

Universidade Federal de Pelotas
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação

Efeitos do tratamento com quercetina em parâmetros de estresse oxidativo e na atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de autismo

Bruna da Silveira de Mattos

Pelotas, 2019

Bruna da Silveira de Mattos

Efeitos do tratamento com quercetina em parâmetros de estresse oxidativo e na atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de autismo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dra. Roselia Maria Spanevello

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M435e Mattos, Bruna da Silveira de

Efeitos do tratamento com quercetina em parâmetros de estresse oxidativo e na atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de autismo / Bruna da Silveira de Mattos ; Roselia Maria Spanevello, orientadora. — Pelotas, 2019.

75 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Autismo. 2. Estresse oxidativo. 3. Flavonoide. 4. δ -ALA-D. I. Spanevello, Roselia Maria, orient. II. Título.

CDD : 574.192

Efeitos do tratamento com quercetina em parâmetros de estresse oxidativo e na atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de autismo.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19 de agosto de 2019

Banca examinadora:

Roselia Maria Spanevello

Profª. Drª. Roselia Maria Spanevello (Orientadora).

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Cristiani Folharini Bortolatto

Profª. Drª. Cristiani Folharini Bortolatto

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Ana Paula Pesarico

Profª. Drª. Ana Paula Pesarico

Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Dedico

Dedico este trabalho aos meus pais Valmir e Neida por me incentivarem e dar forças para concluir esta etapa acadêmica.

Vocês são minha inspiração e luz!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado força, coragem e determinação de escolher os melhores caminhos a serem seguidos. Pelas horas difíceis, onde muitas promessas foram pedidas e atendidas.

Aos meus pais, por terem me dado a oportunidade de viver, e me incentivarem a alcançar os meus objetivos. Agradeço por todo o apoio para cursar esta pós-graduação, cheia de desafios e obstáculos, onde sempre estiveram ao meu lado, me ajudando, desde as horas mais difíceis até as mais gratificantes.

Às minhas irmãs Liliane e Josiane, obrigada por terem me ajudado a dar os primeiros passos, as primeiras palavras e levantar-me dos primeiros tombos. E hoje acompanharem minha trajetória o mais de perto possível, me apoiando e amparando tanto nas horas boas como ruins.

Agradeço ao Djonatan por todo o incentivo, amizade, carinho, apoio e paciência, e também por acreditar nos meus sonhos, e querer realiza-los juntamente comigo.

Ao Nicolas, obrigada por ser a inspiração para realizar este trabalho, e ser o principal motivo de querer achar uma melhora da qualidade de vida para os portadores de autismo.

Agradeço ao NEUROCAN por ter me acolhido desde muito tempo e por ter me proporcionado todo o aprendizado e experiências adquiridas. Em especial à professora Roselia, que me proporcionou a experiência de participar do seu laboratório de pesquisa e assim me incentivar a cursar esta pós-graduação. Obrigada pela amizade, orientação, pelo exemplo a ser seguido, pelo carisma e competência. Agradeço por acreditar nos meus objetivos, me incentivar, apoiar e me acompanhar até o final desta etapa acadêmica.

À Mayara, obrigada pela sua amizade e competência, por ser minha guia, por acreditar em mim, por apoiar-me e me amparar nos momentos mais difíceis deste trabalho. Aos colegas do laboratório: Fernanda, Luíza, Nathalia Pedra, Natália Bona, Anita, Sabrina, Juliane, Karina, Alana, Thais, Bernardo, Lorenzo e também aqueles

que já seguiram outros caminhos. Agradeço pela companhia diária, pela ajuda, pelos momentos de descontração e por tornarem a pesquisa mais tranquila e encorajadora.

Agradeço à todos os professores que passaram por minha vida de estudante, desde os que me ensinaram a ler e escrever, até os professores da graduação, que me ensinaram uma profissão à seguir, da forma mais correta e justa, sem precisar passar por cima de ninguém e respeitando o próximo de acordo com as diferenças de cada profissional.

Por fim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a obtenção deste título. À Universidade Federal de Pelotas por proporcionar-me a formação acadêmica. Ao PPGBBio pela oportunidade e ao aprendizado proporcionado pelo corpo docente. Ao CAPES pela bolsa concedida.

Aos professores da banca por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

“A vida é um momento. É um sopro.
E a gente só leva daqui o amor que deu e recebeu.
A alegria, o carinho e nada mais.”

(Autor desconhecido)

Resumo

MATTOS, Bruna. **Efeitos do tratamento com quercetina em parâmetros de estresse oxidativo e na atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase em cérebro de ratos submetidos a um modelo experimental de autismo, 2019.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma desordem caracterizada por movimentos repetitivos/estereotipados e dificuldades de interação social. Evidências sugerem um envolvimento do estresse oxidativo na patogênese do TEA de modo que o tratamento com moléculas antioxidantes podem ser benéficas contra os sintomas desta patologia. Sendo assim, a quercetina, um flavonoide com atividades antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora pode ser capaz de reduzir o dano oxidativo. Desta forma, este estudo visou avaliar os efeitos preventivos do pré-tratamento com quercetina em parâmetros comportamentais, de estresse oxidativo e na atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) na prole de ratas submetidas a um modelo de TEA induzido por ácido valpróico (VPA). Ratas *Wistar* prenhes foram divididas em quatro grupos: I- Salina; II- quercetina; III- VPA; IV- VPA/quercetina. A quercetina (50 mg/kg) foi administrada por via oral do 6,5º dia ao 18,5º dia de gestação. No 12,5º dia de gestação as ratas dos grupos III e IV receberam VPA na dose de 800 mg/kg via oral. Após a eutanásia, o córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo foram utilizados para as análises bioquímicas. Os resultados demonstraram que a pré-exposição ao VPA gerou redução do peso, aumento da latência durante a locomoção, redução do tempo de interação social, e aumento do limiar nociceptivo, aumento dos indicadores de estresse oxidativo e redução da atividade das enzimas antioxidantes nas estruturas cerebrais, além de redução na atividade da enzima δ -ALA-D em hipocampo. O pré-tratamento com quercetina foi capaz de prevenir tais alterações, além de modular a atividade da enzima δ -ALA-D, sugerindo que a quercetina possui importantes propriedades antioxidantes e neuroprotetoras para prevenir as complicações associadas ao TEA.

Palavras-chave: autismo, estresse oxidativo, flavonoide, δ -ALA-D.

Abstract

MATTOS, Bruna. **Effects of treatment with quercetin on oxidative stress and on the activity of the delta-aminolevulinate dehydratase enzyme in rat brain submitted to an experimental model of autism, 2019.** Dissertation (MSc.) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a disorder characterized by repetitive/stereotyped movements and difficulties in social interaction. Evidence suggests an involvement of oxidative stress in the pathogenesis of ASD and treatment with antioxidant molecules may be beneficial against the symptoms of this pathology. Thus, quercetin, a flavonoid with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activities may be able to reduce oxidative damage. Thus, this study aimed to evaluate the preventive effects of quercetin pretreatment on behavioral, oxidative stress and delta-aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity parameters in offspring of rats submitted to an induced ASD model. valproic acid (VPA). Pregnant rats were divided into four groups: I- Saline; II- quercetin; III-VPA; IV- VPA/quercetin. Quercetin (50 mg/kg) was administered orally from 6.5 days to 18.5 days of gestation. On the 12th day of gestation, the rats of groups III and IV received 800 mg/kg oral VPA. After euthanasia the cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum were used for biochemical analysis. The results showed that VPA pre-exposure led to weight reduction, increased latency during walking, reduction of social interaction time, and increase of nociceptive threshold, increase of oxidative stress indicators and reduction of antioxidant enzyme activity in structures. as well as a reduction in δ -ALA-D enzyme activity in hippocampus. Quercetin pretreatment was able to prevent such changes and modulate the activity of the δ -ALA-D enzyme, suggesting that quercetin has important antioxidant and neuroprotective properties to prevent complications associated with ASD.

Key words: autism, oxidative stress, flavonoid, δ -ALA-D.

Lista de Figuras

Figura 1	Mecanismo proposto da reação de peroxidação lipídica	22
Figura 2	Mecanismo enzimático antioxidante	23
Figura 3	Estrutura do flavonoide quercetina.....	27

Lista de Abreviaturas

CAT – Catalase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSM-5 - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

GPx – Glutathione peroxidase

GSH - glutathione

GST- Glutathione-S-transferase

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TEA – Transtorno do Espectro Autista

VPA – Ácido valproico

δ-ALA-D - delta-aminolevulinato desidratase

Apresentação

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item Manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representa a íntegra deste estudo.

O item Conclusões encontra-se no final desta dissertação e apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem no item Introdução e Revisão Bibliográfica desta dissertação.

O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual foi submetido.

Sumário

1	Introdução.....	15
2	Objetivos.....	17
	Objetivo geral	17
	Objetivos específicos	17
3	Revisão bibliográfica	18
	Autismo	18
	Estresse oxidativo	21
	Quercetina.....	26
4	Manuscrito	30
5	Conclusões	64
	Referências	66
	Anexos	74

1. Introdução

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma desordem complexa do sistema nervoso central (SNC) caracterizado pelo comprometimento em diversos domínios comportamentais como: interação social, linguagem, movimentos repetitivos e estereotipados, bem como, um vasto processo imaginativo (SILVA & MULICK, 2009). Fatores ambientais e genéticos estão associados com o desenvolvimento desta doença, onde a exposição a agentes químicos como o ácido valpróico (VPA) está relacionado com o aumento da incidência de filhos autistas em mães que utilizaram este medicamento durante a gestação (KIM et al., 2017).

O VPA é um fármaco anticonvulsivante com propriedades teratogênicas, que quando utilizado por gestantes no primeiro trimestre de gestação pode gerar malformações cerebrais nos fetos como: defeitos no tubo neural, déficits de desenvolvimento neurológico e nas habilidades vocais (MCVEARRY et al., 2009). O modelo de indução de TEA baseia-se na exposição química ao VPA no período pré-natal em ratas Wistar no 12,5º dia gestacional (NICOLINI et al., 2017) apresentando características fenotípicas do autismo que podem ser avaliadas através de parâmetros comportamentais e do desenvolvimento (CHANG et al., 2017).

Estudos em humanos demonstram que o estresse oxidativo pode estar relacionado com as complicações relacionados com o TEA (ESSA et al., 2012; BU et al., 2017). Desta forma estudos com animais através da exposição ao VPA tem sido importantes para compreender a neurobiologia desta complexa patologia (GU et al., 2013). Existe uma teoria sobre o envolvimento do estresse oxidativo com a indução de TEA pelo VPA, embora este mecanismo não esteja bem estabelecido, uma das explicações que podem estar relacionadas, é devido ao cérebro fetal ser mais susceptível aos danos gerados por espécies reativas de oxigênio (ERO) (MABUNGA et al., 2015). Uma vez que o estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas e a capacidade antioxidante do indivíduo (HALLIWELL, 2012), o estudo da atividade das enzimas antioxidantes pode colaborar para o entendimento desta patologia que não possui cura, bem como das vias de neurotransmissão que possam estar envolvidas com esta doença. Além disto, vêm sendo utilizados compostos com características antioxidantes como resveratrol, astaxantina e curcumina, com o intuito de verificar o efeito benéfico

destes compostos nesta patologia em modelos animais (AL-ASKAR et al., 2017; AL-AMIN, et al., 2015; BAMBINI et al., 2014).

Considerando que estudos demonstram alterações de estresse oxidativo no TEA, a investigação da atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST) catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) podem dar indícios do status redox destes indivíduos (SIES, 2015). Além destas enzimas, estudos vêm demonstrando que a enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), também pode ser utilizada como um biomarcador de estresse oxidativo, embora o seu real envolvimento com as alterações encontradas no TEA, ainda não tenham sido investigadas (SOUZA et al., 2007).

Neste sentido, a busca de novos compostos com propriedades antioxidantes e neuroprotetoras que possam atenuar os danos induzidos pelo estresse oxidativo no SNC pode ser uma estratégia promissora na busca de novos tratamentos para reverter e/ou prevenir complicações associadas ao TEA. Um dos compostos que apresenta estas características é a quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona), que é o principal flavonoide presente na dieta humana, sendo encontrada principalmente em alimentos como batata, cebola, repolho e maçã (HERTOG et al., 1993). Esta substância possui diversas propriedades terapêuticas relacionadas com sua estrutura química, como atividade anti-inflamatória (CHEN et al., 2017), antioxidante (TINAY et al., 2017) além de apresentar efeitos neuroprotetores em doenças neurológicas como as Doenças de Alzheimer e Parkinson (BABAEI et al., 2018).

Neste contexto, considerando as várias atividades biológicas da quercetina, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos preventivos deste flavonoide em um modelo animal de TEA induzido pela exposição pré-natal ao VPA, buscando assim contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas bem como para o estudo dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia deste transtorno.

2. Objetivos

Objetivo geral

Investigar os efeitos da quercetina em parâmetros comportamentais, de estresse oxidativo e na atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) na prole de ratas submetidas a um modelo pré-natal de autismo.

Objetivos específicos

Nas proles de ratas submetidas ao modelo experimental de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA e tratadas com quercetina foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Perfil de ganho de peso, atividade locomotora através do teste de campo aberto, interação social e limiar nociceptivo utilizando o teste de retirada da cauda (“tail flick”).
- Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), nitrito, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e sulfidrilas (SH) em córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo.
- Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutational peroxidase (GPx) e glutational S-transferase (GST) em córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo.
- Atividade da enzima δ -ALA-D em córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo.

3. Revisão bibliográfica

Autismo

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma desordem complexa do sistema nervoso central (SNC), descrito pela primeira vez por Leo Kanner em 1943 (KANNER, 1943). Indivíduos autistas apresentam distúrbios compartilhados em diversos domínios comportamentais que afetam: a linguagem, a interação social, os processos imaginativos, além de possuírem um padrão de movimentos repetitivos e estereotipados (RUBENSTEIN et al., 2018). Estes distúrbios geram dificuldades de relacionamento interpessoal, gerando transtornos de ansiedade, acessos de raiva e agressividade, depressão, autolesões, falta de atenção, bem como alterações do sono e alimentares (KUMAR et al., 2012). A quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) apresenta uma gama de dados para realizar o diagnóstico do TEA. Cabe ressaltar que esse diagnóstico é realizado apenas clinicamente durante a primeira infância e além disto, não possui cura sendo o tratamento realizado apenas de forma paliativa (*American Psychiatric Association*, 2013).

O tratamento destes indivíduos pode ser realizado através de fármacos anticonvulsivantes e estabilizadores de humor como: risperidona, haloperidol, aripiprazol e valproato de sódio, ou através de tratamento não farmacológico como por exemplo, terapias educacionais com músicas, esportes, artes, auxílio terapêutico aos pais e promoção de interação social (Ministério da Saúde, 2016). Porém estas terapias visam somente amenizar os sintomas, sem promover a cura da doença (Ministério da Saúde, 2016).

Atualmente existe uma discrepância de dados de prevalência do TEA. No Brasil existe apenas dados da prevalência da cidade de Atibaia/SP mostrando 0,3% de incidência em crianças de 7-12 anos de idade sendo que mundialmente a prevalência gira em torno de 1-2% da população infantil, adolescente e adulta (Ministério da Saúde, 2016). Além disto, em países asiáticos onde há uma maior incidência de casamentos consanguíneos a prevalência de TEA é maior (ALSHABAN et al., 2019). O dado de prevalência mais utilizado é de um estudo norte-americano indicando a prevalência de 1 em cada 68 crianças norte-

americanas (CHRISTENSEN et al., 2016). Estudos mostram que as crianças do gênero masculino são quatro vezes mais susceptíveis ao transtorno do que as do gênero feminino, embora os motivos desta susceptibilidade não estejam bem elucidados (YEARGIN-ALLSOPP et al., 2003). Embora fatores ambientais possam estar envolvidos com a fisiopatologia do TEA, há estudos que relatam que este é um distúrbio genético com herdabilidade estimada em torno de 90% dos casos (GUPTA & STATE, 2006).

Segundo o ministério da saúde, podem ser observados nos portadores de TEA durante faixas etárias que variam de 0-6 meses até 3 anos de idade dificuldades do desenvolvimento infantil, que podem servir como sinais de alerta, dentre os quais pode-se citar: as crianças não respondem a estímulos de interação social, a linguagem apresenta-se através de gritos ou balbúcio de palavras sem sentido; não reagem a brincadeiras infantis, além de apresentarem dificuldade de inserção de novos alimentos na dieta (Ministério da Saúde, 2016). Segundo o DSM-5, os portadores de TEA devem apresentar critérios clínicos para serem diagnosticados com autismo, como déficits de interação social (redução da reciprocidade, déficits da comunicação não-verbal e do desenvolvimento), alterações comportamentais e cognitivas (movimentos motores repetitivos e estereotipados, insistência em padrões ritualizados de rotinas acompanhado de interesses altamente restritos e anormais) além de, hipo/hiper-reatividade a estímulos sensoriais do ambiente (alterações de temperatura e/ou iluminação) (*American Psychiatric Association*, 2013).

