



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

INSTITUTO DO CÉREBRO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

***Caracterização comportamental e distribuição de neurônios  
inibitórios em um modelo animal de autismo induzido por ácido  
valpróico***

ALUNA: JULIANA ALVES BRANDÃO M. SOUSA

ORIENTADOR: RODRIGO NEVES ROMCY-PEREIRA

NATAL – RN

2013

JULIANA ALVES BRANDÃO M. SOUSA

***Caracterização comportamental e distribuição de  
neurônios inibitórios em um modelo animal de autismo  
induzido por ácido valpróico***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

ORIENTADOR: Dr. Rodrigo Neves Romcy-Pereira

NATAL – RN

2013

JULIANA ALVES BRANDÃO M. SOUSA

***Caracterização comportamental e distribuição de neurônios  
inibitórios em um modelo animal de autismo induzido por ácido  
valpróico***

Apresentada em 23 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA



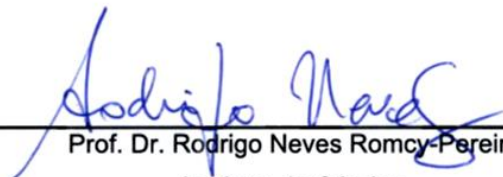
---

Profa. Dra. Carmem Juracy Silveira Gottfried  
Departamento de Bioquímica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



---

Prof. Dr. Marcos Romualdo Costa  
Instituto do Cérebro  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte



---

Prof. Dr. Rodrigo Neves Romcy-Pereira  
Instituto do Cérebro  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Natal – RN

2013

Aos meus avós, Emanuel e Vitória, a minha mãe, Marília e ao meu marido, Breno. Vocês são meu maior suporte.

"A ciência nunca resolve um problema  
sem criar pelo menos outros dez"

George Bernard Shaw

## AGRADECIMENTOS

Agradecer nunca foi fácil para mim, talvez por não conseguir expressar em palavras a minha gratidão. Mas temos que tentar.

Primeiramente, agradeço a minha família, principalmente ao meu avô Emanuel, que me apoiou desde o início em seguir a carreira que escolhi para a minha vida; à minha avó Vitória, por todo o seu carinho e atenção em todos os momentos e à minha mãe Marília, por me proteger através de suas orações. Essa vitória também é de vocês;

Ao meu marido Breno, pelo amor, companheirismo e paciência durante esses quase 12 anos juntos. Sem você ao meu lado tudo teria sido muito mais difícil;

Ao Prof. Dr. Rodrigo Pereira, por toda a orientação e conhecimento compartilhado durante esse período e, principalmente, por ter me dado a oportunidade de ingressar em uma linha de pesquisa completamente nova para mim. Agora me apaixonei pela neurociência, e esse parece ser um caminho sem volta;

Ao Prof. Dr. Marcos Costa, por todas as colaborações tanto no desenvolvimento da pesquisa como no ambiente de trabalho, e por sempre simplificar problemas que, aos meus olhos, parecem sem solução.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Carmem Gottfried, por aceitar o convite para compor essa banca de mestrado e por ser sempre tão acessível a compartilhar informações e dúvidas sobre os nossos projetos de pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Regina Silva, pela contribuição ao trabalho durante os comitês de avaliação que aconteceram durante o mestrado.

Uma das poucas certezas que tenho na vida é que sou privilegiada, pois estar rodeada de pessoas queridas é para poucos, e eu faço parte dessa minoria. Durante a minha vida acadêmica tive o prazer de encontrar amigos que compartilharam (e ainda compartilham) os altos e baixos dessa vida inconstante que é trabalhar com pesquisa científica. Obrigada aos meus amigos do LBMG em especial a Julliane, que tanto me ensinou nos quase 3

anos de iniciação científica. O meu muito obrigado também aos meus amigos de graduação Gabriela, Hudson, Fernanda, Jannyce, Bruno, Willy e Hermany. E em especial a Hermany, por ter me incentivado a fazer uma das melhores mudanças na minha vida.

Desde o meu primeiro dia de mestrado eu posso dizer com toda a certeza que ganhei uma família chamada ICe. Uma família imensa que me acolheu e que na maior parte das vezes passa muito mais tempo comigo do que a minha própria família. Gostaria de agradecer a todo o corpo técnico do ICe, por todo o apoio, suporte e paciência comigo, principalmente durante esses últimos meses.

Obrigada a todos os integrantes do grupo de pesquisa ao qual faço parte. Carol, Léo e Pedro por me ajudarem na parte mais pesada dos experimentos, e por enfrentarem comigo toda a fase de aprendizado nesse novo mundo que é a neurociência; Ana Maria, pela paciência e pelas gargalhadas nos intervalos entre um trabalho e outro; Marina, pela ajuda no processamento dos tecidos e análises histológicas, e também pela paciência comigo; Rafa e Vitor, pelo apoio e pelas sugestões sempre bem-vindas. Vocês são um presente na minha vida.

Aos meus amigos, que me ajudam em tudo que eu precisar e que me aturam em qualquer situação. Sempre é bom saber que tem gente como eu que, da mesma forma que explode de raiva quando um experimento não dá certo, comemora na mesma intensidade e emoção quando ele funciona. O meu muito obrigado as minhas amigas queridas Jéssica, Geissy, Bruna, Kelly, Melek, Roberta, Dani e Annie por estarem ao meu lado nos momentos mais inusitados e por sempre me apoiarem e me confortarem; Robson, por toda a ajuda e por me fazer gostar um pouco mais de estatística; Bryan, Aron, Nat, Runa, Alianda, Renata, Daniel, Cami, Pavão, Hindi, Ju, Zé, Markito, Caixeta por compartilharem comigo os dias sem fim no Ice; Larissa, Andréa, Nelson, Priscila e Ivani, pela ajuda e amizade na fase inicial desse mestrado; Arthur e Vitor, que mesmo longe, sempre dão um jeitinho de dar um grito; Anderson, Freitag, Renzo e Many, a turma que mais me orgulho de ter feito parte. Vocês são o melhor presente que esse mestrado me deu.

## RESUMO

O autismo compreende um grupo heterogêneo de distúrbios do neurodesenvolvimento que afetam a maturação cerebral e produzem déficits sensoriais, motores, de linguagem e de interação social no início da infância. Diversos estudos têm demonstrado um importante envolvimento de fatores genéticos que levam à predisposição ao autismo, que são possivelmente afetados por modulações ambientais durante a vida embrionária e pós-natal. Estudos recentes em modelos animais indicam que alterações no controle epigenético durante o desenvolvimento podem gerar distúrbios na maturação neuronal e produzir um circuito hiper-excitável, resultando em sintomas típicos do autismo. No modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico (VPA) durante a gestação de ratas, foram observadas alterações comportamentais, eletrofisiológicas e celulares semelhantes às observadas nos pacientes com autismo. Entretanto, ainda são poucos os estudos que correlacionam alterações comportamentais com a suposta hiper-excitabilidade neuronal desse modelo. O objetivo desse estudo foi de gerar o modelo animal de autismo por exposição pré-natal ao VPA e avaliar o desenvolvimento e comportamento pós-natal e pré-púbere (PND 30). Além disso, quantificamos a distribuição neuronal de interneurônios parvalbumina-positivos no córtex pré-frontal medial (CPFm) e de células de Purkinje no cerebelo de animais VPA. Nossos resultados mostraram que o tratamento com VPA induziu alterações no desenvolvimento, que foram observadas em alterações comportamentais quando comparadas com os animais controle. Animais VPA mostraram claras alterações comportamentais, como hiperlocomoção, estereotipia prolongada e redução na interação social com animal não-familiar. A quantificação celular revelou uma diminuição no número de interneurônios parvalbumina-positivos no córtex cingulado anterior e no córtex pré-límbico, sugerindo um desbalanço na excitação/inibição nesse modelo animal de autismo. Também observamos que essa redução ocorreu principalmente nas camadas corticais II/III e V/VI. Não observamos modificação na densidade de células de Purkinje na região Crus I do córtex cerebelar. Em conjunto, nossos resultados fortalecem a validade de face do modelo VPA em ratos e relatam modificações específicas na circuitaria inibitória do CPFm nesse modelo de autismo. Novos estudos devem abordar correlatos eletrofisiológicos particulares com alterações celulares, de forma a esclarecer as disfunções comportamentais encontradas nesse modelo animal.

