and motor aspects, hinting a potential early impairment in their integration. These findings suggest that early indicators of impaired sensory-motor integration may be useful as predictive markers for future behavioral

impairments in ASD. Our results align with prior research indicating the substantial impact of VPA exposure during early developmental stages in animal models of ASD.

In conclusion, our study provides a stepping stone for understanding the potential impact of prenatal VPA exposure on developmental milestones as well as provides support for the use of RSV as a reliable tool for investigating both the pathophysiology and etiology of ASD.

### CRedit authorship contribution statement

**Carmem Gottfried:** Supervision, Funding acquisition, Project administration, Conceptualization, Data analysis and discussion, Writing – review & editing, Visualization. **Gustavo Brum Schwingel,** **Mellanie Fontes-Dutra:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Data analysis and discussion, Writing – review & editing, Visualization. **Rudimar Riesgo,** **Victorio Bambini-Junior:** Funding acquisition, Data analysis and discussion, Writing – review & editing, Visualization. **Bárbara Ramos:** Investigation, Methodology, Data analysis and discussion.

### Declaration of Competing Interest

The authors report no conflicts of interest.

### Acknowledgements

We would like to thank the statistical support group from the HCPA and Fluxome (Stenløse, Denmark) for the generous gift of resveratrol. This work was supported by the National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM); National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Clinical Hospital of Porto Alegre (FIPE-HCPA #170280 and #160477) and PROPESQ-UFRGS.

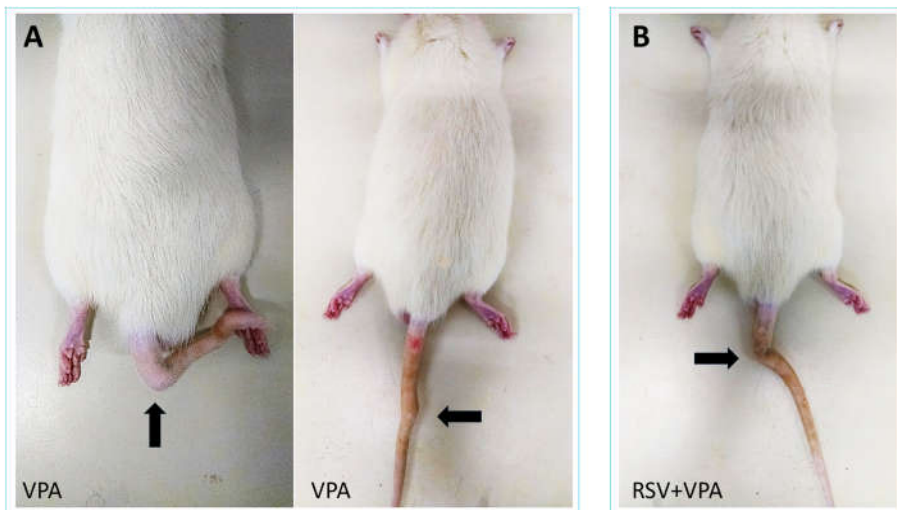
### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.ibneur.2023.09.008](https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2023.09.008).

### References

- Aly, M.I., Abdel-Latif, A.A., 1980. Studies on distribution and metabolism of valproate in rat brain, liver, and kidney. *Neurochem. Res.* 5 (12), 1231–1242. <https://doi.org/10.1007/BF00964959>.
- American Psychiatry Association (APA), 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition*, 5th ed., American Psychiatric Publishing, Inc., <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.893619>.
- Amirzargar, M.A., Yaghubi, F., Hosseinpanah, M., Jafari, M., Pourjafar, M., Rezaeepoor, M., Rezaei, H., Roshanaei, G., Hajilooi, M., Solgi, G., 2017. Anti-inflammatory effects of valproic acid in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury: alteration in cytokine profile. *Inflammation* 40 (4), 1310–1318. <https://doi.org/10.1007/S10753-017-0574-9>.
- Baker, G.A., Bromley, R.L., Briggs, M., Cheyney, C.P., Cohen, M.J., García-Fiñana, M., Gummery, A., Kneen, R., Loring, D.W., Mawer, G., Meador, K.J., Shallcross, R., Clayton-Smith, J., 2015. IQ at 6 years after in utero exposure to antiepileptic drugs: A controlled cohort study. *Neurology* 84 (4), 382. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001182>.
- 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. <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. *Neurosci. Lett.* 583, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>.
- Baranek, G.T., David, F.J., Poe, M.D., Stone, W.L., Watson, L.R., 2006. Sensory Experiences Questionnaire: discriminating sensory features in young children with autism, developmental delays, and typical development. *J. Child Psychol. Psychiatry, Allied Discip.* 47 (6), 591–601. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7610.2005.01546.X>.
- Black, M.H., Chen, N.T.M., Iyer, K.K., Lipp, O.V., Bölte, S., Falkner, M., Tan, T., Girdler, S., 2017. Mechanisms of facial emotion recognition in autism spectrum disorders: Insights from eye tracking and electroencephalography. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 80, 488–515. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.06.016>.
- Bradley, C.C., Boan, A.D., Cohen, A.P., Charles, J.M., Carpenter, L.A., 2016. Reported history of developmental regression and restricted, repetitive behaviors in children with autism spectrum disorders. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 37 (6), 451–456. <https://doi.org/10.1097/DBP.0000000000000316>.
- Camarata, S., Miller, L.J., Wallace, M.T., 2020. Evaluating sensory integration/sensory processing treatment: issues and analysis. *Front. Integr. Neurosci. | Wwv. Front. Org.* 14, 556660. <https://doi.org/10.3389/fnint.2020.556660>.
- Carson, T.B., Wilkes, B.J., Patel, K., Pineda, J.L., Ko, J.H., Newell, K.M., Bodfish, J.W., Schubert, M.C., Radonovich, K., White, K.D., Lewis, M.H., 2017. Vestibulo-ocular reflex function in children with high-functioning autism spectrum disorders. *Autism Res.* 10 (2), 251–266. <https://doi.org/10.1002/AUR.1642>.
- Chen, K.G., Kang, R.R., Sun, Q., Liu, C., Ma, Z., Liu, K., Deng, Y., Liu, W., Xu, B., 2020. Resveratrol ameliorates disorders of mitochondrial biogenesis and mitophagy in rats continuously exposed to benzo(a)pyrene from embryonic development through adolescence. *Toxicology* 442. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2020.152532>.
- Cheng, W., Rolls, E.T., Gu, H., Zhang, J., Feng, J., 2015. Autism: reduced connectivity between cortical areas involved in face expression, theory of mind, and the sense of self. *Brain: A J. Neurol.* 138 (Pt 5), 1382–1393. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWV051>.
- Cheung, P.P.P., Lau, B.W.M., 2020. Neurobiology of sensory processing in autism spectrum disorder. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 173, 161–181. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2020.04.020>.
- 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* 309 (16), 1696. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>.
- Darby, J.R.T., Saini, B.S., Soo, J.Y., Lock, M.C., Holman, S.L., Bradshaw, E.L., McInnes, S. J.P., Voelcker, N.H., Macgowan, C.K., Seed, M., Wiese, M.D., Morrison, J.L., 2019. Subcutaneous maternal resveratrol treatment increases uterine artery blood flow in the pregnant ewe and increases fetal but not cardiac growth. *J. Physiol.* 597 (20), 5063–5077. <https://doi.org/10.1113/JP278110>.
- Deckmann, I., Schwingel, G.B., Fontes-Dutra, M., Bambini-Junior, V., Gottfried, C., 2019. Neuroimmune alterations in autism: A translational analysis focusing on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *NeuroImmunoModulation* 25 (5–6), 285–299. <https://doi.org/10.1159/000492113>.
- Di Martino, A., Yan, C.G., Li, Q., Denio, E., Castellanos, F.X., Alaerts, K., Anderson, J.S., Assaf, M., Bookheimer, S.Y., Dapretto, M., Deen, B., Delmonte, S., Dinstein, I., Ertl-Wagner, B., Fair, D.A., Gallagher, L., Kennedy, D.P., Keown, C.L., Keysers, C., Milham, M.P., 2014. The autism brain imaging data exchange: towards a large-scale evaluation of the intrinsic brain architecture in autism. *Mol. Psychiatry* 19 (6), 659–667. <https://doi.org/10.1038/MP.2013.78>.
- Favre, M.R.M., Barkat, T.R.T., LaMendola, D., Khazen, G., Markram, H., & Markram, K. (2013). *General developmental health in the VPA-rat model of autism*. 7. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00088>.
- Ferreira, F.R., de Moura, N.S.B., Hassib, L., Pombo, T.R., 2020. Resveratrol ameliorates the effect of maternal immune activation associated with schizophrenia in adulthood offspring. *Neurosci. Lett.* 734. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2020.135100>.
- Fontes-Dutra, M., Rabelo, B., Santos-Terra, J., Deckmann, I., Schwingel, G.B., & Gottfried, C., 2020. Maternal Immune Activation and Neuropsychiatric Disorders: The Intricate Puzzle of Autism Spectrum Disorder. 167–205. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-39335-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-39335-9_11).
- Fontes-Dutra, M., Santos-Terra, J., Deckmann, I., Schwingel, G.B., Nunes, G.D.F., Hirsch, M.M., Bauer-Negrini, G., Riesgo, R., Bambini-Junior, V., Hedin-Pereira, C., Gottfried, C., 2018. Resveratrol prevents cellular and behavioral sensory alterations in the animal model of autism induced by valproic acid. *Front. Synaptic Neurosci.* 10 (MAY), 9. <https://doi.org/10.3389/FNSYN.2018.00009>.
- Fox, W.M., 1965. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 13 (2–3), 234–IN5. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(65\)90041-2](https://doi.org/10.1016/0003-3472(65)90041-2).
- Gottfried, C., Bambini-Junior, V., Francis, F., Riesgo, R., Savino, W., 2015. The impact of neuroimmune alterations in autism spectrum disorder. *Front. Psychiatry* 6 (SEP), 121. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00121>.
- Hayashiuchi, M., Kitayama, T., Morita, K., Yamawaki, Y., Oue, K., Yoshinaka, T., Asano, S., Harada, K., Kang, Y., Hirata, M., Irifune, M., Okada, M., Kanematsu, T., 2017. General anesthetic actions on GABA<sub>A</sub> receptors in vivo are reduced in phospholipase C-related catalytically inactive protein knockout mice. *J. Anesth.* 31 (4), 531–538. <https://doi.org/10.1007/S00540-017-2350-2>.
- Hirsch, M.M., Deckmann, I., Santos-Terra, J., Staevie, G.Z., Fontes-Dutra, M., Carello-Collar, G., Körbes-Rockenbach, M., Brum Schwingel, G., Bauer-Negrini, G., Rabelo, B., Gonçalves, M.C.B., Corrêa-Velloso, J., Naaldijk, Y., Castillo, A.R.G., Schneider, T., Bambini-Junior, V., Ulrich, H., Gottfried, C., 2020. Effects of single-dose antipurinergic therapy on behavioral and molecular alterations in the valproic acid-induced animal model of autism. *Neuropharmacology* 167. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107930>.
- Hou, Q., Wang, Y., Li, Y., Chen, D., Yang, F., Wang, S., Sousa, N., Atzori, M., Ellenbroek, B., Yang fengyang, F., & Shali Wang, Libdorg, 2018. A Developmental Study of Abnormal Behaviors and Altered GABAergic Signaling in the VPA-Treated Rat Model of Autism. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00182>.
- Huang, J.-Y., Tian, Y., Wang, H.H., Shen, H., Wang, H.H., Long, S., Liao, M., Liu, Z.-R., Wang, Z.-M., Li, D., Tao, R., Cui, T., Moriguchi, S., Fukunaga, K., Han, F., Lu, Y.M., 2016. Functional genomic analyses identify pathways dysregulated in animal model of autism. *CNS Neurosci. Ther.* 22 (10). <http://dx.doi.org/10.1111/cns.12582>.
- Huberman, A.D., Feller, M.B., Chapman, B., 2008. Mechanisms underlying development of visual maps and receptive fields. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 479–509. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.31.060407.125533>.