O diagnóstico do TEA é complexo, devido aos vários sintomas associados e distintos de um paciente para outro, sendo assim este distúrbio pode ser corriqueiramente confundido com outras patologias neurológicas (HANNON & HANNON, 2017). Dessa forma, o diagnóstico clínico é realizado basicamente através de observações e entrevistas de acordo com o DSM-5 (*American Psychiatric Association*, 2013; GADIA et al.; 2004). Além disso, a criança pode apresentar atividades atípicas até os três anos de idade nos três domínios comportamentais característicos desta patologia para serem diagnosticadas, pois nesta fase ocorre o desenvolvimento da fala e dos processos cognitivos (SILVA & MULICK, 2009).

Atualmente, há uma grande preocupação com o uso de determinados medicamentos durante o período gestacional, uma vez que evidências demonstram um aumento do risco do desenvolvimento de TEA em filhos de mães expostas a agentes químicos durante o primeiro trimestre de gestação (OBERLANDER & ZWAIGENBAUM, 2017). Dentre estes medicamentos, o ácido valpróico (VPA), um ansiolítico que apresenta propriedades teratogênicas quando utilizado por gestantes, está relacionado com o aumento da incidência de filhos autistas quando as mães utilizaram este medicamento durante a gestação (KIM et al., 2017).

O VPA é um fármaco anticonvulsivante, utilizado para o controle de crises epiléticas e como estabilizador de humor, porém é relatado na literatura que este medicamento possui propriedades teratogênicas (BROMLEY et al., 2009). Quando utilizado em mulheres no primeiro trimestre de gestação está associado à um aumento na taxa de TEA nos seus descendentes (KIM et al., 2017), principalmente se a exposição ocorrer na fase de fechamento do tubo neural, pois pode acarretar malformações cerebrais como: defeitos no tubo neural, déficits de desenvolvimento neurológico e nas habilidades vocais (MCVEARRY et al., 2009).

Modelos experimentais apresentam uma grande importância para o avanço das pesquisas pré-clínicas envolvendo diversas neuropatologias. O uso de organismos modelo como ratos, camundongos, peixe-zebra e a mosca *Drosophila* vêm sendo utilizados para fornecer ferramentas úteis que consigam responder dúvidas e hipóteses que seriam inviáveis em humanos, promovendo o conhecimento da neurobiologia do TEA, além de favorecer o estudo de novas terapias (EINAT et al., 2018). Levando em consideração esta premissa, os modelos experimentais que mimetizam patologias humanas podem ser induzidos nos animais através de ações farmacológicas ou transgênicas (MCGONIGLE & RUGGERI, 2014).

No TEA o mais conceituado modelo farmacológico consiste na exposição pré-natal ao VPA em ratas Wistar no 12,5º dia gestacional. Esta exposição ao VPA no período pré-natal gera filhotes que apresentam características fenotípicas comportamentais, pois este período corresponde ao primeiro trimestre de gestação em humanos (NICOLINI et al., 2017). Durante o desenvolvimento embrionário o cérebro fetal apresenta alta susceptibilidade a danos, que podem gerar problemas relacionados com o fechamento do tubo neural (TUNG & WINN, 2011).

Acredita-se que o mecanismo de indução do TEA pelo VPA esteja relacionado com a vulnerabilidade do feto a agentes estressores durante o período

embrionário, sendo que o VPA poderia gerar alterações no desenvolvimento fetal (MABUNGA et al., 2015). Algumas teorias são aceitas quanto à indução de TEA pelo VPA, uma delas sugere que o VPA gera estresse oxidativo durante o desenvolvimento embrionário e devido ao cérebro fetal ser mais susceptível aos danos gerados por espécies reativas isso poderia explicar as alterações cerebrais encontradas (MABUNGA et al., 2015). A outra teoria sugere que as alterações embrionárias induzidas pelo VPA estão associadas à inibição da histona deacetilase, uma enzima responsável pelo descompactamento do DNA, onde o VPA provoca uma hiperacetilação, alterando os processos de transcrição e, desta forma, acaba causando diminuição da proliferação celular em certas áreas do SNC, e assim, podem gerar os problemas relacionados com o fechamento do tubo neural (MABUNGA et al., 2015).

Vários parâmetros podem ser analisados no modelo experimental de TEA com o objetivo de avaliar as mudanças no desenvolvimento e comportamento dos animais, dentre estes, pode-se citar: avaliação do ganho de peso (BRUNNER et al., 2015), teste de campo aberto (KHONGRUM & WATTANATHORN, 2015), interação social (CHANG, et al., 2017) e limiar nociceptivo (SILVERMAN et al., 2010). Sendo assim, o modelo de indução de TEA em filhotes pela exposição pré-natal ao VPA fornece uma ferramenta importante para investigar a neurobiologia do comportamento autista, bem como, a pesquisa de novas terapias farmacológicas (NICOLINI et al., 2017).

Estresse oxidativo

Radical livre é uma molécula altamente reativa que possui em sua última camada eletrônica um número ímpar de elétrons. Estes elétrons desemparelhados conferem uma alta reatividade a estas moléculas (SIES, 1991). Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Nos organismos vivos as ERO são formadas em condições fisiológicas na mitocôndria como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroperoxila ($HO_2^{\cdot}$) e radical hidroxila (OH), outras moléculas como o oxigênio singlet (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), não possuem elétrons desemparelhados, mas são altamente reativos, por participarem

de reações que promovem a formação de radicais livres, porém em condições normais são neutralizadas até água (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). Além das ERO, o organismo também sofre ação das ERN que são o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), o óxido nitroso (N_2O_3), o ácido nitroso (HNO_2), os nitritos (NO_2^-), os nitratos (NO_3^-) e os peroxinitritos (ONOO^-), que são igualmente danosos ao organismo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Estas espécies reativas quando em excesso podem reagir com diversas biomoléculas do organismo que podem levar à alterações químicas das bases púricas e pirimídicas quebrando a fita de DNA, alterando a funcionalidade de proteínas e/ou causar o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Por sua vez, a peroxidação lipídica pode acarretar em alteração da estrutura e da permeabilidade da membrana celular e, por conseguinte, perda da seletividade da troca iônica e formação de produtos citotóxicos que podem levar à morte celular (ANGELOVA & ABRAMOV, 2018). A peroxidação lipídica é um processo em cadeia que apresenta três fases, a iniciação, a propagação e a terminação (Figura 1) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A reação inicia-se após a interação de um radical livre com a cadeia de ácidos graxos contidos na membrana lipídica, durante a fase de propagação, vários intermediários lipoperóxidos podem ser gerados, e a reação só termina quando os lipoperóxidos produzidos anteriormente se autodestroem (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Iniciação	$\text{LH} + \text{OH}^\bullet \text{ (ou } \text{LO}^\bullet) \longrightarrow \text{L}^\bullet + \text{H}_2\text{O (ou LOH)}$
Propagação	$\text{L}^\bullet + \text{O}_2 \longrightarrow \text{LOO}^\bullet$
	$\text{LH} + \text{LOO}^\bullet \longrightarrow \text{L}^\bullet + \text{LOOH}$
Terminação	$\text{LOO}^\bullet + \text{L}^\bullet \longrightarrow \text{LOOL}$
	$\text{LOO}^\bullet + \text{LOO}^\bullet \longrightarrow \text{LOOL} + \text{O}_2$

FIGURA 1 - Mecanismo proposto da reação de peroxidação lipídica, onde L representa um lipídeo (Adaptado de FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Os metais pesados como ferro e cobre do organismo também podem exercer um papel crucial durante a peroxidação lipídica, pois podem agir como catalisadores das reações de oxidação de biomoléculas, formando diferentes tipos de ERO, comprovadas pela reação de Fenton (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Dentre as espécies reativas, o radical OH é uma das espécies mais formadas devido

devido ao seu grande potencial antioxidante, estas substâncias são os compostos fenólicos, onde destacam-se os flavonoides (PIETTA, 2000; BARREIROS et al., 2006).

Todos os tecidos são suscetíveis ao dano oxidativo, entretanto, sabe-se que o cérebro é particularmente propenso a lesão oxidativa devido ao seu elevado consumo de oxigênio, presença de neurotransmissores auto oxidáveis, alto teor de ácidos graxos peroxidáveis e limitada capacidade antioxidante (TER-MINASSIAN, 2006). Neste sentido, é plausível sugerir que o estresse oxidativo possa influenciar negativamente em estruturas cerebrais de portadores de TEA (PISOSCHI & POP, 2015). Em pacientes portadores de TEA já foi relatado um aumento de peroxidação lipídica em plasma (ESSA et al., 2012), dos níveis de ERO em linhagens celulares linfoblastóides (BU et al., 2017), bem como a redução dos níveis de GPx e GST em amostras *pós-mortem* de cerebelo (GU et al., 2013). Em modelos animais de TEA já foram observados redução da atividade das enzimas SOD e CAT em amostras de córtex cerebral, hipocampo e cerebelo (AL-AMIN et al., 2015).

Com base nas evidências atualmente disponíveis, o estresse oxidativo pode resultar em danos celulares e até levar à morte celular, eventos que parecem estar relacionados com os distúrbios relacionados com o TEA (PRAGNYA et al., 2014). De acordo com dados da literatura, estudos com animais mostram que a exposição pré-natal ao VPA leva a mudanças no sistema antioxidante, levando ao estresse oxidativo no SNC tanto na adolescência quanto na idade adulta dos animais (PRAGNYA et al., 2014). Além disso, cabe ressaltar que neste modelo experimental o tratamento com compostos antioxidantes foram capazes de melhorar as alterações comportamentais como nocicepção, atividade locomotora e exploratória, ansiedade e comportamento, além de alterar parâmetros bioquímicos em cérebros de ratos na adolescência e na fase adulta (SANDHYA et al., 2012; BANJI et al., 2011).

O estresse oxidativo também parece ser um importante fator envolvido com a alteração na atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) (SOUZA et al., 2007). A reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos, como exemplo o grupamento heme, a grande importância deste composto reside na sua função como grupo prostético de proteínas (FOLMER et al., 2003). O grupamento heme faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromo a, b e c), biotransformação de xenobióticos

(citocromo P450) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalase e peroxidases) (JAFJE et al., 1995).

Devido a sua natureza sulfidrílica a enzima δ -ALA-D pode ser inibida por uma variedade de metais pesados e não-metais que possuem a propriedade química de oxidar grupamentos sulfidrílicos (GOERING, 1993). A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota de síntese do heme resultando em consequências patológicas (GOERING, 1993). Além da insuficiente produção de heme a inibição desta enzima pode resultar no acúmulo do substrato ácido δ -aminolevulínico (δ -ALA), que está relacionado com a superprodução de ERO (BECHARA et al., 1993). Ainda, dados da literatura indicam que a enzima δ -ALA-D é sensível a situações de estresse oxidativo, sendo assim pode ser considerada um biomarcador adicional do status redox no organismo (BARBOSA et al., 2008).

Sendo assim, a atividade desta enzima vem sendo investigada em modelos experimentais de doenças neurológicas como Parkinson (SAMPAIO et al., 2016), Alzheimer (OLIVEIRA et al., 2018) e depressão (CASARIL et al., 2017), demonstrando que alterações na atividade desta enzima corrobora com os demais achados relacionados ao estresse oxidativo.

O envolvimento da atividade da δ -ALA-D com o TEA pode estar correlacionado com a delicada sensibilidade do cérebro fetal às ações deletérias do estresse oxidativo (ROSE et al., 2007; TUNG & WINN, 2011). Esta hipótese biológica pode dar plausibilidade ao desequilíbrio intracelular redox, sendo que a enzima δ -ALA-D poderia assumir um papel crucial na detoxificação das ERO, servindo como biomarcador de estresse oxidativo, embora o real envolvimento desta enzima com o TEA ainda não tenha sido completamente elucidado (ROSSIGNOL & FRYE, 2014).

Considerando o envolvimento do estresse oxidativo no TEA, nos últimos anos compostos antioxidantes já foram testados em modelos experimentais deste transtorno como curcumina (AL-ASKAR et al., 2017) e astaxantina (AL-AMIN et al., 2015) com o intuito de reverter o dano oxidativo já instaurado nos filhotes. Por outro lado, Bambini et al. (2014) também demonstrou que quando um composto antioxidante como o resveratrol foi administrado durante o período pre-natal no modelo de VPA, este também foi capaz de prevenir várias alterações na prole.

Quercetina

Os flavonoides são substâncias que pertencem à classe de compostos fenólicos, diferindo entre si pela estrutura química e características particulares, e podem ser encontrados em diversas plantas e alimentos, como chás, flores, frutas e vegetais, sendo responsáveis pela grande variedade de cores encontradas nos alimentos (BEHLING et al., 2004). Estes compostos apresentam em sua estrutura química grupamentos fenólicos, que agregam características antioxidantes a estas substâncias (BEHLING et al., 2004). Os flavonoides podem ocorrer como agliconas ou glicosídeos, freqüentemente sendo encontrados como glicosídeos (BRAVO, 1998). Eles podem ser subdivididos em 13 classes, com mais de 5000 compostos como: chalconas, dihidrochalconas, auronas, flavonas, flavonóis, dihidroflavonol, flavanonas, flavanol, flavandiol, antocianidina, isoflavonóides, bioflavonóides e proantocianinas (BRAVO, 1998).

Muitos mecanismos antioxidantes têm sido propostos para os flavonoides, tais mecanismos incluem: redução da formação ERO pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase); quelação de íons metálicos que podem iniciar a produção de OH pela Reação de Fenton; seqüestro de radicais livres; indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína que é uma proteína queladora de metais com propriedades antioxidantes (MIDDLETON et al., 2000; PIETTA, 2000).

Dentre os flavonóis, a quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) é o principal flavonoide presente na dieta humana, representando cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos (BEHLING et al., 2004). A fonte majoritária de quercetina provém de alimentos como: cebola, maçã e brócolis (HERTOG et al., 1993). Estudos mostram que a quercetina possui diversas propriedades terapêuticas, como atividade anti-inflamatória (CHEN et al., 2017), antioxidante (TINAY et al., 2017), anticarcinogênica (RAJA et al., 2017) e ainda, atividade antiviral (ROJAS et al., 2016). Dentre estas propriedades, a atividade antioxidante é uma das mais estudadas uma vez que a mesma está relacionada a sua estrutura química, pois os grupos hidroxil ligados aos anéis aromáticos possuem a capacidade de neutralizar substâncias reativas (ALVES et al., 2010). Desta forma, este composto pode atuar quelando metais, e/ou capturando radicais livres, protegendo desta forma, os tecidos da peroxidação lipídica, causada principalmente pelo OH e o $O_2^{\cdot-}$ que são espécies

altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica (ALVES et al., 2010).

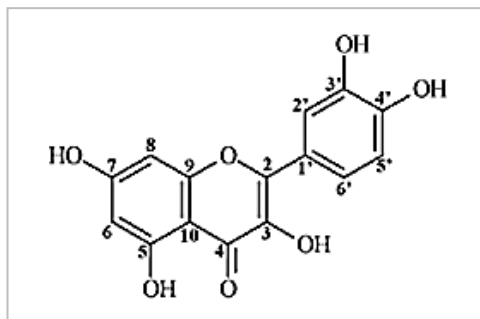


FIGURA 3 – Estrutura do flavonoide quercetina. Adaptado de Wright et al., 2010.

A quercetina pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com $O_2^{\cdot-}$), na formação de OH (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídeos) (AFANAS'EV et al., 1989.) Acredita-se que a forma glicosilada dos flavonoides passa direto pelo intestino delgado sendo hidrolisada pelas enterobactérias liberando a aglicona correspondente, no ceco e cólon (MUROTA & TERAQ, 2003). Assim, estes compostos entram na circulação e são submetidos aos processos de metilação, glucoronidação e/ ou sulfatação no fígado (MUROTA & TERAQ, 2003). Uma parte substancial desses metabólitos podem então ser excretados na bile e retornar ao lúmen intestinal sendo novamente reabsorvidos pelas células intestinais ou serem excretados nas fezes (MUROTA & TERAQ, 2003).

Quanto à quercetina, esta apresenta-se naturalmente como conjugados glicosídicos, assumindo a forma de quercetina-3-O-glucuronideo e quercetina-3'-O-sulfato (KASHYAP et al, 2016). Sua absorção ocorre na microflora intestinal, onde é degradada pelas bactérias intestinais em ácido fenólico, ácido 3-hidroxifenilacético e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (SESINK et al., 2001). Posteriormente, é rapidamente metabolizada em glucuronideo e sulfato, e a metilação ocorre principalmente no fígado e intestino delgado onde a excreção é feita através da bile e urina como glucoronidato e sulfatoconjugado em até 48 h (NISHIJIMA et al., 2015). Após os processos de absorção e metabolização, a concentração plasmática média atinge o pico de 2 a 6 horas após a ingestão de alimentos ricos neste flavonoide (KASHYAP

et al, 2016). Em outro estudo o nível plasmático máximo de quercetina foi observado 8 h após a administração da forma aglicona (SHIMOI et al., 2003).