**Palavras-chave:** autismo, ácido valpróico, córtex pré-frontal, cerebelo, parvalbumina.



## ABSTRACT

Autism comprises a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders that affects the brain maturation and produces sensorial, motor, language and social interaction deficits in early childhood. Several studies have shown a major involvement of genetic factors leading to a predisposition to autism, which are possibly affected by environmental modulators during embryonic and post-natal life. Recent studies in animal models indicate that alterations in epigenetic control during development can generate neuronal maturation disturbances and produce a hyper-excitabile circuit, resulting in typical symptoms of autism. In the animal model of autism induced by valproic acid (VPA) during rat pregnancy, behavioral, electrophysiological and cellular alterations have been reported which can also be observed in patients with autism. However, only a few studies have correlated behavioral alterations with the supposed neuronal hyper-excitability in this model. The aim of this project was to generate an animal model of autism by pre-natal exposure to VPA and evaluate the early post-natal development and pre-puberal (PND30) behavior in the offspring. Furthermore, we quantified the parvalbumin-positive neuronal distribution in the medial prefrontal cortex and Purkinje cells in the cerebellum of VPA animals. Our results show that VPA treatment induced developmental alterations, which were observed in behavioral changes as compared to vehicle-treated controls. VPA animals showed clear behavioral abnormalities such as hyperlocomotion, prolonged stereotypies and reduced social interaction with an unfamiliar mate. Cellular quantification revealed a decrease in the number of parvalbumin-positive interneurons in the anterior cingulate cortex and in the prelimbic cortex of the mPFC, suggesting an excitatory/inhibitory unbalance in this animal model of autism. Moreover, we also observed that the neuronal reduction occurred mainly in the cortical layers II/III and V/VI. We did not detect any change in the density of Purkinje neurons in the Crus I region of the cerebellar cortex. Together, our results strengthens the face validity of the VPA model in rats and shed light on specific changes in the inhibitory circuitry of the prefrontal cortex in this autism model. Further studies should address the challenges to clarify particular electrophysiological correlates of the cellular alterations in order to better understand the behavioral dysfunctions.

**Key words:** autism, valproic acid, prefrontal cortex, cerebellum, parvalbumin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Modificação na expressão gênica ou exposição a fatores ambientais durante o período de neurogênese e seu efeito no desenvolvimento motor e comportamental do indivíduo com autismo.....	4
<b>Figura 2:</b> Interneurônios parvalbuminérgicos corticais. <b>A</b> , Campos de projeção axonal dos neurônios GABAérgicos que expressam parvalbumina sobre neurônios piramidais do córtex. <b>B</b> , Padrões de conectividade local dos interneurônios parvalbumina-positivos.....	7
<b>Figura 3:</b> Fases do ciclo estral e acasalamento. Presença de espermatozoides em esfregaço vaginal em uma rata VPA.....	16
<b>Figura 4:</b> <b>A</b> Esquema do aparato utilizado no teste de atividade locomotora e exploratória; <b>B</b> Animal em livre movimento durante o teste em campo aberto.....	18
<b>Figura 5:</b> Animal executando o teste de reconhecimento de objetos durante <b>A</b> fase de aquisição e <b>B</b> fase de reconhecimento.....	20
<b>Figura 6:</b> Animal durante o teste de interação social.....	22
<b>Figura 7:</b> Número médio de filhotes nascidos por rata.....	26
<b>Figura 8:</b> Número médio de filhotes machos e fêmeas nascidos por rata.....	26
<b>Figura 9:</b> Animal <b>A</b> controle com cauda normal e <b>B</b> VPA com cauda torta após a exposição à droga durante o período embrionário.....	27
<b>Figura 10:</b> Idade de abertura dos olhos em filhotes durante o período pós-natal PND12 a PND16.....	28
<b>Figura 11:</b> Acompanhamento de peso dos animais.....	28
<b>Figura 12:</b> Acompanhamento de peso dos animais <b>A</b> machos e <b>B</b> fêmeas.....	29
<b>Figura 13:</b> Distância percorrida durante o teste de atividade locomotora e exploratória.....	30
<b>Figura 14:</b> Número de <b>A</b> farejadas e <b>B</b> levantamentos realizadas pelos animais durante o teste de atividade locomotora e exploratória.....	30

<b>Figura 15:</b> Tempo das atividades exploratórias de <b>A</b> farejamento e <b>B</b> levantamento.....	31
<b>Figura 16:</b> Duração média dos episódios de auto-limpeza entre os grupos.....	32
<b>Figura 17:</b> Duração dos episódios de auto-limpeza entre <b>A</b> machos e <b>B</b> fêmeas.....	32
<b>Figura 18:</b> Frequência dos episódios de auto-limpeza.....	33
<b>Figura 19:</b> Frequência de auto-limpeza entre <b>A</b> machos e <b>B</b> fêmeas.....	33
<b>Figura 20:</b> Distância total percorrida pelos animais durante o teste de reconhecimento de objetos.....	34
<b>Figura 21:</b> Tempo de exploração dos objetos durante as fases de <b>A</b> aquisição e <b>B</b> reconhecimento.....	35
<b>Figura 22:</b> Porcentagem de exploração dos objetos durante as fases de <b>A</b> aquisição e <b>B</b> reconhecimento.....	36
<b>Figura 23:</b> Índice de discriminação dos objeto durante a fase de reconhecimento.....	36
<b>Figura 24:</b> Distância percorrida pelos animais durante o teste de interação social 1.....	37
<b>Figura 25:</b> Tempo de permanência dos animais nas zonas do aparato de interação social.....	38
<b>Figura 26:</b> Porcentagem de tempo de exploração das zonas do objeto e social.....	38
<b>Figura 27:</b> Índice de discriminação social entre as zonas de interação social e interação com o objeto durante o teste comportamental.....	39
<b>Figura 28:</b> Distância total percorrida pelos animais durante o teste de interação social 2.....	40
<b>Figura 29:</b> Tempo de permanência dos animais nas zonas do aparato de interação social.....	40
<b>Figura 30:</b> Porcentagem de tempo gasto pelos animais nas zonas do aparato de interação social.....	41
<b>Figura 31:</b> Índice de discriminação social entre as zonas de interação social e interação com o objeto durante o teste	42

comportamental.....	
<b>Figura 32:</b> Tempo de permanência dos animais nas zonas do aparato de interação social.....	43
<b>Figura 33:</b> Porcentagem de tempo gasto pelos animais nas zonas do aparato de interação social.....	44
<b>Figura 34:</b> Índice de discriminação social entre as zonas de interação social e interação com o objeto durante o teste comportamental.....	44
<b>Figura 35:</b> Representação histológica do CPFm em um animal VPA e suas respectivas camadas corticais.....	45
<b>Figura 36:</b> Neurônios positivos para parvalbumina (PARV+) no córtex pré-frontal em corte coronal de um animal controle.....	46
<b>Figura 37:</b> Densidade de células PARV+ no CPFm.....	46
<b>Figura 38:</b> Densidade de neurônios PARV+ no Cg, PL e IL.....	47
<b>Figura 39:</b> Densidade de células PARV+ no Cg.....	47
<b>Figura 40:</b> Densidade de células PARV+ no PL.....	48
<b>Figura 41:</b> Densidade de células PARV+ no IL.....	49
<b>Figura 42:</b> Representação histológica das células de Purkinje na região Crus 1 do cerebelo em um animal VPA.....	49
<b>Figura 43:</b> Densidade de células de Purkinje na região Crus 1 do cerebelo.....	50
<b>Figura 44:</b> Padronização de Imunofluorescência para BrdU (verde) no cortex de animal controle BrdU/E15 e foi perfundido em PND15.....	51
<b>Figura 45:</b> Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) no cortex motor em animal controle BrdU/E12.....	51
<b>Figura 46:</b> Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) no cortex motor em animal controle BrdU/E15.....	52
<b>Figura 47:</b> Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) no córtex motor em animal controle e VPA BrdU/E12.....	53
<b>Figura 48:</b> Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) no	

córtex motor em animal controle e VPA BrdU/E15.....	53
<b>Figura 49:</b> Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) na região PFI do hemisfério cerebelar de um animal VPA BrdU/E12. As pontas das setas indicam células de Purkinje BrdU-positivas. PFI: Parafloculo.....	54
<b>Figura S1:</b> Coloração de Nissl no córtex pré-frontal de um animal controle e um animal VPA em PND35.....	71
<b>Figura S2:</b> Coloração de Nissl no CPFm de um animal controle e um animal VPA em PND35.....	72
<b>Figura S3:</b> Coloração de Nissl no córtex cingulado anterior de um animal controle e um animal VPA em PND35.....	73
<b>Figura S4:</b> Coloração de Nissl na região pré-límbica (PL) do CPFm de um animal controle e um animal VPA em PND35.....	74