- Jiang, H. Yin H., Xu, L. Lian L., Shao, L., Xia, R. Man R., Yu, Z. He. Z., Ling, Z.Z. Xin, Yang, F., Deng, M., & Ruan, B., 2016. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *58*, 165–172.
- Just, M.A., Cherkassky, V.L., Keller, T.A., Minshew, N.J., 2004. Cortical activation and synchronization during sentence comprehension in high-functioning autism: evidence of underconnectivity. *Brain: A J. Neurol.* 127 (Pt 8), 1811–1821. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWH199>.
- Just, M.A., Keller, T.A., Malave, V.L., Kana, R.K., Varma, S., 2012. Autism as a neural systems disorder: a theory of frontal-posterior underconnectivity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36 (4), 1292–1313. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.007>.
- Koch, M., 1999. The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.* 59 (2), 107–128. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00098-7](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00098-7).
- Lubics, A., Reglodi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., Lengvári, I., 2005. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav. Brain Res.* 157 (1), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019>.
- Lucchina, L., Depino, A.M., 2014. Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. *Autism Res.* 7 (2), 273–289. <https://doi.org/10.1002/aur.1338>.
- Mabunga, D.F.N., Gonzales, E.L.T., Kim, J.-W., Kim, K.C., Shin, C.Y., 2015. Exploring the validity of valproic acid animal model of autism. *Exp. Neurobiol.* 24 (4), 285–300. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>.
- Maenner, M.J., Warren, Z., Williams, A.R., Amoakohene, E., Bakian, A.V., Bilder, D.A., Durkin, M.S., Fitzgerald, R.T., Furnier, S.M., Hughes, M.M., Ladd-Acosta, C.M., McArthur, D., Pas, E.T., Salinas, A., Vehorn, A., Williams, S., Esler, A., Grzybowski, A., Hall-Lande, J., Shaw, K.A., 2023. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *Mmwr. Surveill. Summ.* 72 (2), 1–14. <https://doi.org/10.15585/MMWR.SS7202A1>.
- Mammel, B., Kvárik, T., Szabó, Z., Gyarmati, J., Ertl, T., Farkas, J., Helyes, Z., Atlasz, T., Reglodi, D., Kiss, P., 2020. Prenatal cigarette smoke exposure slightly alters neurobehavioral development in neonatal rats: Implications for developmental origins of health and disease (DoHAD). *Physiol. Int.* 107 (1), 55–66. <https://doi.org/10.1556/2060.2020.00007>.
- Mamun, A.A., Mannan, M., Doi, S.A.R., 2014. Gestational weight gain in relation to offspring obesity over the life course: A systematic review and bias-adjusted meta-analysis. *Obes. Rev.* 15 (4), 338–347. <https://doi.org/10.1111/OBR.12132>.
- Mayer, C., Joseph, K.S., 2013. Fetal growth: a review of terms, concepts and issues relevant to obstetrics. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 41 (2), 136–145. <https://doi.org/10.1002/UOG.11204>.
- Modabbernia, A., Velthorst, E., Reichenberg, A., 2017. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. *Mol. Autism* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0121-4>.
- Nadebaum, C., Anderson, V.A., Vajda, F., Reutens, D.C., Barton, S., Wood, A.G., 2011. Language skills of school-aged children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Neurology* 76 (8), 719–726. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820d62c7>.
- Ogawa, Y., Irifune, M., Mukai, A., Shimizu, Y., Doi, M., Oue, K., Yoshida, M., Kanematsu, T., Morioka, N., Nakata, Y., Sakai, N., 2020. The indirect  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor agonist gabaculine-induced loss of the righting reflex may inhibit the descending analgesic pathway. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 198 <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173034>.
- Oka, T., Liu, X.F., Kajita, T., Ohgiya, N., Ghoda, K., Taniguchi, T., Arai, Y., Matsumiya, T., 1992. Effects of the subcutaneous administration of enkephalins on tail-flick response and righting reflex of developing rats. *Dev. Brain Res.* 69 (2), 271–276. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(92\)90167-U](https://doi.org/10.1016/0165-3806(92)90167-U).
- Papadakis, N.M., Stavroulakis, G.E., 2020. Handclap for acoustic measurements: optimal application and limitations. *Acoustics* 2020 2 (2), 224–245. <https://doi.org/10.3390/ACOUSTICS2020015>.
- Reha, R.K., Dias, B.G., Nelson, C.A., Kaufer, D., Werker, J.F., Kolbh, B., Levine, J.D., Hensch, T.K., 2020. Critical period regulation across multiple timescales. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117 (38), 23242. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1820836117>.
- Robertson, C.E., Baron-Cohen, S., 2017. Sensory perception in autism. *Nat. Rev. Neurosci.* 18 (11), 671–684. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.112>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(97\)80001-U](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(97)80001-U).
- Rotschafer, S.E., 2021. Auditory discrimination in autism spectrum disorder. *Front. Neurosci.* 15, 419. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2021.651209/BIBTEX>.
- Rouillet, F.I., Lai, J.K.Y., Foster, J.A., 2013. In utero exposure to valproic acid and autism — A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicol. Teratol.* 36, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.004>.
- Ruhela, R.K., Soni, S., Sarma, P., Prakash, A., Medhi, B., 2019. Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Ann. Neurosci.* 26 (1), 25–31. <https://doi.org/10.5214/ANS.0972.7531.260106>.
- Santos-Terra, J., Deckmann, I., Schwingel, G.B., Paz, A.V.C., Gama, C.S., Bambini-Junior, V., Fontes-Dutra, M., Gottfried, C., J. S.-T., I. D., GB, S., AVC, P., CS, G., V. B.-J., M, F.-D., & C, G. (2021). *Resveratrol prevents long-term structural hippocampal alterations and modulates interneuron organization in an animal model of ASD*. 1768. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2021.147593>.
- Schneider, T., Przewłocki, R., 2005. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30 (1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>.
- Schönfeld, L.M., Dooley, D., Jahanshahi, A., Temel, Y., Hendrix, S., 2017. Evaluating rodent motor functions: Which tests to choose? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 83, 298–312. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2017.10.021>.
- Schuch, C.P., Diaz, R., Deckmann, I., Rojas, J.J., Deniz, B.F., Pereira, L.O., 2016. Early environmental enrichment affects neurobehavioral development and prevents brain damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Neurosci. Lett.* 617, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.015>.
- Siemann, J.K., Veenstra-VanderWeele, J., Wallace, M.T., 2020. Approaches to understanding multisensory dysfunction in autism spectrum disorder. *Autism Res.: Off. J. Int. Soc. Autism Res.* 13 (9), 1430–1449. <https://doi.org/10.1002/AUR.2375>.
- Straley, M.E., Togher, K.L., Nolan, A.M., Kenny, L.C., O’Keefe, G.W., 2014. LPS alters placental inflammatory and endocrine mediators and inhibits fetal neurite growth in affected offspring during late gestation. *Placenta* 35 (8), 533–538. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2014.06.001>.
- Thye, M.D., Bednarz, H.M., Herringshaw, A.J., Sartini, E.B., Kana, R.K., 2018. The impact of atypical sensory processing on social impairments in autism spectrum disorder. *Dev. Cogn. Neurosci.* 29, 151–167. <https://doi.org/10.1016/J.DCN.2017.04.010>.
- Tian, S., Lei, I., Gao, W., Liu, L., Guo, Y., Creech, J., Herron, T.J., Xian, S., Ma, P.X., Eugene Chen, Y., Li, Y., Alam, H.B., Wang, Z., 2019. HDAC inhibitor valproic acid protects heart function through Foxm1 pathway after acute myocardial infarction. *EBioMedicine* 39, 83–94. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2018.12.003>.
- 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., Wu, J.M., 2011. What is new for an old molecule? systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS ONE* Vol. 6 (Issue 6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019881>.
- Wang, J., Wang, X., Wang, R., Duan, X., Chen, H., He, C., Zhai, J., Wu, L., Chen, H., 2021. Atypical resting-state functional connectivity of intra/inter-sensory networks is related to symptom severity in young boys with autism spectrum disorder. *Front. Physiol.* 12 <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.626338>.
- Wolf, L.W., LaRegina, M.C., Tolbert, D.L., 1996. A behavioral study of the development of hereditary cerebellar ataxia in the shaker rat mutant. *Behav. Brain Res.* 75 (1–2), 67–81. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00159-3](https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00159-3).
- Wolff, P., Shepard, J., 2013. Causation, touch, and the perception of force. *Psychol. Learn. Motiv. - Adv. Res. Theory* 58, 167–202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407237-4.00005-0>.
- Wu, S., Wu, F., Ding, Y., Hou, J., Bi, J., Zhang, Z., 2017. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr. Scand.* 135 (1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/ACPS.12666>.
- Xie, W., Ge, X., Li, L., Yao, A., Wang, X., Li, M., Gong, X., Chu, Z., Lu, Z., Huang, X., Jiao, Y., Wang, Y., Xiao, M., Chen, H., Xiang, W., Yao, P., 2018. Resveratrol ameliorates prenatal progesterone exposure-induced autism-like behavior through ER $\beta$  activation. *Mol. Autism* 9 (1). <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0225-5>.
- Zhao, Q., Tian, Z., Zhou, G., Niu, Q., Chen, J., Li, P., Dong, L., Xia, T., Zhang, S., Wang, A., 2020. SIRT1-dependent mitochondrial biogenesis supports therapeutic effects of resveratrol against neurodevelopmental damage by fluoride. *Theranostics* 10 (11), 4822–4838. <https://doi.org/10.7150/THNO.42387>.



**Supplementary Figure 1. Illustrative images depicting tail kinks, a prevalent trait observed in VPA-exposed animals.** The images were captured from animals on postnatal day 30 (P30). Black arrows denote tail kinks of varying degrees of curvature among the litters. A, VPA; B, RSV+VPA.



**Supplementary Table 1A. Gross weight among pregnant rats during gestational days.**

Group	Animal	0.5	6.5	7.5	8.5	9.5	10.5	11.5	12.5	13.5	14.5	15.5	16.5	17.5	18.5	Litter size
Control	1	294	306	307	315	319	322	323	319	325	327	346	344	356	356	5
Control	2	223	240	245	249	246	254	256	265	267	274	281	294	298	310	12
Control	3	298	302	307	312	314	317	313	321	322	331	333	346	358	370	10
Control	4	267	272	272	276	277	285	289	288	298	297	298	305	310	315	7
Control	5	275	280	293	295	289	301	302	307	316	315	319	328	342	350	9
Control	6	266	275	270	270	282	289	286	288	291	294	291	300	307	308	6
RSV	1	233	243	255	254	258	266	272	274	276	279	278	294	303	314	11
RSV	2	189	204	208	209	219	221	222	225	226	229	231	243	250	260	9
RSV	3	243	256	266	271	272	277	281	283	286	291	297	306	312	331	10
RSV	4	219	226	232	233	235	242	250	246	251	255	254	267	269	283	7
RSV	5	252	262	262	261	259	269	273	270	272	276	289	292	302	308	10
RSV	6	246	260	267	264	272	276	279	284	291	286	288	304	316	330	12
RSV	7	260	266	275	276	279	286	291	291	296	306	311	317	328	340	12
RSV	8	290	300	302	303	310	310	317	315	317	321	323	324	329	345	6
RSV	9	247	259	257	268	267	267	284	283	288	283	289	290	301	311	8
VPA	1	245	268	265	273	276	284	288	287	286	289	292	287	300	308	2
VPA	2	238	267	258	267	267	275	279	277	272	288	294	300	302	317	11
VPA	3	261	277	286	282	281	284	289	292	284	288	286	288	295	291	1
VPA	4	267	287	289	293	293	298	302	303	297	304	308	312	323	326	8
VPA	5	276	280	280	281	287	290	297	294	286	291	286	286	292	291	2
VPA	6	263	287	288	289	293	299	297	298	304	305	309	310	319	325	9
VPA	7	286	272	270	271	279	281	280	284	273	273	268	272	275	280	2
VPA	8	282	294	290	292	301	302	309	311	305	308	297	309	312	315	3
VPA	9	292	288	285	289	294	292	296	302	288	298	303	313	324	334	12
VPA	10	300	305	309	313	316	315	320	319	323	324	337	336	342	344	7
VPA	11	270	314	308	320	321	313	325	320	328	325	335	331	334	337	4
VPA	12	270	280	275	281	286	291	298	301	299	299	298	302	300	304	3
VPA	13	278	278	285	285	293	290	301	300	304	311	309	317	320	324	4
VPA	14	291	291	305	297	303	307	313	315	303	303	306	308	308	319	3
RSV+VPA	1	230	239	243	248	253	258	265	266	265	271	274	282	299	298	10
RSV+VPA	2	201	213	215	226	228	231	235	240	235	239	245	253	260	265	9
RSV+VPA	3	240	248	259	258	265	254	269	279	283	273	275	284	291	308	11
RSV+VPA	4	243	265	263	266	266	267	283	284	287	287	281	305	298	305	11
RSV+VPA	5	221	233	236	240	241	248	254	252	255	260	256	267	280	284	8
RSV+VPA	6	221	226	232	233	235	242	250	246	251	255	254	267	269	283	9
RSV+VPA	7	251	263	259	268	266	277	273	271	269	271	273	270	274	280	2
RSV+VPA	8	285	292	293	304	307	308	309	310	301	305	304	305	315	316	2
RSV+VPA	9	280	286	290	289	292	296	298	300	289	301	298	299	308	314	3

Data expressed in weight (g) during the pregnancy days 0.5 to 18.5 and the number of pups. Complementary to Figure 1.

