

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Faculdade de Farmácia  
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Inibição da Aromatase por ácido valpróico no Autismo

Julia Medeiros Sorrentino

Porto Alegre, Dezembro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Faculdade de Farmácia  
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Inibição da Aromatase por ácido valpróico no Autismo

Julia Medeiros Sorrentino

Orientação: Profa. Dra. Carmem Gottfried

Co-orientação: Me. Geancarlo Zanatta

Porto Alegre, Dezembro de 2013.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.*

*É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”*

(Martin Luther King)

## INIBIÇÃO DA AROMATASE POR ÁCIDO VALPRÓICO NO AUTISMO

O autismo pertence ao Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), e é caracterizado pelo comprometimento da comunicação, interação social, comportamento estereotipado e restritos interesses do indivíduo. A etiologia do autismo ainda é desconhecida, mas diversos estudos apontam para uma origem multifatorial. No autismo, alguns componentes endógenos encontram-se alterados. Dentre esses, a testosterona destaca-se por apresentar níveis séricos elevados. Diversas isoenzimas do citocromo P450 apresentam atividade de detoxificação de fármacos. A aromatase (CYP19A1) é uma isoenzima do citocromo P450, responsável pela biossíntese de estrogênios a partir de precursores androgênicos. A reação catalítica ocorre em um processo de três etapas que resultam na aromatização de um dos anéis que formam o esqueleto da estrutura básica dos esteroides. A aromatase encontra-se principalmente na placenta e nos folículos dos ovários e em menores concentrações no fígado, músculo e cérebro. O ácido valpróico (VPA) é um fármaco da classe de anticonvulsivantes e é também utilizado como estabilizador de humor. Entretanto, essa classe apresenta-se como um grupo de substâncias com potencial teratogênico quando utilizados por gestantes está relacionado ao aumento dos riscos de surgimento de autismo. O VPA é um dos principais fármacos dessa classe atuando como inibidor de aromatase. O uso do VPA em mulheres está associado a efeitos adversos como ovários policísticos, anovulação e hiperandrogenismo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o mecanismo de inibição da aromatase pelo VPA, relacionado ao Autismo. Para isso, aplicação de ferramentas de Bioinformática para a modelagem da estrutura molecular do VPA, otimização da estrutura, docking no sítio ativo da aromatase e análise dos principais resíduos envolvidos na inibição da enzima foram utilizados. Como resultado, a análise sobre os principais resíduos envolvidos na inibição da enzima pelo VPA, sugere que a Arg115 é o resíduo fundamental para que ocorra a inibição enzimática. A energia de interação com o VPA é significativa frente a interação que ocorre com precursores androgênicos. O impedimento estérico gerado pelo ancoramento do VPA a um resíduo não envolvido na aromatização do precursor androgênico, revela o mecanismo de inibição da enzima pelo VPA. Os resultados apresentados nesse estudo sugerem que os níveis séricos elevados de testosterona podem ter como fundamento a inibição da CYP19A1 através do uso do VPA. Além disso, os resultados obtidos auxiliam na elucidação estrutural dos fatores principais no desenvolvimento de novos e promissores inibidores seletivos desta enzima. O mecanismo de ação explicado através de metodologia de bioinformática contribui de maneira significativa nos avanços dos estudos sobre a etiologia do autismo.

Palavras-chave: autismo; aromatase; ácido valpróico; docking.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Transtorno do Espectro do Autismo .....	1
1.2 Aromatase .....	2
1.3 Ácido Valróico.....	5
1.4 Modelagem molecular <i>in silico</i> como ferramenta na avaliação de moléculas .....	6
1.4.1 Ancoramento molecular ( <i>Docking</i> ) .....	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo Geral .....	9
2.2 Objetivos Específicos .....	9
3. METODOLOGIA .....	10
3.1 Dados estruturais da Aromatase .....	10
3.2 Estrutura molecular do VPA .....	10
3.3 Docking .....	11
3.4 Otimização Clássica do resultado do docking .....	12
3.5 Obtenção das imagens.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4.1 Estrutura molecular do VPA .....	13
4.2 Redocking .....	14
4.3 Docking VPA/ CYP19A1 .....	15
5. CONCLUSÕES.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Transtorno do Espectro do Autismo

O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA), descrito inicialmente por Hans Asperger em 1938 e, seguido por um relato de uma população de 11 crianças feito por Leo Kanner, em 1943, caracteriza-se por uma série de condições comportamentais compreendendo distúrbios do encéfalo que englobam o transtorno autista imaturo, Síndrome de Asperger e Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Não Especificado (TDNE) (Kogan *et al.*, 2009). O TEA é caracterizado pelo comprometimento da comunicação e interação social, pelo comportamento estereotipado e pelos restritos interesses. Cerca de 70% dos indivíduos caracterizados com autismo apresentam deficiência intelectual e de 25% a ocorrência de epilepsia (Tuchman e Rapin, 2002; Baird *et al.*, 2006). Um estudo de Kogan e colaboradores, em 2009, apresentou que a incidência do diagnóstico de TEA, entre as crianças norte-americanas com idade de 3 a 17 anos, foi estimada como 110 casos em 10.000 indivíduos (1:91) (Kogan *et al.*, 2009). Em 2012, a estimativa de diagnóstico apresentada por Elsabbagh e colaboradores, é de 62 em 10.000 indivíduos (Elsabbagh *et al.*, 2012).

O autismo é caracterizado por deficiências em três domínios: a) na interação social, b) na linguagem, na comunicação e, c) em interesses e atividades restritos (Tuchman e Rapin, 2002; Gadia, Tuchman e Rotta, 2004). O diagnóstico é clínico e baseia-se nos critérios descritos no Manual Estatístico e Diagnóstico da Associação Americana de Psiquiatria, o DSM (Gadia, Tuchman e Rotta, 2004). A etiologia do autismo ainda é desconhecida, mas diversos estudos apontam para uma origem multifatorial. Inúmeros, estudos na área da genética (Abrahams e Geschwind, 2008; Sarachana *et al.*, 2011; Hall e Kelley, 2013), biológicas (Belmonte *et al.*, 2004), ambiental e de desenvolvimento (Elsabbagh *et al.*, 2012) contribuem para o avanço da compreensão da doença. Além desses, também merece destaque a validação de instrumentos de triagem e diagnóstico, que auxilia na redução da heterogeneidade da caracterização clínica em estudos de investigação, e o estabelecimento de um modelo animal de autismo (Bambini-Junior *et al.*, 2011), que permite estudos mais detalhados

sobre o comportamento e o metabolismo, tais como: mecanismo de ação de fármacos para o tratamento dos sintomas relacionados ao espectro, vias metabólicas e avaliação de níveis séricos de componentes endógenos. Dentre os componentes endógenos, a testosterona destaca-se por apresentar níveis séricos elevados. Os resultados apresentados em estudos que relacionam níveis de testosterona durante a gestação e comportamento autista mostram que crianças de 18 - 24 meses de idade e de 6 - 9 anos demonstram “traços” autistas (Auyeung *et al.*, 2009; Auyeung *et al.*, 2010), assim como interesses restritos aos 48 meses (Knickmeyer *et al.*, 2005). Recentemente, foi descrito que crianças diagnosticadas com autismo possuem um aumento dos níveis de testosterona na saliva quando comparado aos níveis em crianças com desenvolvimento típico (Majewska *et al.*, 2013).

## **1.2 Aromatase**

A aromatase, uma isoenzima do citocromo P450, também é conhecida como CYP19A1. Essa enzima é composta por 503 resíduos de aminoácidos e um grupamento heme no sítio catalítico (Figura 1) e está localizada na membrana do retículo endoplasmático (Ghosh *et al.*, 2009; Jiang e Ghosh, 2012). A aromatase apresenta alta especificidade por androstenediona (ASD, sigla em inglês), testosterona (TST) e 16 $\alpha$ -hidroxitestosterona (HTST), sendo que todas possuem a mesma estrutura básica derivadas do ciclopentanofenantreno (gonano) (Figura 2). Ao ligar-se a estes substratos, a enzima promove a catálise e conversão em estrona, 17 $\beta$ -estradiol e 17 $\alpha$ ,16 $\beta$ -estriol, respectivamente. Entre os vertebrados, a aromatase é a única enzima conhecida que catalisa a biossíntese de estrogênios a partir de precursores androgênicos.