A absorção da quercetina depende do veículo utilizado para solubilizá-la, pois sua estrutura química é pouco solúvel em água, sendo assim esta substância necessita ser tratada farmacotecnicamente (KHALED et al., 2003). Neste sentido, agentes solubilizantes podem ser uma alternativa para melhorar a solubilidade de compostos insolúveis em água, sendo os tensoativos uma estratégia farmacêutica a ser utilizada (ROCHA et al., 2016). O Tween 20, um surfactante não-iônico, é considerado um agente solubilizante pouco tóxico e pouco irritativo, mas a concentração a ser utilizada possui restrições, pois pode causar diarreia osmótica (ROCHA et al., 2016). Cabe ressaltar que as mais diversas doses de quercetina variando de 2 a 2000 mg/kg já foram utilizadas mostrando o efeito preventivo deste flavonoide em vários modelos animais experimentais utilizando ratos prenhes, com efeito benéfico sobre a prole e ausência de teratogenicidade (DOGAN et al., 2015; BRAGA et al., 2013; TOUMI et al., 2013; MAHABADY et al., 2016).

Além disso, é importante destacar que dados da literatura já demonstraram que a quercetina foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica e modular a atividade das enzimas SOD e CAT em plaquetas de ratos submetidos a um modelo experimental de hipotireoidismo (BALDISSARELLI et al., 2016). Ainda, VANHEES et al. (2013), demonstraram que a suplementação de quercetina durante o período gestacional em camundongos aumentou a expressão de SOD, CAT e GPx em fígado e pulmão da prole adulta, sugerindo que esse flavonoide possa acionar um gatilho intrauterino modulando o sistema antioxidante com efeito duradouro na fase adulta, afim de proteger o organismo de doenças crônicas nas quais o estresse oxidativo possa estar envolvido (VANHEES et al., 2013). Além deste dado, pesquisadores demonstraram que a quercetina reduziu o estresse oxidativo observado pela atividade das enzimas SOD e CAT e pelos níveis de peroxidação lipídica e de glutathiona (GSH), em tecido cerebral de ratos submetidos a um modelo animal de lesão cerebral fetal induzido por lipopolissacarídeo (WANG & LIU, 2018). Outro e mais atual estudo, sugere que a quercetina apresenta um potencial efeito terapêutico para diminuir o estresse oxidativo, promovendo a sobrevivência neuronal e antagonizando a inflamação, suprimindo o dano cerebral infantil causado por infecção materna intrauterina (WANG & LIU, 2018).

O uso prolongado de antirretrovirais em pacientes HIV positivos exacerba o estresse oxidativo, induzindo disfunção neurológica e cognitiva. Neste contexto, AKANG (2019) observou o efeito benéfico da quercetina em ratos expostos à terapia antirretroviral, mostrando que este flavonoide preveniu os efeitos deletérios do estresse oxidativo, aumentando a atividade das enzimas CAT e GSH e preveniu a peroxidação lipídica no hipocampo de ratos expostos à terapia antiretroviral, indicando que a quercetina poderia ser utilizada como terapia adjuvante para melhorar os sintomas e auxiliar na adesão mais efetiva ao tratamento com antirretrovirais em pacientes HIV positivos (AKANG, 2019).

Diante do exposto é importante destacar que apesar das propriedades terapêuticas da quercetina já descritas na literatura existe uma grande carência de dados mostrando o efeito deste flavonoide tanto em humanos quanto em modelos experimentais de TEA, pois nenhum estudo na literatura avaliou os efeitos desta molécula sobre esta doença. Neste contexto, sabe-se que a busca por novas terapias que possam auxiliar no tratamento de diversas doenças, esbarra na necessidade do conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na sua etiologia. Sendo assim, baseado em resultados prévios provenientes de estudos em animais que demonstram efeitos benéficos e promissores da quercetina em alterações no SNC, o presente trabalho visou investigar os efeitos do tratamento com a quercetina em um modelo experimental de TEA a fim de estabelecer se este composto pode interferir nas alterações associadas a esta patologia.

4. Manuscrito

Quercetin prevents alterations of behavioral parameters, delta-aminolevulinic dehydratase activity and oxidative damage in brain of rats in a prenatal model of autism

Bruna da Silveira de Mattos, Mayara Sandrielly Pereira Soares, Luiza Spohr, Nathalia Stark Pedra, Fernanda Cardoso Teixeira, Anita Almeida Ávila, Francieli Moro Stefanello, Jucimara Baldissarelli, Giovana Duzzo Gamaro, Roselia Maria Spanevello

Quercetin prevents alterations of behavioral parameters, delta-aminolevulinic dehydratase activity and oxidative damage in brain of rats in a prenatal model of autism

Bruna da Silveira de Mattos¹, Mayara Sandrielly Pereira Soares¹, Luiza Spohr¹, Nathalia Stark Pedra¹, Fernanda Cardoso Teixeira¹, Anita Almeida Ávila¹, Francieli Moro Stefanello², Jucimara Baldissarelli¹, Giovana Duzzo Gamaro¹, Roselia Maria Spanevello^{1*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Laboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário S/N, Pelotas, RS, Brazil.

*Corresponding author: Roselia Maria Spanevello,

Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brazil, CEP: 96010-900

Phone: 55 53 32757355

Fax: 55 53 32757354

e-mail: roselia.spanevello@ufpel.edu.br

Declarations of interest: None

Abstract

Autism is a neuropathology characterized by behavioral disorders. Considering that oxidative stress is involved in the pathophysiology of this disease, we evaluated the effects of quercetin, a flavonoid with antioxidant and neuroprotective properties, in an experimental model of autism induced by valproic acid (VPA). Twelve pregnant female rats were divided into four groups (control, quercetin, VPA, VPA+quercetin). Quercetin (50 mg/kg) was administered orally to the animals from gestational days 6.5 to 18.5, and VPA (800 mg/kg) was administered orally in a single dose on gestational day 12.5. Behavioral tests such as open field, social interaction, and tail flick nociceptive assays were performed on pups between 30 and 40 days old, after which the animals were euthanized. Cerebral cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum were collected for evaluation of oxidative stress parameters. The pups exposed to VPA during the gestational period showed reduced weight gain, increased latency in the open field and tail flick tests and reduced time of social interaction accompanied by changes in oxidative stress parameters mainly in the hippocampus and striatum. Prenatal treatment with quercetin prevented the behavioral changes and damage caused by oxidative stress, possibly due to its antioxidant action. Our findings demonstrated that quercetin has neuroprotective effects in an animal model of autism, suggesting that this natural molecule could be an important therapeutic agent for treatment of autism spectrum disorders.

Key words: autism, quercetin, valproic acid, oxidative stress, brain, nociception.

1. Introduction

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex childhood neurodevelopmental disorder characterized by impaired social interaction and communication, and by repetitive and stereotyped behavior [1,2]. Although the prevalence of ASD differs among ethnic groups, this disorder affects about 1 in 68 children and is more common in males than females [3]. The etiology and pathology of autism are still poorly understood, however evidences suggest that various factors such as genetic, environmental, immune and neurochemical alterations are involved in the development of this condition [4].

Several studies suggest that oxidative stress is commonly involved in ASD pathophysiology [5,6,7]. Oxidative stress is characterized by the enhanced production of oxygen free radicals and/or an impaired enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses [8], and this condition induces damage in structure of lipids, proteins, and nucleic acids leading to cell dysfunction [9]. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), as well vitamins C and E are usually effective in blocking harmful effects of reactive oxygen species (ROS) [10]. In fact, alterations in oxidative stress biomarkers such as increased lipid peroxidation and ROS levels and reduction of GPx, glutathione-S-transferase (GST), SOD and CAT activities have been demonstrated in both patients and in animal models of ASD [5, 7, 11,12].

The enzyme aminolevulinic dehydratase (ALA-D), an important enzyme involved in heme biosynthesis, has also been used as an indirect marker of oxidative stress [13]. This enzyme is highly sensitive to oxidation, and its inhibition may result in the substrate 5-aminolevulinic acid (ALA) accumulation, which is associated with overproduction of free radicals. Rose et al. [14] demonstrated that autistic children have alterations in the frequency of allelic variants of ALA-D.

Considering that oxidative stress is involved in the pathophysiology of ASD, compounds with antioxidant properties have become important therapeutic tools to minimize or prevent the changes caused by free radical damage in experimental models of ASD (12,15). Quercetin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone) is a ubiquitous flavonoid present in various foods such as apples, red onions, grapes, citrus fruits, cherries, broccoli and capers [16]. This molecule has several therapeutic properties, including anti-inflammatory [17] and antioxidant [18] activities. Thus, the aim of the present study was to evaluate the preventive effects of quercetin treatment on behavioral parameters and oxidative stress in the brains of rats in a prenatal model of autism induced by VPA.

2. Material and Methods

Chemicals

Quercetin (QUE), epinephrine, dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA), thiobarbituric acid (TBA), 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 5-aminolevulinic acid hydrochloride (ALA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Trichloroacetic acid (TCA) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were purchased from Synth® (Brazil), and a commercial kit for glutathione peroxidase (GPx) was obtained from R&D Systems. All other reagents used in the experiments were analytical grade and the highest purity.

Animals

All animal procedures were approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation (CEEAA) of the Federal University of Pelotas, Brazil under protocol number CEEAA 4961-2016. The use of the animals is in accordance with the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals in Scientific Research Activities (DBCA) that is in agreement with the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA). Adult female and male Wistar rats were obtained from the local breeding colony and kept on a light/dark cycle 12/12h. Temperature was controlled ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and solid and liquid diet was available *ad libitum* during all experimental periods. After monitoring the estrous cycle, the females were submitted to mating overnight, and if in the morning spermatozoa were found in vaginal secretions, this day was designated as the first day of pregnancy and confirmed by the stay of 3 to 4 days in the diestrus phase of the estrous cycle.

Animal model of autism and treatment with quercetin

Twelve pregnant female rats were divided into four groups (n=3/group): Group I (Tween 3%), Group II (QUE), Group III (valproic acid (VPA)), Group IV (VPA/QUE). Quercetin (50 mg/kg) was dissolved in Tween 3% and administered intragastrically in the females of groups II and IV over 13 days (from the sixth to the twenty-eighth day of gestation), while the animals in groups I and III received only vehicle (Tween 3%). VPA was purchased as the sodium salt and dissolved in 0.9% saline. On embryonic day 12.5, females of groups III and IV received VPA by intragastric administration at a dose of 800 mg/kg, while

the animals of groups I and II received or 0.9% saline solution. The dose of quercetin and VPA was based on previous studies [19,20].

The female rats were separated and allowed free access to their own litters. Forty pups were selected for the postnatal experiments (n=10/group): Group I (6 males and 4 females), Group II (5 males and 5 females), Group III (5 males and 5 females), and Group IV (5 males and 5 females). The offspring were weaned at 21 days of age. Weight gain was evaluated weekly. Behavioral tests were performed on animals between postnatal days 30 and 40, after which the pups were euthanized and the brains were collected for biochemical assays. The timeline of this experimental protocol is shown in figure 1.

Behavioral tests

Open-field test

Locomotor activity was assessed at postnatal day 30 using an open field apparatus [21]. The apparatus consisted of a wooden box measuring $72 \times 72 \times 33$ cm. The floor of the arena was divided into 16 equal quadrants (18×18 cm) and placed in a sound-proof room. Each pup was placed individually in one of the frames for 5 min, where the total number of squares crossed with all paws (crossing) was counted and the locomotion latency time was assessed. The apparatus was cleaned with a 10% alcohol solution and dried after each test session on each individual animal.

2 Social interaction

The social interaction test was performed on the pups on postnatal day 35 according to Kaidanovich-Beilin et al. [22] with some adaptations. The test consists of observing the social interaction of the "resident" animal (considered the housing box rat) with the "strange" rat (rat from another box of the same age) for 5 minutes in a $72 \times 72 \times 33$ cm box containing a grid of $10 \times 15 \times 7$ cm large enough to keep the "strange" rat immobilized. Twenty-four hours before the test, the "resident" rat underwent training for 5 minutes, allowing free operation of the apparatus and the containment grid to acclimate the animal to the apparatus. During the test, the number of social interactions (the number of times the "resident" moved toward the "stranger") and the interaction time (total time the rat "resident" sniffed, touched, licked or climbed onto the containment grid where the "stranger" was). The strange rat was changed after each litter was evaluated. The apparatus was cleaned with a 10% alcohol solution and dried after each test session on each individual animal.

2.4.3 Nociceptive threshold

The tail flick test was performed to evaluate the nociceptive threshold of rats, using an automatic analgesiometer. On the first day the rats, were familiarized with the tail-flick apparatus. On the second day, the animals were submitted to the tail-flick test. Rats were placed on the apparatus, with the light source positioned below the tail. This test consisted of determining the latency of the animal to withdraw its tail when it reached the nociceptive threshold. The tail flick test was performed in triplicate not exceeding the time of 10 seconds of the apparatus to avoid tissue damage [23].

Tissue and homogenate preparation

After the tail flick test, the animals were anesthetized with isoflurane and euthanized. Cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum were collected. For analysis of oxidative stress parameters, the tissues were homogenized in pH 7.4 sodium phosphate buffer containing KCl (1:10, w/v). The homogenates were centrifuged at 2,500 g for 10 min at 4 °C. The pellet was discarded, and the supernatant was separated for use in biochemical assays. For the ALA-D assay, the samples were placed on ice and homogenized for 10 min in 0.9% saline (1/4, w/v). The homogenate was centrifuged at 2,000 g at 4 °C for 10 min to produce the supernatant that was used for the ALA-D assay. The protein quantification was determined using bovine serum albumin as a standard, according to Lowry et al. [24].

Oxidative stress parameters in brain structures

Reactive oxygen species (ROS) quantification

The generation of ROS was measured by the method described by Ali et al. [25], with some modifications. The intracellular ROS levels were measured by the oxidation of dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) to fluorescent dichlorofluorescein (DCF). The intensity of fluorescence emission by DCF was measured at 488/525 nm, 30 min after the addition of DCFH-DA to the medium. The result is expressed in $\mu\text{mol} / \text{mg}$ of protein.

Nitrite levels

The concentration of nitrites was determined according to previous studies [26], using the Griess reaction. For the reaction, the homogenate was incubated with 1% sulfanilamide and 0.3% N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride at room temperature for 10 min in

the dark. The nitrite content was quantified by spectrophotometry at 540 nm using sodium nitrite as pattern; the results were expressed as μM per mg of protein.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) quantification

The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured according to the method of Esterbauer and Cheeseman [27], which is based on the reaction of lipoperoxides with 0.67% thiobarbituric acid, using 10% trichloroacetic acid to acidify the medium at 100 °C for 30 min. Absorbance of the pink solution formed after the reaction was determined at 535 nm; the results are expressed as nmol of TBARS per mg of protein.

Total sulfhydryl content quantification

The total thiol content was quantified according to the method of Aksenov and Markesbery [28], which is based on the reduction of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, resulting in a yellow derivative (TNB). The reaction medium consisted of the addition of PBS buffer (pH 7.4) containing EDTA to the homogenized tissue, and the reaction was initiated after addition of DTNB. Absorption was measured by spectrophotometry at 412 nm. The results were expressed as nmol TNB per mg protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

The assay to determine the SOD activity was performed according to Misra and Fridovich [29]. The test consists of the inhibition of superoxide-dependent adrenaline self-oxidation. SOD removes superoxide as an intermediate product of the reaction, which was measured by spectrophotometry at 480 nm absorbance; the result is shown as units per mg of protein (U/ mg protein). A unit of SOD was defined as the amount of enzyme to cause 50% inhibition of adrenaline autoxidation.

Catalase (CAT) activity

To determine the CAT activity, the method according to Aebi [30] was used. This method is based on the decomposition of 30 mM hydrogen peroxide in reaction medium containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). Absorbance was measured by spectrophotometry at 240 nm 3 min at 37 ° C. The result was expressed as units per mg of protein (U / mg protein), where, one unit of the enzyme is defined as 1 nmol of hydrogen peroxide consumed per minute.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx enzyme activity was measured using a commercial kit (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, UK), which acts as a catalyst for the oxidation of glutathione (GSH) by cumene hydroperoxide. In this reaction, the oxidized glutathione (GSSG) is immediately converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP⁺ in the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH. The disappearance of NADPH was monitored at 340 nm absorbance and the specific activity of GPx was reported as units per mg protein (U/mg protein).

Glutathione S-transferase (GST) activity

The activity of the GST enzyme was assessed according to the method described by Habig et al. [31]. The technique involves the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) in reaction medium containing 10 mM GSH and 20 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5). The activity of the enzyme was quantified at 340 nm absorbance and the result expressed as $\mu\text{mol GS-DNB/ min/mg protein}$.

Aminolevulinic acid dehydratase activity (ALA-D) activity

The activity of ALA-D was assayed according to the method proposed by Sassa [32], which is based on the formation of porphobilinogen (PBG). The samples were incubated for 3 hours at 37°C and the reaction was quenched with trichloroacetic acid (TCA); the reaction product was determined with Ehrlich reagent. The absorbance of the sample was assessed at 555 nm and the result described as nmol porphobilinogen (PBG)/mg protein/h.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software. Data were analyzed by analysis of variance by two- or one-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. $P < 0.05$ was considered as significant difference between the groups. Data were expressed as mean $\pm$ standard error (SEM).

3. Results

Weight gain

The weight gain profile of the offspring was evaluated weekly during a period of 30 days after birth. As shown in Figure 2, pups whose mothers were exposed to VPA had lower weight gain at postnatal day 21 when compared to control animals ($P < 0.001$, Figure 2).

However, pretreatment with quercetin (50 mg/kg) prevented this reduction when compared to the VPA only group ($P<0.05$, Figure 2).