**Supplementary Table 1B. Individual weight variation among pregnant rats.**

Group	Animal	6.5	7.5	8.5	9.5	10.5	11.5	12.5	13.5	14.5	15.5	16.5	17.5	18.5	Litter size
Control	1	12	1	8	4	3	1	-4	6	2	19	-2	12	0	5
Control	2	17	5	4	-3	8	2	9	2	7	7	13	4	12	12
Control	3	4	5	5	2	3	-4	8	1	9	2	13	12	12	10
Control	4	5	0	4	1	8	4	-1	10	-1	1	7	5	5	7
Control	5	5	13	2	-6	12	1	5	9	-1	4	9	14	8	9
Control	6	9	-5	0	12	7	-3	2	3	3	-3	9	7	1	6
	Mean±SD	8.667±5.08	3.167±6.08	3.833±2.71	1.667±6.21	6.833±3.43	0.167±3.06	3.167±5.11	5.167±3.76	3.167±4.11	5.000±7.61	8.167±5.52	9.000±4.19	6.333±5.24	8.167±2.63
RSV	1	10	12	-1	4	8	6	2	2	3	-1	16	9	11	11
RSV	2	15	4	1	10	2	1	3	1	3	2	12	7	10	9
RSV	3	13	10	5	1	5	4	2	3	5	6	9	6	19	10
RSV	4	7	6	1	2	7	8	-4	5	4	-1	13	2	14	7
RSV	5	10	0	-1	-2	10	4	-3	2	4	13	3	10	6	10
RSV	6	14	7	-3	8	4	3	5	7	-5	2	16	12	14	12
RSV	7	6	9	1	3	7	5	0	5	10	5	6	11	12	12
RSV	8	10	2	1	7	0	7	-2	2	4	2	1	5	16	6
RSV	9	12	-2	11	-1	0	17	-1	5	-5	6	1	11	10	8
	Mean±SD	10.77±3.03	5.333±4.71	1.667±4.12	3.556±4.09	4.778±3.56	6.111±4.59	0.222±2.99	3.556±2.00	2.556±4.77	3.778±4.35	8.556±6.06	8.111±3.33	12.44±3.81	9.444±2.12
VPA	1	23	-3	8	3	8	4	-1	-1	3	3	-5	13	8	2
VPA	2	29	-9	9	0	8	4	-2	-5	16	6	6	2	15	11
VPA	3	16	9	-4	-1	3	5	3	-8	4	-2	2	7	-4	1
VPA	4	20	2	4	0	5	4	1	-6	7	4	4	11	3	8
VPA	5	13	0	1	6	3	7	-3	-8	5	-5	0	6	-1	2
VPA	6	11	1	1	4	6	-2	1	6	1	4	1	9	6	9
VPA	7	9	-2	1	8	2	-1	4	-11	0	-5	4	3	5	2
VPA	8	8	-4	2	9	1	7	2	-6	3	-11	12	3	3	3
VPA	9	6	-3	4	5	-2	4	6	-14	10	5	10	11	10	12
VPA	10	13	4	4	3	-1	5	-1	4	1	13	-1	6	2	7
VPA	11	14	-6	12	1	-8	12	-5	8	-3	10	-4	3	3	4
VPA	12	10	-5	6	5	5	7	3	-2	0	-1	4	-2	4	3
VPA	13	8	7	0	8	-3	11	-1	4	7	-2	8	3	4	4
VPA	14	13	14	-8	6	4	6	2	-12	0	3	2	0	11	3
	Mean±SD	13.78±6.41	0.357±6.35	2.857±5.15	4.071±3.22	2.214±4.49	5.214±3.78	0.643±2.97	-3.643±7.00	3.857±4.92	1.571±6.35	3.071±4.89	5.357±4.43	4.929±4.89	5.071±3.62
RSV+VPA	1	9	4	5	5	5	7	1	-1	6	3	8	17	-1	10
RSV+VPA	2	12	2	11	2	3	4	5	-5	4	6	8	7	5	9
RSV+VPA	3	8	11	-1	7	-11	15	10	4	-10	2	9	7	17	11
RSV+VPA	4	22	-2	3	0	1	16	1	3	0	-6	24	-7	7	11
RSV+VPA	5	12	3	4	1	7	6	-2	3	5	-4	11	13	4	8
RSV+VPA	6	5	6	1	2	7	8	-4	5	4	-1	13	2	14	9
RSV+VPA	7	12	-4	9	-2	11	-4	-2	-2	2	2	-3	4	6	2
RSV+VPA	8	7	1	11	3	1	1	1	-9	4	-1	1	10	1	2
RSV+VPA	9	6	4	-1	3	4	2	2	-11	12	-3	1	9	6	3
	Mean±SD	10.33±5.12	2.778±4.38	4.667±4.74	2.333±2.64	3.111±6.17	6.111±6.43	1.333±4.18	-1.444±5.83	3.000±5.87	-0.222±3.80	8.000±7.98	6.889±6.88	6.556±5.72	7.222±3.80

Data expressed in weight (g) and standard deviation during the pregnancy days 6.5 to 18.5 and the number of pups. Complementary to Figure 1.

**Supplementary Table 1C. Summary of weight variation among pregnant rats.**

ED	Control	RSV	p value	VPA	RSV + VPA
	Mean±SD	Mean±SD	non-VPA vs. VPA groups	Mean±SD	Mean±SD
6.5	8.667±5.08	10.778±3.03	ns	13.786±6.41	10.333±5.12
7.5	3.167±6.08	5.333±4.72	ns	0.357±6.36	2.778±4.38
8.5	3.833±2.71	1.667±4.12	ns	2.857±5.16	4.667±4.74
9.5	1.667±6.21	3.556±4.10	ns	4.071±3.22	2.333±2.65
10.5	6.833±3.43	4.778±3.56	ns	2.214±4.49	3.111±6.17
11.5	0.167±3.06	6.111±4.59	ns	5.214±3.79	6.111±6.43
12.5	3.167±5.11	0.222±2.99	ns	0.643±2.98	1.333±4.18
13.5	5.167±3.76	3.556±2.01	*<0.05	-3.643±7.00	-1.444±5.83
14.5	3.167±4.11	2.556±4.77	ns	3.857±4.93	3.000±5.87
15.5	5.000±7.61	3.778±4.35	0.777	1.571±6.36	-0.222±3.80
16.5	8.167±5.52	8.556±6.06	ns	3.071±4.89	8.000±7.98
17.5	9.000±4.19	8.111±3.33	ns	5.357±4.43	6.889±6.88
18.5	6.333±5.24	12.444±3.81	*<0.05	4.929±4.89	6.556±5.73

Weight (g) variation during the pregnancy days 6.5 to 18.5. Statistical analysis: Generalized estimating equations (GEE) by Wald Chi-Square (inference) followed by Bonferroni.\* p<0.05. Complementary to Figure 1.

**Supplementary Table 1D. Descriptive statistical analysis of weight variation from E13.5 to E18.5.**

<b>Weight Variation</b>	<b>Mean(g)±SD</b>	<b>Wald Chi-Square; df; p value</b>	<b>Mean Difference; dF; Bonferroni; p value</b>
<b>E13.5</b>	Control: 5.167±3.76 RSV: 3.556±2.00 VPA: -3.643±7.00 RSV+VPA: -1.444±5.83	Intercept: Wald Chi-Square = 267.226; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> VPA: Wald Chi-Square= 29.080; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> RSV: Wald Chi-Square= 2.268; df=1; p=0.132	Mean Difference (VPA groups – non-VPA groups): -6,79* <b>p&lt;0.05</b> Standard Error: 1.518 dF:1 Bonferroni Significance: p<0.001
<b>E14.5</b>	Control: 3.167±4.11 RSV: 2.556±4.77 VPA: 3.857±4.92 RSV+VPA: 3.000±5.87	Intercept: Wald Chi-Square = 267.226; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> VPA: Wald Chi-Square= 29.080; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> RSV: Wald Chi-Square= 2.268; df=1; p=0.132	Mean Difference (VPA groups – non-VPA groups): -0.91 Standard Error: 1.522 dF:1 Bonferroni Significance: p=0.549
<b>E15.5</b>	Control: 5.000±7.61 RSV: 3.778±4.35 VPA: 1.571±6.35 RSV+VPA: -0.222±3.80	Intercept: Wald Chi-Square = 267.226; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> VPA: Wald Chi-Square = 29.080; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> RSV: Wald Chi-Square = 2.268; df=1; p=0.132	Mean Difference (VPA groups – non-VPA groups): -3.21 Standard Error: 1.813 dF:1 Bonferroni Significance: p=0.077
<b>E16.5</b>	Control: 8.167±5.52 RSV: 8.556±6.06 VPA: 3.071±4.89 RSV+VPA: 8.000±7.98	Intercept: Wald Chi-Square = 267.226; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> VPA: Wald Chi-Square = 29.080; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> RSV: Wald Chi-Square = 2.268; df=1; p=0.132	Mean Difference (VPA groups – non-VPA groups): -3.21 Standard Error: 1.949 dF:1 Bonferroni Significance: p=0.100
<b>E17.5</b>	Control: 9.000±4.19 RSV: 8.111±3.33 VPA: 5.357±4.43 RSV+VPA: 6.889±6.88	Intercept: Wald Chi-Square = 267.226; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> VPA: Wald Chi-Square= 29.080; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> RSV: Wald Chi-Square= 2.268; df=1; p=0.132	Mean Difference (VPA groups – non-VPA groups): -2.32 Standard Error: 1.434 dF:1 Bonferroni Significance: p=0.106
<b>E18.5</b>	Control: 6.333±5.24 RSV: 12.44±3.81 VPA: 4.929±4.89 RSV+VPA: 6.556±5.72	Intercept: Wald Chi-Square = 267.226; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> VPA: Wald Chi-Square= 29.080; df=1; <b>p&lt;0.001**</b> RSV: Wald Chi-Square= 2.268; df=1; p=0.132	Mean Difference (VPA groups – non-VPA groups): -4.24* <b>p&lt;0.05</b> Standard Error: 1.637 dF:1 Bonferroni Significance: p=0.010

Mean (g) and standard deviation of weight variation from embryonic day E13.5 to embryonic day E18.5. Statistical analysis: Generalized estimating equations (GEE) by Wald Chi-Square (inference) followed by Bonferroni, \*p<0.05 \*\*p<0.001. Complementary to Figure 1.

**Supplementary Table 2. Descriptive statistical analysis of the total number of pups by experimental group.**

	Mean $\pm$ SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
<b>Animals per litter</b>	Control: 8.167 $\pm$ 2.63 RSV: 9.444 $\pm$ 2.12 VPA: 5.071 $\pm$ 3.62 RSV+VPA: 7.222 $\pm$ 3.80	Interaction: F (1, 34) = 0.1574; p=0.6940 VPA: F (1, 34) = 5.841; p=0.0212* RSV: F (1, 34) = 2.428; p=0.1284	Control vs RSV
			0.8770
			Control vs VPA:
			0.2240
			Control vs RSV+VPA:
			0.9452
RSV vs VPA:			
0.0168*			
RSV vs RSV+VPA:			
0.4758			
VPA vs RSV+VPA:			
0.4186			

Values are shown as mean number of pups  $\pm$ SD. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey's test, \* p<0.05. Complementary to Figure 2

**Supplementary Table 3. Correlation coefficient ( $r_s$ ) between weight variation and the total number of pups.**

<b>Pregnancy Day</b>	<b>Control</b>	<b>RSV</b>	<b>VPA</b>	<b>RSV+VPA</b>
<b>0.5</b>	-0.200	0.034	-0.335	-0.445
<b>6.5</b>	-0.486	0.126	0.303	-0.338
<b>7.5</b>	-0.319	0.218	0.179	-0.280
<b>8.5</b>	-0.429	0.034	0.309	-0.456
<b>9.5</b>	-0.486	0.152	0.319	-0.398
<b>10.5</b>	-0.486	0.168	0.313	-0.481
<b>11.5</b>	-0.429	-0.008	0.149	-0.338
<b>12.5</b>	-0.232	0.181	0.275	-0.219
<b>13.5</b>	-0.429	0.160	0.270	-0.219
<b>14.5</b>	-0.200	0.151	0.389	-0.174
<b>15.5</b>	-0.429	0.004	0.635*	-0.127
<b>16.5</b>	-0.200	0.261	0.666**	0.038
<b>17.5</b>	-0.200	0.311	0.736**	-0.135
<b>18.5</b>	0.029	0.218	0.780**	-0.017

Values are shown as Spearman correlation coefficient ( $r_s$ ) \*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ . Complementary to Figure 3

**Supplementary Table 4. Weight (g) of female pups from 6-20 postnatal days (PND).**

<b>PND</b>	<b>Control Mean ± SD</b>	<b>RSV Mean ± SD</b>	<b>VPA Mean ± SD</b>	<b>RSV+VPA Mean ± SD</b>
<b>6</b>	14.243±1.128	16.400±0.894	13.200±1.863	13.067±1.710
<b>8</b>	17.395±2.099	21.200±0.837	16.124±2.433	16.733±1.668
<b>10</b>	20.781±2.499	26.600±1.140	20.141±2.873	21.867±1.642
<b>12</b>	24.452±2.783	30.800±1.304	24.212±3.759	25.333±2.350
<b>14</b>	27.952±2.924	35.960±1.519	28.706±4.104	28.933±2.463
<b>16</b>	31.738±3.137	39.200±2.490	32.176±4.786	32.800±2.077
<b>18</b>	35.386±3.413	43.600±3.912	35.941±5.539	36.467±2.264
<b>20</b>	41.752±4.710	55.800±3.114	41.000±6.354	42.200±3.448

Complementary to Figure 4A.

**Supplementary Table 5. Weight of male pups from 6-20 postnatal days (PND).**

<b>PND</b>	<b>Control Mean ± SD</b>	<b>RSV Mean ± SD</b>	<b>VPA Mean ± SD</b>	<b>RSV+VPA Mean ± SD</b>
<b>6</b>	14.500±1.271	17.429±1.134	13.891±1.652	13.385±1.557
<b>8</b>	17.361±2.253	22.714±1.380	16.896±1.857	16.231±1.964
<b>10</b>	21.972±2.824	27.714±0.756	20.587±2.657	21.077±2.290
<b>12</b>	25.389±2.913	32.429±0.535	24.822±2.988	25.462±2.602
<b>14</b>	29.378±3.118	35.571±2.936	28.826±3.651	28.000±3.000
<b>16</b>	32.889±2.610	41.857±0.690	32.600±4.057	32.154±3.412
<b>18</b>	37.422±3.226	47.429±2.225	36.652±4.969	35.615±3.990
<b>20</b>	44.472±4.276	52.714±2.812	40.870±5.707	41.231±6.126

Complementary to Figure 4B.

**Supplementary Table 6. Descriptive statistical analysis of weight variation of pups.**

Parameter	Wald Chi-Square; df; p value	Pairwise Comparisons
<b>Weight Females</b>	Intercept: Wald Chi-Square = 29.575; df=1; p<0.001*** VPA: Wald Chi-Square = 38.831; df=1; p<0.001*** RSV: Wald Chi-Square = 50.095; df=1; p<0.001***	Control vs RSV:
		<0.001***
		Control vs VPA:
		>0.9999
		Control vs RSV+VPA:
		>0.9999
		RSV vs VPA:
<0.001***		
		RSV vs RSV+VPA:
		<0.001***
		VPA vs RSV+VPA:
		>0.9999
<b>Weight Males</b>	Intercept: Wald Chi-Square = 35.223; df=1; p<0.001*** VPA: Wald Chi-Square = 77.141; df=1; p<0.001*** RSV: Wald Chi-Square = 40.616; df=1; p<0.001***	Control vs RSV:
		<0.001***
		Control vs VPA:
		0.622
		Control vs RSV+VPA:
		0.786
		RSV vs VPA:
<0.001***		
		RSV vs RSV+VPA:
		0.622
		VPA vs RSV+VPA:
		>0.9999

Mean weight (g), standard deviation of female and male pups from postnatal day 6 to postnatal 20. Statistical analysis: Generalized estimating equations (GEE) by Wald Chi-Square (inference) followed by Bonferroni, \*p<0.05 \*\*\*p<0.001. Complementary to Figure 4.