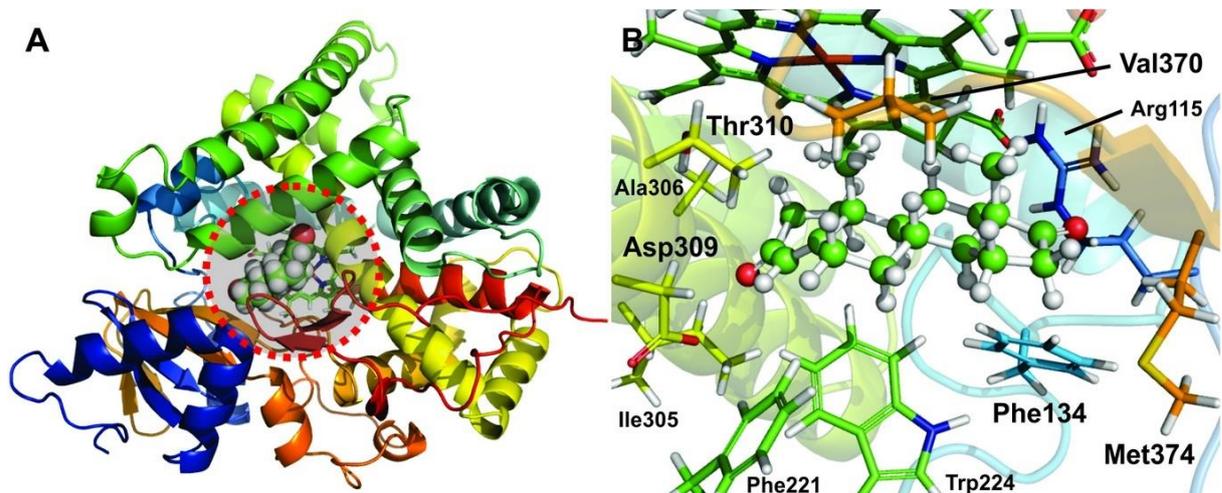


Figura1. **Estrutura cristalográfica da aromatase (PDB 3S79).** (A) Estrutura cristalográfica da aromatase destacando – linha vermelha tracejada - o sítio catalítico da enzima e ligante (androstenediona). (B) Ampliação do sítio catalítico destacando a disposição dos resíduos de aminoácido envolvidos na interação molecular com a androstenediona (Figuras elaboradas em *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC*)

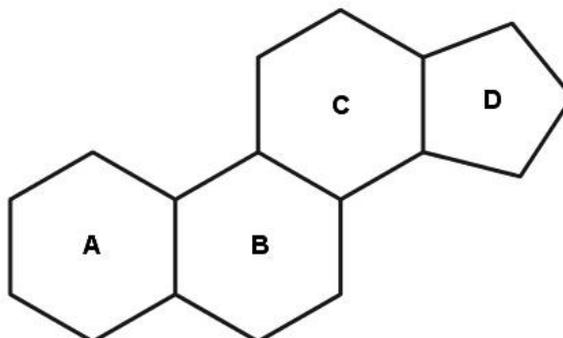


Figura 2. **Estrutura básica de esteroides.** Ciclopentanofenantreno.

A reação catalítica ocorre por um processo de três etapas, resultando na aromatização do anel A da estrutura básica andrógena. Cada etapa da reação requer um mol de  $O_2$ , um mol de NADPH e NADPH citocromo redutase. Nas duas primeiras reações há uma reação típica de hidroxilação na metila C19. Como consequência, a aromatização do anel A ocorre na etapa final da catálise, conforme representado na Figura 3. Muitas outras isoenzimas do citocromo P450 são responsáveis pelo metabolismo de uma grande variedade de compostos endógenos e xenobióticos.

A aromatase tem sido intensamente estudada nas últimas décadas, entretanto, o seu mecanismo de ação ainda é pouco esclarecido. Muitos fármacos são Inibidores

de Aromatase (IA) e são utilizados para impedir a síntese de estrogênio tendo como finalidade o tratamento de cânceres. Derivados triazólicos como anastrozol e lanotrazol, e análogos de esteroides, como exemestano, são fármacos IA amplamente aplicados no tratamento de endometriose, câncer de ovário, de mama, entre outros.

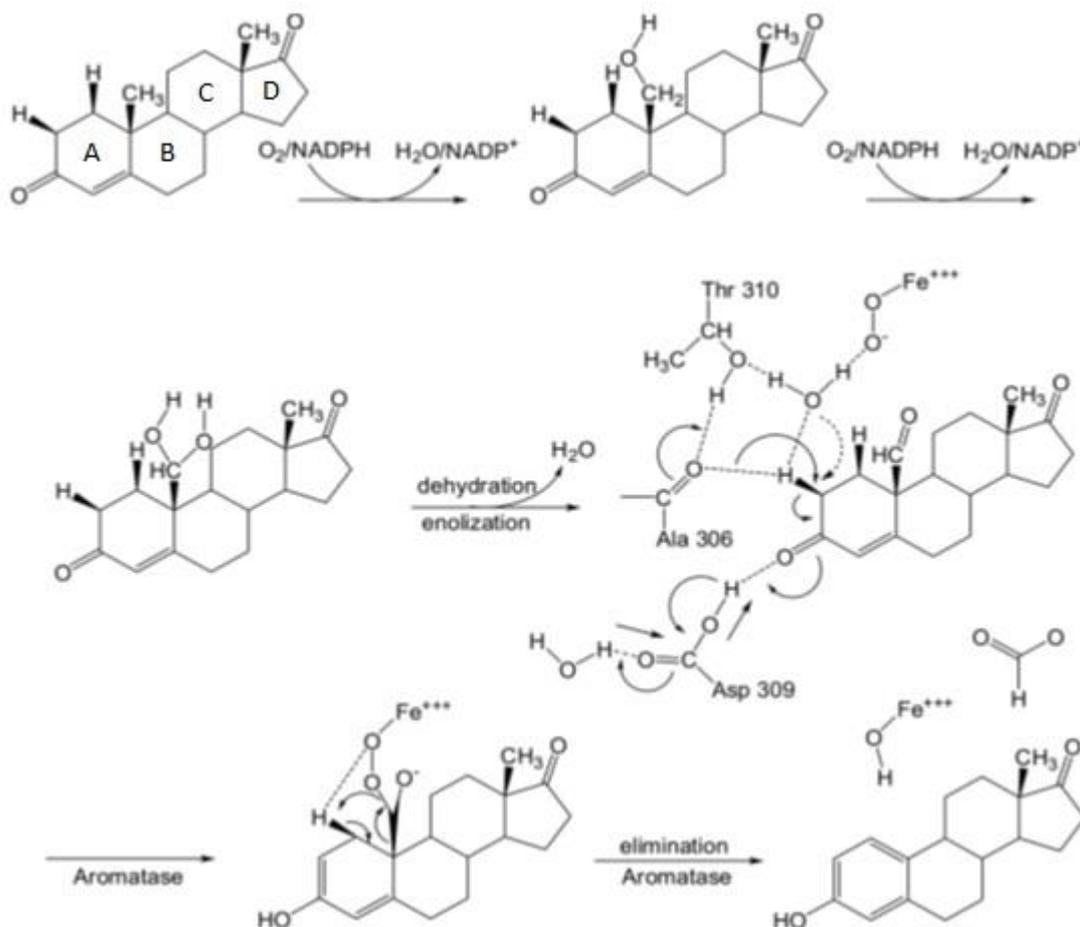


Figura 3. **Reação catalítica da CYP19A1.** No primeiro passo, ocorre a hidroxilação do C19 da androstenediona seguida de uma segunda hidroxilação no mesmo carbono, gerando C19-dihidroandrostenediona. Ocorre uma desidratação levando a formação da C19-aldeído-androstenediona. Em seguida, um ataque nucleofílico ao H em C2 pela Thr310 e o grupamento cetona da Ala306, ao mesmo tempo que ocorre um ataque eletrofílico à carbonila em C3 pela Asp309. Dessa forma, os elétrons são deslocados, auxiliados pelo Fe do grupamento heme, formando o sistema aromático e gerando os produtos ácido fórmico e estrona. (Adaptado de Suvannang e colaboradores, 2011).