Locomotor activity and social interaction

In the open field test, no significant difference in locomotor activity was observed in any of the experimental groups, evaluated through the number of total crosses (Figure 3A). VPA exposure increased latency (Figure 3B) in the open field test and quercetin treatment prevented this alteration (VPA [$F_{(1,36)}=11.78$, $P=0.0016$], Quercetin: [$F_{(1,36)}=35.14$, $P<0.0001$], interaction: [$F_{(1,36)}=17.09$, $P=0.0002$]). Figure 3C and 3D shows the social interaction test. No significant difference was observed in the number of social interactions (Figure 3C) in any of the experimental groups evaluated. However, exposure to VPA resulted in reduced social interaction time and quercetin treatment prevented this behavioral change (VPA [$F_{(1,36)}=0.9384$, $P=0.3393$], Quercetin [$F_{(1,36)}=29.51$, $P<0.0001$], interaction: [$F_{(1,36)}=9.087$, $P=0.0048$]) (Figure 3D).

Nociceptive threshold

In the nociceptive threshold test, VPA increased the tail flick latency, whereas quercetin treatment during the prenatal period prevented this alteration (VPA [$F_{(1,36)}=0.4064$, $P=0.5283$], quercetin [$F_{(1,36)}=18.89$, $P=0.0001$], interaction: [$F_{(1,36)}=18.89$, $P=0.0001$]) (Figure 4).

Oxidative stress parameters in cerebral cortex

In cerebral cortex, VPA increased ROS and nitrite levels, while quercetin was able to prevent only nitrite alterations (ROS: VPA [$F_{(1,20)}=0.04703$, $P=0.8317$], quercetin [$F_{(1,20)}=2.859$, $P=0.1147$], interaction: [$F_{(1,20)}=6.038$, $P=0.0288$] (Figure 5A), (Nitrite: VPA: [$F_{(1,20)}=0.9084$, $P=0.3497$], quercetin treatment: [$F_{(1,20)}=11.98$, $P=0.0019$], interaction: [$F_{(1,20)}=3.315$, $P=0.0807$]) (Figure 5B). No changes were observed in TBARS levels and total thiol content in any of the groups evaluated in this study (Figure 5C and D). In addition, VPA induced an increase in the activities of SOD, GPx and GST enzymes and a reduction of CAT activity in the cerebral cortex. Pretreatment with quercetin was only able to prevent alterations in CAT enzyme activity (SOD: VPA [$F_{(1,20)}=16.94$, $P=0.0003$], Quercetin [$F_{(1,20)}=1.362$, $P=0.2534$], interaction: [$F_{(1,20)}=1.148$, $P=0.2935$]) (Figure 5E). (CAT: VPA [$F_{(1,20)}=0.1667$, $P=0.6897$], quercetin [$F_{(1,20)}=28.74$, $P=0.0001$], interaction: [$F_{(1,20)}=9.137$, $P=0.0098$]) (Figure 5F). (GPx: VPA [$F_{(1,20)}=15.90$, $P=0.0011$], Quercetin [$F_{(1,20)}=0.05603$,

$P= 0.8159$], interaction: [$F_{(1,20)}= 0.5653$ $P= 0.4630$]) (Figure 5G). (GST: VPA [$F_{(1,20)}= 14.34$, $P= 0.0020$], quercetin [$F_{(1,20)}= 5.276$, $P= 0.9943$], interaction: [$F_{(1,20)}= 3.877$, $P= 0.0691$]) (Figure 5H).

Oxidative stress parameters in hippocampus

In the hippocampus, VPA induced an increase of ROS, nitrites and TBARS levels, as well as a reduction of total thiol content; quercetin was only able to prevent alterations in total thiol content (Figure 6). (ROS: VPA [$F_{(1,20)}= 3.951$, $P=0.0654$], Quercetin [$F_{(1,20)}= 11.18$, $P=0.0044$], interaction: [$F_{(1,20)}= 6.116$, $P= 0.0258$] (Figure 6A). (Nitrite: VPA [$F_{(1,20)}= 7.381$, $P=0.0120$], quercetin [$F_{(1,20)}= 12.32$, $P= 0.0018$], interaction: [$F_{(1,20)}= 13.76$, $P= 0.0011$]) (Figure 6B). (TBARS: VPA [$F_{(1,20)}= 0.3188$, $P=0.5790$], quercetin [$F_{(1,20)}= 16.69$, $P=0.0006$], interaction: [$F_{(1,20)}=7.652$, $P= 0.0123$] (Figure 6C). (Thiol content: VPA [$F_{(1,20)}= 9.877$, $P= 0.0072$], Quercetin [$F_{(1,20)}= 2.520$, $P=0.1347$], interaction: [$F_{(1,20)}= 3.136$ $P= 0.0984$] (Figure 6D).

In relation to antioxidant enzymes, VPA reduced the activities of SOD, CAT, GPx and GST enzymes in hippocampus. Quercetin (50 mg/kg) prevented changes in activity of all enzymes except for GPx. (SOD: VPA [$F_{(1,20)}= 21.94$, $P= 0.0002$], quercetin [$F_{(1,20)}= 17.08$, $P= 0.0008$], interaction: [$F_{(1,20)}= 10.94$, $P= 0.0044$]) (Figure 6E). (CAT: VPA [$F_{(1,20)}= 1.385$, $P=0.2695$], quercetin [$F_{(1,20)}= 9.327$, $P= 0.0137$], interaction: [$F_{(1,20)}= 23.15$, $P= 0.0010$]) (Figure 6F). (GPx: VPA [$F_{(1,20)}=26.87$, $P=0.0003$], quercetin [$F_{(1,20)}=11.56$, $P=0.0059$], interaction: [$F_{(1,20)}= 0.4168$, $P= 0.5318$]) (Figure 6G). (GST: VPA [$F_{(1,20)}= 22.63$, $P=0.0005$], quercetin [$F_{(1,20)}= 78.40$ $P<0.0001$], interaction: [$F_{(1,20)}= 0.1334$, $P=0.7213$]) (Figure 6H).

Oxidative stress parameters in striatum

Quercetin treatment prevented the increase of ROS, nitrite and TBARS levels induced by VPA in the striatum. (ROS: VPA [$F_{(1,20)}=10.37$, $P=0.0122$], quercetin treatment: [$F_{(1,20)}= 4.607$, $P= 0.0641$], interaction: [$F_{(1,20)}= 0.1793$, $P=0.6831$] (Figure 7A). (Nitrite levels: VPA [$F_{(1,20)}= 4.465$, $P= 0.0488$], quercetin [$F_{(1,20)}= 6.675$, $P= 0.0187$], interaction: [$F_{(1,20)}= 12.24$, $P= 0.0026$]) (Figure 7B). (TBARS: VPA: [$F_{(1,20)}= 10.72$, $P=0.0051$], quercetin [$F_{(1,20)}= 3.528$, $P= 0.0799$], interaction: [$F_{(1,20)}= 6.195$, $P= 0.0250$] (Figure 7C). There were no changes in total thiol content in any of the groups evaluated in this study (Figure 7D).

Prenatal exposure to VPA induced a reduction in the activities of SOD, CAT, GPx and GST enzymes; quercetin did not prevent these alterations. (SOD: VPA [$F_{(1,20)}= 21.00$, $P=0.0013$], quercetin [$F_{(1,20)}= 0.3500$, $P=0.5687$], interaction: [$F_{(1,20)}= 0.5203$, $P=$

0.489]) (Figure 7E). (CAT: VPA [$F_{(1,7)}= 14.92$, $P=0.006$], quercetin [$F_{(1,20)}= 0.001$, $P=0.969$], interaction: [$F_{(1,20)}= 2.632$, $P=0.1488$]) (Figure 7F). (GPx: VPA [$F_{(1,20)}= 8.296$, $P=0.018$], quercetin [$F_{(1,20)}= 0.0072$, $P=0.934$], interaction: [$F_{(1,20)}= 0.170$, $P=0.6892$]) (Figure 7G). (GST: VPA [$F_{(1,20)}= 10.37$, $P=0.0122$], quercetin [$F_{(1,20)}= 4.607$, $P=0.0641$], interaction: [$F_{(1,20)}= 0.1793$, $P=0.6831$]) (Figure 7H).

Oxidative stress parameters in cerebellum

In cerebellum, no changes were observed in the levels of ROS, nitrites, total thiol content, or GST enzyme activity in any of the groups evaluated in this study (Figure 8 A, B, D and H). VPA induced an increase in TBARS levels, though quercetin did not prevent this change. (TBARS: VPA: [$F_{(1,20)}= 25.63$, $P=0.0007$], quercetin [$F_{(1,20)}= 1.805$, $P=0.212$], interaction: [$F_{(1,20)}= 0.0137$, $P=0.909$] (Figure 8C). In addition, VPA induced an increase in SOD and CAT and a decrease in GPx activities. Quercetin prevented the alterations in CAT and GPx enzyme activity: (SOD: VPA: [$F_{(1,20)}= 5.55$, $P=0.046$], quercetin [$F_{(1,20)}= 1.701$, $P=0.228$], interaction [$F_{(1,20)}= 4.079$, $P= 0.0781$]) (Figure 8E). (CAT: VPA [$F_{(1,20)}= 5.292$, $P=0.040$], quercetin: [$F_{(1,20)}= 13.35$, $P= 0.0033$], interaction [$F_{(1,12)}= 10.62$, $P=0.006$]) (Figure 8F). (GPx: VPA [$F_{(1,20)}= 28.58$, $P=0.0007$], quercetin [$F_{(1,20)}= 13.37$, $P=0.006$], interaction: [$F_{(1,20)}= 3.208$, $P=0.111$]) (Figure 8G).

ALA-D activity

In this study, we also evaluated the effects of quercetin treatment on ALA-D activity (Figure 9) in cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum in the model of autism induced by VPA. Our results showed that quercetin prevented the reduction of the activity of this enzyme induced by VPA only in hippocampus: (VPA: [$F_{(1,20)}= 5.307$, $P=0.0440$], quercetin [$F_{(1,20)}= 10.79$, $P=0.0082$], interaction: [$F_{(1,20)}= 0.01261$, $P=0.9128$] (Figure 9B). No changes were observed in cerebral cortex, striatum and in any of the groups evaluated (Figure 9 A, C and D).

4. Discussion

The animal model of autism induced by VPA is described in the literature as an alternative to investigate behavioral and biochemical changes in rodents similar to those found in individuals with ASD [33]. In our study, VPA was administered orally in pregnant rats and the behavioral changes of the pups were similar to those described in other studies when VPA was administered intraperitoneally [12,15,34,35]. The possible mechanisms

involved in VPA-induced autism-like behavior in rats include oxidative damage in fetal brain, inhibition of histone deacetylase (promoting increased neuronal death of rat embryos by apoptosis), and imbalance of the GABAergic inhibitory/excitatory system mainly in the hippocampus, generating epileptic seizures and hyperserotonemia [33].

In our study, we evaluated the preventive effects of the quercetin treatment in pups of female rats exposed to VPA on gestational day 12.5 (prior to the closure of the neural tube of fetuses) [36]. Our findings demonstrated that VPA exposure reduced the body weight, increased latency to begin to move in the open field test, reduced the social interaction and increased nociceptive threshold in the pups. Similar results have been demonstrated in other studies using VPA to induce autism-like behavior in rats [15, 35,37].

The delay to start to ambulate within the open field apparatus as well as the decrease in social interaction may be related to fear or decreased motivation to explore a new environment, which can be associated with dysfunctions in brain endocannabinoid systems induced by VPA exposure [38]. Our results of the tail flick test also correlated with the literature, which shows that an important sensory alteration in ASD is reduced sensitivity to pain [39]. Interestingly, quercetin administered during pregnancy was able to prevent alterations in social interaction and nociception. These protective effects of quercetin can be explained in part by anxiolytic activity [40] and inhibited synthesis of prostaglandins and cytokines [41,42].

VPA pre-natal exposure also altered the oxidative stress parameters in different brain regions of the pups. In cerebral cortex, our results show an increase in ROS and nitrite levels associated with an increase in antioxidant enzyme activities such as SOD, GPx and GST. Similarly, in cerebellum, there was also an increase in TBARS levels accompanied with the increased activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT. In contrast, in hippocampus and striatum, the animals exposed to VPA during the pre-natal period had more pronounced oxidative damage evidenced by increased levels of ROS, nitrites and TBARS, accompanied by a reduction of total thiol content and decreased activities of all antioxidant enzymes evaluated. These results are in accordance with previous studies that also used VPA to induce autism [12,43].

A disequilibrium of the redox system leads to damage in components of the cell membrane and DNA [8,10, 44]. ROS also can oxidize proteins, leading to inactivation of enzymes and receptors, causing homeostatic disruption [45]. Antioxidant enzymes such as SOD, CAT, GPx and GST are an important system of defense that protects the organism against damage from free radicals and peroxides. SOD is responsible for catalyzing the

breakdown of superoxide anions into oxygen and hydrogen peroxide, which are then degraded by enzymes such as CAT and GPx [46]. A decrease in antioxidant enzymes induced by VPA, specifically, in striatum and hippocampus can contribute to an increase in levels of superoxide anions, the most potent oxidants of biological system, and hydrogen peroxide, a harmful compound that freely crosses biological membranes and can produce hydroxyl radicals in the presence of transition metal ions [44,45]. These findings could explain the increase in ROS levels and lipid peroxidation observed in brains of pups exposed to VPA in the gestational period.

In addition, we also observed that VPA decreased the ALA-D activity in hippocampus of pups. The enzyme ALA-D is a sulfhydryl-containing enzyme that catalyzes the conversion of two molecules of delta-aminolevulinate to porphobilinogen, a heme precursor [13, 47]. Although we can't explain the exact mechanism involved in ALA-D inhibition in our study, some hypothesis could be considered: i) reactive species produced by VPA administration can oxidize the thiol groups, causing enzyme alteration. The decrease in ALA-D activity leads to accumulation of its substrate 5-aminolevulinate (ALA), which can have pro-oxidant effects [47]. In fact, ALA-D activity has been considered an indirect marker of oxidative stress [13]. ii) Previous studies have demonstrated that infantile zinc deficiency contributes to the pathophysiology of ASD [48]. Considering that zinc is essential for ALA-D activity, we can exclude the possibility that alterations in this homeostatic element contributed to the results observed. In accordance with this hypothesis, Cesar et al. [49] demonstrated that zinc treatment reduced VPA-induced autistic-like behaviors.

The hippocampus has been considered an important primary site of lesion in ASD due to the fact that this brain structure is important for language processing, semantics, creativity, emotions and motivation [50]. Middle-aged adult patients with ASD present reduced hippocampal volume that could be related to reduced working memory [51]. An imbalance of GABAergic neurotransmission in the hippocampus could negatively influence the eye-opening reflex, indicating the developmental impairment of the pups during the synaptogenesis phase [52]. In pre-frontal cortex and hippocampal sublayers of ASD induced by VPA, an interneural space characterized by sparse and smaller neurons and a disorganized spatial arrangement has been observed, which correlates with growth delay, maturation, reduction of exploratory activity and interaction [53]. Changes in the accessibility of chromatin promoter regions in the hippocampus suggest a change in gene expression, which may cause phenotypic manifestations such as learning impairment and problems with memory consolidation in ASD [54].

The main finding of this study was the ability of quercetin treatment (50 mg/kg) to prevent oxidative damage in brain structures of animals exposed to VPA in an experimental model of autism. In addition, quercetin was also capable of preventing the reduction of ALA-D enzyme in hippocampus in the VPA group. These data are in agreement with the literature, which shows the capacity of quercetin to reduce oxidative damage in other experimental models [19,55,56].

The antioxidant activity of quercetin is related to its chemical structure, since the hydroxyl groups attached to the aromatic rings have the capacity to neutralize reactive substances such as ROS [57,58]. In this way, this compound can act by chelating metals and/or capturing free radicals, thus protecting the tissues from lipid peroxidation caused mainly by the hydroxyl radical and the superoxide anion [57,58]. Considering the great deal of studies showing the induction of oxidative stress by prenatal exposure to VPA, our results suggest that antioxidant action of quercetin could be effective in preventing the associated oxidative brain damage.

Previous studies have demonstrated that estrogenic compounds derived from plants can cross the placenta [59]. Quercetin administered in pregnant rats induces beneficial effects in both mothers and their offspring. Quercetin (100 mg/kg) was able to attenuate oxidative stress and reduce neural tube defects in embryos in diabetic pregnant mice [60], thus decreasing the teratogenic effects of theophylline in rat embryos [61]. Quercetin also has a beneficial role on hematological and behavioral in pregnant rats exposed to predator stress [62]. Pregnant obese rats that received quercetin during gestation and lactation showed reduced birth weight and less postnatal weight gain in their offspring [63]. Taken together, these results suggest that quercetin also may cross the placenta during intrauterine development. Besides, quercetin administered in doses ranging from 2-2000 mg/kg in pregnant rats did not cause teratogenic effects [64].

5. Conclusions

In conclusion, our results showed that quercetin was able to prevent alterations in behavior, nociception and brain oxidative damage induced by valproic acid in this animal model of autism. These findings suggest that quercetin can be a natural alternative to prevent changes associated with autism, especially if used by pregnant women in anticonvulsive therapy or mothers that have children with ASD who want to have other children.

Acknowledgments and funding sources

This research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Finance code 001. R.M.S is recipient of CNPq fellowship (309299/2017-9).