**Supplementary Table 7. Length of females pups from 6-20 postnatal days (PND).**

PND	Control Mean± SD	RSV Mean± SD	VPA Mean± SD	RSV+VPA Mean± SD
6	9.48±0.37	9.90±0.22	8.94±0.75	8.60±0.51
8	10.45±0.42	11.30±0.45	9.76±0.81	9.90±0.51
10	11.64±0.45	12.60±0.22	10.79±0.85	11.00±0.65
12	12.90±0.58	14.20±0.45	11.85±1.21	12.13±0.64
14	13.76±0.79	15.30±0.27	12.88±1.32	13.30±0.68
16	15.07±0.60	16.50±0.50	13.88±1.28	14.13±0.55
18	16.43±0.76	17.60±0.55	15.24±1.35	15.60±0.83
20	17.45±0.84	18.90±0.74	16.59±1.80	16.40±0.99

Complementary to Figure 4C.



**Supplementary Table 8. Length of male pups from 6-20 postnatal days (PND).**

PND	Control Mean± SD	RSV Mean± SD	VPA Mean± SD	RSV+VPA Mean± SD
6	9.64±0.29	10.00±0.50	9.02±0.61	8.73±0.39
8	10.69±0.55	11.57±0.19	9.96±0.62	9.92±0.67
10	11.69±0.46	12.50±0.71	10.91±0.69	11.00±0.68
12	12.83±1.00	13.79±0.39	12.26±0.86	12.04±0.75
14	14.08±0.43	15.21±0.57	12.98±1.06	13.23±1.41
16	15.22±0.43	16.21±0.39	14.22±1.30	14.23±0.86
18	16.53±0.50	17.64±0.48	15.40±1.42	15.42±1.13
20	18.00±0.69	18.79±0.49	16.83±1.14	16.54±1.20

Complementary to Figure 4D.

**Supplementary Table 9. Descriptive statistical analysis of length variation of pups.**

Parameter	Wald Chi-Square; df; p value	Pairwise Comparisons
<b>Length Females</b>	Intercept: Wald Chi-Square = 4029.737; df=1; p<0.001*** VPA: Wald Chi-Square = 94.890; df=1; p<0.001*** RSV: Wald Chi-Square = 20.218; df=1; p<0.001***	Control vs RSV: <0.001***
		Control vs VPA: 0.001**
		Control vs RSV+VPA: <0.001***
		RSV vs VPA: <0.001***
		RSV vs RSV+VPA: <0.001***
		VPA vs RSV+VPA: >0.9999
		Control vs RSV: <0.001***
Control vs VPA: <0.001***		
<b>Length Males</b>	Intercept: Wald Chi-Square = 5159.901; df=1; p<0.001*** VPA: Wald Chi-Square = 99.883; df=1; p<0.001*** RSV: Wald Chi-Square = 8.645; df=1; p=0.003**	Control vs RSV+VPA: <0.001***
		RSV vs VPA: <0.001***
		RSV vs RSV+VPA: <0.001***
		VPA vs RSV+VPA: >0.9999

Mean length (cm), standard deviation of female and male pups from postnatal day 6 to postnatal 20. Statistical analysis: Generalized estimating equations (GEE) by Wald Chi-Square (inference) followed by Bonferroni, \*p<0.05 \*\*\*p<0.001. Complementary to Figure 4.

**Supplementary Table 10. Onset (PND) of developmental hallmarks of female pups.**

<b>Hallmarks</b>	<b>Control</b>	<b>RSV</b>	<b>VPA</b>	<b>RSV+VPA</b>
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
<b>Eyes Opening</b>	14.00±0.00	14.40±0.89	15.29±1.57	14.27±0.70
<b>Incisor Teeth Appearance</b>	12.48±1.46	11.60±0.89	14.24±1.39	13.47±0.92
<b>Ear Reflex</b>	14.57±2.58	10.00±2.45	13.53±2.40	12.13±1.41
<b>Cliff Avoidance</b>	7.33±1.82	6.40±0.89	8.82±2.92	6.40±0.83
<b>Negative Geotaxis</b>	9.24±3.01	9.60±2.19	10.47±2.50	9.20±2.70
<b>Startle Reflex</b>	13.43±0.91	10.80±1.10	13.41±1.97	13.47±0.92
<b>Righting Reflex</b>	7.24±1.37	7.20±1.10	8.59±1.84	8.13±1.41
<b>Lower Limb Grip</b>	8.19±2.38	6.40±0.89	9.18±1.59	7.73±1.03
<b>Lower Limb Positioning</b>	6.10±0.47	6.00±0.00	6.82±1.01	6.13± 0.52
<b>Upper Limb Grip</b>	6.00±0.00	6.40±0.89	6.71±0.99	6.40±0.83
<b>Upper Limb Positioning</b>	6.76±1.46	6.00±0.00	6.59±0.94	7.20±1.01
<b>March Reflex</b>	14.29±3.35	12.40±3.29	15.29±4.18	14.67±3.44

Complementary to Figures 5, 6 and 7. Data in Postnatal day (PND).

**Supplementary Table 11. Descriptive statistical analysis of the onset (PND) of developmental hallmarks in female pups.**

	Mean ± SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
<b>Eyes Opening</b>	Control: 14.00±0.00 RSV: 14.40±0.89 VPA: 15.29±1.57 RSV+VPA: 14.27±0.70	Interaction: F (1, 54) = 5.938; <b>p=0.0181*</b> VPA: F (1, 54) = 3.927; p=0.0526 RSV: F (1, 54) = 1.147; p=0.2889	Control vs RSV: 0.8360
			Control vs VPA: <b>0.0007***</b>
			Control vs RSV+VPA: 0.8436
			RSV vs VPA: 0.2695
			RSV vs RSV+VPA: 0.9931
			VPA vs RSV+VPA: <b>0.0193*</b>
<b>Incisor Teeth Appearance</b>	Control: 12.48±1.46 RSV: 11.60±0.89 VPA: 14.24±1.39 RSV+VPA: 13.47±0.92	Interaction: F (1, 54) = 0.01796; p=0.8939 VPA: F (1, 54) = 20.41; <b>p&lt;0.0001****</b> RSV: F (1, 54) = 4.200; <b>p=0.0453*</b>	Control vs RSV: 0.5419
			Control vs VPA: <b>0.0008***</b>
			Control vs RSV+VPA: 0.1282
			RSV vs VPA: <b>0.0013**</b>
			RSV vs RSV+VPA: <b>0.0391*</b>
			VPA vs RSV+VPA: 0.3593
<b>Ear Reflex</b>	Control: 14.57±2.58 RSV: 10.00±2.45 VPA: 13.53±2.40 RSV+VPA: 12.13±1.41	Interaction: F (1, 54) = 5.191; <b>p=0.0267*</b> VPA: F (1, 54) = 0.6132; p=0.4370 RSV: F (1, 54) = 18.33; <b>p&lt;0.0001****</b>	Control vs RSV: <b>0.0010***</b>
			Control vs VPA: 0.5050
			Control vs RSV+VPA: <b>0.0133*</b>
			RSV vs VPA: <b>0.0185*</b>
			RSV vs RSV+VPA: 0.2796
			VPA vs RSV+VPA: 0.3198
<b>Cliff Avoidance</b>	Control: 7.33±1.82 RSV: 6.40±0.89 VPA: 8.82±2.92 RSV+VPA: 6.40±0.83	Interaction: F (1, 54) = 1.546; p=0.2191 VPA: F (1, 54) = 1.546; p=0.2191 RSV: F (1, 54) = 7.843; <b>p=0.0071***</b>	Control vs RSV: 0.7748
			Control vs VPA: 0.1044
			Control vs RSV+VPA: 0.1282
			RSV vs VPA: 0.5006
			RSV vs RSV+VPA: >0.9999
			VPA vs RSV+VPA: <b>0.0053**</b>
<b>Negative Geotaxis</b>	Control: 9.24±3.01 RSV: 9.60±2.19 VPA: 10.47±2.50 RSV+VPA: 9.20±2.70	Interaction: F (1, 54) = 1.000; p=0.3217 VPA: F (1, 54) = 0.2601; p=0.6121 RSV: F (1, 54) = 0.3099; p=0.5801	Control vs RSV: 0.9929
			Control vs VPA: 0.4965
			Control vs RSV+VPA: >0.9999
			RSV vs VPA: 0.9184
			RSV vs RSV+VPA: 0.9914

			VPA vs RSV+VPA:	0.5406
			Control vs RSV:	0.0012**
			Control vs VPA:	>0.9999
<b>Startle Reflex</b>	Control: 13.43±0.91 RSV: 10.80±1.10 VPA: 13.41±1.97 RSV+VPA: 13.47±0.92	Interaction: F (1, 54) = 10.88; p=0.0017** VPA: F (1, 54) = 10.61; p=0.0019** RSV: F (1, 54) = 10.01; p=0.0026**	Control vs RSV+VPA:	0.9998
			RSV vs VPA:	0.0017**
			RSV vs RSV+VPA:	0.0017**
			VPA vs RSV+VPA:	0.9994
			Control vs RSV:	>0.9999
			Control vs VPA:	0.0394*
<b>Righting Reflex</b>	Control: 7.24±1.37 RSV: 7.20±1.10 VPA: 8.59±1.84 RSV+VPA: 8.13±1.41	Interaction: F (1, 54) = 0.2053; p=0.6523 VPA: F (1, 54) = 6.162; p=0.0162* RSV: F (1, 54) = 0.2872; p=0.5942	Control vs RSV+VPA:	0.3044
			RSV vs VPA:	0.2790
			RSV vs RSV+VPA:	0.6294
			VPA vs RSV+VPA:	0.8289
			Control vs RSV:	0.2072
			Control vs VPA:	0.3518
<b>Lower Limb Grip</b>	Control: 8.19±2.38 RSV: 6.40±0.89 VPA: 9.18±1.59 RSV+VPA: 7.73±1.03	Interaction: F (1, 54) = 0.09818; p=0.7552 VPA: F (1, 54) = 4.378; p=0.0411* RSV: F (1, 54) = 8.509; p=0.0051**	Control vs RSV+VPA:	0.8783
			RSV vs VPA:	0.0202*
			RSV vs RSV+VPA:	0.4909
			VPA vs RSV+VPA:	0.1243
			Control vs RSV:	0.9917
			Control vs VPA:	0.0079**
<b>Lower Limb Positioning</b>	Control: 6.10±0.47 RSV: 6.00±0.00 VPA: 6.82±1.01 RSV+VPA: 6.13±0.52	Interaction: F (1, 54) = 2.133; p=0.1499 VPA: F (1, 54) = 4.474; p=0.0390* RSV: F (1, 54) = 3.718; p=0.0591	Control vs RSV+VPA:	0.9983
			RSV vs VPA:	0.0839
			RSV vs RSV+VPA:	0.9801
			VPA vs RSV+VPA:	0.0254*
			Control vs RSV:	0.6851
			Control vs VPA:	0.0214*
<b>Upper Limb Grip</b>	Control: 6.00±0.00 RSV: 6.40±0.89 VPA: 6.71±0.99 RSV+VPA: 6.40±0.83	Interaction: F (1, 54) = 2.546; p=0.1164 VPA: F (1, 54) = 2.546; p=0.1164 RSV: F (1, 54) = 0.04525; p=0.8323	Control vs RSV+VPA:	0.3688
			RSV vs VPA:	0.8399
			RSV vs RSV+VPA:	>0.9999
			VPA vs RSV+VPA:	0.6344
			Control vs RSV:	0.6627
			Control: 6.76±1.46	Interaction: F (1, 54) = 2.835; p=0.0980

<b>Upper Limb Positioning</b>	RSV: 6.00±0.00	VPA: F (1, 54) = 1.583; p=0.2138	Control vs VPA:	0.9783
	VPA: 6.59±0.94	RSV: F (1, 54) = 0.03387; p=0.8547	Control vs RSV+VPA:	0.7668
	RSV+VPA:		RSV vs VPA:	0.8224
	7.20±1.01		RSV vs RSV+VPA:	0.3135
			VPA vs RSV+VPA:	0.5713
			Control vs RSV:	0.7257
<b>March Reflex</b>	Control: 14.29±3.35	Interaction: F (1, 54) = 0.3208; p=0.5735	Control vs VPA:	0.8303
	RSV: 12.40±3.29	VPA: F (1, 54) = 2.173; p=0.1462	Control vs RSV+VPA:	0.9896
	VPA: 15.29±4.18	RSV: F (1, 54) = 1.280; p=0.2630	RSV vs VPA:	0.4075
	RSV+VPA:		RSV vs RSV+VPA:	0.6253
	14.67±3.44		VPA vs RSV+VPA:	0.9617

Mean and standard deviation of the onset of female pups. Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey's test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Complementary to Figures 5, 6 and 7. Data in Postnatal day (PND)

**Supplementary Table 12. Onset (PND) of developmental hallmarks of male pups.**

<b>Hallmarks</b>	<b>Control</b>	<b>RSV</b>	<b>VPA</b>	<b>RSV+VPA</b>
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
<b>Eyes Opening</b>	14.00±0.00	14.00±0.00	15.22±1.44	15.22±1.44
<b>Incisor Teeth Appearance</b>	11.89±1.72	11.14±1.07	14.43±1.70	13.23±1.30
<b>Ear Reflex</b>	13.44±1.59	11.71±2.93	12.78±2.47	13.38±1.26
<b>Cliff Avoidance</b>	7.33±2.11	6.00±0.00	10.43±3.19	7.38±1.71
<b>Negative Geotaxis</b>	7.78±2.17	10.29±1.38	10.26±2.78	9.23±2.24
<b>Startle Reflex</b>	13.00±1.03	11.43±0.98	13.91±1.76	13.23±1.01
<b>Righting Reflex</b>	7.11±1.27	6.57±0.98	8.52±1.50	7.54±1.45
<b>Lower Limb Grip</b>	7.44±1.64	6.29±0.76	8.96±1.46	8.31±3.64
<b>Lower Limb Positioning</b>	6.44±1.03	6.00±0.00	7.13±1.46	6.15±0.55
<b>Upper Limb Grip</b>	6.00±0.00	6.00±0.00	6.35±0.78	6.62±0.96
<b>Upper Limb Positioning</b>	6.44±0.70	6.00±0.00	6.17±0.58	6.46±0.88
<b>March Reflex</b>	13.33±4.07	12.29±3.55	14.70±3.75	12.92±3.62