### 1.3 Ácido Valpróico

Fármacos anticonvulsivantes também têm se apresentado como uma classe de fármacos importantes na inibição do CYP19A1. Efeitos adversos comuns em pacientes que fazem uso contínuo dessa classe de medicamentos, são consequências diretas de alterações hormonais, como ovários policísticos, anovulação, obesidade, desordens menstruais, alterações das concentrações séricas de hormônios sexuais e hiperandrogenismo (El-Khayat *et al.*, 2004; Morrow *et al.*, 2006; Krepula *et al.*, 2012). Jacobsen e colaboradores avaliaram a inibição do CYP19A1 utilizando vinte fármacos anticonvulsivantes usados como mono ou politerapia no tratamento de crianças com epilepsia, e observou que sete fármacos foram capazes de inibir aromatase, dentre esses fármacos destacam-se a etossuximida, o fenobarbital e o ácido valpróico (VPA) (Jacobsen, Halling-Sorensen e Birkved, 2008).

Alguns fármacos antiepiléticos (FAE) são utilizados como estabilizadores de humor e controle de distúrbio convulsivo. Entretanto, muitos desses fármacos são teratogênicos quando utilizados por gestantes, oferecendo um aumento do risco de malformações congênitas no embrião e no feto (Moore, 2000; Morrow *et al.*, 2006; Ornoy, 2009). Crianças expostas a esses medicamentos durante o período fetal, em especial o VPA (Bromley *et al.*, 2010), são mais vulneráveis a apresentar um desenvolvimento cognitivo reduzido além de malformações congênitas e características autistas (Moore, 2000; Eriksson *et al.*, 2005). Os elevados níveis de testosterona durante o desenvolvimento é apontado como fator de risco para o TEA, de acordo com diversos estudos que apresentam que os níveis de testosterona fetal aumentado está associada ao TEA e características autistas. Estudos em animais mostram que a administração de ácido valpróico em ratas Wistar prenhes resulta em uma prole com comportamento semelhante ao apresentado por indivíduos com diagnóstico de autismo (Bambini-Junior *et al.*, 2011). A representação molecular do VPA pode ser vista na Figura 4.

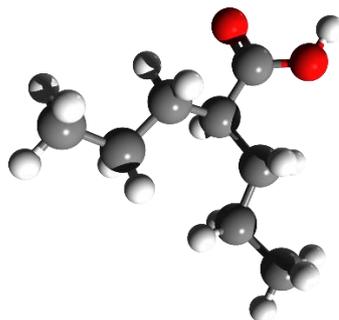


Figura 4. Estrutura molecular do ácido valpróico.

#### 1.4 Modelagem molecular *in silico* como ferramenta na avaliação de moléculas

A modelagem molecular *in silico* refere-se a qualquer estudo aplicado a métodos físicos ou teóricos para explicar um comportamento observado ou previsto de moléculas utilizando ferramentas computacionais (Roncaglioni e Benfenati, 2008). Através desta abordagem, a descoberta e o planejamento de novos fármacos tornam-se mais atrativos pois o uso desta ferramenta é capaz de proporcionar uma redução do tempo na obtenção de resultados e, também, dos altos custos envolvidos em pesquisas (Magalhães, 2007). Com a modelagem molecular, é possível avaliar parâmetros toxicológicos de compostos frente a importantes alvos, planejar teoricamente moléculas que apresentem propriedades eletrônicas e estruturais para um encaixe adequado ao receptor (Kitchen *et al.*, 2004). O desenvolvimento de técnicas de modelagem molecular foi possível através da determinação da estrutura tridimensional de proteínas e outras moléculas por cristalografia de raios-X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), assim como do conhecimento de química molecular e quântica e a aplicação da tecnologia computacional.

Para os estudos em modelagem molecular, dois métodos teóricos são aplicados: os baseados em mecânica clássica e os em mecânica quântica (MQ). Na mecânica clássica, a estrutura molecular é tratada como uma série de esferas carregadas ligadas por bastões. Nesse método, não é considerado a posição dos elétrons. A mecânica clássica é utilizada para calcular as diversas interações e energias (campos de força) resultantes do alongamento das ligações, ângulo de flexão, interações não-ligadas e energias de torção (Magalhães, 2007; Patrick, 2009)

Na mecânica quântica, o efeito das interações eletrônicas são levados em conta, o que resulta em dados muito mais precisos. As propriedades da molécula são calculadas através da física quântica, onde os elétrons e o núcleo de cada átomo são considerados, com a aplicação da equação de Schrödinger (equação 1):

$$\hat{H}\Psi=E\Psi \quad (1)$$

De forma bastante simplificada, o operador hamiltoniano ( $\hat{H}$ ) descreve as energias potenciais e cinéticas entre elétrons e núcleo levando em consideração a posição espacial de cada partícula; o  $\Psi$  é a função de onda, que é uma função da posição da partícula e do tempo, e o  $E$  é a energia total do sistema (Cramer, 2005). Os métodos de MQ têm se tornado cada vez mais populares no desenvolvimento de fármacos auxiliado por computador, principalmente devido à alta importância do uso de rotinas com métodos de MQ em todas as fases do desenvolvimento *in silico* de fármacos (Raha, 2007), o custo computacional – devido ao grande número de elétrons envolvidos – ainda é um fator limitante. Estruturas polieletrônicas apresentam cálculos mais complexos e, para a obtenção de cálculos mais prováveis e executáveis, são feitas aproximações como, por exemplo, estudos da Teoria do Funcional da Densidade (DFT, sigla em inglês), que considera a densidade eletrônica (Tostes, 1998). Na DFT, o sistema é descrito em termos de densidade eletrônica  $\rho(r)$ , a qual depende somente de três coordenadas espaciais, ao invés de funções de onda, e a energia total de um sistema multieletrônico é expresso como função da densidade de carga dos elétrons, através da resolução das equações de Kohn-Sham (Hohenberg e Kohn, 1964; Kohn e Sham, 1965).

#### 1.4.1 Ancoramento molecular (*Docking*)

Métodos e ferramentas computacionais têm sido desenvolvidos e aplicados visando o estudo específico dos princípios pelos quais os alvos moleculares reconhecem, interagem e se associam com moléculas ativadoras ou inibidoras (Perola, Walters e Charifson, 2004). O conhecimento dos mecanismos envolvidos nestas interações é um dos aspectos essenciais para o sucesso na descoberta e planejamento de novos fármacos, área conhecida como Desenho Racional de

Fármacos Baseado em Estrutura (DRFBE) (Kuntz, 1992). O método *in silico* mais utilizado para o estudo das interações entre ligantes e macromoléculas (enzimas, receptores proteicos) é o docking molecular.

Os estudos de docking têm evoluído principalmente a respeito do desenvolvimento de drogas de uso medicinal (Sousa, Fernandes e Ramos, 2006). O docking molecular pode ser definido como uma predição de interação, por exemplo, do modo de ligação entre ligante e receptor, além de interações entre proteínas (Brooijmans e Kuntz, 2003). Prever as características de interação entre ligantes e seus alvos moleculares, é o principal objetivo do docking molecular. O conhecimento prévio a respeito do ligante e do receptor, como o espaço de interação no sítio catalítico, cargas envolvidas, tipos de interações, permitem que detalhes do método sejam mais precisos (Goodford, 1985).

Diversas ferramenta de bioinformática são amplamente utilizadas para o docking. As mais utilizadas são os softwares Autodock e Dock, respectivamente, de acordo com Sousa e colaboradores (2006). O uso do software Autodock tem se destacado nos últimos anos por proporcionar qualidade aos resultados e por ser gratuito (Sousa, Fernandes e Ramos, 2006) (Figura 5). Outros softwares, como o Autodock Vina (Vina), apresenta-se como uma alternativa ao Autodock. Além de ser um software mais simples, a velocidade de execução do Vina é superior a velocidade apresentada pelo Autodock.