## **LISTA DE ABREVIações**

5-HT: 5-hidroxitriptofano

AP: Antero-posterior

BrdU: Bromo deoxiuridina

CA: Corno de Amon

CEUA: Comitê de Ética para Uso de Animais

Cg: Córtex Cingulado

*CNTNAP2*: Proteína Associada a Conectina Tipo-2

CPF: Córtex Pré-frontal

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DSM-IV: Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais IV

DSM-V: Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais V

EEG: Eletroencefalograma

GABA: Ácido gamaaminobutírico

GAD65: glutamato descarboxilase 65kDa

GAD67: glutamato descarboxilase 67kDa

HAC: Histona acetilase

HCl: Ácido Clorídrico

HDAC: Histona desacetilase

IL: Córtex Infralímbico

IRM: Imagem por Ressonância Magnética

NaCl: Cloreto de Sódio

NGS: Soro Normal de Cabra

NMDA: N-Metil D-Aspartato

PARV: Parvalbumina

PB: Tampão Fosfato

PBS: Tampão Fosfato Salina

PFA: Paraformaldeído

PND: Dia pós-natal

PL: Córtex pré-límbico

RNA: Ácido Ribonucleico

TEA: Transtorno do Espectro Autista

VPA: Ácido Valpróico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	AUTISMO	1
1.2	NEUROATOLOGIA	2
1.3	BASES MOLECULARES	3
1.4	CIRCUITOS NEURONAIS	5
1.5	MODELOS EXPERIMENTAIS	9
1.6	MODELO DE EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL A ÁCIDO VALPRÓICO (MODELO VPA)	10
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	14
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODO</b>	<b>15</b>
4.1	MODELO ANIMAL DE AUTISMO	15
4.2	DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL	17
4.3	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS	17
4.3.1	ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA	17
4.3.2	AUTO-LIMPEZA (ou <i>GROOMING</i> )	18
4.3.3	RECONHECIMENTO DE OBJETOS	19
4.3.4	INTERAÇÃO SOCIAL	20
4.4	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	22
4.4.1	PERFUSÃO E PREPARAÇÃO DO TECIDO	22
4.4.2	IMUNOFLOURESCÊNCIA	23
4.4.3	NISSL	24
4.4.4	CONTAGEM E DISTRIBUIÇÃO CELULAR	24
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
5.1	DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL	26
5.2	TESTES COMPORTAMENTAIS	29
5.2.1	ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA	29
5.2.2	AUTO-LIMPEZA	31
5.2.3	RECONHECIMENTO DE OBJETOS	34
5.2.4	INTERAÇÃO SOCIAL	37
5.2.4.1	INTERAÇÃO SOCIAL 1	37
5.2.4.2	INTERAÇÃO SOCIAL 2	39
5.3	QUANTIFICAÇÃO CELULAR	45
5.3.1	PARVALBUMINA	45
5.3.2	CÉLULAS DE PURKINJE	49
5.4	PROLIFERAÇÃO NEURONAL	50
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>



<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>70</b>
<b>10</b>	<b>FIGURAS SUPLEMENTARES.....</b>	<b>71</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 AUTISMO**

O autismo, inicialmente descoberto por Hans Asperger e em seguida por Leo Kanner (1943), é um transtorno psiquiátrico caracterizado por alterações comportamentais em crianças logo nos primeiros anos de vida. Entre os principais sintomas apresentados encontram-se déficit de interação social, comportamento repetitivo, hiperatividade, interesse restrito, atraso no desenvolvimento da linguagem verbal e não-verbal, além de dificuldade no processamento de informações emocionais (Kanner, 1943). Os critérios para classificação e diagnóstico do autismo vêm sendo constantemente alterados. Até o início do ano de 2013, o diagnóstico do autismo se baseava na edição IV do Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais (DSM-IV), da Sociedade Americana de Psiquiatria. Nele o autismo está incluindo dentro de uma classe de transtornos de espectro autista (TEA), juntamente com outras patologias que compartilham alguns dos traços comportamentais listados acima. São elas a Síndrome de Asperger, o transtorno desintegrativo infantil, Síndrome de Rett e TEA não-especificado . Atualmente, com o DSM-V, a classificação do autismo já foi novamente modificada, não havendo mais diagnóstico diferencial entre as patologias que faziam parte do espectro autista. Todas elas, incluindo a Síndrome de Asperger e o TEA não-especificado, são agora considerados “transtornos com autismo” e tem como um dos principais critérios o diagnóstico logo no início da infância (Association, 2013).

A melhora e a mudança nos critérios de diagnóstico, assim como o desenvolvimento de serviços especializados mostram que a prevalência dos transtornos do espectro autista vem aumentando nos últimos anos. De acordo com o DSM-IV, a prevalência de TEA na população mundial é de 1%. Já no Brasil, o único dado epidemiológico refere-se a um estudo piloto realizado na cidade de Atibaia, no estado de São Paulo, onde é encontrada uma prevalência de apenas 0,3% de TEA na população (Paula et al. 2011). Meninos são mais

afetados pela doença, sendo a prevalência mundial de 3 a 4 indivíduos do sexo masculino para 1 do sexo feminino (Garcia-Penãs, 2009).

## **1.2 NEUROPATOLOGIA**

Estudos anatômicos, histológicos e de imagem por ressonância magnética (IRM) revelam a existência de padrões morfológicos característicos em pacientes com autismo. Entre as principais alterações observadas estão o aumento do volume cerebral durante os primeiros anos de vida, anormalidades nos núcleos dos nervos cranianos, hipoplasia de estruturas do tronco cerebral, perda de células de Purkinje, além de alterações em estruturas do córtex frontal e do lobo temporal, principalmente na amígdala e hipocampo (Schultz 2005). Avaliações de pacientes com autismo por IRM demonstraram um aumento volumétrico da amígdala no início da infância, que se normaliza com a idade. Também foi relatada a diminuição no número de neurônios nesta estrutura (Bauman et al, 2005).

Courchesne e colaboradores observaram que o encéfalo de paciente com autismo sofre um rápido crescimento durante o período pós-natal inicial, ocorrendo uma desaceleração no crescimento de acordo com a idade. Em alguns casos, uma terceira fase pode ser observada em regiões cerebrais de pré-adolescentes, caracterizada por um processo de degeneração neuronal. Alterações em estruturas do lobo temporal, como amígdala e hipocampo também parecem estar afetadas em pacientes com autismo (Courchesne et al, 2007).

Em recente estudo, o mesmo grupo encontrou um aumento relativo no peso médio do cérebro de crianças com autismo. Também foi relatado um aumento no número global de neurônios no córtex pré-frontal (CPF) no cérebro dessas crianças, chegando a 60% de diferença entre os grupos. Esse aumento no número de neurônios também foi observado quando essa quantificação especificou as sub-regiões do CPF analisadas: 79% na sub-região dorsolateral e 29% na sub-região mesial. Não foram encontradas alterações entre os grupos quanto ao tamanho dos neurônios, assim como quanto ao número global de células gliais. Os autores sugerem que, uma vez que o processo de

neurogênese ocorre majoritariamente durante a fase embrionária, indivíduos com autismo podem estar sujeitos a sofrer alterações em mecanismos reguladores do ciclo celular e de apoptose durante este período (Courchesne et al, 2011).

Alterações no padrão de organização cortical foram relatadas em análises *post-mortem* do encéfalo de pacientes com autismo. Casanova e colaboradores observaram um padrão alterado na distribuição celular na camada III do córtex pré-frontal dorsolateral desses pacientes, sendo observado um aumento na densidade neuronal de até 23% quando comparados com a densidade celular em pacientes normais (Casanova et al, 2006).

Estudos neuropatológicos do cerebelo mostram uma redução no número de células de Purkinje em tecidos *post-mortem* de pacientes com autismo, enquanto a análise por IRM revelam a presença de um cerebelo mais volumoso nesses pacientes. Uma possível explicação para a diferença encontrada é a heterogeneidade entre os grupos estudados. No primeiro caso, grande parte das amostras foram provenientes de pacientes com algum grau de retardo mental, além de alguns também sofrerem de epilepsia. Dessa forma, o fato de fazer uso de medicamentos já poderia estar afetando a perda de células de Purkinje. Já os pacientes submetidos à IRM foram em geral indivíduos com alta funcionalidade e que tinham o quadro de epilepsia como critério de exclusão (Amaral et al, 2008).