6. References

- [1] E. Rubenstein, L. Wiggins, L. Schieve, C. Bradley, C. Diguiseppi, E. Moody, J Pandey, R. Pretzel, A. Howard, A. Olshan, B. Pence, J. Daniels, Associations between parental broader autism phenotype and child autism spectrum disorder phenotype in the study to explore early development, *Autism* 23 (2019) 436-448. <https://doi.org/10.1177/1362361317753563>.
- [2] B. Zaboski, E. Storch, Comorbid autism spectrum disorder and anxiety disorders: a brief review, *Future Neurol.* 13(2018) 31–37. <https://doi.org/10.2217/fnl-2017-0030>.
- [3] D. Christensen, K. Braun, J. Baio, D. Bilder, J. Charles, J. Constantino, J. Daniels, M. Durkin, R. Fitzgerald, M. Kurzius-Spencer, L. Lee, S. Pettygrove, C. Robinson, E. Schulz, C. Wells, M. Wingate, W. Zahorodny, M. Yeargin-Allsopp, Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 sites, United States, 2012, *MMWR Surveill Summ.* 65 (2018)1-23. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6513a1>.
- [4] I. Zucker, Risk mitigation for children exposed to drugs during gestation: A critical role for animal preclinical behavioral testing, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 77 (2017)107-121. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.03.005>.
- [5] A. Chauhan, V. Chauhan, Oxidative stress in autism, *Pathophysiol.* 13 (2006) 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.05.007>
- [6] A. Frustaci, M. Neri, A. Cesario, J.B. Adams, E. Domenici, B. Dalla Bernardina, S. Bonassi, Oxidative stress-related biomarkers in autism: Systematic review and meta-analyses, *Free Radic. Biol. Med.* 152 (2012) 2128-2141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.011>.

- [7] F. Gu, V. Chauhan, A. Chauhan, Impaired synthesis and antioxidant defense of glutathione in the cerebellum of autistic subjects: Alterations in the activities and protein expression of glutathione-related enzymes, *Free Rad. Biol. Med.* 65(2013)488–496. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.021>.
- [8] H. Sies, Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biol.* 4 (2015) 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.
- [9] G. Bjørklund, S. Chirumbolo, Role of oxidative stress and anti-oxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition* 33(2017) 311-321. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.07.018>.
- [10] B. Halliwell, Free radicals and antioxidants: updating a personal view, *Nutr. Rev.* 70 (2012): 257-265. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>.
- [11] X. Bu, X. Lu, L. Yang, X. Xu, J. Wang, J. Tang, Role of SIRT1/PGC-1 α in mitochondrial oxidative stress in autistic spectrum disorder. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 13 (2017)1633-1645. <https://doi.org/10.2147/NDT.S129081>.
- [12] M Al-amin, M. Rahman, F. R. Khan, F. Zaman, H. Reza, Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism, *Behav. Brain Res.* 286 (2015) 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.041>.
- [13] T. Gonçalves, D. Benvegnú, G. Bonfanti, A. Frediani, J. Rocha, Delta-ALA-D activity is a reliable marker for oxidative stress in bone marrow transplant patients, *BMC Cancer.* 9 (2009)138. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-138>.
- [14] S. Rose, S. Melnyk, A. Savenka, A. Hubanks, S. Jernigan. M. Cleves, S. James, The Frequency of Polymorphisms affecting Lead and Mercury Toxicity among Children with Autism, *Am. J. Biochem. Biotech.* 3 (2007) 187-196.
- [15] V. Bambini-Junior, G. Zanatta, D. Nunes, M. Melo, M. Michels, F. Dutra, N. Freire, R. Riesgo, C. Gottfried, Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid, *Neurosci. Lett.* 583 (2014) 176-181. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>.
- [16] D. Kashyap, A. Sharma, T. Mukherjee, H. Tuli, K. Sak, Quercetin and ursolic acid: dietary moieties with promising role in tumor cell cycle arrest, *Austin Oncol.* 1(2016) 1010.

- [17] H. Chen, C. Lu, H. Liu, M. Wang, H. Zhao, Y. Yan, L. Han, Quercetin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via the NF- κ B pathway, *Int. Immunopharmacol.* 48 (2017) 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.04.022>.
- [18] I. Tinay, T. Sener, O. Cevik, S. Cadirci, H. Toklu, S. Cetinel, G. Sener, T. Tarcan, Antioxidant agent quercetin prevents impairment of bladder tissue contractility and apoptosis in a rat model of ischemia/reperfusion injury, *Low Urin. Tract Symptoms* 9 (2017) 117-123. <https://doi.org/10.1111/luts.12125>.
- [19] C. P Braga, A. Momentti, F. Peixoto, R. Baptista, F. Santos, F. Fava, A. Fernandes. Influence of treatment with quercetin on lipid parameters and oxidative stress of pregnant diabetic rats, *Can J Physiol Pharmacol.* 91(2013) 171-177. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0173>.
- [20] S. Raza, A. Harker, S. Richards, B. Kolb, R. Gibb, Tactile stimulation improves neuroanatomical pathology but not behavior in rats prenatally exposed to valproic acid, *Behav. Brain Res.* 282 (2015) 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.055>.
- [21] M. Gazal, M. Valente, B. Acosta, F. Kaufmann, E. Braganhol, C. Lencina, F. Stefanello, G. Ghisleni, M. Kaster, Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 724 (2014) 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.12.028>.
- [22] O. Kaidanovich-Beilin, T. Lipina, I. Ukobradovic, J. Roder, J. Woodgett, Assessment of Social Interaction Behaviors, *J. Vis. Exp.* 48 (2011): 2473. <https://doi.org/10.3791/2473>.
- [23] G. Gamaro, E. Suyenaga, M. Borsoi, J. Lermen, P. Pereira, P. Ardenghi, Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats, *ISRN Pharmacol.* 2011 (2011) 451682. <https://doi.org/10.5402/2011/451682>.
- [24] O. H. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall, (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [25] S. Ali, C. Lebel, S. Bondy, Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity, *Neurotoxicol.* 13 (1992) 637–648.

- [26] D. Stuehr, C. Nathan, Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells, *J. Exp. Med.* 169 (1989) 1543–1555. <https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1543>
- [27] H. Esterbauer, K. Cheeseman KH, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal, *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H).
- [28] M. Aksenov, V. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)01636-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)01636-6)
- [29] H. Misra, I. Fridovich I, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* 247 (1971) 3170–3175.
- [30] H. Aebi, Catalase in vitro, *Meth. Enzymol.* 105 (1984) 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- [31] W. H. Habig, M. J. Pabst, W. Jacoby, Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 7130–7139.
- [32] S. Sassa, Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay, *Enzyme* 28 (1982) 133–145
- [33] D. Mabunga, E. Gonzales, J. kim, K. kim, C. Shin, Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism, *Exp. Neurobiol.* 24 (2015) 285–300. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>
- [34] M. Al-askar, R. Bhat, M. Selim, L. Al-Ayadhi, A. El-Ansary, Postnatal treatment using curcumin supplements to amend the damage in VPA-induced rodent models of autism, *BMC Complement Altern Med.* (2017) 259. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1763-7>.
- [35] T. Schneider, R. Przewłocki, Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism, *Neuropsychopharmacol.* 30 (2005) 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>.
- [36] P. Rodier, J. Ingram, V. Croog, Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism, *Reprod. Toxicol.* 11 (1997) 417–422.

- [37] T. Schneider, D. Labuz, R. Przewlocki, Nociceptive changes in rats after prenatal exposure to valproic acid, *Pol. J. Pharmacol.* 53 (2001) 531–534.
- [38] D. Kerr, L. Downey, M. Conboy, D. Finn, M. Roche, Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism, *Behav. Brain Res.* 249 (2013) 124–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.043>.
- [39] C. Clarke, Autism spectrum disorder and amplified pain, *Case Rep. Psych.* 2015 (2015) 930874. <https://doi.org/10.1155/2015/930874>.
- [40] C. Vissienon, K. Nieber, O. Kelber, V. Butterweck, Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin—are they prodrugs? *J. Nutr. Biochem.* 23 (2012) 733–740. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.03.017>.
- [41] D. Valerio, S. Georgetti, S. Danilo, R. Casagrande, T. Cunha, F. Vicentini, S. Vieira, M. Fonseca, S. Ferreira, F. Cunha, W. Verri, Quercetin Reduces Inflammatory Pain: Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production, *J. Nat. Prod.* 72 (2009) 1975–1979. <https://doi.org/10.1021/np900259y>.
- [42] K. Morikawa, M. Nonaka, M. Narahara, I. Torii, K. Kawaguchi, T. Yoshikawa, Y. Kumazawa, S. Morikawa, Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats, *Life Sci.* 74 (2003) 709–721. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.06.036>
- [43] N. Morakotsriwan, J. Wattanathorn, W. Kirisattayakul, K. Chaisiwamongkol, Autistic-Like Behaviors, Oxidative Stress Status, and Histopathological Changes in Cerebellum of Valproic Acid Rat Model of Autism Are Improved by the Combined Extract of Purple Rice and Silkworm Pupae, *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016 (2016) 3206561. <https://doi.org/10.1155/2016/3206561>.
- [44] A. Phaniendra, D. Jestadi, L. Periyasamy, Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases, *Indian J. Clin. Biochem.* 30 (2015) 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- [45] F. Facchinetti, V. Dawson, T. Dawson, Free radicals as mediators of neuronal injury, *Cell. Mol. Neurobiol.* 18 (1998) 667–682.

- [46] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidante and functional foods: impacto n human health, *Pharmacogn. Rev.* 8 (2010) 118–126. [https://doi.org/ 10.4103/0973-7847.70902](https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902).
- [47] M. Ahamed, S. Verma, A. Kumar, M. Siddigui, Delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition and oxidative stress in relation to blood lead among urban adolescents, *Hum. Exp. Toxicol.* 25 (2006) 547-553. [https://doi.org/ 10.1191/0960327106het657oa](https://doi.org/10.1191/0960327106het657oa).
- [48] H. Yasuda, K. Yoshida, Y. Yasuda, T. Tsutsui, Infantile zinc deficiency: Association with autism spectrum disorders, *Sci Rep.* 1 (2011):129. [https://doi.org/ 10.1038/srep00129](https://doi.org/10.1038/srep00129).
- [49] L. Cezar, T. Kirsten, C. Fonseca, A. Lima, M. Bernardi, L. Felicio, Zinc as a therapy ina rat model of autism prenataally induced by valproic acid, *Prog. Neuropsychophar. Biol. Psych.* 84 (2018) 173-180. [https://doi.org/ 0.1016/j.pnpbp.2018.02.008](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.02.008).
- [50] G. DeLong, Autism, amnesia, hippocampus, and learning, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 16 (1992) 63-70.
- [51] B. Braden, C. Smith, A.Thompson, T. Glaspy, E. Wood, D. Vatsa, A. Abbott , S. McGee, L.Baxter, Executive function and functional and structural brain differences in middle-age adults with autism spectrum disorder, *Autism. Res.* 12 (2017)1945-1959. [https://doi.org/ 10.1002/aur.1842](https://doi.org/10.1002/aur.1842).
- [52] Y. Fueta, Y. Sekino, S. Yoshida, Y. Kanda, S. Ueno, Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus, *Neurotoxicology* 65 (2018) 1-8. [https://doi.org/ 10.1016/j.neuro.2018.01.001](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.01.001).
- [53] M. Codagnone, M. Podestá, N. Uccelli, A. Reínés, Differential local connectivity and neuroinflammation profiles in medial prefrontal cortex and hippocampus in the valproic acid rat model of autism, *Dev. Neurosci.* 37(2015) 215-231. <https://doi.org/10.1159/000375489>.
- [54] J. Koberstein, S. Poplawski, M. Wimmer, G. Porcari, C. Kao, B. Gomes, D. Risso, H. Hakonarson, N. Zhang, R. Schultz, T. Abel, L. Peixoto, Learning-dependent chromatin remodeling highlights noncoding regulatory regions linked to autism, *Sci. Signal.* 2018 11(2018). pii: ean6500. [https://doi.org 10.1126/scisignal.aan6500](https://doi.org10.1126/scisignal.aan6500).

- [55] G. Duranti, R. Ceci, F. Patrizio, P. Sgr`o, L. Luigi, S. Sabatini, F. Felici, I. Bazzucchi, Chronic consumption of quercetin reduces erythrocytes oxidative damage: evaluation at resting and after eccentric exercise in human, *Nutrit. Res.* 50 (2017)73-81. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.12.002>.
- [56] M. Santos, P. Poletti, G. Favero, A. Stacchiotti, F. Bonomini, C. Montanari, S. Bona, N. Marroni, R. Rezzani, F. Veronese, Protective effects of quercetin treatment in a pristane-induced mouse model of lupus nephritis, *Autoimmunity* 51 (2018) 69-80. <https://doi.org/10.1080/08916934.2018>.
- [57] C. Alves, J. David, J. David, M. Bahia, R. Aguiar, Methods for determination of *in vitro* antioxidant activity for extracts and organic compounds, *Qim. Nova*, v. 33 (2010) 2202-2210. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>
- [58] S. Ozgen, O. Kilinc, Z. Selamoglu, Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review, *Turkish J. Agricul. Food Sci. Technol.* 4(2016): 1134-1138.
- [59] E. Todaka E, K. Sakurai, H. Fukata, H. Miyagawa, M. Uzuki, M. Omori, H. Osada, Y. Ikezuki , O. Tsutsumi, T. Iguchi, C. Mori, Fetal exposure to phytoestrogens the difference in phytoestrogen status between mother and fetus, *Environ. Res.* 99(2005) 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.11.006>.
- [60] L.Cao, C. Tan, F. Meng, P. Liu, E. Reece, Z. Zhao, Amelioration of intracellular stress and reduction of neural tube defects in embryos of diabetic mice by phytochemical quercetin, *Sci. Rep.* 18 (2016) 21491. <https://doi.org/10.1038/srep21491>.
- [61] N. Karampour, A. Arzi, H. Varzi, B. Mohammadian, M. Rezaei, Quercetin preventive effects on theophylline-induced anomalies in rat embryo, *Jun. J. Nat. Pharm. Prod.* 9(2014)e17834.
- [62] M. Toumi, S. Merzoug, A. Tahraoui, Effects of quercetin on predator stress-related hematological and behavioral alterations in pregnant rats and their offspring, *J. Biosci.* 41 (2016) 379-349.
- [63] Z. Wu, J. Zhao, H. Xu, Y. Lyv, X. Feng, Y. Fang, Y.Xu, Maternal quercetin administration during gestation and lactation decrease endoplasmic

reticulum stress and related inflammation in the adult offspring of obese female rats, *Eur. J. Nutr.* 53(2014) 1669-1683. doi: 10.1007/s00394-014-0673-4.

[64] C. Willhite, Teratogenic potential of quercetin in the rat, *Food Chem. Toxicol.* 1982 20(1982):75-79.

Legends of figures

Figure 1: Experimental protocol for prenatal administration of quercetin (50 mg/kg) in model of autism induced by valproic acid (VPA) (800 mg/kg).

Figure 2: Effect of quercetin treatment on weekly weight gain in grams of rats exposed to the prenatal animal model of autism. The lines represent mean $\pm$ SEM. ### $P < 0.001$ VPA group different from the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ group VPA/QUE group different from the VPA group (n= 10).

Figure 3: Effect of quercetin treatment on behavioral responses of rats exposed to the prenatal animal model of autism. Number of total crosses (A) and latency (B) on the open field test, and number (C) and time (D) of interactions in the social interaction test. The latency and interaction time are described in seconds. Bars represent mean $\pm$ SEM. # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ different from the control group, *** $P < 0.001$ different from the VPA group (n= 10/group).

Figure 4: Effect of quercetin treatment on the tail flick test response of rats submitted to the prenatal animal model of autism. Bars represent mean $\pm$ SEM. Result expressed in the seconds. ## $P < 0.01$ different from the control group, *** $P < 0.001$ different from the VPA group (n= 10).

Figure 5: Effect of quercetin treatment on ROS levels (A); nitrites (B); TBARS (C); total thiol content (D); and on the activities of the enzymes superoxide dismutase (E); catalase (F); glutathione peroxidase (G) and glutathione-S-transferase (H) in cerebral cortex of rats exposed to the prenatal animal model of autism. Bars represent mean $\pm$ SEM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ different from the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ different from the VPA group (n= 8-10/group).

Figure 6: Effect of quercetin treatment on ROS levels (A); nitrites (B); TBARS (C); total thiol content (D); and on the activity of the enzymes superoxide dismutase (E); catalase (F); glutathione peroxidase (G) and glutathione-S-transferase (H) in hippocampus of rats exposed to the prenatal animal model of autism. Bars represent mean $\pm$ SEM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ different from the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ different from the VPA group (n= 6/group).

Figure 7: Effect of quercetin treatment on ROS levels (A); nitrites (B); TBARS (C); total thiol content (D); and on the activity of the enzymes superoxide dismutase (E); catalase (F); glutathione peroxidase (G) and glutathione-S-transferase (H) in striatum of rats exposed to the prenatal animal model of autism. Bars represent mean $\pm$ SEM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ different from the control group, * $P < 0.05$ different from the VPA group (n= 6/group).