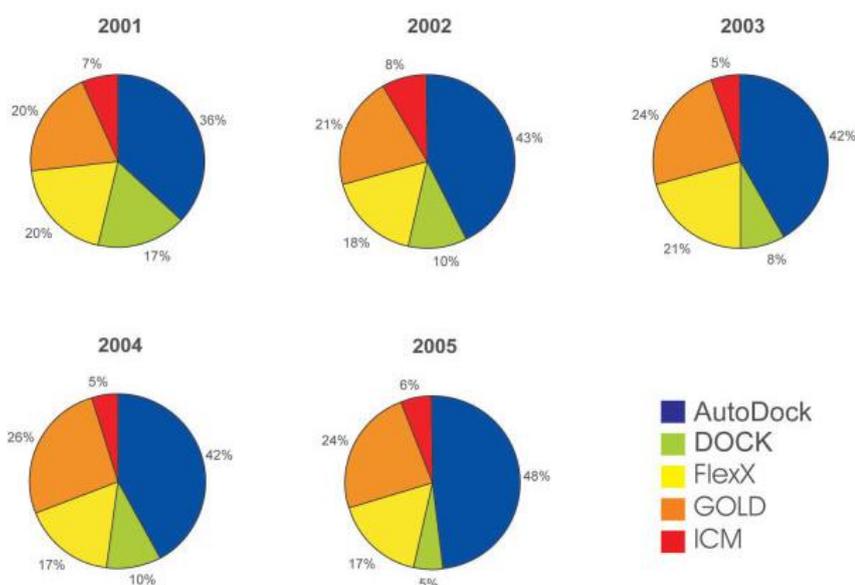


Figura 5: **Frequência de utilização dos programas de docking.** Análise dos cinco programas mais comuns através do ISI Web of Science (Adaptado de Sousa e colaboradores, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a interação entre o CYP19A1 e o ácido valpróico, buscando elucidar o mecanismo molecular de inibição da enzima.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Obter a melhor conformação do VPA no sítio catalítico da aromatase através da técnica de docking;
2. Avaliar os principais resíduos de interação com o ligante afim de caracterizar o sítio catalítico.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Dados estruturais da Aromatase

A estrutura proteica utilizada neste estudo foi obtida através dos dados cristalográficos da aromatase placentária humana - citocromo P450 (CYP19A1) - complexada com o precursor androstenediona. Os dados cristalográficos (PDB ID: 3S79) foram obtidos por Ghosh e colaboradores através de difração de raios X em um grau de resolução de 2,75 Å (Ghosh *et al.*, 2012).

#### 3.2 Estrutura molecular do VPA

A estrutura molecular do VPA foi desenhado com o auxílio do programa Marvin Sketch versão 5.4.1.0 (Marvin Beans Suite – ChemAxon) e seu estado de protonação no pH 7,2 definido com a ferramenta “Protonation -> pKa” do mesmo programa. Afim de obter-se a melhor conformação para usá-la como semente na metodologia de docking, a estrutura molecular do VPA foi submetida a procedimentos de minimização energética, como segue:

- (i) Otimização geométrica clássica utilizando o código FORCITE do pacote Materials Studio – Accelrys parametrizado com o campo de força Universal. Os parâmetros de tolerância de convergência utilizados foram  $2,0 \times 10^{-5}$  kcal/mol (energia total de variação),  $0,001 \text{ kcal/mol.Å}^{-1}$  (força máxima por átomo) e  $1,0 \times 10^{-5}$  Å (deslocamento atômico máximo).
- (ii) Utilizando a estrutura gerada no passo anterior foi realizado uma busca conformacional através do método de *annealing* com variação de temperatura entre 300 kelvin e 500 kelvin ao longo de 100 ciclos. Ao final de cada ciclo a conformação resultante sofreu um processo de minimização energética novamente através do uso do campo de força Universal nas

especificações citadas anteriormente. Os resultados foram organizados em ordem decrescente de energia potencial total e a conformação de menor energia foi escolhida para prosseguir o experimento.

- (iii) A conformação de menor energia selecionada no passo anterior foi submetida a um refinamento conformacional através do método quântico DFT implementado no código DMOL3 (Delley, 1990; 2000) do pacote Materials Studio – Accelrys. O nível de teoria utilizado foi o “Generalized Gradient Approximation” (GGA, em inglês) com o funcional de correlação Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE, em inglês) (Perdew, Burke e Ernzerhof, 1996).

### 3.3 Docking

O docking molecular foi realizado utilizando o programa Autodock versão 4.2 (Morris, 1998; Huey *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2009) para a seleção da melhor conformação do VPA ao sítio catalítico da enzima. A estrutura cristalográfica da CYP19A1 humana (PDB ID 3S79) utilizada para análise foi elucidada por Gosh e colaboradores (2012), a 2,75 Å de resolução (Ghosh *et al.*, 2012). Os parâmetros de docking foram ajustados para melhor representar as interações relevantes no sítio catalítico, afim de garantir maior acurácia ao procedimento. Para este fim, foi realizado o redocking.

Foram realizados 10 procedimentos de docking consecutivos, sendo que cada um utilizou uma semente independente (início do processo de busca conformacional) e gerou 50 possíveis conformações. Ao total foram obtidas 500 poses, as quais foram agrupadas em clusters com critério de 1,5 Å e ordenados de acordo com a energia de ligação calculada pelo Autodock 4.2 durante o procedimento.

### **3.4 Otimização Clássica do resultado do docking**

Dentre os resultados obtidos no docking, foi selecionada a conformação mais representativa do cluster de menor energia e também mais populoso. Esta conformação foi então adicionada ao arquivo contendo os dados d estrutura da aromatase (livre do ligante cristalográfico) e foram adicionados átomos de hidrogênio ao sistema afim de submetê-lo a um processo de minimização energética clássica para a obtenção de um estado energético mais favorável a interação com o receptor. A otimização energética foi realizada em duas etapas. Na primeira, somente os átomos de hidrogênio de todo o sistema (aromatase e VPA) tiveram suas posições ajustadas. Na segunda etapa, a molécula de VPA e todos os átomos de hidrogênio da aromatase ficaram livres para o ajuste de suas posições atômicas. Para a otimização geométrica clássica foi utilizado o código FORCITE do pacote Materials Studio – Accelrys parametrizado com o campo de força Universal. Os parâmetros de tolerância de convergência utilizados foram  $2,0 \times 10^{-5}$  kcal/mol (energia total de variação), 0,001 kcal/mol  $\text{\AA}^{-1}$  (força máxima por átomo) e  $1,0 \times 10^{-5}$   $\text{\AA}$  (deslocamento atômico máximo).

### **3.5 Obtenção das imagens**

Imagens do complexo cristalográfico (3S79) e dos complexos gerados por ancoramento molecular foram obtidas com o programa PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estrutura molecular do VPA

Para melhor mimetizar o comportamento molecular em condições fisiológicas, o estado de protonação da molécula de VPA foi avaliada. Conforme a Figura 6, os resultados obtidos mostram que cerca de 99,13% – 99,45% (pH 7,2 – 7,4, respectivamente) das moléculas de VPA encontra-se no estado desprotonado em condições fisiológicas. A representação molecular do VPA em condições fisiológicas pode ser visualizada na Figura 7.

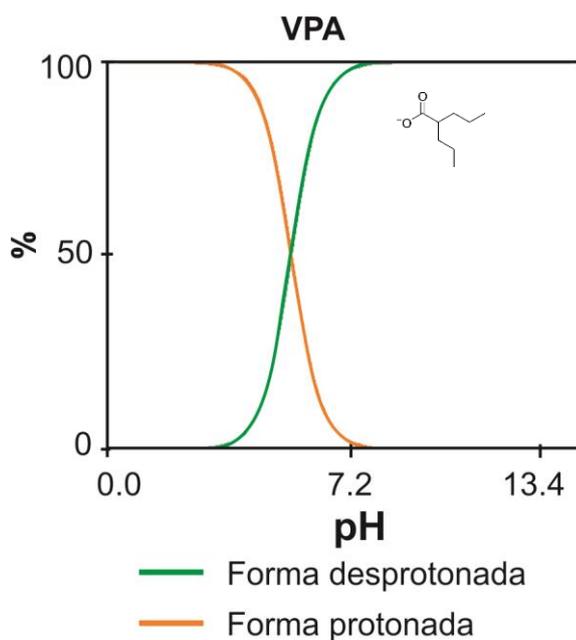


Figura 6: **Proporção do estado de protonação.** Variação do estado de protonação, conforme o pH do meio.