Complementary to Figures 5, 6 and 7. Data in Postnatal day (PND)

**Supplementary Table 13. Descriptive statistical analysis of the onset of developmental hallmarks in male pups.**

Hallmarks	Mean ± SD	F (DFn, DFd); p Value	Pairwise comparisons
<b>Eyes Opening</b>	Control: 14.00±0.00 RSV: 14.00±0.00 VPA: 15.22±1.44 RSV+VPA: 15.22±1.44	Interaction: F (1, 57) = 4.077; p=0.0482* VPA: F (1, 57) = 6.777; p=0.0118* RSV: F (1, 57) = 4.077; p=0.0482*	Control vs RSV:
			>0.9999
			Control vs VPA:
			0.0006***
			Control vs RSV+VPA:
			0.9688
			RSV vs VPA:
0.0191*			
RSV vs RSV+VPA:			
0.9849			
VPA vs RSV+VPA:			
0.0092**			
<b>Incisor Teeth Appearance</b>	Control: 12.48±1.46 RSV: 11.60±0.89 VPA: 14.24±1.39 RSV+VPA: 13.47±0.92	Interaction: F (1, 57) = 0.2786; p=0.5997 VPA: F (1, 57) = 28.52; p<0.0001**** RSV: F (1, 57) = 5.051; p=0.0285*	Control vs RSV:
			0.6971
			Control vs VPA:
			0.0001***
			Control vs RSV+VPA:
			0.0887
			RSV vs VPA:
0.0001***			
RSV vs RSV+VPA:			
0.0265*			
VPA vs RSV+VPA:			
0.1202			
<b>Ear Reflex</b>	Control: 13.44±1.59 RSV: 11.71±2.93 VPA: 12.78±2.47 RSV+VPA: 13.38±1.26	Interaction: F (1, 57) = 3.757; p=0.0576 VPA: F (1, 57) = 0.7024; p=0.4055 RSV: F (1, 57) = 0.8790; p=0.3524	Control vs RSV:
			0,2735
			Control vs VPA:
			0,7575
			Control vs RSV+VPA:
			0.9998
			RSV vs VPA:
0.6534			
RSV vs RSV+VPA:			
0.3478			
VPA vs RSV+VPA:			
0.8475			
<b>Cliff Avoidance</b>	Control: 7.33±2.11 RSV: 6.00±0.00 VPA: 10.43±3.19 RSV+VPA: 7.38±1.71	Interaction: F (1, 57) = 1.633; p=0.2065 VPA: F (1, 57) = 11.15; p=0.0015** RSV: F (1, 57) = 10.64; p=0.0019**	Control vs RSV:
			0.5931
			Control vs VPA:
			0.0007***
			Control vs RSV+VPA:
			>0.9999
			RSV vs VPA:
0.0004***			
RSV vs RSV+VPA:			
0.6036			
VPA vs RSV+VPA:			
0.0027**			
<b>Negative Geotaxis</b>	Control: 7.78±2.17 RSV: 10.29±1.38 VPA: 10.26±2.78 RSV+VPA: 9.23±2.24	Interaction: F (1, 57) = 7.144; p=0.0098** VPA: F (1, 57) = 1.164; p=0.2852 RSV: F (1, 57) = 1.246; p=0.2689	Control vs RSV:
			0.0882
			Control vs VPA:
			0.0073**
			Control vs RSV+VPA:
0.3317			
RSV vs VPA:			
>0.9999			
RSV vs RSV+VPA:			
0.7726			

			VPA vs RSV+VPA:	0.5879
			Control vs RSV:	0.0541
			Control vs VPA:	0.1501
<b>Startle Reflex</b>	Control: 13.00±1.03	Interaction: F (1, 57) = 1.361; p=0.2482 VPA: F (1, 57) = 12.69; p=0.0007*** RSV: F (1, 57) = 8.744; p=0.0045**	Control vs RSV+VPA:	0.9654
	RSV: 11.43±0.98		RSV vs VPA:	0.0004***
	VPA: 13.91±1.76		RSV vs RSV+VPA:	0.0302*
	RSV+VPA:		VPA vs RSV+VPA:	0.4700
	13.23±1.01		Control vs RSV:	0.8118
			Control vs VPA:	0.0093**
<b>Righting Reflex</b>	Control: 7.24±1.37	Interaction: F (1, 57) = 0.3305; p=0.5677 VPA: F (1, 57) = 9.494; p=0.0032** RSV: F (1, 57) = 3.895; p=0.0533	Control vs RSV+VPA:	0.8257
	RSV: 7.20±1.10		RSV vs VPA:	0.0087**
	VPA: 8.59±1.84		RSV vs RSV+VPA:	0.4387
	RSV+VPA:		VPA vs RSV+VPA:	0.1742
	8.13±1.41		Control vs RSV:	0.2772
			Control vs VPA:	0.0076**
<b>Lower Limb Grip</b>	Control: 7.44±1.64	Interaction: F (1, 57) = 0.4907; p=0.4865 VPA: F (1, 57) = 9.215; p=0.0036** RSV: F (1, 57) = 12.70; p=0.0007***	Control vs RSV+VPA:	0.9766
	RSV: 6.29±0.76		RSV vs VPA:	0.0004***
	VPA: 8.96±1.46		RSV vs RSV+VPA:	0.5008
	RSV+VPA:		VPA vs RSV+VPA:	0.0054**
	8.31±3.64		Control vs RSV:	0.8308
			Control vs VPA:	0.2591
<b>Lower Limb Positioning</b>	Control: 6.44±1.03	Interaction: F (1, 57) = 0.6429; p=0.4260 VPA: F (1, 57) = 1.601; p=0.2109 RSV: F (1, 57) = 4.585; p=0.0365*	Control vs RSV+VPA:	0.9045
	RSV: 6.00±0.00		RSV vs VPA:	0.1280
	VPA: 7.13±1.46		RSV vs RSV+VPA:	0.9923
	RSV+VPA:		VPA vs RSV+VPA:	0.0896
	6.15±0.55		Control vs RSV:	>0.9999
			Control vs VPA:	0.3368
<b>Upper Limb Grip</b>	Control: 6.00±0.00	Interaction: F (1, 57) = 0.5268; p=0.4709 VPA: F (1, 57) = 6.828; p=0.0115* RSV: F (1, 57) = 0.5268; p=0.4709	Control vs RSV+VPA:	0.0573
	RSV: 6.00±0.00		RSV vs VPA:	0.6080
	VPA: 6.35±0.78		RSV vs RSV+VPA:	0.1961
	RSV+VPA:		VPA vs RSV+VPA:	0.6411
	6.62±0.96		Control vs RSV:	0.5050
	Control: 6.44±0.70	Interaction: F (1, 57) = 3.306; p=0.0743		



<b>Upper Limb Positioning</b>	RSV: 6.00±0.00	VPA: F (1, 57) = 0.2251; p=0.6370	Control vs VPA:	0.6258
	VPA: 6.17±0.58	RSV: F (1, 57) = 0.1517; p=0.6983	Control vs RSV+VPA:	0.9999
	RSV+VPA: 6.46±0.88		RSV vs VPA:	0.9420
			RSV vs RSV+VPA:	0.5165
			VPA vs RSV+VPA:	0.6527
			Control vs RSV:	0.9283
<b>March Reflex</b>	Control: 13.33±4.07	Interaction: F (1, 57) = 0.1112; p=0.7400	Control vs VPA:	0.6763
	RSV: 12.29±3.55	VPA: F (1, 57) = 0.8458; p=0.3616	Control vs RSV+VPA:	0.9912
	VPA: 14.70±3.75	RSV: F (1, 57) = 1.682; p=0.1998	RSV vs VPA:	0.4742
	RSV+VPA: 12.92±3.62		RSV vs RSV+VPA:	0.9848
			VPA vs RSV+VPA:	0.5501

Mean and standard deviation of the onset of male pups. . Statistical analysis: two-way ANOVA followed by Tukey's test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Complementary to Figures 5, 6 and 7.

## **6. DISCUSSÃO**

Neste estudo, observamos alterações na variação de peso gestacional nos dias E13.5 e E18.5 em fêmeas expostas ao VPA. Além disso, uma correlação positiva foi observada entre a variação de peso em E15,5, E16,5, E17,5 e E18,5 e o número de filhotes no grupo VPA. Como previamente observado nesse modelo (Favre et al., 2013), o grupo VPA exibiu menos filhotes por ninhada em comparação com os outros grupos. Após a injeção de VPA, as fêmeas prenhes experimentaram contrações imediatas na região abdominal inferior, induzindo alterações transitórias (de alguns minutos) no comportamento locomotor e padrões respiratórios. Este desconforto agudo provavelmente afetou os padrões alimentares, porém, com as análises realizadas não se tem como afirmar se esse desconforto transitório interferiu de fato no desenvolvimento embrionário. Estudos anteriores com VPA radioativo ( $[^{14}\text{C}]\text{VPA}$  e  $[^3\text{H}]\text{VPA}$ ) mostraram que o VPA, quando administrado intraperitonealmente, é rapidamente absorvido pelo metabolismo de ratos, com presença detectável no cérebro, fígado e rins em dez minutos. Dentro de trinta minutos, o VPA atinge concentrações máximas nesses órgãos, seguido por uma queda subsequente, com 97% da radioatividade do VPA perdida em 24 horas (Aly & Abdel-Latif, 1980; Herbison et al., 1982). A injeção intraperitoneal de solução salina não provocou nenhuma reação observável. No caso da injeção intraperitoneal contendo VPA, as contrações nas proximidades da aplicação foram agudas e transitórias. Estudos prévios indicam que a maior parte musculatura da parede abdominal no roedor contém fibras do tipo IIB (67–74 %), contendo alta atividade ATPásica da miosina (pH 9,4), são de contração rápida, têm baixa capacidade oxidativa e alta glicolítica e fadigam rapidamente (Herbison et al., 1982; Siebenaller et al., 2022). Um estudo realizado com preparações de músculo liso do trato gastrointestinal de ratos mostrou que o VPA pode

provocar resposta contrátil em concentrações de até  $10^{-4}$  g/mL, provavelmente por induzir aumento de cálcio intracelular. O efeito contrátil foi prevenido por indometacina, um antiinflamatório que reduz produção de prostaglandina, sugerindo que a via pela qual o VPA possa estar induzindo contração do músculo liso seja por meio de receptores de prostaglandina do tipo F (FP), seguido por aumento de cálcio intracelular (Ruan et al., 2011). Diante desses achados, sugerimos que contrações observadas na rata prenhe após a administração de VPA estejam ocorrendo por meio de aumento de cálcio intracelular nas células da musculatura uterina. Novos estudos serão necessários para investigar essa hipótese. Essas contrações observadas podem ser explicadas pela nocicepção local causada pela administração do VPA, levando-se em conta o volume alta administrado. Não sendo possível afirmar que esses efeitos possam ser indutores de inflamação a nível sistêmico.

Assim, a correlação entre a variação de peso observado entre E15.5-E18.5 e o número reduzido de filhotes no grupo VPA pode estar relacionada ao impacto de uma alta concentração de VPA (600 mg/kg) sobre o ambiente intrauterino, bem como sobre mecanismos de sinalização locais em nível uterino/placentário, com consequente reabsorção fetal resultando potencialmente em menos filhotes com posterior prejuízo no neurodesenvolvimento. O modelo animal de TEA usado nesse trabalho envolveu ratas prenhes expostas a 600 mg/kg de VPA. Na literatura, foi encontrado evidências, usando uma exposição de 500 mg/kg em outros estudos, mais de 50% das gestações mostraram reabsorção completa (Favre et al., 2013).

É importante destacar que o período gestacional em humanos é particularmente vulnerável a fatores de risco ambientais, podendo promover impactos no

desenvolvimento encefálico. O ganho de peso insuficiente durante a gestação aumenta o risco de atrasos no desenvolvimento na comunicação, habilidades motoras e domínios sociais em crianças (Modabbernia et al., 2017). Modelos animais expostos a fatores de risco ambiental durante o desenvolvimento pré-natal, como o lipopolissacarídeo (LPS), demonstraram efeitos adversos no peso placentário, contagem de embriões e anomalias neurodesenvolvimentais subsequentes na vida pós-natal (Straley et al., 2014). A ativação imunológica materna, que induz um estado pró-inflamatório durante a gestação, tem sido associada a prejuízos do neurodesenvolvimento na prole (Deckmann et al., 2018; Fontes-Dutra et al., 2020).

Uma única dose intraperitoneal de 600 mg/Kg de VPA pode desencadear efeitos como hiperativação de vias biológicas associadas à inflamação, contribuindo para um propagar alterações sobre o sistema imunológico no período pós-natal (Huang et al., 2016). É importante destacar que o VPA, administrado em animais não prenhes induz efeitos anti-inflamatórios (Amirzargar et al., 2017; Tian et al., 2019), porém, durante o período gestacional, o efeito, dependendo da dose, pode ser indutor de resposta pró-inflamatória (Lucchina and Depino, 2014). A exposição pré-natal ao VPA em humanos também está associada a um maior risco de desenvolvimento de TEA em crianças (Christensen et al., 2013). Além disso, é digno de nota que crianças expostas a doses de valproato de cerca de 800 mg ou mais, por vários dias durante a gravidez apresentaram uma redução substancial de 9,7 pontos em seus escores de QI em comparação com aquelas que não foram expostas (Baker et al., 2015).