Figure 8: Effect of quercetin treatment on ROS levels (A); nitrites (B); TBARS (C); total thiol content (D); and on the activity of the enzymes superoxide dismutase (E); catalase (F); glutathione peroxidase (G) and glutathione-S-transferase (H) in cerebellum of rats submitted to the prenatal animal model of

autism. Bars represent mean $\pm$ SEM. # $P<0.05$, ### $P<0.001$ different from the control group, ** $P<0.01$ different from the VPA group (n= 6/group).

Figure 9: Effect of quercetin treatment in rats exposed to the prenatal animal model of autism on the activity of the enzyme aminolevulinic acid dehydratase in cerebral cortex (A), hippocampus (B), striatum (C) and cerebellum (D). Bars represent mean $\pm$ SEM. The activity of the enzyme ALA-D was described as nmol porphobilinogen (PBG) per hour per mg protein. # $P<0.5$ different from the control group, ** $P<0.01$ different from the VPA group (n= 6/group).

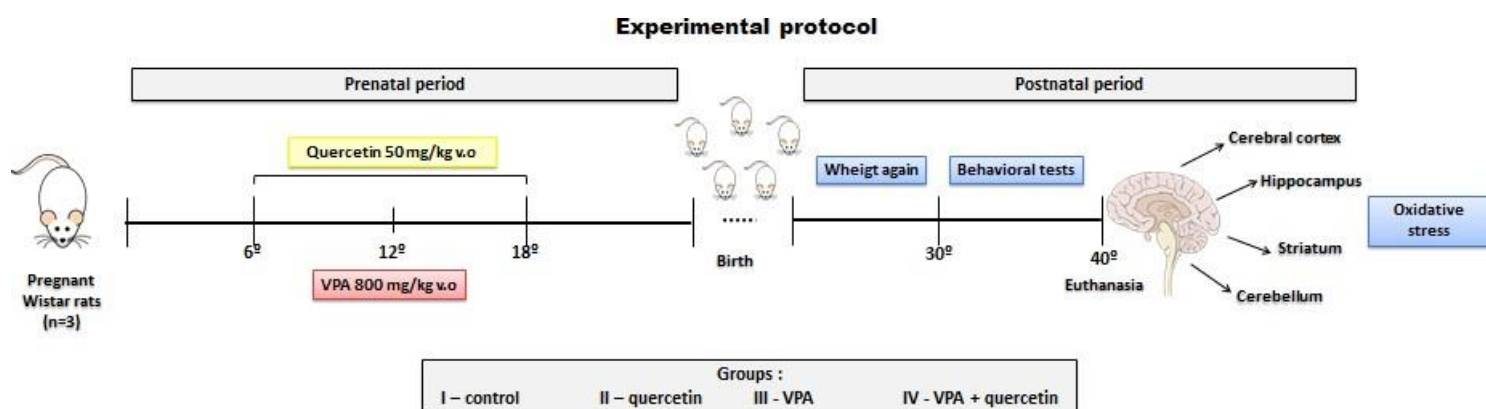


Figure 1

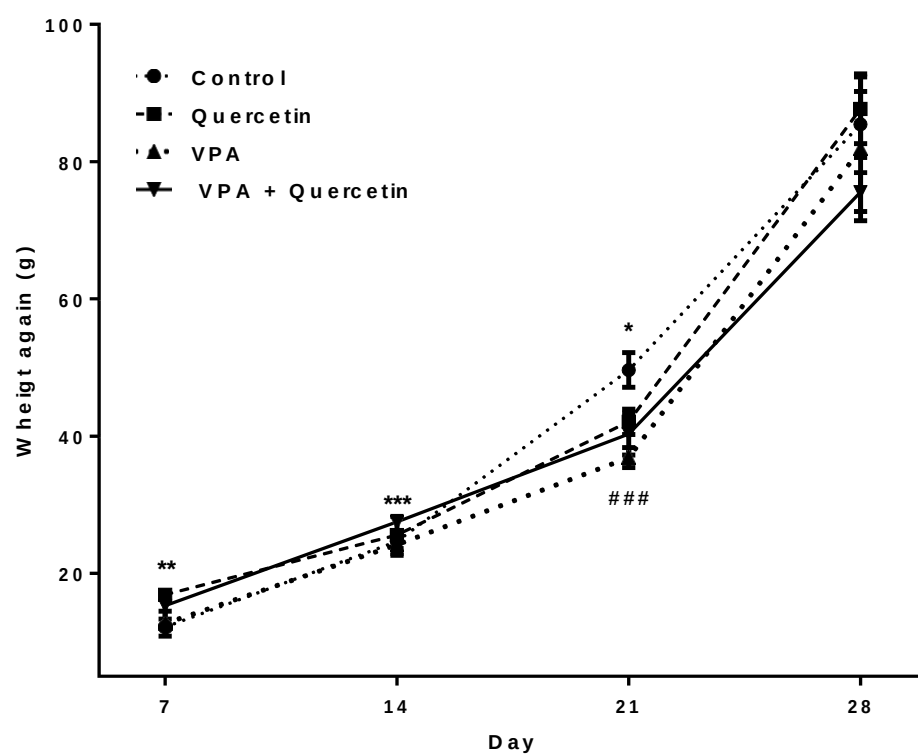


Figure 2

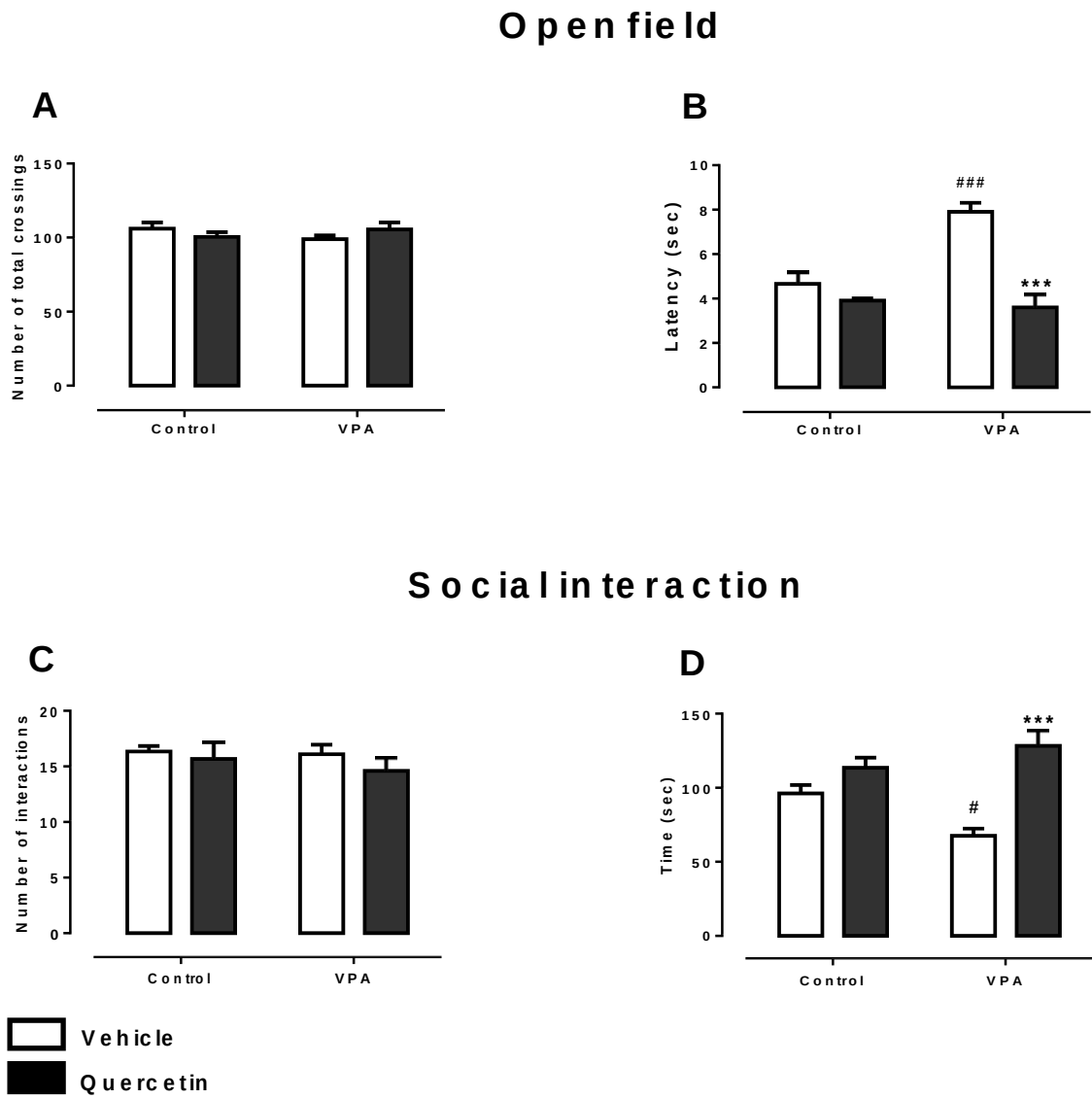


Figure 3

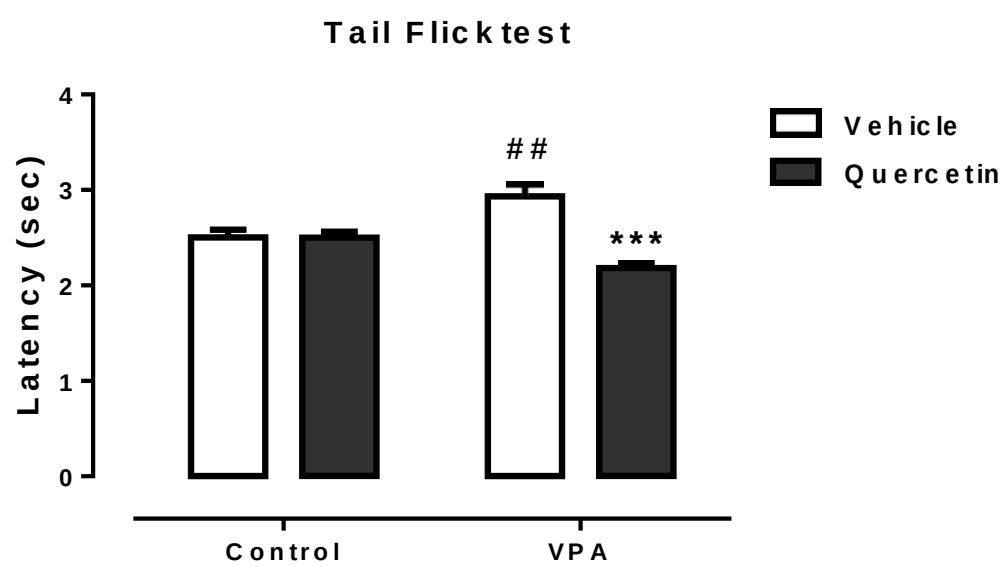


Figure 4

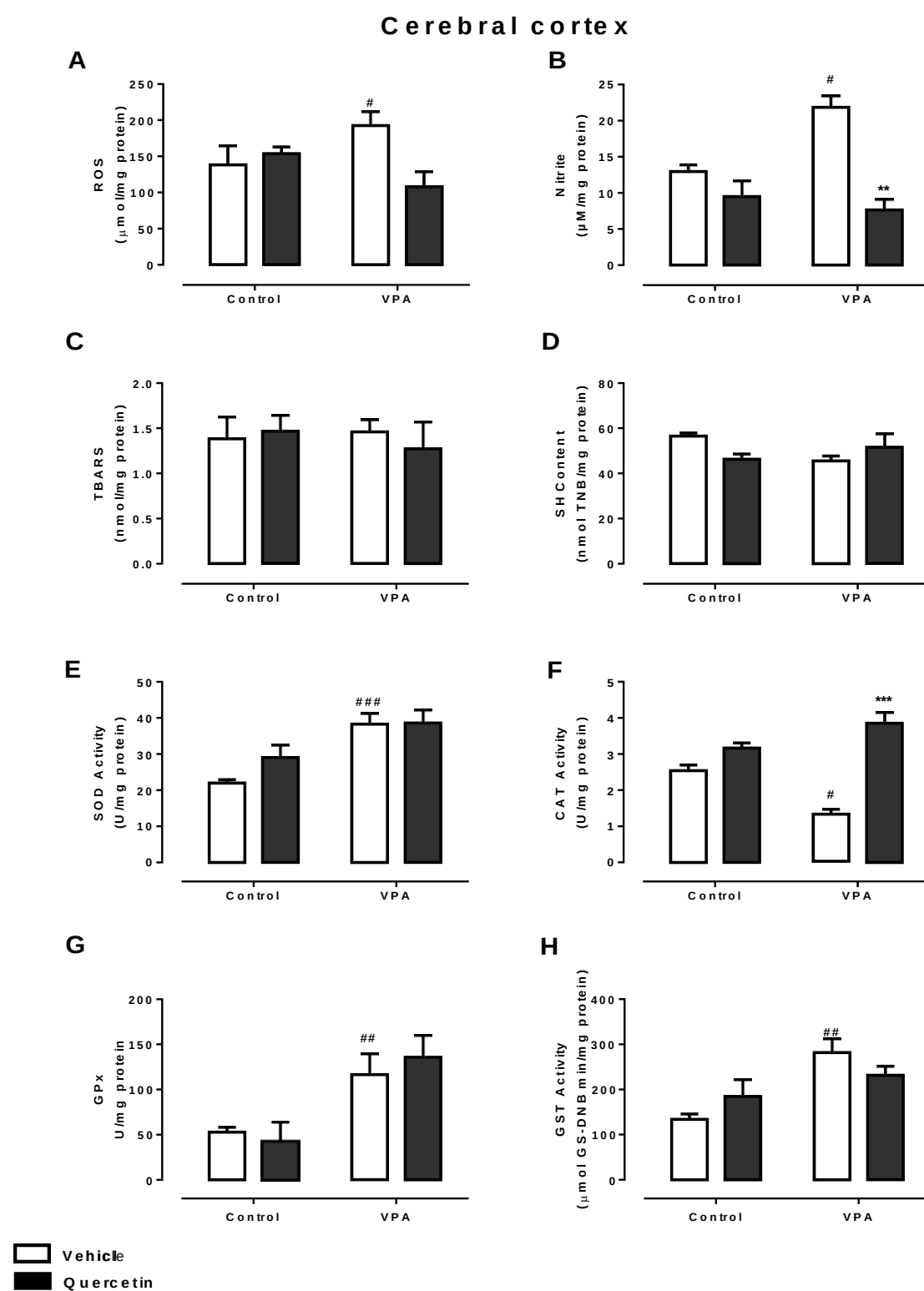


Figure 5

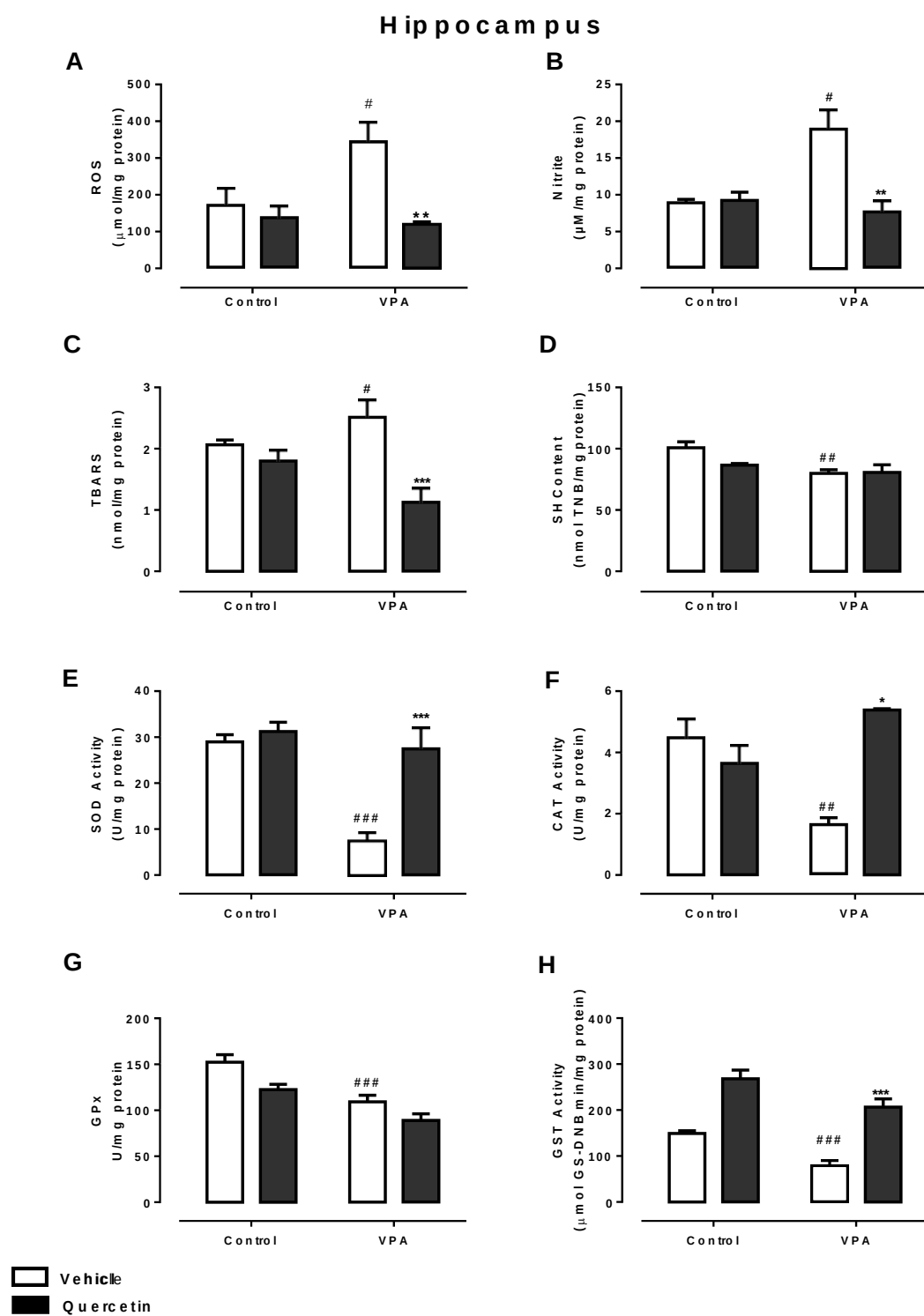


Figure 6

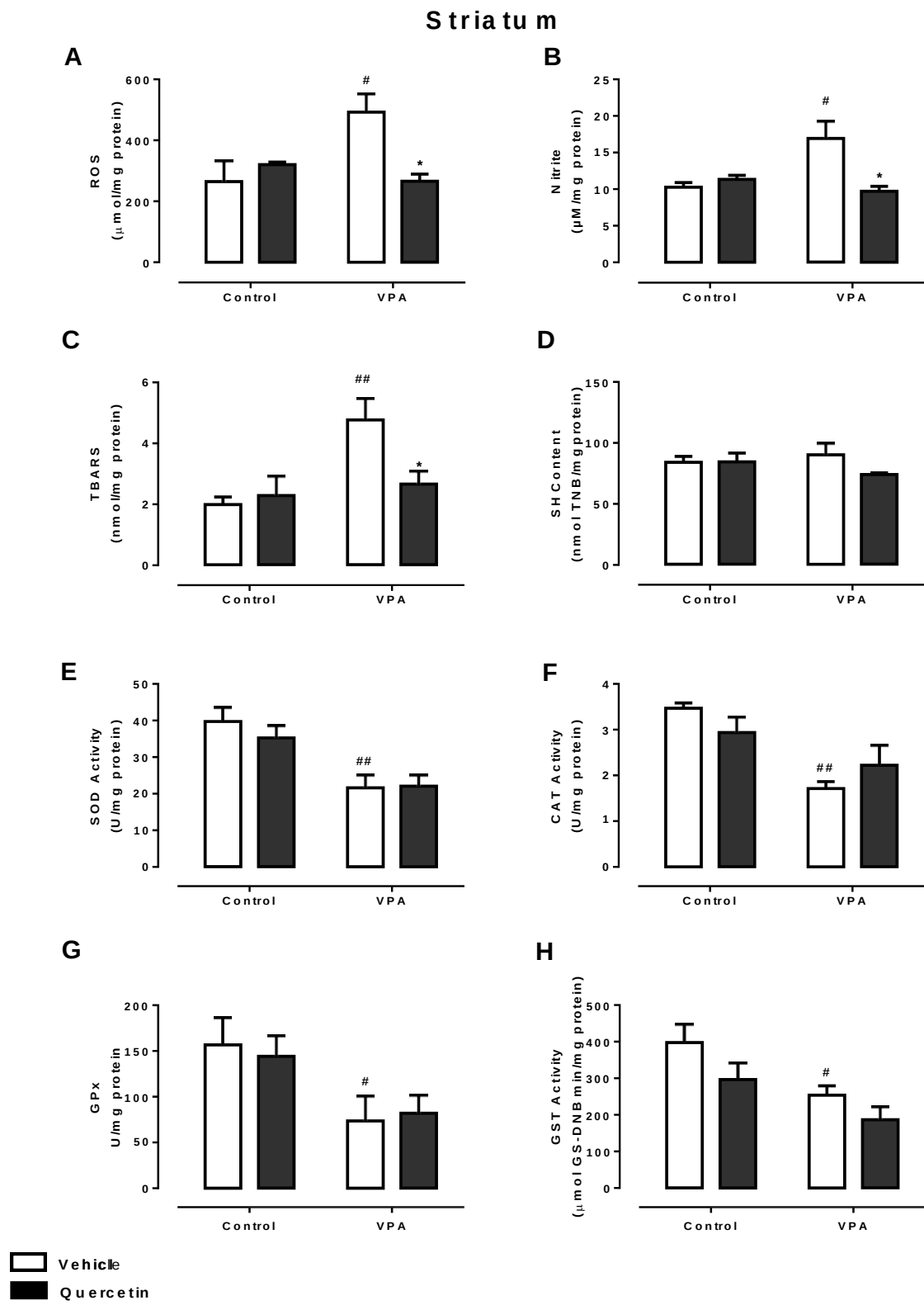


Figure 7

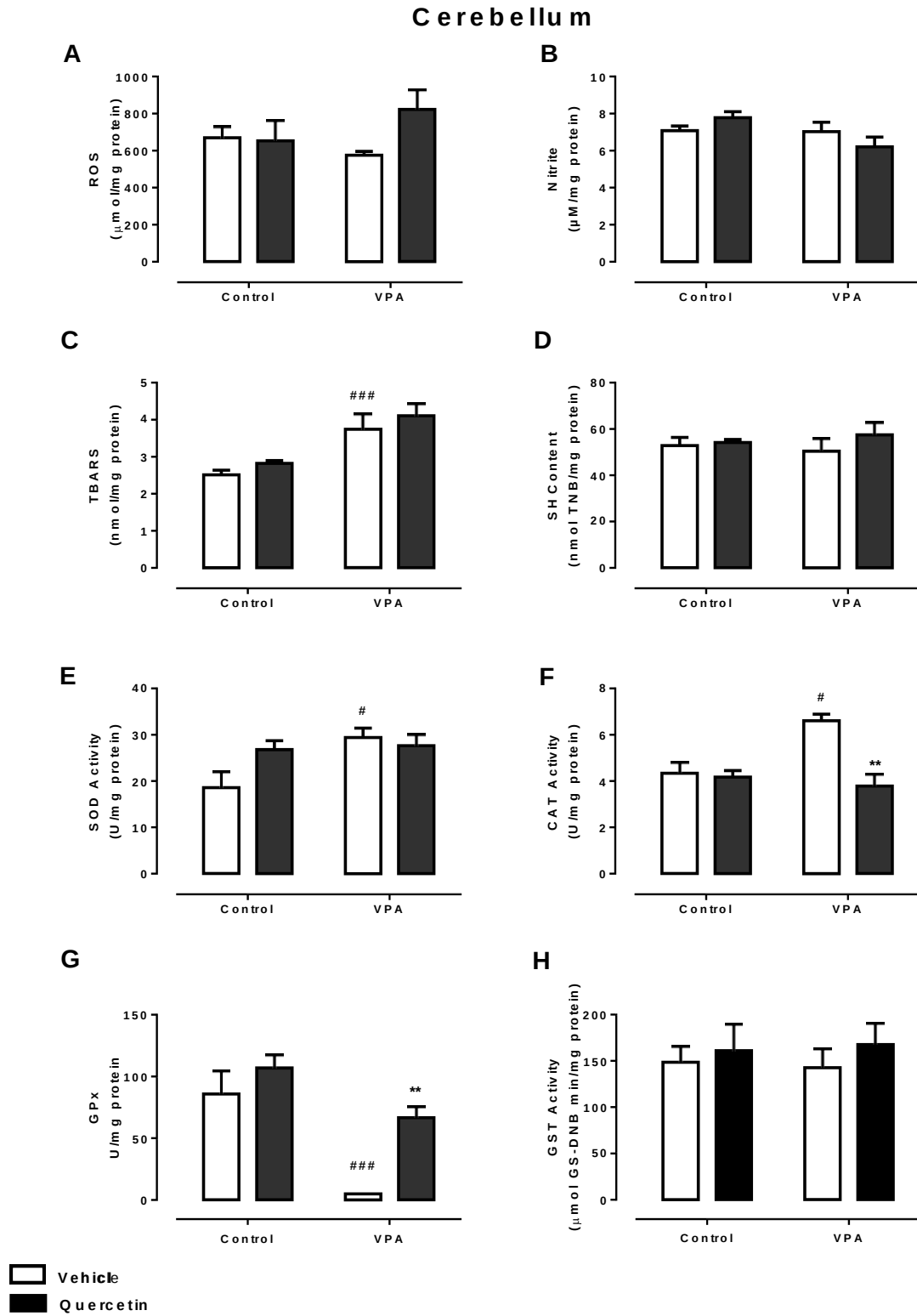


Figure 8

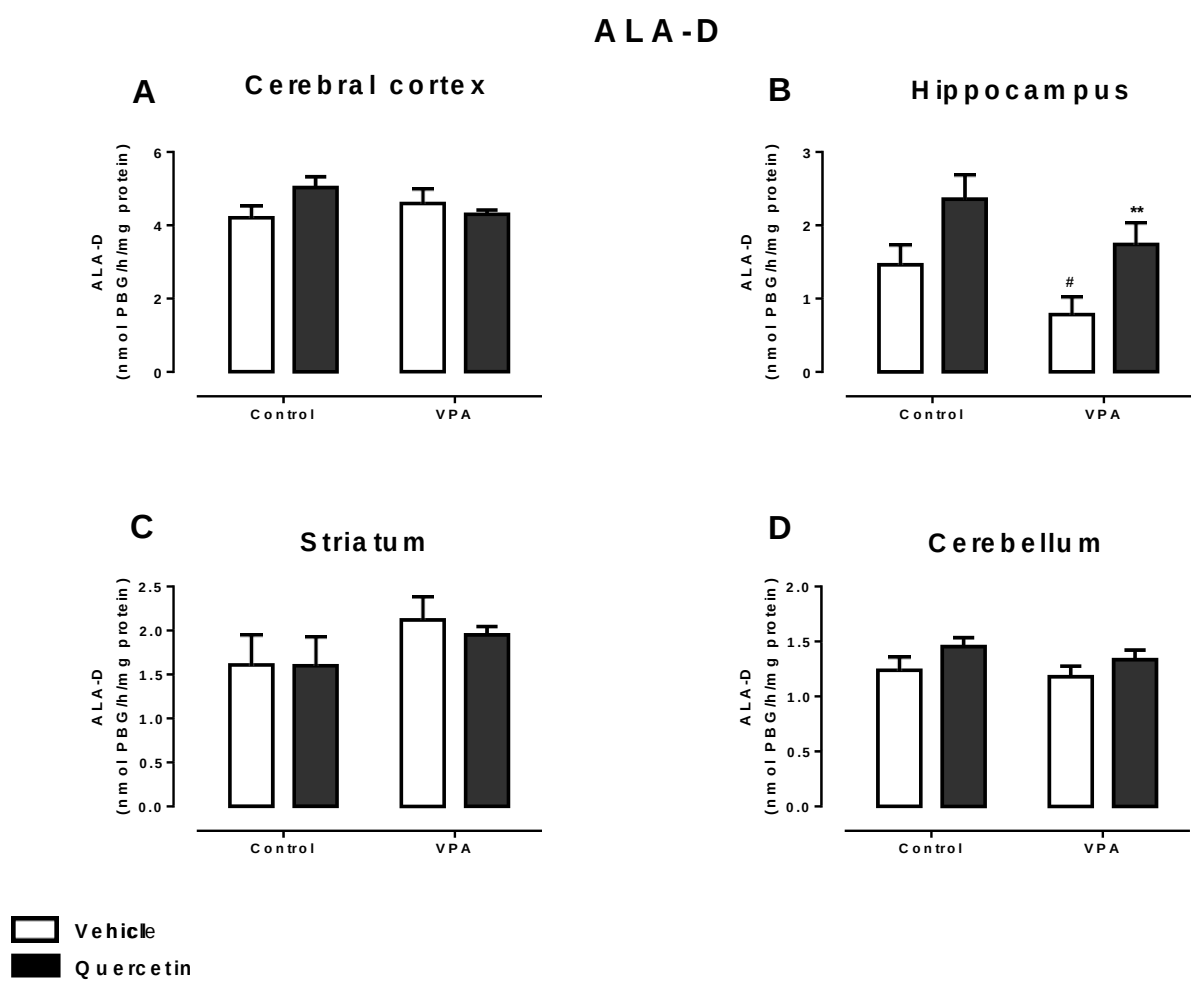


Figure 9

5. Conclusões:

A exposição ao VPA durante o período pré-natal gerou redução do ganho de peso dos filhotes no 21º dia pós-natal, enquanto que a quercetina preveniu este efeito. Quanto à atividade locomotora avaliada pelo teste de campo aberto, a exposição pré-natal ao VPA não alterou a locomoção dos filhotes, porém aumentou a latência durante o teste, enquanto que a quercetina agiu preventivamente e assim, inibiu esta alteração. Em relação à interação social, não foram observadas alterações do número de interações sociais, somente foram encontradas alterações no tempo de interação social dos filhotes, enquanto que a quercetina impediu esta alteração comportamental. Quanto ao limiar nociceptivo a exposição pré-natal ao VPA induziu aumento da latência para o filhote reagir ao estímulo nociceptivo, enquanto que o tratamento com quercetina preveniu essa alteração.

Em relação aos indicadores de estresse oxidativo a exposição pré-natal ao VPA gerou aumento de TBARS, nitritos e ROS, nas estruturas cerebrais, córtex, hipocampo, estriado e cerebelo, seguido de uma redução do conteúdo tiólico total em hipocampo. Enquanto que o tratamento com quercetina conseguiu prevenir estas alterações em córtex, hipocampo e estriado, indicando que este flavonoide agiu de forma antioxidante protegendo os filhotes das ações deletérias que o estresse oxidativo pode causar.

A exposição pré-natal ao VPA induziu alterações na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST em córtex cerebral, hipocampo, estriado e cerebelo, reduzindo ou aumentando suas atividades, indicando desta forma a presença de estresse oxidativo, devido ao desequilíbrio do sistema antioxidante. Quanto ao tratamento com a quercetina, este flavonoide conseguiu prevenir as ações do VPA e assim, impedir as alterações encontradas nas enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST em córtex cerebral, hipocampo e cerebelo, embora não tenha conseguido prevenir as ações do VPA no estriado.