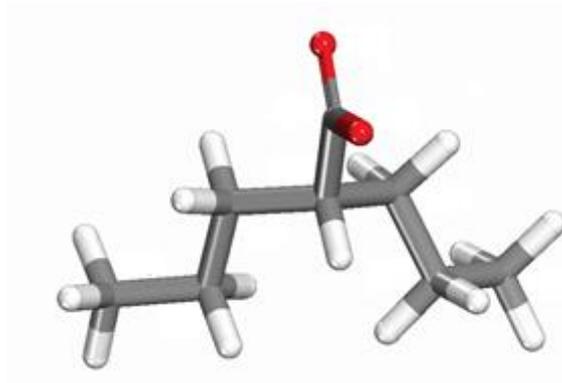


Figura 7: Estado de protonação do VPA em condições fisiológicas.

## 4.2 Redocking

O redocking do ligante cristalográfico (androstenediona) foi realizado, mantendo a estrutura flexível e a proteína rígida, e mostrou resultados satisfatórios (Figura 8), confirmado pelo valor de *Root Mean Square Deviation* (RMSD) obtido: 0,72 Å. Segundo Brooijmans e colaboradores, resultados inferiores a 2,0 Å representam boa acurácia para sistemas envolvendo o docking de pequenos ligantes em proteínas (Brooijmans e Kuntz, 2003), o que indica que neste estudo a utilização do software Autodock versão 4.2 é capaz de propor um modelo de interação confiável.

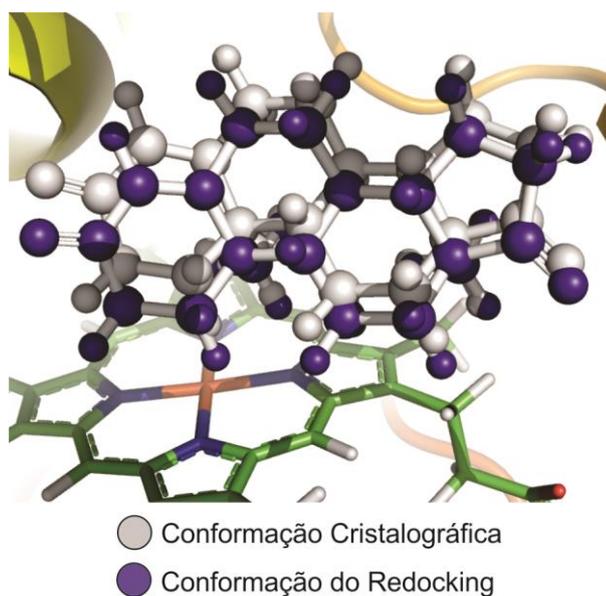


Figura 8. **Redocking.** Redocking da androstenediona.

### 4.3 Docking VPA/ CYP19A1

Afim de garantir a reprodutibilidade dos resultados, foram realizados 10 procedimentos de docking, sendo que ao total foram geradas 500 conformações. Estas conformações foram agrupadas em clusters (Figura 9) conforme a energia de interação definida durante o docking e separadas por um critério de RMSD de 1,5 Å. Das 500 conformações analisadas, 257 pertenciam ao cluster de menor energia (~ -5,23 kcal/mol) e 140 poses ao segundo cluster. A diferença energética observada entre as conformações destes dois clusters é de aproximadamente 0,02 kcal/mol e estruturalmente não representaram diferenças após a otimização clássica dos resultados. Desta forma, foi escolhida para análise a conformação representativa do maior cluster, com energia de -5,23 kcal/mol e *ki* calculado de 146,3 µM.

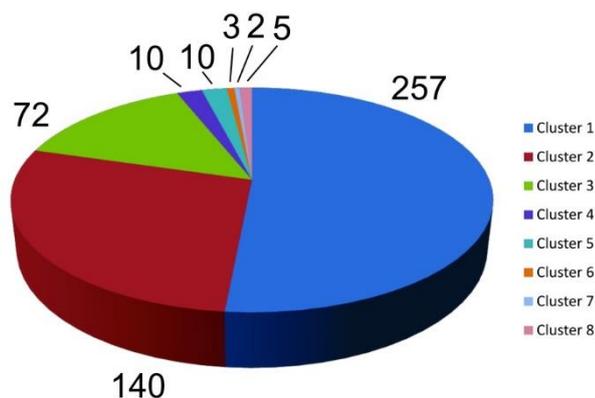


Figura 9. **Cluster.** Distribuição das conformações resultantes do docking, agrupadas por critério de menor energia.

Afim de buscar a interação mais adequada entre os resíduos de aminoácido do sítio catalítico da aromatase e o VPA, foi realizado um procedimento de minimização energética. Tal procedimento permitiu que os átomos de hidrogênio de toda a estrutura, bem como toda a molécula de VPA tivessem suas posições otimizadas. A importância da otimização dos hidrogênios se deve ao fato de que estes não estão presentes nos dados cristalográficos e foram, portanto, inseridos manualmente no sistema. Também, a otimização completa da molécula de VPA através de passos de minimização energética permitiu que um nível energético mais baixo fosse atingido, o

que indica uma conformação mais estável, bem como uma rede de interações intra e intermoleculares com maior acurácia. O resultado do docking e da conformação após a otimização clássica são representados na Figura 10.

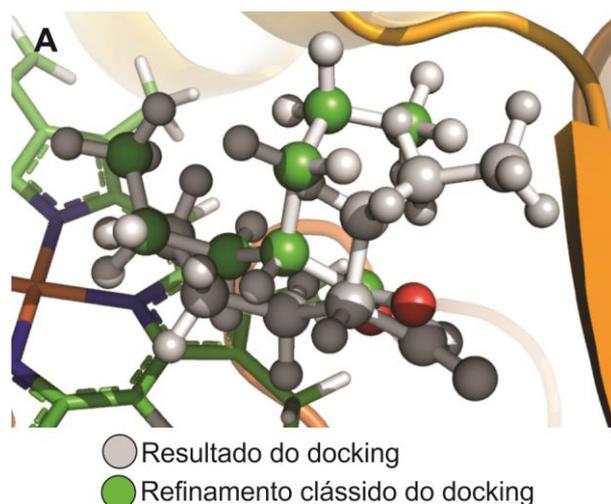


Figura 10. **Complexo VPA e CYP19A1.** Conformações resultantes do docking (cinza) e após a otimização clássica.

Conforme é observado, o deslocamento da molécula de VPA, no sítio da aromatase, representou um RMSD de 1,7558 Å. Tal deslocamento é levemente superior ao critério para a os limites entre clusters (1,5 Å), indicando que esta técnica proporcionou um refinamento da conformação analisada mantendo os critérios de escolha de cluster. Além do mais, a nova conformação obtida após a otimização clássica permitiu uma significativa melhora entre as interações moleculares, como pode ser observado pelo aumento da energia de ligação representado na Tabela 1.

Tabela 1: Energia de ligação do VPA na aromatase antes e após a minimização energética clássica.

	<b>E<sub>lig</sub> (Kcal/mol)</b>	<b>RMSD</b>
Conformação do docking	-1,37	0
Otimização clássica do docking	-34,00	1,7558

Energias de ligação para ambas as estruturas foram calculadas pelo código FORCITE, campo de força Universal (veja detalhes em materiais e métodos).

O cristal da enzima complexada ao substrato nos fornece uma ideia sobre as interações mais importantes entre ligante e resíduos do sítio catalítico, as quais podem estar relacionadas no processo de inibição enzimática. No complexo obtido, a estrutura esteroide (Figura 11) é envolta por resíduos hidrofóbicos e por resíduos dadores de prótons para os oxigênios posicionados em C3 e C17. A região molecular da estrutura do andrógeno correspondente a posição em C4 e C6, apresenta-se exposta ao canal de acesso ao sítio catalítico. A aromatização do anel ocorre através da interação (do tipo ligação de hidrogênio) da cetona em C3 com o resíduo de Asp309 (resíduo ácido). Os resíduos de Arg115 e Met374, apresentam interação com o oxigênio em C19, sugerindo unicamente que esses resíduos atuam como uma espécie de âncora para estrutura da androstenediona. Esta interação impossibilita o deslocamento espacial do precursor andrógeno no sítio catalítico. Sendo assim, os principais resíduos envolvidos na aromatização de andrógenos incluem, essencialmente, de Arg115, Met374 e Asp309.