O RSV possui diferentes efeitos moleculares, incluindo a modulação de mecanismos metabólicos como a biogênese mitocondrial e ativação de sirtuína (SIRT) 1,

uma desacetilase de histonas (Zhao et al., 2020). Estudos anteriores com roedores demonstraram que a administração gestacional de RSV pode prevenir anomalias no desenvolvimento em modelos de distúrbios do neurodesenvolvimento, dentre eles, modelos de TEA, esquizofrenia, e de atraso no neurodesenvolvimento mediado por disfunções mitocondriais. (Xie et al., 2018; Chen et al., 2020; Ferreira et al., 2020; Zhao et al., 2020). Além disso, a injeção subcutânea de RSV em ovelhas prenhes aumentou o peso fetal, promovendo melhor oxigenação e crescimento fetal (Darby et al., 2019). Com base nesses achados, postulamos que o RSV promove um ambiente gestacional mais favorável que auxilia na recuperação de possíveis danos futuros. O aumento observado no peso fetal e no comprimento dos filhotes no grupo RSV pode ser atribuído a condições uterinas aprimoradas que sustentam um desenvolvimento pré e pós-natal melhorado. Consequentemente, as alterações na variação de peso observadas em ratas grávidas expostas ao VPA podem ser consequência de um ambiente uterino prejudicado que afeta o desenvolvimento da prole nos primeiros estágios de vida, semelhante aos resultados observados em humanos (Mayer and Joseph, 2013; Mamun et al., 2014).

Os efeitos da exposição ao VPA se estendem tanto para o início quanto para o final da vida pós-natal, com diversos estudos demonstrando prejuízos sociais na idade adulta (Schneider and Przewłocki, 2005; Bambini-Junior et al., 2011; Favre et al., 2013; Deckmann et al., 2018). Embora o RSV não tenha conseguido mitigar completamente os danos observados na variação de peso induzida pelo VPA e a redução na contagem de filhotes, ele contrapôs de maneira eficaz prejuízos nos marcos de desenvolvimento induzidos pelo VPA. Interessantemente, o RSV facilitou o aparecimento precoce de certos marcos de desenvolvimento, além de influenciar positivamente os resultados de

peso e comprimento. Isso sugere que os efeitos do RSV vão além da prevenção do fenótipo do tipo autista, envolvendo potencialmente o metabolismo celular e o desenvolvimento de tecidos (Vang et al., 2011), conforme evidenciado pelo aumento de peso e comprimento em comparação com os outros grupos. O tratamento pré-natal com RSV preveniu o início tardio dos reflexos de abertura dos olhos, aversão ao penhasco e preensão dos membros inferiores induzidos pelo VPA em machos. Embora o desenvolvimento dos membros tenha sido afetado, não houve alteração no reflexo de marcha, indicando que, embora o mecanismo funcional-mecânico motor funcione normalmente, as alterações nos membros podem estar relacionadas à integração sensório-motora.

A integração sensorial refere-se ao processo de consolidar informações de um ou vários domínios sensoriais, direcionando o processamento dessas múltiplas vias para o encéfalo (Camarata et al., 2020). Avaliações de rastreamento ocular (*eye-tracking*) em indivíduos com TEA, incluindo crianças e bebês, revelaram desafios em manter o contato visual típico, sugerindo que redes neurais envolvidas na integração sensorial podem contribuir para comportamentos atípicos (Black et al., 2017). Respostas reduzidas à integração de estímulos vestibulo-ocular são observadas em crianças com TEA e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Carson et al., 2017). Esse déficit pode resultar possivelmente em um processamento visual alterado, em vez de um comprometimento isolado no sistema vestibular. Uma repercussão potencial de distúrbios na integração vestibular-visual pode se manifestar no atraso no marco de abertura dos olhos entre animais pré-natalmente expostos ao VPA. Este marco é fundamental para o processamento e integração de estímulos visuais, e pode ser potencialmente afetado por

padrões anormais de conexão visual que surgem antes da abertura dos olhos (Huberman et al., 2008). Portanto, hipotetizamos que atrasos na abertura dos olhos podem surgir como consequência de distúrbios na integração vestibular-visual, possivelmente influenciada pelo desenvolvimento precoce de padrões de conexão visual que ocorrem antes da abertura dos olhos. Essa perspectiva sugere uma possível interação entre distúrbios na integração sensorial e o momento da abertura dos olhos. Essa relação complexa destaca a necessidade de investigações adicionais para elucidar os mecanismos intrincados subjacentes a esses atrasos no desenvolvimento.

Embora nosso estudo não tenha encontrado alterações no reflexo da pálpebra ou em suas bases neurais, anomalias na integração de domínios sensoriomotores, semelhantes aos padrões de TEA, podem estar presentes (Wang et al., 2017). Padrões distintos de conectividade, foram documentados em indivíduos com TEA (Just et al., 2004, 2012). Estudos sugerem um espectro de alterações de conectividade em TEA, abrangendo subconectividade, superconectividade ou ambos, retratando um padrão difuso de conectividade prejudicada (Di Martino et al., 2014; Cheng et al., 2015). Sujeitos com TEA apresentam dificuldades em filtrar informações auditivas de estímulos ruidosos, em vez de um comprometimento auditivo direto (Rotschafer, 2021), semelhante ao que é observado ao analisar o processamento de estímulos visuais. O atraso na resposta ao reflexo de sobressalto, bem como na geotaxia negativa, na aversão ao penhasco e no endireitamento, induzido pela exposição pré-natal ao VPA, pode resultar em parte de processos anormais dentro do eixo auditivo-vestibular.

Prejuízos no sistema somatossensorial, responsável pelo processamento de estímulos táteis, proprioceptivos e nociceptivos, são comumente observados em

indivíduos com TEA, oferecendo um potencial valor diagnóstico (Thye et al., 2018). No modelo animal de TEA induzido pela exposição ao VPA, foram observados prejuízos no processamento de estímulos somatossensoriais, incluindo o teste comportamental *Whisker Nuisance Task* além de distribuição irregular de neurônios GABAérgicos parvalbumina-positivos na área somatossensorial primária (Fontes-Dutra et al., 2018). O sistema inibitório desempenha um papel fundamental em atenuar o ruído das informações sensoriais, contribuindo para a integração sensorial nas áreas somatossensoriais primárias e secundárias. Além disso, a maturação desses neurônios também é considerada um marcador do estágio do desenvolvimento sensorial inicial (Reha et al., 2020).

Considerando a distribuição de interneurônios comprometida nas camadas somatossensoriais e a importância do córtex somatossensorial secundário em funções como discriminação tátil, manipulação de objetos, agarrar e soltar (Wolff and Shepard, 2013), postulamos que a integração comprometida de estímulos somatossensoriais contribui para os atrasos observados na preensão e no posicionamento dos membros em ratos expostos ao VPA. A literatura documenta extensamente a integração sensoriomotora-vestibular-visual (Cheung and Lau, 2020), e o comprometimento nessa interação complexa pode afetar diretamente o desenvolvimento de comportamentos como a aversão ao penhasco, a geotaxia negativa e o endireitamento em animais expostos ao VPA.

Além disso, os mecanismos subjacentes aos efeitos neuroprotetores do RSV contra a exposição ao VPA durante a gestação envolvem sua capacidade de modular a sinalização de neurotransmissores, reduzir o estresse oxidativo e a inflamação, melhorar a neurogênese e plasticidade sináptica, e aprimorar a função cognitiva. Esses mecanismos



são respaldados por um crescente corpo de evidências provenientes de modelos animais, estudos em cultura de células e estudos clínicos. A capacidade do RSV de contrariar as alterações induzidas pelo VPA na expressão gênica e atividade de neurotransmissores o torna um candidato promissor para a prevenção e tratamento de diferentes distúrbios neurológicos. Estudos adicionais são necessários para compreender os mecanismos exatos subjacentes aos efeitos neuroprotetores do RSV no modelo animal de TEA induzido por VPA, bem como para determinar a dosagem ideal, segurança e duração do tratamento com RSV durante a gravidez em seres humanos. No geral, o potencial valor terapêutico do RSV na prevenção e tratamento do TEA e de outros distúrbios neurológicos associados ao estresse oxidativo e à inflamação representa uma área de grande interesse para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas.

Embora nosso estudo forneça informações valiosas sobre as consequências do desenvolvimento da exposição pré-natal ao VPA e os benefícios potenciais da intervenção com RSV, reconhecemos a importância crítica de mais estudos e evidências clínicas para preencher a lacuna entre os resultados em modelos com murinos e suas implicações potenciais para indivíduos com TEA. A tradução de resultados de modelos animais para contextos clínicos requer uma consideração cuidadosa das diferenças entre espécies, bem como a natureza multifacetada do TEA.

No manuscrito presente no capítulo II, destacamos efeitos biológicos do RSV e do VPA, que poderão auxiliar estudos futuros envolvendo possíveis alvos biológicos no modelo VPA, bem como possíveis alvos para geração de terapias mais assertivas no TEA.

A capacidade do RSV de diminuir o estresse oxidativo e a inflamação, promover a neurogênese, aumentar a plasticidade sináptica e melhorar a função cognitiva o torna

um candidato promissor para ensaios clínicos. No modelo de TEA com VPA, o RSV impediu as alterações comportamentais, celulares e moleculares induzidas pelo VPA. Além disso, o RSV apresentou efeitos neuroprotetores em outras doenças neurológicas, como doença de Alzheimer (Karuppagounder et al., 2009; Turner et al., 2015), doença de Parkinson (Khan et al., 2010) e esclerose múltipla (Zheng et al., 2023).

É necessário ressaltar que o efeito do VPA, aumentando a permanência de GABA na fenda sináptica e causando efeitos inibitórios é desejado e seguro, sendo inclusive o motivo para a sua prescrição médica no contexto da epilepsia e seu uso é eficaz. O VPA é seguro para uso pós-natal sendo inclusive utilizado em pacientes com TEA por seus efeitos como estabilizador de humor. A precaução advém de seu uso em mulheres em idade fértil, que possam vir a ter uma gestação. A importância da continuidade do tratamento com o VPA poderia demandar uma atenção às terapias que visem minimizar os riscos para a prole.

Com relação ao sistema excitatório/inibitório, o ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório que contrabalança a excitação no encéfalo maduro. A ação inibitória do GABA depende da entrada de íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), hiperpolarizando o neurônio. Entretanto, no início do desenvolvimento, a sinalização do GABA induz correntes de  $\text{Cl}^-$  para fora, sendo despolarizante. A regulação dinâmica do GABA, passando de um neurotransmissor excitatório para inibitório é um marco significativo durante a maturação encefálica, regulando proliferação, migração, diferenciação e plasticidade dos neurônios em desenvolvimento (Peerboom and Wierenga, 2021). A mudança está intimamente associada à expressão do canal de potássio KCC2, que permite o estabelecimento do sinal inibitório na circuitaria neuronal

(McMoneagle et al., 2023). Pesquisas adicionais são necessárias para elucidar os eventos moleculares específicos e as vias de sinalização envolvidas nas funções do GABA durante as fases iniciais e como elas contribuem para o refinamento e estabelecimento da conectividade neuronal. Tais investigações aprofundarão nossa compreensão do desenvolvimento neural e podem oferecer possíveis abordagens terapêuticas para transtornos do neurodesenvolvimento relacionados com sinalizações GABAérgicas alteradas.

Salientamos que os mecanismos subjacentes aos efeitos neuroprotetores do RSV contra os efeitos do VPA durante a gravidez podem envolver sua capacidade de modular o sinal GABAérgico, reduzir o estresse oxidativo e a inflamação, aumentar a neurogênese e a plasticidade sináptica, e melhorar a função cognitiva. Esses mecanismos são apoiados por um corpo crescente de evidências provenientes de modelos animais, estudos de cultura de células e estudos clínicos. A capacidade do RSV de contrapor as alterações na expressão gênica e atividade dos neurotransmissores induzidas pelo VPA o torna um candidato promissor para a prevenção e tratamento de diferentes distúrbios neurológicos.

Embora o atual estágio de pesquisa do uso de RSV em humanos no contexto intrauterino de prevenção aos transtornos do neurodesenvolvimento esteja ainda em estágios pré-clínicos, a possibilidade de incorporar o RSV como uma intervenção terapêutica na gestação instiga considerações mais amplas sobre sua aplicação em populações específicas, especialmente no caso de famílias com históricos de TEA. Alguns casos que poderiam futuramente ser contemplados com uma abordagem utilizando o RSV são, dentre outras, o caso de pais que já tiveram um primeiro filho diagnosticado ou com sintomas que possam desejar uma segunda gestação, ou ainda no

caso de tios e primos diagnosticados, evidenciando um potencial gatilho genético presente. Ou ainda, em casos de mulheres com epilepsia que necessitam de controle das crises convulsivas, utilizando-se, por exemplo de VPA para o manejo das crises.

Esta perspectiva emergente destaca a necessidade contínua de investigações científicas para estabelecer protocolos seguros e eficazes, visando potenciais aplicações do RSV como uma ferramenta terapêutica inovadora durante a gestação. A aplicação clínica do RSV na prevenção do TEA demanda uma abordagem criteriosa, enfocando a personalização do tratamento com base em fatores individuais e considerando os estágios críticos do desenvolvimento neural. Um estudo recente de nosso grupo de pesquisa encontrou resultados interessantes utilizando o RSV em meninos de 5 anos de idade, diminuindo irritabilidade e melhorando o score ABC, uma escala elaborada para triagem e indicação de probabilidade de diagnóstico de TEA (Marchezan et al., 2022). Outro estudo com 62 pacientes também encontrou melhora na irritabilidade e no score ABC após utilizar o RSV juntamente com a risperidona, tratamento padrão ouro para agressividade e irritabilidade no TEA (Hendouei et al., 2020).