Quanto às ações do VPA na atividade da enzima δ -ALA-D foi encontrado uma redução da atividade desta enzima em hipocampo, enquanto que nenhuma alteração foi observada em córtex cerebral, estriado e cerebelo. Porém, o tratamento com quercetina agiu prevenindo esta alteração, aumentando a atividade da enzima δ -ALA-D.

Neste sentido, os resultados demonstrados neste trabalho mostram que a quercetina foi capaz de prevenir alterações no comportamento, na nocicepção e no dano oxidativo cerebral induzido pelo VPA no modelo animal de TEA. Sugerindo que a quercetina pode ser uma alternativa natural para prevenir alterações associadas ao TEA, especialmente se usado por mulheres grávidas em terapia anticonvulsiva ou em mães que já tenham filhos com TEA e que pretendem ter outros filhos.

Referências

_____. Portaria nº 324, de 31 de março de 2016. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Comportamento Agressivo como Transtorno do Espectro do Autismo. Ministério da Saúde, Brasília, 2016. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2016/prt0324_31_03_2016.html>. Acesso em: 28 jun. 2019.

AFANAS'EV, I. B.; DOROZHKO, A. I.; BRODSKII, A. V.; KOSTYUK, V. A.; POTAPOVITCH, A. I. Chelating and free radicalscavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical pharmacology**, v. 38, p. 1763-1769, 1989.

AKANG, E. N. Combination antiretroviral therapy (cART)-induced hippocampal disorders: Highlights on therapeutic potential of Naringenin and Quercetin. **IBRO Reports**, v. 6, n. 24, p. 137-146, 2019.

AL-AMIN, M., RAHMAN, M., KHAN, F. R., ZAMAN, F., REZA, H. Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-induced mice model of autism. **Behavioural Brain Research**, v. 286, n. 1, p. 112-121, 2015.

AL-ASKAR, M., BHAT, R., SELIM, M., AL-AYADHI, L., EL-ANSARY, A. Postnatal treatment using curcumin supplements to amend the damage in VPA-induced rodent models of autism. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2017.

ALSHABAN, F.; ALDOSARI, M.; AL-SHAMMARI, H.; EL-HAG, S.; GHAZAL, I.; TOLEFAT, M.; ALI, M.; KAMAL, M.; ABDEL, A. N.; ABEIDAH, M.; SAAD, A. H.; DEKAIR, L.; AL-KHASAWNEH, M.; RAMSAY, K.; FOMBONNE, E. Prevalence and correlates of autism spectrum disorder in Qatar: a national study. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 30, n. 18, p.1-15, 2019.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

American Psychiatric Association. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)**. 5. ed. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2013.

ANGELOVA, P. R.; ABRAMOV, A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. **FEBS Letters**, v. 592, n. 5, p. 692-702, 2018.

BABAEI, F.; MIRZABABAEI, M.; NASSIRI-ASL, M. Quercetin in Food: Possible Mechanisms of Its Effect on Memory. **Journal of Food Science**, v. 9, n. 83, p. 2280-2287, 2018.