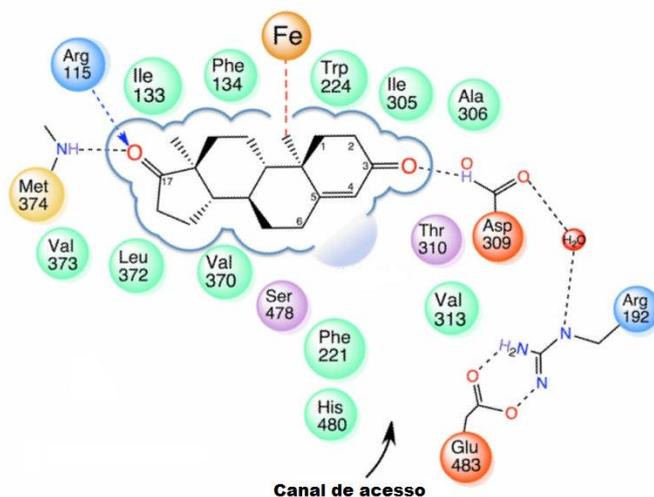


Figura 11. **Resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da CYP19A1 envolvidos na interação com a androstenediona.** Em verde, resíduos de caráter hidrofóbico, amarelo contendo enxofre; magenta, ácido; azul, básico; lilás, polar (adaptado de Gosh, 2009).

A análise das interações no sítio catalítico indicam a proximidade do VPA com os resíduos de Arg115, Val370 e Trp224, conforme Figura 12. De acordo com a literatura, os resíduos essenciais para a inibição da aromatase por IA são Arg115, Met374 e Asp309 (Suvannang *et al.*, 2011). A proximidade do VPA a região contendo

a Arg115, sugere que ocorre uma interação entre a hidroxila do VPA e o resíduo de Arg115 (resíduo básico).

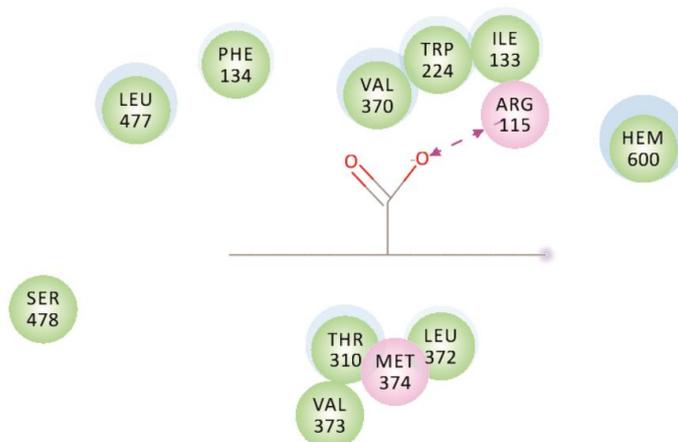


Figura 12: **Resíduos de contato com o VPA no sítio catalítico da Aromatase.** Em verde, resíduos básicos; em magenta, resíduos polares.

Através dos resultados apresentados neste trabalho, é possível inferir no mecanismo de inibição da CYP450 pelo VPA, que justifique a alteração do nível sérico de testosterona em pacientes com autismo expostos a esse fármaco durante o período gestacional. Ainda que alguns estudos demonstrem que fármacos anticonvulsivantes são potentes inibidores do citocromo P450, o mecanismo de ação desses sobre a isoenzima CYP19A1 ainda não está bem estabelecido. A aplicação de ferramentas de bioinformática tem possibilitado uma melhor elucidação e previsão dos mecanismos bioquímicos. A modelagem molecular é considerada uma estratégia promissora no planejamento de novos fármacos, na previsão de possíveis eventos adversos e na compreensão de mecanismos de ação dos mesmos. O método de mecânica clássica aplicado neste trabalho, permitiu a aquisição de resultados estruturais de forma rápida, detalhada e coerente com os mecanismos de inibição da aromatase por outros fármacos descritos na literatura.

Utilizando-se do método quântico DFT foi possível realizar a análise da contribuição individual de alguns resíduos do sítio catalítico para a ligação do VPA. A Arg115 é considerada um dos principais resíduos envolvidos na aromatização da androstenediona (Ghosh *et al.*, 2009) e na inibição enzimática por IA (Suvannang *et al.*, 2011).

Neste estudo, a energia de interação entre a Arg115 e a androstenediona foi de

-10,00 kcal/mol, enquanto que, a energia de interação do mesmo resíduo e o VPA foi de -75,30 kcal/mol (Figura 13). A interação observada para o resíduo Met374 com a androstenediona foi de -12,50 kcal/mol e com o VPA foi -10,60 kcal/mol.

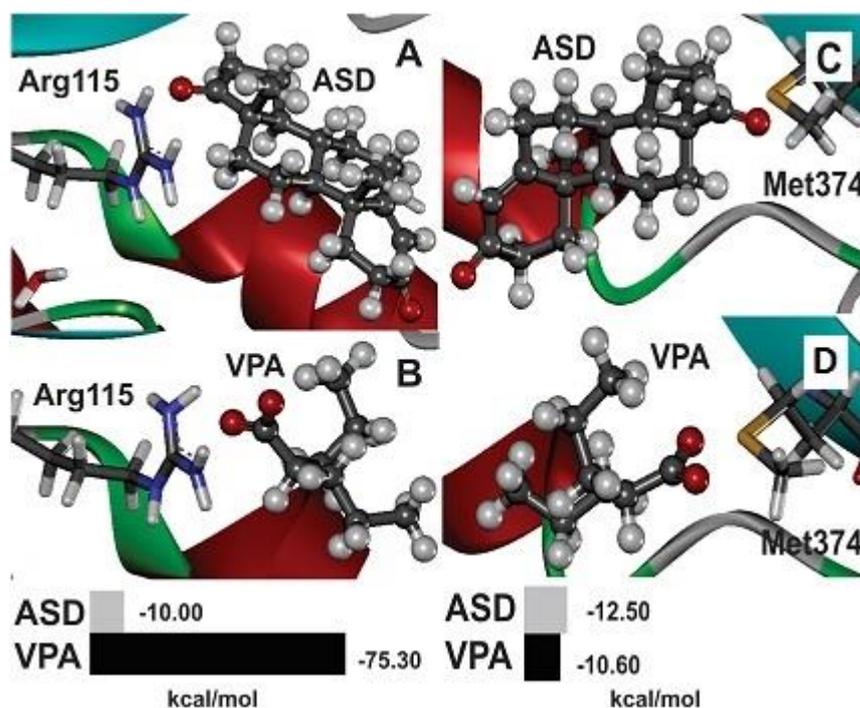


Figura 13. **Energias de interação.** Comparativo entre as energias de interação entre o resíduo de Arg115 e ASD (A) e, também com o VPA (B) e comparativo de energias envolvendo o resíduo de Met374 com ASD (C) e com VPA (D).

Observa-se que a Arg115 teve um papel crucial na interação local com o grupamento carboxila do VPA, o qual encontra-se desprotonado e com carga parcial negativa, conforme observado na Figura 14.

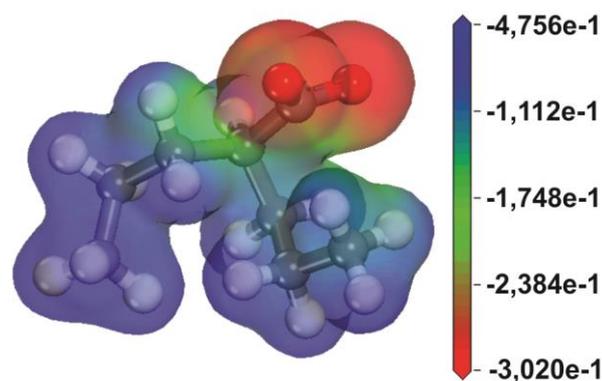


Figura 14: **Molécula de VPA com representação da densidade eletrônica.** Regiões em vermelho representam carga negativa e regiões em azul, positiva (menor densidade de elétrons).

O complexo obtido pelo docking mostra que ocorre um impedimento estérico no canal que dá acesso ao sítio catalítico, impossibilitando que o ligante natural tenha acesso. Em comparação a outros IAs aplicados no tratamento de canceres, o ácido valpróico apresenta-se como uma estrutura rígida e pequena, fatores que contribuem para uma melhor performance para atingir o sítio ativo da enzima. Moléculas maiores, como o ligante natural, demonstram maior dificuldade em alcançar o sítio, logo, proporcionando ao VPA um melhor desempenho frente a androstenediona. Conforme observado na Figura 15, a distribuição de cargas no sítio catalítico favorece a forte interação entre o grupamento carboxila do VPA (a região em vermelho ao redor do grupo funcional representa alta densidade eletrônica) e o resíduo de aminoácido Arg115, com baixa densidade eletrônica. Tal distribuição de cargas forma uma região com polos de parciais de carga positiva e negativa, favorecendo uma forte interação atrativa.