Além de não apresentar evidências que possam causar preocupações com relação ao consumo durante a gestação, pesquisas recentes propõe que o RSV poderia ser benéfico em diversos aspectos da gestação, atuando amplamente, seja na fertilidade masculina, melhorando o número e qualidade de espermatozoides (Cui et al., 2016) seja melhorando condições de ovários e tratando endometriose (Bruner-Tran et al., 2011; Ricci et al., 2013; Shojaei-Zarghani & Rafraf, 2022; Yavuz et al., 2014)

No entanto, é imperativo exercer cautela, realizando estudos mais aprofundados para entender completamente os benefícios e possíveis riscos associados ao uso do RSV

durante a gravidez. Ainda que evidências permitam que a exploração desse campo de pesquisa seja promissor e possa subsidiar, no futuro, uma intervenção segura durante a gestação para gestantes elegíveis.

A prevalência do TEA em meninos e meninas pode se manifestar de maneira distinta, com as características tradicionais do TEA muitas vezes apresentando nuances específicas de gênero. Em meninos, observa-se frequentemente uma manifestação mais evidente de comportamentos repetitivos e padrões restritos, alinhando-se com os critérios diagnósticos convencionais. No entanto, em meninas com TEA, esses comportamentos podem ser mais sutis e, muitas vezes, compensados por estratégias sociais aparentemente mais avançadas. Além disso, profissionais de saúde relatam observações empíricas de que meninas diagnosticadas com TEA, em geral tem comportamentos mais graves, sendo aparentemente mais prejudicadas em ambos os domínios da díade.

O diagnóstico do TEA apresenta uma notável disparidade de gênero, sendo que, meninos são diagnosticados com mais frequência do que meninas. Esta discrepância tem levantado questões cruciais sobre um possível subdiagnóstico em meninas, uma vez que os critérios diagnósticos tradicionais podem não refletir completamente a expressão do TEA no sexo feminino. Uma hipótese intrigante sugere que a natureza socialmente mais adaptativa das meninas pode mascarar certos comportamentos característicos do TEA, resultando em um subdiagnóstico significativo.

A compreensão dessas diferenças de gênero no diagnóstico do TEA é crucial para garantir uma avaliação mais precisa e inclusiva. É necessário que os profissionais de saúde estejam cientes das variações na apresentação do TEA também em meninas, adaptando os critérios diagnósticos para considerar nuances específicas de gênero. Essa

abordagem mais sensível pode facilitar uma intervenção precoce e personalizada, proporcionando às meninas com TEA o suporte necessário para o seu amplo desenvolvimento.

A hipótese do "cérebro extremamente masculino", do inglês "*Extreme Male Brain*" é uma teoria que sugere características neuroanatômicas e funcionais distintas no cérebro de meninos com TEA. Essa teoria, proposta por Simon Baron-Cohen e colaboradores (Baron-Cohen, 2009; Greenberg et al., 2018; van Eijk & Zietsch, 2021), destaca a ideia de que o cérebro de indivíduos com TEA, especialmente meninos, exibe características mais "masculinas" em comparação com o padrão típico de desenvolvimento. Demonstrando características masculinas mais pronunciadas (Greenberg et al., 2018; van Eijk & Zietsch, 2021).

Os elementos chave desta hipótese incluem uma ênfase na maior prevalência de habilidades cognitivas ligadas ao hemisfério cerebral esquerdo, como a capacidade para sistemas de categorização e análise detalhada de padrões, características frequentemente associadas a funções mais "masculinas". Além disso, sugere-se que o cérebro extremamente masculino apresentaria um foco acentuado em áreas de interesse específico, por vezes consideradas como "obsessões" no contexto do TEA (Baron-Cohen, 2009; Greenberg et al., 2018).

Essa hipótese destaca a variabilidade nas características cognitivas e comportamentais dentro do espectro autista, ressaltando que as diferenças de gênero podem estar entrelaçadas com características neurobiológicas específicas. No entanto, é importante notar que a hipótese do "cérebro extremamente masculino" tem sido objeto de debate, com críticos apontando para a diversidade significativa dentro do espectro e

ressaltando a necessidade de uma abordagem mais individualizada ao considerar o perfil neurobiológico de indivíduos com TEA. E evidenciando que algumas das propostas dessa hipótese poderiam ser, em muito explicadas por uma diferença no tamanho encefálico observado nos pacientes com TEA. (van Eijk & Zietsch, 2021).

Nosso estudo revelou descobertas significativas ao explorar as alterações nos marcos do desenvolvimento em um modelo animal de TEA induzido pelo VPA. Observamos alterações induzidas pelo VPA nos marcos do desenvolvimento em ambos os sexos (abertura dos olhos, aparecimento do dente incisivo e endireitamento), apenas em machos (aversão à queda, geotaxia negativa e preensão dos membros inferiores) e apenas em fêmeas (posicionamento dos membros inferiores). Apesar de apresentar de alguma forma ser menos vulneráveis a alguns efeitos nocivos do VPA, e não apresentarem as alterações no comportamento social encontrados em machos do modelo VPA, as fêmeas VPA também apresentam diversas alterações relacionadas ao transtorno, sejam elas comportamentais, morfológicas ou moleculares (Favre et al., 2013; Kataoka et al., 2013; Nicolini & Fahnestock, 2018; Schneider et al., 2008). A complexidade observada nos padrões de comportamento em fêmeas do modelo VPA sugere que uma avaliação abrangente, considerando uma variedade de domínios comportamentais, é essencial para compreender plenamente a heterogeneidade dessa condição e desenvolver intervenções específicas para as necessidades individuais de cada sexo.

Essa diferenciação comportamental entre os sexos destaca a complexidade do espectro autista, enfatizando que os gêneros podem apresentar alterações comportamentais de maneira e em grau diferentes, o que pode ser observado em humanos e em modelos animais. Essa compreensão mais refinada das nuances de comportamento

entre os sexos no contexto do TEA é crucial para orientar futuras pesquisas e estratégias de intervenção, reconhecendo a importância de abordagens personalizadas para atender às distintas manifestações comportamentais observadas em meninos e meninas com TEA (Greenberg et al., 2018).

A SIRT1, tem sido objeto de interesse no contexto do autismo devido ao seu papel na regulação epigenética, inflamação, estresse oxidativo e metabolismo celular. Além disso, o VPA tem sido implicado na alteração da expressão gênica por meio da inibição das histona desacetilases, incluindo a SIRT1, levando a mudanças epigenéticas que podem contribuir para os fenótipos autistas observados em modelos animais e em humanos expostos ao VPA durante a gestação (Zahedi et al., 2023).

Assim, o RSV tem se destacado como um agente promissor no contexto do autismo, contrapondo os efeitos do VPA (Hidema et al., 2020). Em estudos pré-clínicos, o RSV demonstrou ter efeitos neuroprotetores e moduladores do sistema nervoso central, inclusive através da ativação da SIRT1 (Elesawy et al., 2022; Zahedi et al., 2023), com efeitos benéficos sobre expressão gênica e homeostase celular. Em particular, a capacidade do RSV de modular a atividade da SIRT1 pode influenciar positivamente processos celulares essenciais para o desenvolvimento neural, como a plasticidade sináptica e a resposta ao estresse oxidativo.

Postulamos que a prevenção do TEA através do RSV, especialmente em modelos animais induzidos por VPA, pode envolver a modulação da SIRT1. Contudo, é crucial salientar que tanto o VPA quanto o RSV são moléculas multifacetadas. Assim, seria simplista presumir um antagonismo direto, onde uma molécula age de maneira inibitória em uma via enquanto a outra atua de forma excitatória, seguindo um padrão inverso.



Embora interações mais simplificadas entre o VPA e o RSV possam ocorrer, não devem ser consideradas a explicação exclusiva para os fenótipos comportamentais observados.

Em resumo, este estudo investigou os efeitos da exposição pré-natal ao VPA e o potencial papel do RSV na modulação desses efeitos em um modelo animal de TEA. Observamos que a exposição ao VPA durante a gestação resultou em alterações nos marcos do desenvolvimento, tanto em machos quanto em fêmeas, com diferenças específicas de sexo em alguns comportamentos. Além disso, encontramos evidências de que o RSV pode atenuar alguns dos efeitos induzidos pelo VPA, especialmente relacionados ao desenvolvimento comportamental. No entanto, são necessárias investigações adicionais para compreender completamente os mecanismos subjacentes aos efeitos do VPA e do RSV e para determinar a eficácia e segurança do RSV como uma intervenção terapêutica potencial durante a gestação em humanos. A consideração das diferenças de gênero na expressão e tratamento do TEA é crucial para garantir intervenções eficazes e personalizadas que abordem as necessidades individuais dos pacientes.

A capacidade do RSV de modular a sinalização de neurotransmissores, reduzir o estresse oxidativo e a inflamação, melhorar a neurogênese e plasticidade sináptica, além de influenciar positivamente o desenvolvimento comportamental, destaca seu potencial como uma intervenção terapêutica promissora no contexto do TEA. No entanto, é crucial reconhecer as limitações do presente estudo, como a necessidade de investigações mais aprofundadas para elucidar os mecanismos moleculares exatos pelos quais o RSV exerce seus efeitos neuroprotetores.

Considerando o cenário atual de pesquisa sobre o uso de RSV em transtornos do neurodesenvolvimento, incluindo o TEA, é de suma importância abordar questões relevantes relacionadas à segurança, eficácia e dosagem. Estudos clínicos adicionais são necessários para validar a aplicabilidade desses achados em seres humanos, garantindo uma transição segura e eficaz do laboratório para a prática clínica.

O trabalho incluído no capítulo II abordou os potenciais mecanismos neuroprotetores do RSV contra a exposição ao VPA durante a gestação, destacando suas capacidades de modulação da sinalização de neurotransmissores, em especial GABAérgicos, redução do estresse oxidativo e inflamação, além de promoção da neurogênese e plasticidade sináptica. Evidências abordadas sugerem que o RSV pode atuar futuramente como um agente terapêutico promissor na prevenção e tratamento de transtornos neurológicos, incluindo o TEA, associado à exposição ao VPA. A capacidade do RSV de atravessar a barreira hematoencefálica e interagir com múltiplas vias celulares reforça sua potencial aplicação clínica, oferecendo um enfoque multifacetado para mitigar os efeitos adversos da exposição ao VPA.

No entanto, é importante destacar as limitações dos estudos atuais, que se concentram predominantemente em modelos pré-clínicos. A translação desses achados para contextos clínicos humanos requer pesquisas adicionais para avaliar a eficácia e segurança do RSV em populações humanas, especialmente em mulheres grávidas e suas crias. Estudos futuros devem explorar doses terapêuticas, possíveis efeitos adversos e a duração ideal do tratamento com RSV para maximizar seus benefícios neuroprotetores.

Em resumo, os achados elencados nesse trabalho trazem evidências que contribuem para a compreensão dos mecanismos subjacentes às ações neuroprotetoras do

RSV e abrem novas perspectivas para intervenções terapêuticas no contexto do TEA e outros transtornos do neurodesenvolvimento, em especial no que se refere às questões associadas ao estresse oxidativo e inflamação. A continuidade das investigações nesta área é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes que possam melhorar a qualidade de vida de indivíduos afetados por essas condições neurológicas.

#### Conclusões:

- Os dados avaliados destacam as consequências prejudiciais da exposição pré-natal ao VPA na variação de peso gestacional e na contagem de filhotes em um modelo animal.
- O desconforto imediato e o comportamento alterado exibidos por ratas prenhes após a injeção de VPA enfatizam o impacto potencial deste teratígeno no desenvolvimento embrionário.
- A associação do VPA com respostas inflamatórias e imunológicas sugere mecanismos envolvendo neuroinflamação para o gatilho embrionário.
- As alterações nos marcos do desenvolvimento abrangem aspectos sensoriais e motores, indicando uma possível deficiência precoce em sua integração, sensoriomotora, podendo servir como marcadores preditivos para futuros prejuízos comportamentais no TEA, ao longo do desenvolvimento.
- O sinal excitatório GABAérgico durante o desenvolvimento embrionário pode ser alvo da ação do VPA, com potencial para exacerbar a via excitatória
- O RSV tem potencial para contrapor o efeito do VPA sobre a via GABAérgica.

Ponderações finais:

Nossos resultados estão alinhados com pesquisas anteriores que indicam o impacto substancial da exposição ao VPA durante os estágios iniciais do desenvolvimento em modelos animais de TEA. Estudos adicionais são necessários para compreender os mecanismos exatos subjacentes aos efeitos neuroprotetores do RSV no modelo animal de VPA, assim como para determinar a dosagem ideal, segurança e duração do tratamento com RSV durante a gravidez em humanos. No geral, o potencial terapêutico do RSV na prevenção e tratamento do TEA e outros distúrbios neurológicos associados ao estresse oxidativo e à inflamação é uma área propícia para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas. Nosso estudo amplia a compreensão sobre o impacto da exposição pré-natal ao VPA sobre os marcos do desenvolvimento, reforçando o uso do RSV no modelo VPA como uma importante estratégia para investigar a fisiopatologia e etiologia do TEA, assim como potencial uso terapêutico em humanos durante o período gestacional.

Perspectivas:

Como perspectivas, destacam-se a análise de receptores gabaérgicos, SIRT1 e marcadores de estresse oxidativo em animais em estágio de desenvolvimento embrionário no modelo animal de TEA induzido por VPA, bem como o eventual efeito preventivo mediado por RSV. Em especial, analisando diferentes janelas de desenvolvimento (por exemplo, E13,5, E15,5 e E18,5). Tais estudos permitiriam acompanhar a maturação do encéfalo em ambiente fetal e poderiam sugerir mecanismos etiológicos de transtornos do desenvolvimento. Além de poder futuramente direcionar estudos visando abordagens preventivas.