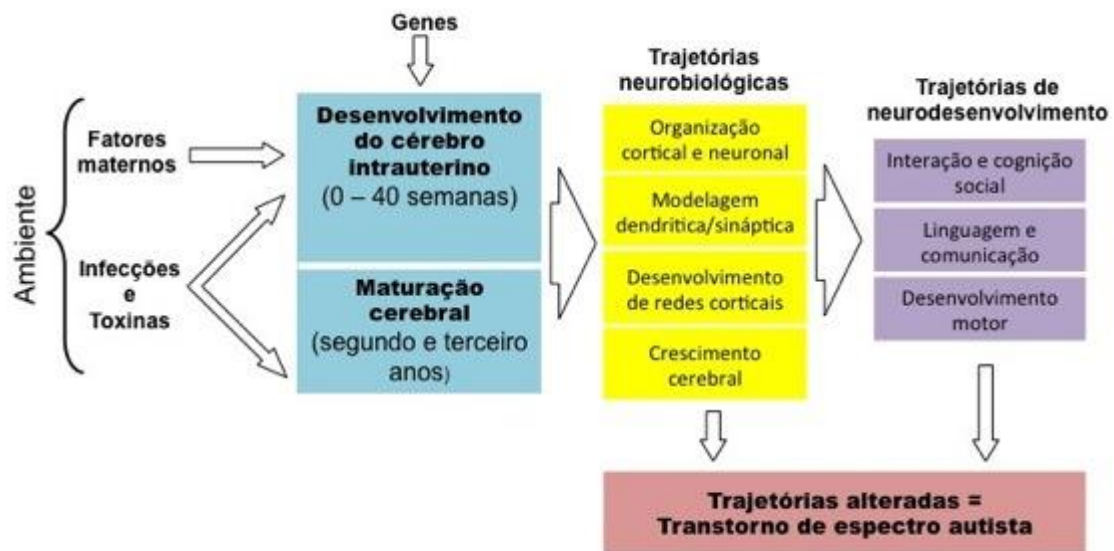
### **1.3 BASES MOLECULARES**

A classificação do autismo como um distúrbio com forte base genética fundamenta-se no fato de que a concordância entre gêmeos monozigóticos é de 60 a 90%, enquanto entre irmãos dizigóticos é de 3 a 5% (Garcia-Penãs, 2009). Até o momento já foram identificados 15 diferentes *loci* cromossômicos envolvidos com o aumento do risco de desenvolver autismo.

A predisposição ao autismo tem sido ligada a inúmeros genes, incluindo aqueles que codificam proteínas envolvidas em processos de migração neuronal, proliferação, diferenciação, adesão celular e morfogênese de espinhas dendríticas. Apesar deste importante componente genético, nenhum

gene específico foi classificado como responsável por desencadear o transtorno. Alterações epigenéticas durante o desenvolvimento também têm sido fortemente relacionadas como causa primária do autismo. Fatores ambientais, como infecção por rubéola durante a gestação, vacinação ou até mesmo a utilização de algumas drogas (talidomida, etanol e ácido valpróico), principalmente no primeiro trimestre de gestação, tem sido considerados como fatores de risco para o desenvolvimento do autismo (Arndt et al, 2005).

Dessa forma, a influência genética assim como a ambiental, principalmente no período gestacional e início da infância, devem ser consideradas ao estudar alterações na organização neuro-cortical que afetem o comportamento social e cognitivo no início da infância (Pardo et al, 2007).



Adaptado de Pardo e colaboradores (2007)

**Figura 1:** Modificação na expressão gênica ou exposição a fatores ambientais durante o período de neurogênese e maturação das redes neurais promovem alterações na organização sináptica e cortical que refletem no desenvolvimento motor e comportamental característico do indivíduo com autismo.

Modificações de proteínas que participam da morfogênese das espinhas dendríticas podem levar à alteração na dinâmica e estabilidade das mesmas, podendo conferir sintomatologia de TEA. Proteínas de adesão celular

envolvidas na estabilização da conexão entre neurônios pré e pós-sinápticos, como a neuroligina-3 e neurexina-1, também parecem estar envolvidas com o desenvolvimento de alterações neurais no autismo. Mutações nos genes codificadores das neuroliginas levam à um aumento no número de sinapses excitatórias em neurônios hipocampais, enquanto reduções de neurexina 1, seu ligante pré-sináptico, diminui a extensão dos dendritos e o número total de espinhas dendríticas no córtex (Südhof, 2008).

Durand e colaboradores demonstraram que mutações no gene *Shank3*, envolvido com a regulação da organização estrutural das espinhas dendríticas, podem desencadear desordens de comunicação social e linguagem, o que torna esse gene um forte candidato para o desenvolvimento de modelos animais de autismo. O conjunto desses dados demonstra a importância de estruturas pós-sinápticas intactas para o desenvolvimento normal de funções de linguagem, cognitivas e de interação social (Durand et al, 2007).

#### **1.4 CIRCUITOS NEURONAIS**

As propriedades de funcionamento dos microcircuitos cerebrais têm fornecido a base conceitual para hipóteses acerca das disfunções observadas no autismo. Inicialmente foi proposto que a fisiopatologia do autismo fosse reflexo da hipo-funcionalidade de diversas estruturas cerebrais, uma vez que estudos demonstraram diminuição na atividade do CPF e amígdala, as quais estão diretamente envolvidas com comportamentos de interação social, medo, funções executivas, linguagem e emoções observados em pacientes com autismo (revisado por Markram et al, 2007).

Entretanto, recentemente a teoria de que o autismo seria desencadeado por uma hiperfunção cortical vem sendo reforçada por resultados obtidos em modelos animais. Markram e colaboradores propuseram a hipótese de que o autismo é uma síndrome de hipersensibilidade ao ambiente, baseando-se na hiper-funcionalidade de regiões como o CPFm, córtex somatosensorial e amígdala, gerada por algum insulto ou disfunção genética em determinado estágio de desenvolvimento do embrião. Por exemplo, a percepção sensorial

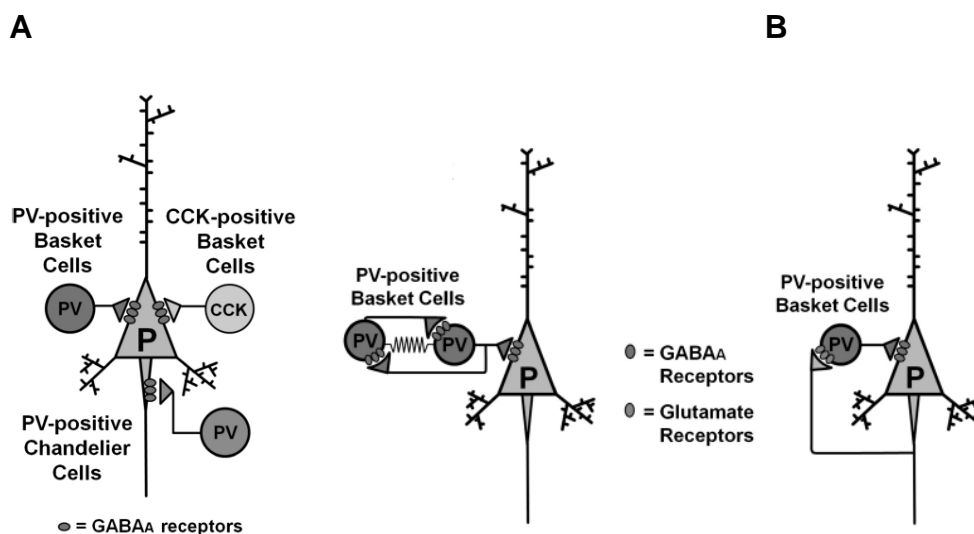
exagerada poderia ocorrer devido a uma hiper-reatividade e hiper-plasticidade de circuitos neurais do córtex sensorial primário (Markram et al, 2007).

Em experimentos realizados com modelo animal de autismo, foi observado um padrão de conectividade alterado. Neurônios piramidais da camada V do córtex somatosensorial e do CPFm apresentaram elevada conectividade com neurônios da própria vizinhança, sugerindo uma hiper-excitabilidade neuronal nestas regiões (Rinaldi et al, 2008). Desta forma, os autores propõem que as alterações observadas no autismo como déficit de interação social, atenção e comportamento repetitivo possam ser consequência desta hiper-conectividade local existente nessas regiões.