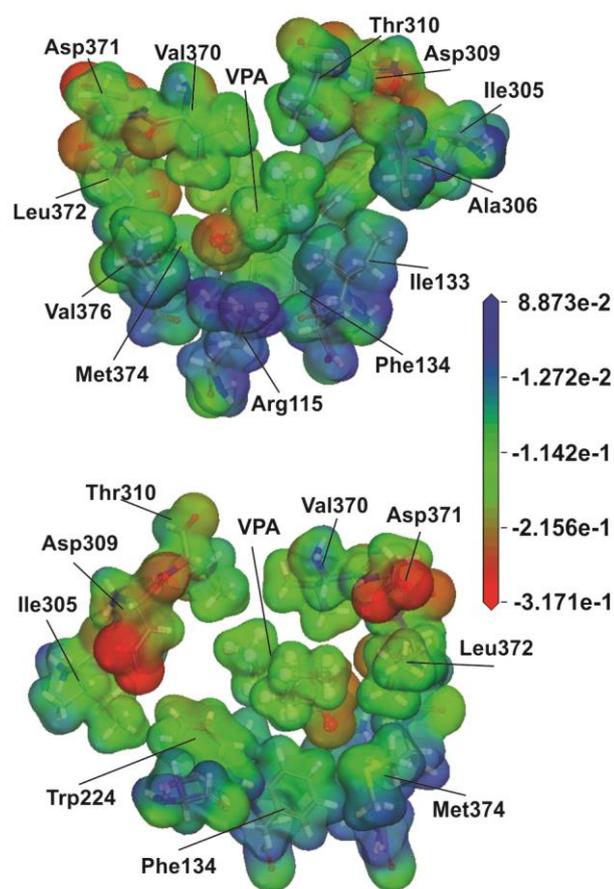


Figura 15. **Densidade eletrônica.** Densidade eletrônica observada pelo complexo formado pelo VPA no sítio catalítico da aromatase.

O ambiente proporcionado ao feto, com a administração do VPA, interfere na modificação hormonal regular da mãe e, por consequência, do feto. Essa ocorrência pode estar diretamente relacionada aos episódios de mal formação congênita, modificações de rotas metabólicas seguidos de alterações nos padrões comportamentais. Diversos estudos apresentam que o diagnóstico de autismo possui uma estreita relação a administração de VPA durante a gestação (Moore, 2000; Williams *et al.*, 2001; Rasalam *et al.*, 2005; Viinikainen *et al.*, 2006).

Além dos estudos farmacológicos, estudos genéticos contribuem para que a hipótese de que hormônios androgênicos possam estar sendo fatores diretamente ligados a etiologia do autismo, além de outras desordens metabólicas e psiquiátricas. O estudo apresentado em 2011 por Sarachana e colaboradores apresentou o gene RORA (Retinoic acid-related orphan receptor-alpha) como um potencial gene

candidato para o Autismo. Neste estudo, foi demonstrado que a expressão de RORA, um fator de transcrição, pode ser regulada por hormônios sexuais e que um dos principais alvos de transcrição é a CYP19A1 (Sarachana *et al.*, 2011). Ou seja, RORA é regulada negativamente pelo aumento nos níveis de testosterona e, assim, por consequência, reduz a atividade da aromatase (Sarachana *et al.*, 2011), conforme representado na Figura 16. Sendo assim, o uso do IA durante a gestação pode estar gerando o ambiente rico em androgênios para o feto. O aumento na concentração de testosterona, ocasiona um feed-back negativo sobre RORA e que, conseqüentemente, reduz a atividade da aromatase fetal.

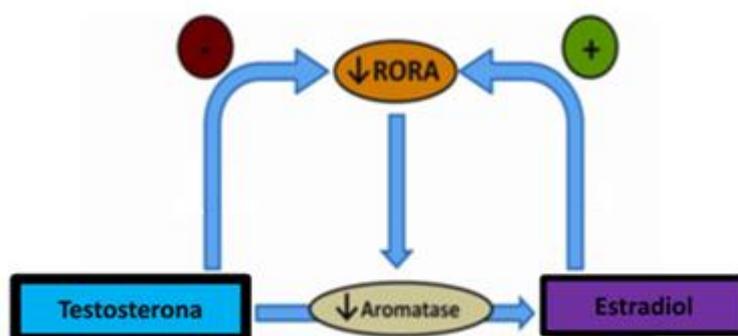


Figura 16. **Regulação de RORA.** O esquema ilustra o mecanismo pelo qual a redução observada em RORA no cérebro autista pode levar ao aumento dos níveis de testosterona através de um feedback negativo da aromatase (adaptado de Sarachana e colaboradores, 2011).

Os resultados apresentados nesse estudo sugerem que os níveis séricos elevados de testosterona podem ter como fundamento a inibição da CYP19A1 através do uso do ácido valpróico, cujo efeito é potencializado pela ação da testosterona sobre o gene RORA. O mecanismo de ação explicado através de metodologia de bioinformática contribui de maneira significativa nos avanços dos estudos sobre a etologia do autismo.

## 5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado o docking do VPA no sítio catalítico da aromatase citocromo P450. Os resultados indicam que o mecanismo de inibição proporcionado pelo VPA ocorre através da interação deste com a porção do sítio formada pelos resíduos Arg115, Ile133 e Met 374. Dentre estes, destaca-se a importância da interação com os resíduos Arg115 e Met347. A análise da Arg115 demonstrou que esta interage atrativamente com o VPA através de uma energia de -75,30 kcal/mol. Tal interação é suficiente para evitar o deslocamento imediato do VPA e a ligação da androstenediona, a qual apresenta energia de interação com a Arg115 de -10,00 kcal/mol. Por sua vez, a conformação espacial adotada pelo VPA ocupa uma importante região do cristal, responsável pelo ancoramento da androstenediona. Nesta posição, o VPA causa um impedimento estérico no sítio catalítico, desfavorecendo a interação do ligante endógeno androstenediona.

Desta forma, conclui-se que a inibição da aromatase pelo VPA ocorre devido ao impedimento estérico reforçado pela forte interação deste com o resíduo Arg115 o qual, apesar de não participar diretamente da aromatização, é fundamental para acomodar a androstenediona no sítio. Os dados aqui apresentados são de grande importância não somente para o entendimento do mecanismo de inibição responsável pelo aumento dos níveis séricos de testosterona em pacientes autistas, mas também auxiliam na elucidação estrutural dos fatores chaves na pesquisa e desenvolvimento de novos e promissores inibidores seletivos desta enzima, baseados no bloqueio parcial do sítio catalítico, para o tratamento de câncer. Além disso, a maneira como ocorre a interação do VPA com a CYP19A1, e as consequências geradas indicam que este estudo apresenta uma forte contribuição para a etiologia do autismo.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAMS, B. S.; GESCHWIND, D. H. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 5, p. 341-55, May 2008. ISSN 1471-0064 (Electronic)  
1471-0056 (Linking).

AUYEUNG, B. et al. Fetal testosterone predicts sexually differentiated childhood behavior in girls and in boys. **Psychol Sci**, v. 20, n. 2, p. 144-8, Feb 2009. ISSN 1467-9280 (Electronic)  
0956-7976 (Linking).

AUYEUNG, B. et al. Foetal testosterone and autistic traits in 18 to 24-month-old children. **Mol Autism**, v. 1, n. 1, p. 11, 2010. ISSN 2040-2392 (Electronic).

BAIRD, G. et al. Prevalence of disorders of the autism spectrum in a population cohort of children in South Thames: the Special Needs and Autism Project (SNAP). **The Lancet**, v. 368, n. 9531, p. 210-215, 2006. ISSN 01406736.

BAMBINI-JUNIOR, V. et al. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters. **Brain Res**, v. 1408, p. 8-16, Aug 23 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic)  
0006-8993 (Linking).

BELMONTE, M. K. et al. Autism and abnormal development of brain connectivity. **J Neurosci**, v. 24, n. 42, p. 9228-31, Oct 20 2004. ISSN 1529-2401 (Electronic)  
0270-6474 (Linking).