## 7. REFERÊNCIAS

- Aldenkamp, A., Vigevano, F., Arzimanoglou, A., & Covanis, A. (2006). Role of valproate across the ages. Treatment of epilepsy in children. *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum*, 184(SUPPL. 184), 1–13.  
<https://doi.org/10.1111/J.1600-0404.2006.00666.X>
- Aly, M. I., & Abdel-Latif, A. A. (1980). Studies on distribution and metabolism of valproate in rat brain, liver, and kidney. *Neurochemical Research*, 5(12), 1231–1242. <https://doi.org/10.1007/BF00964959>
- Baron-Cohen, S. (2009). Autism: the empathizing-systemizing (E-S) theory. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1156, 68–80. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2009.04467.X>
- Beghi, E. (2020). The Epidemiology of Epilepsy. *Neuroepidemiology*, 54(2), 185–191.  
<https://doi.org/10.1159/000503831>
- Björk, M. H., Zoega, H., Leinonen, M. K., Cohen, J. M., Dreier, J. W., Furu, K., Gilhus, N. E., Gissler, M., Hálfðánarson, Ó., Iglund, J., Sun, Y., Tomson, T., Alvestad, S., & Christensen, J. (2022). Association of Prenatal Exposure to Antiseizure Medication With Risk of Autism and Intellectual Disability. *JAMA Neurology*, 79(7), 772–781. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2022.1269>
- Bromley, R. L., Mawer, G. E., Briggs, M., Cheyne, C., Clayton-Smith, J., García-Fiñana, M., Kneen, R., Lucas, S. B., Shallcross, R., & Baker, G. A. (2013). The prevalence of neurodevelopmental disorders in children prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 84(6), 637. <https://doi.org/10.1136/JNNP-2012-304270>
- Bruner-Tran, K. L., Osteen, K. G., Taylor, H. S., Sokalska, A., Haines, K., & Duleba, A. J. (2011). Resveratrol inhibits development of experimental endometriosis in vivo and reduces endometrial stromal cell invasiveness in vitro. *Biology of Reproduction*, 84(1), 106–112. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.110.086744>
- Christensen, J., Grønborg, 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*, 309(16), 1696.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2013.2270>

- Cui, X., Jing, X., Wu, X., & Yan, M. (2016). Protective effect of resveratrol on spermatozoa function in male infertility induced by excess weight and obesity. *Molecular Medicine Reports*, *14*(5), 4659. <https://doi.org/10.3892/MMR.2016.5840>
- De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Cicek, A. E., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Fu, S. C., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P. F., Brownfeld, J. M., Cai, J., Campbell, N. G., ... Buxbaum, J. D. (2014). Synaptic, transcriptional, and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, *515*(7526), 209. <https://doi.org/10.1038/NATURE13772>
- Devinsky, O., Vezzani, A., O'Brien, T. J., Jette, N., Scheffer, I. E., De Curtis, M., & Perucca, P. (2018). Epilepsy. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*. <https://doi.org/10.1038/NRDP.2018.24>
- Elesawy, R. O., El-Deeb, O. S., Eltokhy, A. K., Arakeep, H. M., Ali, D. A., Elkholy, S. S., & Kabel, A. M. (2022). Postnatal baicalin ameliorates behavioral and neurochemical alterations in valproic acid-induced rodent model of autism: The possible implication of sirtuin-1/mitofusin-2/ Bcl-2 pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *150*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.112960>
- Favre, M. R., Barkat, T. R., LaMendola, D., Khazen, G., Markram, H., & Markram, K. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*(JUL). <https://doi.org/10.3389/FNBEH.2013.00088>
- Fiest, K. M., Sauro, K. M., Wiebe, S., Patten, S. B., Kwon, C. S., Dykeman, J., Pringsheim, T., Lorenzetti, D. L., & Jetté, N. (2017). Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology*, *88*(3), 296–303. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003509>
- Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., Mahajan, M., Manaa, D., Pawitan, Y., Reichert, J., Ripke, S., Sandin, S., Sklar, P., Svantesson, O., Reichenberg, A., Hultman, C. M., Devlin, B., Roeder, K., & Buxbaum, J. D. (2014). Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics*, *46*(8), 881–885. <https://doi.org/10.1038/NG.3039>
- Gerstner, T., Bell, N., & König, S. (2008). Oral valproic acid for epilepsy - long-term

- experience in therapy and side effects. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(2), 285–292. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.2.285>
- Greenberg, D. M., Warrier, V., Allison, C., & Baron-Cohen, S. (2018). Testing the Empathizing-Systemizing theory of sex differences and the Extreme Male Brain theory of autism in half a million people. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(48), 12152–12157. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1811032115>
- Hauser, W. A., & Beghi, E. (2008). First seizure definitions and worldwide incidence and mortality. *Epilepsia*, 49 Suppl 1(SUPPL. 1), 8–12. <https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2008.01443.X>
- Hendouei, F., Sanjari Moghaddam, H., Mohammadi, M. R., Taslimi, N., Rezaei, F., & Akhondzadeh, S. (2020). Resveratrol as adjunctive therapy in treatment of irritability in children with autism: A double-blind and placebo-controlled randomized trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 45(2), 324–334. <https://doi.org/10.1111/JCPT.13076>
- Herbison, G. J., Jaweed, M. M., & Ditunno, J. F. (1982). Muscle fiber types. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 63(5), 227–230. [https://doi.org/10.1016/s0030-5898\(20\)31357-2](https://doi.org/10.1016/s0030-5898(20)31357-2)
- Hernández-Díaz, S., Smith, C. R., Shen, A., Mittendorf, R., Hauser, W. A., Yerby, M., & Holmes, L. B. (2012). Comparative safety of antiepileptic drugs during pregnancy. *Neurology*, 78(21), 1692–1699. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3182574F39>
- Hidema, S., Kikuchi, S., Takata, R., Yanai, T., Shimomura, K., Horie, K., & Nishimori, K. (2020). Single administration of resveratrol improves social behavior in adult mouse models of autism spectrum disorder. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 84(11), 2207–2214. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1794783>
- Holmes, L. B. (2002). Teratogen-induced limb defects. *American Journal of Medical Genetics*, 112(3), 297–303. <https://doi.org/10.1002/AJMG.10781>
- 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*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>

- Kishk, N., Mourad, H., Ibrahim, S., Shamloul, R., Al-Azazi, A., & Shalaby, N. (2019). Sex differences among epileptic patients: A comparison of epilepsy and its impacts on demographic features, clinical characteristics, and management patterns in a tertiary care hospital in Egypt. *Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*, 55(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S41983-019-0078-7/TABLES/6>
- Maenner, M. J., Warren, Z., Williams, A. R., Amoakohene, E., Bakian, A. V., Bilder, D. A., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T., Furnier, S. M., Hughes, M. M., Ladd-Acosta, C. M., McArthur, D., Pas, E. T., Salinas, A., Vehorn, A., Williams, S., Esler, A., Grzybowski, A., Hall-Lande, J., Nguyen, R. H. N., Pierce, K., Zahorodny, W., Hudson, A., Hallas, L., Mancilla, K. C., Patrick, M., Shenouda, J., Sidwell, K., DiRienzo, M., Gutierrez, J., Spivey, M. H., Lopez, M., Pettygrove, S., Schwenk, Y. D., Washington, A., & Shaw, K. A. (2023). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C. : 2002)*, 72(2). <https://doi.org/10.15585/MMWR.SS7202A1>
- Marchezan, J., Deckmann, I., Da Fonseca, G. C., Margis, R., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2022). Resveratrol Treatment of Autism Spectrum Disorder-A Pilot Study. *Clinical Neuropharmacology*, 45(5), 122–127. <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000516>
- Meador, K. J., Baker, G. A., Browning, N., Clayton-Smith, J., Combs-Cantrell, D. T., Cohen, M., Kalayjian, L. A., Kanner, A., Liporace, J. D., Pennell, P. B., Privitera, M., & Loring, D. W. (2010). Effects of breastfeeding in children of women taking antiepileptic drugs. *Neurology*, 75(22), 1954–1960. <https://doi.org/10.1212/WNL.0B013E3181FFE4A9>
- Nicolini, C., & Fahnestock, M. The valproic acid-induced rodent model of autism, 299(Pt A), 217–227. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28472621/>
- Ricci, A. G., Olivares, C. N., Bilotas, M. A., Bastón, J. I., Singla, J. J., Meresman, G. F., & Barañao, R. I. (2013). Natural therapies assessment for the treatment of endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(1), 178–188. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DES369>
- Romoli, M., Mazzocchetti, P., D'Alonzo, R., Siliquini, S., Rinaldi, V. E., Verrotti, A.,



- Calabresi, P., & Costa, C. (2019). Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Current Neuropharmacology*, *17*(10), 926–946. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666181227165722>
- Ruan, Y. C., Zhou, W., & Chan, H. C. (2011). Regulation of smooth muscle contraction by the epithelium: role of prostaglandins. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *26*(3), 156–170. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00036.2010/ASSET/IMAGES/LARGE/PHY0011100500003.JPEG>
- Sanders, S. J., He, X., Willsey, A. J., Ercan-Sencicek, A. G., Samocha, K. E., Cicek, A. E., Murtha, M. T., Bal, V. H., Bishop, S. L., Dong, S., Goldberg, A. P., Jinlu, C., Keaney, J. F., Klei, L., Mandell, J. D., Moreno-De-Luca, D., Poultney, C. S., Robinson, E. B., Smith, L., Solli-Nowlan, T., Su, M. Y., Teran, N. A., Walker, M. F., Werling, D. M., Beaudet, A. L., Cantor, R. M., Fombonne, E., Geschwind, D. H., Grice, D. E., Lord, C., Lowe, J. K., Mane, S. M., Martin, D. M., Morrow, E. M., Talkowski, M. E., Sutcliffe, J. S., Walsh, C. A., Yu, T. W., Ledbetter, D. H., Martin, C. L., Cook, E. H., Buxbaum, J. D., Daly, M. J., Devlin, B., Roeder, K., & State, M. W. (2015). Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*, *87*(6), 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2015.09.016>
- Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Hultman, C., Larsson, H., & Reichenberg, A. (2017). The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA*, *318*(12), 1182–1184. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2017.12141>
- Schneider, T, Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., & Przewlocki, 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/S0306-4530\(08\)00061-9](https://doi.org/S0306-4530(08)00061-9) [pii]10.1016/j.psyneuen.2008.02.011
- Schneider, Tomasz, & Przewlocki, 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), 80–89. <https://doi.org/10.1038/SJ.NPP.1300518>
- Shojaei-Zarghani, S., & Rafraf, M. (2022). Resveratrol and Markers of Polycystic

- Ovary Syndrome: a Systematic Review of Animal and Clinical Studies. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 29(9).  
<https://doi.org/10.1007/S43032-021-00653-9>
- Siebenaller, A. R., Noonan, A. M., & Brown, S. H. M. (2022). Comparing contractile properties within an integrated group of muscles: The abdominal wall. *Journal of Biomechanics*, 144, 111355. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOMECH.2022.111355>
- Teixeira-Da-silva, P., Pérez-Blanco, J. S., Santos-Buelga, D., Otero, M. J., & García, M. J. (2022). Population Pharmacokinetics of Valproic Acid in Pediatric and Adult Caucasian Patients. *Pharmaceutics*, 14(4).  
<https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14040811>
- Thijs, R. D., Surges, R., O'Brien, T. J., & Sander, J. W. (2019). Epilepsy in adults. *The Lancet*, 393(10172), 689–701. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)
- Tick, B., Bolton, P., Happé, F., Rutter, M., & Rijdsdijk, F. (2016). Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 57(5), 585–595.  
<https://doi.org/10.1111/JCPP.12499>
- Tomson, T., Battino, D., Bonizzoni, E., Craig, J., Lindhout, D., Perucca, E., Sabers, A., Thomas, S. V., & Vajda, F. (2019). Declining malformation rates with changed antiepileptic drug prescribing: An observational study. *Neurology*, 93(9), E831–E840. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008001>
- Tomson, T., Battino, D., Bonizzoni, E., Craig, J., Lindhout, D., Sabers, A., Perucca, E., & Vajda, F. (2011). Dose-dependent risk of malformations with antiepileptic drugs: an analysis of data from the EURAP epilepsy and pregnancy registry. *The Lancet. Neurology*, 10(7), 609–617. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70107-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70107-7)
- van Eijk, L., & Zietsch, B. P. (2021). Testing the Extreme Male Brain Hypothesis: Is Autism Spectrum Disorder Associated with a More Male-Typical Brain? *Autism Research : Official Journal of the International Society for Autism Research*, 14(8), 1597. <https://doi.org/10.1002/AUR.2537>
- Veroniki, A. A., Cogo, E., Rios, P., Straus, S. E., Finkelstein, Y., Kealey, R., Reynen, E., Soobiah, C., Thavorn, K., Hutton, B., Hemmelgarn, B. R., Yazdi, F., D'Souza, J., MacDonald, H., & Tricco, A. C. (2017). Comparative safety of anti-epileptic

- drugs during pregnancy: a systematic review and network meta-analysis of congenital malformations and prenatal outcomes. *BMC Medicine*, 15(1).  
<https://doi.org/10.1186/S12916-017-0845-1>
- Yang, G., Ge, S., Singh, R., Basu, S., Shatzer, K., Zen, M., Liu, J., Tu, Y., Zhang, C., Wei, J., Shi, J., Zhu, L., Liu, Z., Wang, Y., Gao, S., & Hu, M. (2017). Glucuronidation: Driving Factors and Their Impact on Glucuronide Disposition. *Drug Metabolism Reviews*, 49(2), 105.  
<https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1293682>
- Yavuz, S., Aydin, N., Celik, O., Yilmaz, E., Ozerol, E., & Tanbek, K. (2014). Resveratrol successfully treats experimental endometriosis through modulation of oxidative stress and lipid peroxidation. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(2), 324–329. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.136619>
- Zahedi, E., Sadr, S. S., Sanaeierad, A., & Roghani, M. (2023). Valproate-induced murine autism spectrum disorder is associated with dysfunction of amygdala parvalbumin interneurons and downregulation of AMPK/SIRT1/PGC1 $\alpha$  signaling. *Metabolic Brain Disease*, 38(6), 2093–2103. <https://doi.org/10.1007/S11011-023-01227-1>