Marcação com coloração de Golgi em cérebros humanos *post-mortem* de pacientes diagnosticados com transtorno do espectro autista revelaram um aumento na densidade de espinhas nos dendritos apicais de neurônios piramidais da camada II dos lobos frontal, temporal e parietal e um aumento também na camada V apenas no lobo temporal (Hutsler et al, 2010). Esses dados apoiam a hipótese da hiper-conectividade de circuitos locais presente em indivíduos com TEA.

Os interneurônios GABAérgicos exercem um papel fundamental no equilíbrio entre as sinapses excitatórias e inibitórias, modulando a atividade neuronal das primeiras através de mecanismos de inibição lateral. Assim, a deficiência na produção ou migração de interneurônios GABAérgicos pode resultar em um córtex hiper-excitável. Estudos realizados por Fatemi e colaboradores demonstraram uma redução de cerca de 50% nos níveis proteicos de GAD65 e GAD67 nos córtices parietal e cerebelar de pacientes com autismo. Outros grupos de pesquisa também relataram uma diminuição nos níveis de glutamato descarboxilase em tecido cerebelar *post-mortem*, indicando que uma possível alteração na produção de GABA teria implicações na sintomatologia autista (Yip et al, 2007). Além disso, um grupo de genes que codificam receptores GABAérgicos parece estar alterado em pacientes com autismo, sendo encontrados em trissomia no locus 15q11-13, considerado um locus de susceptibilidade à doença (Shao et al, 2003).

Dentre os neurônios GABAérgicos envolvidos na circuitaria local, os interneurônios parvalbumina positivos (PV+) corticais - células em cesto e células em candelabro – compreendem até 40% dos neurônios GABAérgicos corticais e desempenham um papel fundamental no controle da excitabilidade e geração de padrões oscilatórios corticais (Gonchar et al, 2007; Xu et al, 2010). Uma importante característica destes neurônios é que seu campo de projeção axonal está concentrado em torno do corpo celular dos neurônios-alvo (células em cesto) ou do segmento inicial do axônio (células em candelabro), promovendo forte ação inibitória (Figura 2). Além disso, possuem a propriedade de serem células de disparo rápido com baixa taxa de habituação (“*fast-spiking non-accomodating*”). Em um estudo utilizando modelos animais de TEA os autores mostraram redução destes interneurônios no córtex somatosensorial (Gogolla et al, 2009). Outros estudos observaram que camundongos *knockout* para parvalbumina exibem traços com autismo (Gogolla, Leblanc et al. 2009).



**Figura 2:** Interneurônios parvalbuminérgicos corticais. **A**, Campos de projeção axonal dos neurônios GABAérgicos que expressam parvalbumina sobre neurônios piramidais do córtex. **B**, Padrões de conectividade local dos interneurônios parvalbumina-positivos. Adaptado de Gonzalez-Burgos e Lewis (2012).

Além da participação do GABA nos mecanismos de alteração de excitabilidade neural no TEA, outros neurotransmissores também encontram-se



alterados. Vários estudos demonstram um aumento nos níveis plasmáticos de serotonina (5-HT) em pacientes com autismo (Anderson et al, 1990). A depleção de 5-HT subsequente a redução na disponibilidade de triptofano leva a um agravamento no quadro autista, sugerindo que o aumento dos níveis plasmáticos de 5-HT podem ser uma resposta compensatória do organismo. Recentemente, modelos animais de autismo induzido por ácido valpróico (VPA) revelaram uma diminuição de 46% nos níveis de 5-HT no hipocampo de ratos adultos, fato que não foi observado no córtex ou cerebelo (Dufour-Rainfray et al, 2010). Estudos *in vitro* que fazem uso de teratógenos relacionados com o desenvolvimento do autismo também têm revelado um aumento na expressão do gene *gata-3* (transportador pré-sináptico de GABA), envolvido na regulação da diferenciação de neurônios serotoninérgicos (Rout et al, 2009).

Um fato que pode estar bastante relacionado à alteração na regulação desse balanço excitação-inibição no autismo é o fato de um grande número de estudos demonstrarem que a epilepsia é a desordem do sistema nervoso central mais comumente associada ao autismo. Estudos recentes demonstram uma alta comorbidade de epilepsia no autismo, indicando que de 5 a 40% dos pacientes com autismo podem desenvolver algum quadro epiléptico no decorrer da vida (Turk et al, 2009). Esse número pode aumentar de acordo com a maior gravidade do TEA, podendo chegar a 60%. Em geral o aparecimento de crises epiléticas se agrupa mais comumente em dois momentos: durante infância (antes dos 5 anos) e no período de adolescência (depois dos 10 anos) (Tuchman et al, 2011).

Um dos fatores importantes no desenvolvimento concomitante de autismo e epilepsia é a regressão autista, fenômeno que atinge cerca de 30% das crianças com autismo. Ele se caracteriza por um retardo da linguagem e sociabilidade durante os primeiros anos de vida e a ocorrência de padrões epileptiformes no EEG das crianças. Também tem sido observada uma elevada correlação do autismo com a ocorrência de epilepsia associada ao retardo mental. A epilepsia parece ser fator que contribui para o aumento da morbidade e mortalidade em pacientes com autismo, o que torna as pesquisas nesta área de grande importância (Tuchman et al, 2002).

## 1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS

Diversos modelos experimentais têm sido propostos para o estudo das bases neurofisiológicas do autismo: (1) os modelos baseados em animais geneticamente modificados, onde há perda de função em genes específicos como neurexina-1, neuroligina-3, reelina, *CNTNAP2* (*proteína Associada a Conectina Tipo-2*), SHANK-3, entre outros; (2) os modelos baseados em lesões de estruturas límbicas como a amígdala e o hipocampo ventral, e (3) os modelos baseados na exposição pré-natal a agentes tóxicos, como o ácido valpróico (VPA), álcool e talidomida (Klauck et al, 2006)

Entre os modelos genéticos, o camundongo knockout *CNTNAP2* tem sido utilizado no estudo do autismo. O gene que codifica a *CNTNAP2* é um dos genes de susceptibilidade ao autismo em humanos, e codifica uma proteína pertencente à família das neurexinas, envolvida nas interações entre neurônio e glia. Estes animais apresentam déficit de interação social, assim como comportamento repetitivo e hiperatividade (Penagarikano et al, 2011).

Modelos animais induzidos por lesões também apresentam sua importância no estudo do autismo. Lesões bilaterais na amígdala de primatas não-humanos têm mostrado o aparecimento de traços com autismo nestes animais, que passam a apresentar deficiências de interação social, falta de expressão facial, além de ausência de comportamento emocional, agressividade e movimentos repetitivos (Sweeten, 2002). Em experimentos com roedores, Wolterink e colaboradores mostraram que lesões do núcleo basolateral e central da amígdala induzidas no 7º dia pós-natal também foram capazes de desencadear distúrbios comportamentais nos animais semelhantes aos observados em pacientes com autismo (Wolterink et al, 2001). Uma vez que o autismo é uma patologia que afeta diferentes regiões, o modelo induzido por lesões torna o estudo mais limitado.

O modelo por exposição pré-natal a VPA em roedores apresenta validade de face, uma vez que reproduz aspectos comportamentais e histopatológicos característicos do quadro humano de autismo. Neste modelo

podemos observar alterações histológicas no tronco encefálico e cerebelo semelhantes às encontradas em tecidos *post-mortem* de pacientes com autismo (Rodier et al, 1996). Também se observa déficits em comportamentos sociais e de resposta sensorial que reproduzem sintomas com autismo (Schneider et al, 2005). Os períodos de sensibilidade à droga e os processos de má-formação durante a embriogênese, incluindo principalmente alterações no tubo neural, levaram à hipótese de que o autismo possa ser reflexo de um distúrbio durante o desenvolvimento embrionário. Atualmente, esta hipótese também inclui a exposição a agentes patogênicos (p.ex. vírus) durante a gestação. Uma vez que neste modelo o VPA é injetado na fêmea grávida durante o período de fechamento do tubo neural (E12), este fármaco pode promover alterações sistêmicas nos animais ainda durante esta fase. Desta forma, as características observadas neste modelo podem decorrer da interação entre a exposição à droga e o *background* genético dos animais.