BROMLEY, R. L. et al. Early cognitive development in children born to women with epilepsy: a prospective report. **Epilepsia**, v. 51, n. 10, p. 2058-65, Oct 2010. ISSN 1528-1167 (Electronic)  
0013-9580 (Linking).

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 32, p. 335-73, 2003. ISSN 1056-8700 (Print)  
1056-8700 (Linking).

CRAMER, C. J. **Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models**. 2005. ISBN 9780470091838.

DELLEY, B. An all-electron numerical method for solving the local density functional for polyatomic molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 92, n. 1, p. 508, 1990. ISSN 00219606.

\_\_\_\_\_. From molecules to solids with the DMol[sup 3] approach. **The Journal of Chemical Physics**, v. 113, n. 18, p. 7756, 2000. ISSN 00219606.

EL-KHAYAT, H. A. et al. Physical growth and endocrinal disorders during pubertal maturation in girls with epilepsy. **Epilepsia**, v. 45, n. 9, p. 1106-15, Sep 2004. ISSN 0013-9580 (Print)  
0013-9580 (Linking).

ELSABBAGH, M. et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. **Autism Res**, v. 5, n. 3, p. 160-79, Jun 2012. ISSN 1939-3806 (Electronic)  
1939-3806 (Linking).

ERIKSSON, K. et al. Children exposed to valproate in utero--population based evaluation of risks and confounding factors for long-term neurocognitive development. **Epilepsy Res**, v. 65, n. 3, p. 189-200, Jul 2005. ISSN 0920-1211 (Print)  
0920-1211 (Linking).

GADIA, C. A.; TUCHMAN, R.; ROTTA, N. T. [Autism and pervasive developmental disorders]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 80, n. 2 Suppl, p. S83-94, Apr 2004. ISSN 0021-7557 (Print)  
0021-7557 (Linking).

GHOSH, D. et al. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. **Nature**, v. 457, n. 7226, p. 219-23, Jan 8 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic)  
0028-0836 (Linking).

GHOSH, D. et al. Novel aromatase inhibitors by structure-guided design. **J Med Chem**, v. 55, n. 19, p. 8464-76, Oct 11 2012. ISSN 1520-4804 (Electronic)  
0022-2623 (Linking).

GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **J Med Chem**, v. 28, n. 7, p. 849-57, Jul 1985. ISSN 0022-2623 (Print)  
0022-2623 (Linking).

HALL, L.; KELLEY, E. The contribution of epigenetics to understanding genetic factors in autism. **Autism**, Oct 14 2013. ISSN 1461-7005 (Electronic)  
1362-3613 (Linking).

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous Electron Gas. **Physical Review**, v. 136, n. 3B, p. B864, 1964.

HUEY, R. et al. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **J Comput Chem**, v. 28, n. 6, p. 1145-52, Apr 30 2007. ISSN 0192-8651 (Print)  
0192-8651 (Linking).

JACOBSEN, N. W.; HALLING-SORENSEN, B.; BIRKVED, F. K. Inhibition of human aromatase complex (CYP19) by antiepileptic drugs. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 1, p. 146-53, Feb 2008. ISSN 0887-2333 (Print)  
0887-2333 (Linking).

JIANG, W.; GHOSH, D. Motion and flexibility in human cytochrome p450 aromatase. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32565, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 11, p. 935-49, Nov 2004. ISSN 1474-1776 (Print) 1474-1776 (Linking).

KNICKMEYER, R. et al. Foetal testosterone, social relationships, and restricted interests in children. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 46, n. 2, p. 198-210, Feb 2005. ISSN 0021-9630 (Print) 0021-9630 (Linking).

KOGAN, M. D. et al. Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. **Pediatrics**, v. 124, n. 5, p. 1395-403, Nov 2009. ISSN 1098-4275 (Electronic) 0031-4005 (Linking).

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. **Physical Review**, v. 140, n. 4A, p. A1133, 1965.

KREPULA, K. et al. Psychiatric disorders related to polycystic ovary syndrome. **Endokrynol Pol**, v. 63, n. 6, p. 488-91, 2012. ISSN 0423-104X (Print) 0423-104X (Linking).

KUNTZ, I. D. Structure-based strategies for drug design and discovery. **Science**, v. 257, n. 5073, p. 1078-82, Aug 21 1992. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking).

MAGALHÃES, C. S., BARBOSA, H. J. C., DARDANNE, L. E. Métodos de docking receptor-ligante para o desenho racional de compostos bioativos. In: MARINHO, J. R. (Ed.). **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007. cap. 14, p.489-531.

MAJEWSKA, M. D. et al. Marked elevation of adrenal steroids, especially androgens, in saliva of prepubertal autistic children. **Eur Child Adolesc Psychiatry**, Sep 17 2013. ISSN 1435-165X (Electronic) 1018-8827 (Linking).

MOORE, S. J., TURNPENNY, P., QUINN, A., GLOVER, S. LLOYD, D. J. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, n. 7, p. 489-497, 2000. ISSN 14686244.

MORRIS, G. M., GOODSELL, D. S., HALLIDAY, R. S., HUEY, R., HART, W. E. , BELEW, R. K., OLSON, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with

selective receptor flexibility. **J Comput Chem**, v. 30, n. 16, p. 2785-91, Dec 2009. ISSN 1096-987X (Electronic)  
0192-8651 (Linking).

MORROW, J. et al. Malformation risks of antiepileptic drugs in pregnancy: a prospective study from the UK Epilepsy and Pregnancy Register. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 77, n. 2, p. 193-8, Feb 2006. ISSN 0022-3050 (Print)  
0022-3050 (Linking).

ORNOY, A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? **Reprod Toxicol**, v. 28, n. 1, p. 1-10, Jul 2009. ISSN 1873-1708 (Electronic)  
0890-6238 (Linking).

PATRICK, G. L. **An Introduction to medicinal chemistry**. 4a. Oxford: 2009. 752  
ISBN 9780199234479.

PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. **Physical Review Letters**, v. 77, n. 18, p. 3865-3868, 1996.

PEROLA, E.; WALTERS, W. P.; CHARIFSON, P. S. A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. **Proteins**, v. 56, n. 2, p. 235-49, Aug 1 2004. ISSN 1097-0134 (Electronic)  
0887-3585 (Linking).

RAHA, K., PETERS, M. B., WANG, B., YU, N., WOLLACOTT, A. M., WESTERHOFF, L. M., AND MERZ, K. M., JR. The role of quantum mechanics in structure-based drug design. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 725-731, 2007.

RASALAM, A. D. et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. **Dev Med Child Neurol**, v. 47, n. 8, p. 551-5, Aug 2005. ISSN 0012-1622 (Print)  
0012-1622 (Linking).

RONCAGLIONI, A.; BENFENATI, E. In silico-aided prediction of biological properties of chemicals: oestrogen receptor-mediated effects. **Chem Soc Rev**, v. 37, n. 3, p. 441-50, Mar 2008. ISSN 0306-0012 (Print)  
0306-0012 (Linking).

SARACHANA, T. et al. Sex hormones in autism: androgens and estrogens differentially and reciprocally regulate RORA, a novel candidate gene for autism. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17116, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)  
1932-6203 (Linking).

SOUSA, S. F.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Protein-ligand docking: current status and future challenges. **Proteins**, v. 65, n. 1, p. 15-26, Oct 1 2006. ISSN 1097-0134 (Electronic)  
0887-3585 (Linking).

SUVANNANG, N. et al. Molecular Docking of Aromatase Inhibitors. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 3597-3617, 2011. ISSN 1420-3049.

TOSTES, J. G. R. Estrutura molecular: o conceito fundamental da química. **Química Nova**, v. 7, 1998.

TUCHMAN, R.; RAPIN, I. Epilepsy in autism. **The Lancet Neurology**, v. 1, n. 6, p. 352-358, 2002. ISSN 14744422.

VIINIKAINEN, K. et al. The effects of valproate exposure in utero on behavior and the need for educational support in school-aged children. **Epilepsy Behav**, v. 9, n. 4, p. 636-40, Dec 2006. ISSN 1525-5050 (Print)  
1525-5050 (Linking).

WILLIAMS, G. et al. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. **Dev Med Child Neurol**, v. 43, n. 3, p. 202-6, Mar 2001. ISSN 0012-1622 (Print)  
0012-1622 (Linking).