BALDISSARELLI, J.; SANTI, A.; SCHMATZ, R.; ZANINI, D.; CARDOSO, A. M.; ABADALLA, F. H.; THOMÉ, G. R.; MURUSSI, C.; POLACHINI, C. R. N.; DELENOGARE, D. P.; LORO, V. L.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Quercetin changes purinergic enzyme activities and oxidative profile in platelets of

rats with hypothyroidism. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1849-1857, 2016.

BAMBINI-JUNIOR, V.; ZANATTA, G.; NUNES, D. F. G.; MELO, M. G.; MICHELS, M.; DUTRA, F. M.; FREIRE, N. V.; RIESGO, R.; GOTTFRIED, C. Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neuroscience Letters**, v. 583, p. 176-181, 2014.

BANJI, D.; BANJI, O. J.; ABBAGONI, S.; HAYATH, M. S.; KAMBAM, S.; CHILUKA, V. L. Amelioration of behavioural aberrations and oxidative markers by green tea extract in valproate induced autism in animals. **Brain Research**, v. 1410, p. 141-151, 2011.

BARBOSA, N. B.; ROCHA, J. B.; SOARES, J. C.; WONDRACEK, D. C.; GONÇALVES, J. F.; SCHETINGER, M. R.; NOGUEIRA, C.W. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 1, p. 186-194, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BECHARA, E. J. H.; MEDEIROS, M. H. G.; MONTEIRO, H. P.; HERMES-LIMA, M.; PEREIRA, B.; DEMASI, M.; COSTA, C. A.; ABDALLA, D. S. P.; ONUKI, J.; WENDEL, C. M. A.; MASCIO, P. D. A free radical hypothesis of Lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Química Nova**, v. 16, n. 4, p. 385-392, 1993.

BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H.; ANTUNES, L.; BIANCHI, M. Flavonóide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BRAGA, C. P.; MOMENTTI, A. C.; PEIXITO, F. B.; BAPTISTA, R. F. F.; SANTOS, F. A.; FAVA, F. H.; FERNANDES, A. A. H. Influence of treatment with quercetin on lipid parameters and oxidative stress of pregnant diabetic rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 91, p. 171-177, 2013.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROMLEY, R. L.; BAKER, G. A.; MEADOR, K. J. Cognitive abilities and behaviour of children exposed to antiepileptic drugs in utero. **Current Opinion in Neurology**, v. 22, p. 162-166, 2009.

BRUNNER, D.; KABITZKE, P.; HE, D.; COX, K.; THIEDE, L.; HANANIA, T.; SABATH, E.; ALEXANDROV, V.; SAXE, V.; PELES, E.; MILLS, A.; SPOOREN, W.; GHOSH, A.; FELICIANO, P.; BENEDETTI, M.; CLAYTON, A. L.; BIEMANS, B. Comprehensive analysis of the 16p11.2 deletion and null ctnnap2 mouse models of autism spectrum disorder. **Plos One**, v. 10, n. 8, p. 1-39, 2015.

BU, X.; LU, X.; YANG, L.; XU, X.; WANG, J.; TANG, J. Role of SIRT1/PGC-1 α in mitochondrial oxidative stress in autistic spectrum disorder. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 23, n. 13, p. 1633-1645, 2017.

CASARIL, A. M.; DOMINGUES, M.; FRONZA, M.; VIEIRA, B.; BEGNINI, K.; LENARDÃO, E. J.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; NOGUEIRA, C. W.; SAVEGNAGO, L. Antidepressant-like effect of a new selenium-containing compound is accompanied by a reduction of neuroinflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-challenged mice. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1263-1273, 2017.

CHANG, Y. C.; COLE, T. B.; COSTA, L. G. Behavioral phenotyping for autism spectrum disorders in mice. **Current Protocols in Toxicology**, v. 22, n. 11, p. 1-11, 2017.

CHEN, H.; LU, C.; LIU, H.; WANG, M.; ZHAO, H.; YAN, Y.; HAN, L. Quercetin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via the NF- κ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 48, p. 110-117, 2017.

CHRISTENSEN, D. L.; BAIO, J.; VAN, N. B. K. et al. Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 sites, United States, 2012. **MMWR Surveill Summ**, v. 65, n. 3, p. 1-23, 2016.

COUTINHO, F. G. avaliação do dano oxidativo e atividade do sistema antioxidante enzimático no sangue do cordão umbilical e saliva de recém-nascidos pré-termo com fatores de risco para sepse neonatal precoce. 2017. 63 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo, 2017.

DOGAN, Z.; KOCAHAN, S.; ERDEMLI, E.; KOSE, E.; YILMAZ, I.; EKINCIOGLU, Z.; EKINCI, N.; TURKOZ, Y. Effect of chemotherapy exposure prior to pregnancy on fetal brain tissue and the potential protective role of quercetin. **Cytotechnology**, v. 67, p. 1031-1038, 2015.

EINAT, H.; EZER, I.; KARA, N. Z.; BELZUNG, C. Individual responses of rodents in modelling of affective disorders and in their treatment: prospective review. **Acta Neuropsychiatrica**, p. 1-11, 2018.

ESSA, M. M.; GUILLEMIN, G. J.; WALY, M. I.; AL-SHARBATI, M. M.; AL-FARSI, Y. M.; HAKKIM, F. L.; ALI, A.; AL-SHAFAEE, M. S. Increased Markers of Oxidative Stress in Autistic Children of the Sultanate of Oman. **Biological trace element research**, v. 147, n. 1-3, p. 25-27, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FOLMER, V.; SOARES, J. C.; GABRIEL, D.; ROCHA, J. B. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). **The journal of nutrition**, v. 133, n. 7, p. 2165-2170, 2003.

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. Autism and pervasive developmental disorders. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p. 583-594, 2004.

GOERING, P. L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. **Neurotoxicology**, v. 14, n. 2-3, p. 45-60, 1993.

GU, F.; CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Chauhan, Impaired synthesis and antioxidant defense of glutathione in the cerebellum of autistic subjects: Alterations in the activities and protein expression of glutathione-related enzymes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 488-496, 2013.

GUPTA, A. R.; STATE, M. W. Autism: genetics. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2006.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B., Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, p. 257–265, 2012.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231–255, 2004.

HANNON, M. D.; HANNON, L. V. Fathers' orientation to their children's autism diagnosis: a grounded theory study. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 47, n. 7, p. 2265-2274, 2017.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. **Nutrition and Cancer**, v. 20, n. 1, p. 21- 29, 1993.

JAFFE, E. K.; ALI, S.; MITCHELL, L. W.; TAYLOR, K. M.; VOLIN, M.; MARKHAM, G. D. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of Escherichia coli porphobilinogen synthase. **Biochemistry**, v. 34, p. 244-251, 1995.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **The Nervous Child**, v. 2, p. 217-250, 1943.

KASHYAP, D.; SHARMA, A.; MUKHERJEE, T. K.; TULI, H. S.; SAK, K. Quercetin and ursolic acid: dietary moieties with promising role in tumor cell cycle arrest. **Austin Oncology**, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2016.

KHALED, K. A.; EL-SAYED, Y.; AL-HADIYA, B. M. Disposition of the flavonoid quercetin in rats after single intravenous and oral doses. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 29, n. 4, p. 397-403, 2003.

KHONGRUM, J.; WATTANATHORN, J. Laser acupuncture improves behavioral disorders and brain oxidative stress status in the valproic acid rat model of autism. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 8, n. 4, p. 183-191, 2015.

KIM, J. W.; SEUNG, H.; KIM, K. C.; GONZALES, E. L.; OH, H. A.; YANG, S. M.; KO, M. J.; HAN, S. H.; BANERJEE, S.; SHIN, C. Y. Agmatine rescues autistic behaviors in the valproic acid-induced animal model of autism. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 71-81, 2017.

KUMAR, B.; PRAKASH, A.; SEWAL, R. K.; MEDHI, B.; MODI, M. Drug therapy in autism: a present and future Perspective. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 6, p. 1291-1304, 2012.

LOWE, F. Biomarkers of oxidative stress. **Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 65–87, 2014.

MABUNGA, D. F. N.; GONZALES, E. L. T.; KIM, J.; KIM, K. C.; SHIN, C. Y. Exploring the validity of valproic acid animal model of autism. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 285-300, 2015.

MAHABADY, K. M.; GHOLAMI, M. R.; VARZI, N. H.; ZENDEDEL, A.; DOOSTIZADEH, M. Protective effect of quercetin on skeletal and neural tube teratogenicity induced by cyclophosphamide in rat fetuses. **Veterinary Research Forum**, v. 7, n. 2, p. 133-138, 2016.

MCGONIGLE, P.; RUGGERI, B. Animal models of human disease: challenges in enabling translation. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 162-171, 2014.

MCVEARRY, K. M.; GAILLARD, W. D.; VANMETER, J.; MEADOR, K. J. A prospective study of cognitive fluency and originality in children exposed in utero to carbamazepine, lamotrigine, or valproate monotherapy. **Epilepsy & Behavior**, v. 16, p. 609-616, 2009.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implications of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.

NICOLINI, C.; FAHNESTOCK, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. **Experimental Neurology**, v. 13, p. 18-26, 2017.

NISHIJIMA, T.; TAKIDA, Y.; SAITO, Y.; IKEDA, T.; IWAI, K. Simultaneous ingestion of high-methoxy pectin from apple can enhance absorption of quercetin in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 1531–1538, 2015.

OBERLANDER, T. F.; ZWAIGENBAUM, L. Disentangling maternal depression and antidepressant use during pregnancy as risks for autism in children. **Jama**, v. 317, n. 15, p. 1533-1534, 2017.

OLIVEIRA, J. S.; ABDALLA, F. H.; DORNELLES, G. L.; PALMA, T. V.; SIGNOR, C.; SILVA, B. J.; BALDISSARELLI, J.; LENZ, L. S.; OLIVEIRA, V. A.; CHITOLINA, S. M. R.; MELCHIORI, M. V. M.; RUBIN, M. A.; ANDRADE, C. M. Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the

purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin. **Psychopharmacology**, v. 236, n. 2, p. 641-655, 2018.

PIETTA, P.G. J. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7 p. 1035-1042, 2000.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.97, n.1, p.55-74, 2015.

PRAGNYA, B.; KAMESHWARI, J. S.; VEERESH, B. Ameliorating effect of piperine onbehavioural abnormalities and oxidative markers in sodium valproate inducedautism in BALB/C mice. **Behavioural Brain Research**, v. 270, n. 15, p. 86-94, 2014.

RAJA, S. B.; RAJENDIRAN, V.; KASINATHAN, K. N.; AMRITHALAKSHMI, P.; VENKABALASUBRAMANIAN, S.; MURALI, M. R.; DEVARAJ, H.; DEVARAJ, S. N. Differential cytotoxic activity of Quercetin on colonic cancer cells depends on ROS generation through COX-2 expression. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 92-106, 2017.

ROCHA, A. B. O.; KUMINEK, G.; MACHADO, T. C.; ROSA, J.; RAUBER, G. S.; BORBA, P. A. A.; CARDOSO, S. G. Cocristsais: Uma estratégia promissora na área farmacêutica. **Quimica Nova**, v. 39, n. 9, p. 1112-1125, 2016.

ROJAS, A.; CAMPO, J. A. D.; CLEMENT, S.; LEMASSON, M.; VALDECASAS, M. G.; GÓMEZ, A. G.; RANCHAL, I.; BARTOSCH, B.; BAUTISTA, J. D.; ROSENBERG, A. R.; NEGRO, F.; GÓMEZ, M; R. Effect of quercetin on hepatitis C virus life cycle: from viral to host targets. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-9, 2016.

ROSE, S.; MELNYK, S.; SAVENKA, A.; HUBANKS, A.; JERNIGAN, S.; CLEVES, M.; JAMES, S.; The Frequency of Polymorphisms affecting Lead and Mercury Toxicity among Children with Autism. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 187-196, 2007.

ROSSIGNOL, D. A.; FRYE, R. E. The use of medications approved for Alzheimer's disease in autism spectrum disorder: a systematic review. **Frontiers in Pediatrics**, v. 2, p. 1-8, 2014.

RUBENSTEIN, E.; WIGGINS, L. D.; SCHIEVE, L. A.; BRADLEY, C.; DIGUISEPPI, C.; MOODY, E.; PANDEY, J.; PRETZEL, R. E.; HOWARD, A. G.; OLSHAN, A. F.; PENCE, B. W.; DANIELS, J. Associations between parental broader autism phenotype and child autism spectrum disorder phenotype in the Study to Explore Early Development. **Autism**, v. 1, p. 1-13, 2018.

SAMPAIO, T. B.; MARCONDES SARI, M. H.; PESARICO, A. P.; NOGUEIRA, C. W. δ -Aminolevulinate Dehydratase Activity is Stimulated in a MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease: Correlation with Myeloperoxidase Activity. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 37, n. 5, p. 911-917, 2016.

SANDHYA, T.; SOWJANYA, J.; VEERESH, B. Bacopa monniera (L.) Wettst ameliorates behavioural alterations and oxidative markers in sodium valproate induced autism in rats. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 5, p. 1121-1131, 2012.

SESINK, A. L. A.; O'LEARY, K. A.; HOLLMAN, P. C. H. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. **Journal of nutrition bethesda**, v. 131, p. 1938-1941, 2001.

SHIMOI, K.; YOSHIKUMI, K.; KIDO, T.; USUI, Y.; YUMOTO, T. Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin and a-G-rutin, a water soluble flavonoid, in rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, p. 2785-2789, 2003.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, **Redox Biology**, n. 4, p. 180-183, 2015.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology** v. 82, p. 391-295, 1997.

SIES, H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. New York: **Academic Press**, 1991.

SILVA, M.; MULICK, J. A. Diagnosing autistic disorder: Fundamental aspects and practical considerations. **Psicologia Ciência e Profissão**, v. 29, n. 1, p. 116-131, 2009.

SILVERMAN, J. L.; YANG, M.; TURNER, S. M.; KATZ, A. M.; BELL, D. B.; KOENIG, J. I.; CRAWLEY, J. N. Low stress reactivity and neuroendocrine factors in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. **Neuroscience**, v. 171, n. 4, p. 1197-1208, 2010.

SOUZA, J. B.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W.; BORGES, V. C.; KAIZER, R. R.; MORSCH, V. M.; DRESSLER, V. L.; MARTINS, A. F.; FLORES, E. M.; SCHETINGER, M. R. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 321-325, 2007.

TER-MINASSIAN, A. Cerebral metabolism, brain injury. **Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation**, v. 7, p. 714-721, 2006.

TINAY, I.; SENER, T. E.; CEVIK, O.; CADIRCI, S.; TOKLU, H.; CETINEL, S.; SENER, G.; TARCAN, T. Antioxidant agent quercetin prevents impairment of bladder tissue contractility and apoptosis in a rat model of ischemia/reperfusion injury. **Low Urinary Tract Symptoms**, V. 9, N. 2, P. 117-123, 2017.

TOUMI, M. L.; MERZOUG, S.; BAUDIN, B.; TAHRAOUI, A. Quercetin alleviates predator stress-induced anxiety-like and brain oxidative signs in pregnant rats and immune count disturbance in their offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 107, p. 1-10, 2013.

TUNG, E. W.; WINN, L. M. Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: a role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube defects. **Molecular pharmacology**, v. 80, n. 6, p. 987-979, 2011.

VANHEES, K.; SCHOOTEN, F. J.; DOORN-KHOSROVANI, W. S. B.; HELDEN, S.; MUNNIA, A.; PELUSO, M.; BRIEDÉ, J. J.; HAENEN, G. R.; GODSCHALK, R. W. Intrauterine exposure to flavonoids modifies antioxidant status at adulthood and decreases oxidative stress-induced DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 57, p. 154-161, 2013.

WANG, Q.; LIU, C. Protective effects of quercetin against brain injury in a rat model of lipopolysaccharide-induced fetal brain injury. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 71, p. 175-180, 2018.

WRIGHT, B.; GIBSON, T.; SPENCER, J.; LOVEGROVE, J. A.; GIBBINS, J. M. Platelet-Mediated Metabolism of the Common Dietary Flavonoid, Quercetin. **Plos One**, v. 5, n. 3, p. 1-6, 2010.

YEARGIN-ALLSOPP, M.; RICE, C.; KARAPURKAR, T.; DOERNBERG, N.; BOYLE, C.; MURPHY, C. Prevalence of autism in a US metropolitan area. **Jama**, v. 289, n. 1, p. 49-55, 2003.

Anexos

Anexo A: Carta de parecer do Cômite de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 04 de agosto de 2016

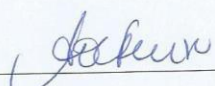
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeitos do tratamento com quercetina em parâmetros comportamentais, neuroquímicos e inflamatórios em ratos submetidos a um modelo experimental de autismo induzido pela exposição pré-natal ao ácido valproico**", registrada com o nº23110.004961/2016-17, sob a responsabilidade de **Roselia Maria Spanevello**- que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – 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 recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 04/07/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	05/08/2016 a 01/08/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	181
Idade	30 a 60 dias
Sexo	5 machos adultos e 80 filhotes; 16 fêmeas adultas e 80 filhotes
Origem	Biotério Central

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 4961-2016**).


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
 Presidente da CEEA

Ciente em: 10 / 08 / 2016
 Assinatura do Professor Responsável: 