## **1.6 MODELO DE EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL A ÁCIDO VALPRÓICO (MODELO VPA)**

O VPA é uma droga amplamente utilizada na clínica para o tratamento de epilepsia nos últimos 40 anos, se mostrando eficiente no controle de crises convulsivas em adultos e especialmente na infância. Além disso, ele também é utilizado no tratamento de migrânea e transtorno bipolar (Nalivaeva et al, 2009).

Do ponto de vista farmacológico, o VPA pertence à classe de inibidores da enzima histona desacetilase (HDAC) com ação também sobre canais iônicos e transportadores de GABA e pode atuar alterando expressão gênica através de controle epigenético. A regulação da acetilação de lisinas na porção C-terminal das moléculas de histonas presentes nos nucleossomos altera o estado de compactação e a estrutura da cromatina. O aumento da acetilação de histonas produz descompactação do DNA, aumentando o acesso da RNA polimerase II e proteínas acessórias necessárias à transcrição. O efeito é observado através do aumento da expressão de genes comumente silenciados (Göttlicher et al, 2001). Assim, o equilíbrio entre as funções das enzimas HDAC e histona acetilase (HAC), além das DNA metil-transferases, que controlam o

grau reestruturação da cromatina e o nível de transcrição de regiões cromosômicas específicas, fica comprometido. A exposição de uma droga com alto poder de regulação da expressão gênica durante o período de neurogênese pode levar então a uma modificação nos padrões de expressão de genes relacionados ao neurodesenvolvimento. A inibição das proteínas histonas desacetilases induzidas pelo VPA tem se mostrado importante na neuroproteção de cultura de neurônios corticais do VPA, aumentando a viabilidade dessas células *in vitro* (Jeong et al, 2003).

Entretanto, vários estudos recentes demonstraram que o VPA apresenta efeito teratogênico se administrado em altas doses durante um período crítico da gestação. A utilização deste fármaco durante o primeiro trimestre levou ao nascimento de muitas crianças com problemas cognitivos e com alguns tipos de má formações. Esse conjunto de sinais e sintomas ficou conhecido como Síndrome do Valproato Fetal (Ardinger, 1988). Porém, em estudo preliminar, Christianson e colaboradores observaram que algumas dessas crianças apresentavam diagnóstico para o autismo (Christianson et al, 1994; Williams et al, 1997), o que levou à suspensão da utilização desse fármaco durante a gravidez.

Dessa forma, Rodier e colaboradores propuseram um modelo animal para estudo das alterações de espectro autista, no qual é realizada a injeção de VPA em fêmeas grávidas, em dose única, durante o período de fechamento do tubo neural (E12) dos embriões. Os autores observaram que, na dose de 350mg/kg de VPA, os animais apresentaram uma série de efeitos morfológicos e comportamentais que se assemelham aos observados nos pacientes com autismo, como grande redução os núcleos faciais e na oliva superior, acompanhado de um encurtamento do tronco encefálico entre o corpo trapezóide e a oliva inferior. Ao contrário de drogas, como a talidomida, que que não reproduzem as mesmas lesões em humanos e roedores, o VPA tem mostrado resultados semelhante aos observados na espécie humana, sendo por isso um modelo bastante validado na literatura para a compreensão do autismo. Foram relatadas alterações nos núcleos dos nervos cranianos semelhantes as observadas em amostras *post-mortem* de pacientes com

autismo, assim como diminuição no número de células de Purkinje (Rodier et al, 1996).

Mais recentemente, Schneider e colaboradores realizaram uma bateria de testes comportamentais para avaliar o desenvolvimento pós-natal de animais expostos ao VPA durante o período embrionário em comparação com animais controle. Seus resultados revelam que os animais VPA apresentam alterações no desenvolvimento pós-natal, seguido de menor sensibilidade à dor, menor atividade exploratória, hiperatividade locomotora e comportamento repetitivo. Além disso, os animais apresentaram maior aversão social medida pela diminuição no tempo de interação com outros animais. Esses resultados demonstram que o modelo animal de VPA apresenta características comportamentais que se assemelham aos endofenótipos observados em humanos (Schneider et al, 2005). Um conjunto de estudos recentes, utilizando testes comportamentais e tecidos de animais VPA, mostrou que certas alterações comportamentais estão associadas a distúrbios em circuitos neurais específicos. Animais VPA adultos apresentaram memórias aversivas amplificadas e bloqueio do processamento cortical de informações visuais (Rinaldi et al, 2008; Pohl-Guimaraes et al, 2011) e a eletrofisiologia em fatias cerebrais de animais VPA mostrou um aumento da neurotransmissão mediada por receptores NMDA, hiperconectividade e aumento de plasticidade no CPFm (Rinaldi et al, 2007; Rinaldi et al, 2008), (Markram et al, 2010). A análise da expressão de proteínas no hipocampo de ratos expostos ao VPA durante o período pré-natal revelou que há um aumento nos níveis de recaptção de glutamato pelos astrócitos em animais VPA adultos (Silvestrin et al, 2013), fatores que em conjunto ajudam a compreender a neuropatologia do autismo

Apesar da grande quantidade de estudos na área, ainda é pouco compreendido como as alterações comportamentais dos animais VPA podem estar relacionadas com modificações nos padrões de migração e excitação/inibição neuronal em estruturas corticais envolvidas na fisiopatologia do autismo. Dessa forma, procuramos validar no âmbito comportamental o modelo animal de autismo induzido por VPA, assim como observar a ocorrência de alterações morfológicas no CPFm desses animais, através da quantificação de interneurônios positivos para parvalbumina.

## **2 JUSTIFICATIVA**

As desordens de espectro autista acometem indivíduos desde a fase inicial da vida, produzindo um grande impacto familiar e social. Além disso, sua prevalência é alta (1/100) e também está associada a alta chance de desenvolver epilepsia no decorrer da vida. Dessa forma, a compreensão das alterações celulares e eletrofisiológicas presentes no encéfalo autista é fundamental para o desenvolvimento de melhores tratamentos. Para isso, o uso de modelos experimentais nos permite investigar com mais precisão os mecanismos envolvidos nas alterações comportamentais comumente observadas no autismo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Gerar e caracterizar comportamentalmente o modelo experimental de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valpróico (VPA) em tarefas de natureza exploratória, cognitiva e social. Além disso, quantificar e avaliar a distribuição de interneurônios parvalbuminérgicos no córtex pré-frontal medial e células de Purkinje no cerebelo.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

(A) Avaliar o desenvolvimento pós-natal de ratos expostos ao VPA durante a fase embrionária.

(B) Avaliar o comportamento locomotor, exploratório, de auto-limpeza (*grooming*) e de interação social, assim como a memória de reconhecimento de objetos em animais controle e VPA pré-púberes (PND30-35);

(C) Quantificar a densidade de interneurônios parvalbumina-positivos no córtex pré-frontal medial (sub-áreas: cíngulo anterior, pré-límbico e infra-límbico) em animais controle e VPA pré-púberes (PND30-35);

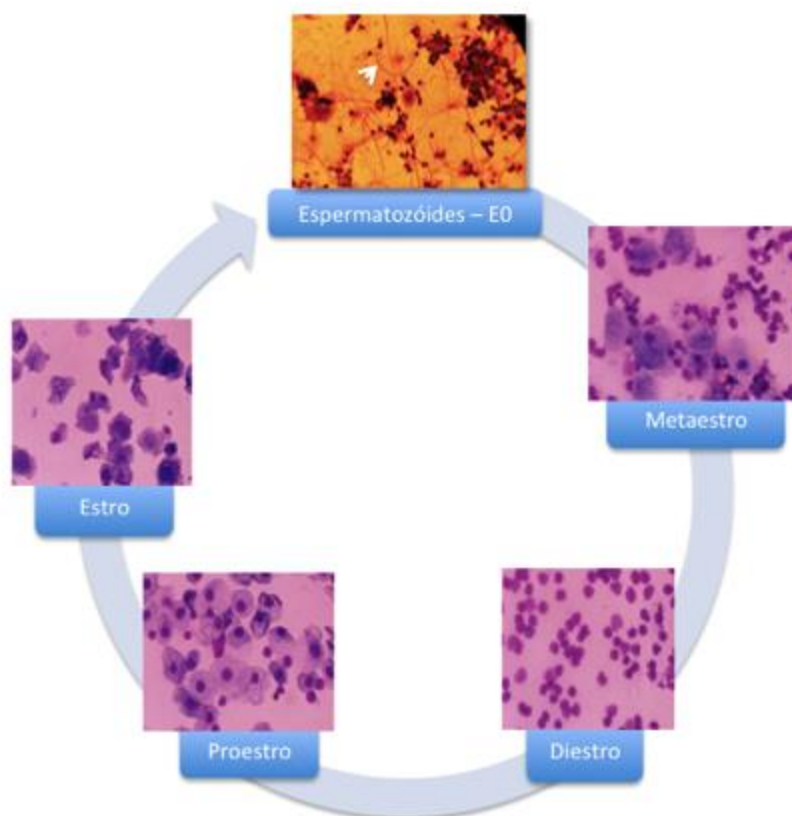
(D) Quantificar a densidade de células de Purkinje na região Crus 1 do córtex cerebelar de animais controle e VPA pré-púberes (PND30-35).

## 4 MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 MODELO ANIMAL DE AUTISMO

Para compor os casais genitores dos ratos VPA (n= 7 casais) e controles (n= 5 casais) utilizamos ratos adultos Wistar machos e fêmeas (idade de 90-180 dias) não relacionados consanguineamente mantidos no Biotério Setorial do Instituto do Cérebro da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). As fêmeas tiveram o ciclo estral monitorado diariamente por esfregaço vaginal e foram colocadas para acasalar individualmente com os machos no início do período noturno (19:00h; período de atividade). Na manhã seguinte ao acasalamento, a determinação do primeiro dia gestacional (E0) foi confirmada pela combinação dos seguintes critérios: presença do tampão vaginal, presença de espermatozóides na lavagem vaginal e a estabilização do ciclo estral em diestro na semana seguinte ao acasalamento (Figura 3). Passados 12 dias da fertilização (E12), correspondendo ao final do fechamento do tubo neural nestes animais, as fêmeas (n= 5) receberam uma injeção intraperitoneal de valproato de sódio (VPA, 500 mg/kg, i.p.; Sigma, P4345) dissolvido em solução salina 0,9% na concentração de 250 mg/mL. Passados 30 minutos da aplicação de VPA, as fêmeas receberam uma injeção de 5'-bromo-deoxiuridina (BrdU, 50 mg/kg, i.p.; Sigma, B5002) dissolvida em solução salina na concentração de 50 mg/mL. Essa injeção teve como objetivo marcar as células em atividade mitótica durante a ação do valproato. As fêmeas prenhas do grupo controle receberam apenas uma injeção de solução salina 0,9%, seguida pela injeção de BrdU (50 mg/kg, i.p.) 30 minutos depois.





**Figura 3:** Fases do ciclo estral e acasalamento. Presença de espermatozoides (seta) em esfregaço vaginal confirmando o dia gestacional E0 em uma rata VPA.

Para observar os efeitos da exposição ao VPA sobre a gênese de interneurônios corticais, um grupo independente de fêmeas grávidas (n=2) recebeu a injeção de VPA (500 mg/kg, i.p.) no dia gestacional E15. Fêmeas controle (n=1) receberam uma injeção de solução salina 0,9% em E12, e uma injeção de BrdU (50 mg/kg, i.p.) em E15.

Após o nascimento, a prole de cada fêmea permaneceu com a mãe por 21 dias durante a amamentação, momento no qual os filhotes foram separados por sexo e acomodados em grupos de 4-6 animais por caixa. Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (414 x 344 x 168 mm<sup>3</sup>) com raspas de madeira no assoalho numa sala com temperatura (23 ± 2 °C), umidade (65-75%) e ciclo claro-escuro (de 12-12h; luz ligada às 7:00h e desligada às 19:00h) controlados e com livre acesso à comida e água. Todos os procedimentos experimentais realizados com os animais foram previamente

aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) da UFRN sob o protocolo de número 044/2011.

## **4.2 DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**

Avaliamos o desenvolvimento pós-natal através do acompanhamento do ganho de peso e da data de abertura dos olhos tanto dos filhotes VPA quanto dos filhotes controle. Os filhotes tiveram seus pesos monitorados em amostragens obtidas nos dias pós-natais (PND): PND7, PND14, PND21, PND28 e PND35. Entre PND12 e PND16, os filhotes foram monitorados diariamente para determinação do dia da abertura dos olhos, com o mínimo de manipulação, a fim de não estressar as ratas-mães.

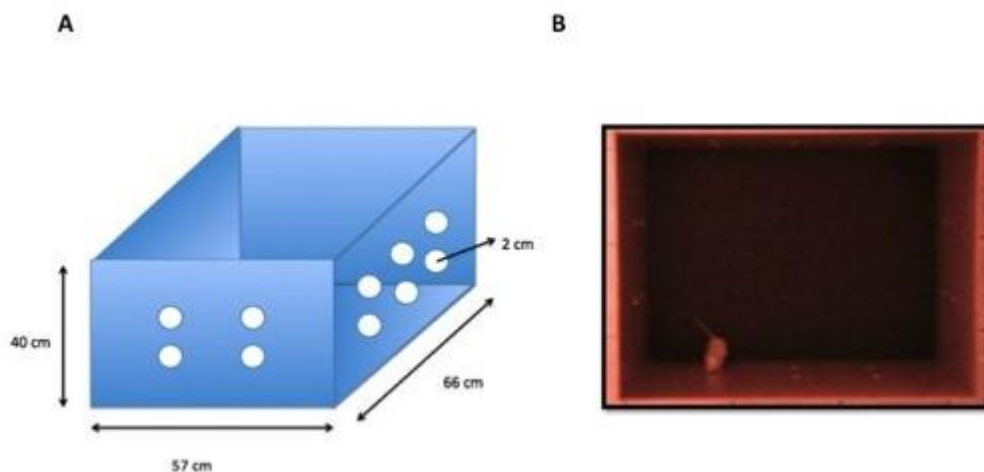
## **4.3 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS**

Realizamos avaliações comportamentais destinadas a validar o modelo animal de VPA utilizado. Os experimentos foram realizados nos animais durante a fase pré-pubere (PND30-35). Os protocolos comportamentais foram adaptados de Schneider e Przewlocki (Schneider and Przewlocki 2005) e os dados analisados com o auxílio do software Any-Maze (Soelting Co.).

### **4.3.1 ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA**

O teste de atividade locomotora e exploratória tem como objetivo principal avaliar o estado motivacional dos animais experimentais expostos a um novo ambiente, assim como avaliar seu desempenho motor e capacidade de exploração do novo ambiente. O teste foi realizado em uma arena retangular (66 x 57 x 40 cm<sup>3</sup>), confeccionada de madeira com assoalho preto. Para estimular a exploração dos animais, as paredes continham 6 orifícios (paredes maiores) e 4 orifícios (paredes menores) de 2 cm de diâmetro igualmente distribuídos em duas fileiras (Figura 4A). Todo o ambiente foi mantido com iluminação tênue de baixa intensidade, para evitar que os animais

ficassem estressados. Para isso, utilizamos uma lâmpada vermelha de 40W, de maneira a formar uma penumbra homogênea sobre o aparato. Na semana anterior ao teste, os animais foram habituados ao experimentador através do manuseio diário por 5 min. No dia do experimento, cada animal (idade PND30) foi levado à arena e deixado explorar livremente o ambiente por um período de 5 minutos (Figura 4B). Todas as sessões foram realizadas entre as 08:00h e 10:00h e foram filmadas para análise posterior. Durante a análise, três parâmetros de cada sessão de teste foram avaliados: (1) a distância total percorrida durante a tarefa, (2) o número e o tempo dos comportamentos de levantamento (definido como elevação sobre as duas patas posteriores) e (3) o número e o tempo dos comportamentos de farejamento (definido como a inserção do focinho nos orifícios presentes nas paredes da arena). Após o término do teste, os animais foram retornados às suas caixas de origem e reconduzidos ao biotério.



**Figura 4:** **A** Esquema do aparato utilizado no teste de atividade locomotora e exploratória; **B** Animal em livre movimento durante o teste em campo aberto.

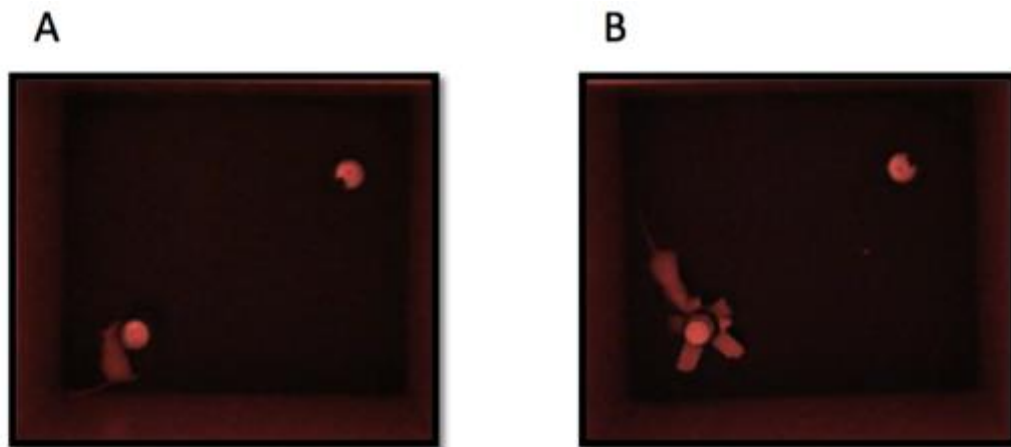
#### 4.3.2 AUTO-LIMPEZA (ou *GROOMING*)

O comportamento de auto-limpeza em roedores é um comportamento inato e modulado intensamente pelo estado de ansiedade do animal (McFarlane, Kusek et al. 2008). Ele consiste de movimentos onde o animal lambe as patas anteriores, a barriga e o dorso numa progressão estereotipada

antero-posterior. A avaliação do comportamento de auto-limpeza tem como objetivo principal verificar a ocorrência de estereotípias e sua repetitividade, fenótipos comumente observados no autismo. O teste foi realizado em uma arena retangular (66 x 57 x 40 cm<sup>3</sup>) confeccionada em madeira com assoalho pintado de preto. O ambiente recebeu iluminação homogênea de baixa intensidade, para reduzir o estresse dos animais. Para isso, utilizamos uma lâmpada vermelha de 40W, de forma garantir uma penumbra. Cada animal foi levado à arena e deixado explorar livremente o ambiente por um período de 5 minutos. Após o término do teste, os animais foram retornados às suas caixas de origem e reconduzidos ao biotério. Todas as sessões foram filmadas para posterior análise. Foram avaliados a frequência do comportamento de auto-limpeza e a duração média de cada evento.

#### **4.3.3 RECONHECIMENTO DE OBJETOS**

O teste de reconhecimento de objetos é um teste de memória que avalia o julgamento da ocorrência prévia de um evento, envolvendo um circuito do córtex pré-frontal (Ozawa et al., 2006). Nele o animal deve ser capaz de diferenciar um objeto novo de um objeto familiar lhe apresentado anteriormente. No PND30 e PND31, os animais foram habituados à arena (66 x 57 x 40 cm<sup>3</sup>), em três sessões de 5 minutos, sendo a primeira no PND30 e as duas seguintes no PND31. O teste de reconhecimento de objetos foi realizado no PND32, sendo dividido em duas fases: (1) fase de aquisição e (2) fase de reconhecimento. Na fase de aquisição, os animais foram expostos a dois objetos iguais (A e B), ficando livres para explorar os mesmos durante 5 minutos, sendo posteriormente levados de volta para suas caixas. Após intervalo de 10 minutos, iniciamos a fase de reconhecimento, na qual os animais foram re-expostos a dois objetos, sendo um objeto familiar (A) e outro novo objeto (C), diferente dos anteriores. Os animais ficaram livres para explorar os mesmos durante 5 minutos (Figura 5). Todas as fases do teste foram realizadas na penumbra, através da utilização de uma lâmpada vermelha de 40W. Após o teste, os animais foram retornados às suas caixas de origem e levados ao biotério. Todas as sessões foram filmadas para análise posterior.



**Figura 5:** Animal executando o teste de reconhecimento de objetos durante **A** fase de aquisição e **B** fase de reconhecimento

Foi considerada atividade exploratória de cada objeto a presença do nariz do animal em uma distância de pelo menos 2 cm do objeto, ou o ato de tocar e cheirar o objeto com o focinho. Não se considerou exploração se deslocar próximo ao objeto ou sentar-se ou apoiar-se nele. Os parâmetros avaliados foram o tempo que os animais exploraram cada objeto, e a distância percorrida por cada animal. Com estes dados comparamos o tempo de exploração do objeto novo com o tempo de exploração do objeto familiar com o uma medida da capacidade dos animais em distinguir o objeto novo do familiar. Além disso, avaliamos a atividade locomotora durante essa tarefa.

Calculamos também um índice de discriminação dos objetos, o qual consiste na razão entre a diferença do tempo de exploração e o tempo total de exploração dos objetos. Nesse parâmetro valores próximos a 1 representariam os animais que são capazes de discriminar o objeto novo do familiar, enquanto valores próximos a -1 representam animais que não discriminaram bem os objetos apresentados.

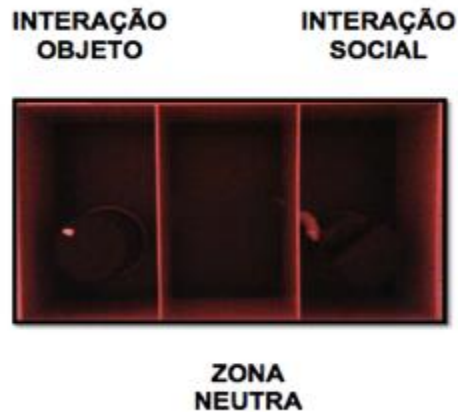
$$\text{Índice de discriminação} = \frac{t_{\text{novo}} - t_{\text{familiar}}}{t_{\text{novo}} + t_{\text{familiar}}}$$

#### 4.3.4 INTERAÇÃO SOCIAL

O teste de interação social avaliou a preferência do animal em explorar um objeto a interagir socialmente com um animal não-familiar. Para realização do teste, os animais foram previamente habituados aos experimentadores durante uma semana. A habituação ao aparato experimental ocorreu em PND33 durante duas sessões de 5 minutos cada, em uma caixa de madeira (105 x 60 x 35 cm<sup>3</sup>) dividida internamente em três compartimentos semelhantes de 35 x 60 x 35 cm<sup>3</sup>. No dia do teste, colocamos um rato não-familiar restrito por uma gaiola metálica em um dos compartimentos da extremidade e uma gaiola metálica idêntica no compartimento da outra extremidade. O compartimento central foi deixado livre de qualquer objeto. O teste consistiu em posicionar os animais (PND34) no compartimento central da caixa e deixá-los explorar livremente todos os ambientes por 10 minutos (Figura 6). Realizamos dois testes de interação social, sendo a diferença entre os dois apenas no tipo de objeto utilizado para exploração: no teste 1 (Interação Social 1 - IS 1) utilizamos um objeto de plástico, rico em detalhes para estimulação sensorial, enquanto no teste 2 (Interação Social 2 - IS 2), o objeto utilizado foi uma gaiola idêntica à que isolava o animal desconhecido, porém sem nenhum animal no seu interior. A iluminação do ambiente foi feita com uma lâmpada vermelha de 40W, para se criar uma penumbra. Todas as sessões foram filmadas para análise posterior. Foram avaliados no teste os seguintes parâmetros: (1) distância percorrida, (2) tempo de permanência em cada compartimento da caixa e (3) proporção do tempo de interação social e interação com o objeto. Também avaliamos o índice de discriminação social para esse teste, que consiste na razão da diferença do tempo de interação social e interação com o objeto pelo tempo total de permanência das duas zonas. Valores próximos a 1 representam animais que tiveram preferência pela zona de interação social, enquanto valores próximos a -1 representam animais que tem preferência pela zona de interação com o objeto.

$$\text{Índice de discriminação social} = \frac{t \text{ interação social} - t \text{ interação objeto}}{t \text{ interação social} + t \text{ interação objeto}}$$

Após o teste, os animais foram retornados às suas caixas de origem e levados ao biotério



**Figura 6:** Animal durante o teste de interação social. No compartimento da direita encontra-se o animal não-familiar isolado por uma gaiola, enquanto na esquerda há uma gaiola vazia.

#### 4.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

##### 4.4.1 PERFUSÃO E PREPARAÇÃO DO TECIDO

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados profundamente com tiopental sódico (80mg/kg,i.p., Cristália) e posteriormente sacrificados por perfusão transcardíaca. Este procedimento consistiu em abrir a caixa torácica do animal para exposição do coração, e posterior punção do ventrículo esquerdo com uma agulha de gavagem, por onde foi bombeado o perfusato. Este líquido foi drenado através de um corte realizado no átrio direito. Cada animal foi perfundido inicialmente com tampão fosfato salina (PBS: tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.4 + salina: NaCl 150 mM à temperatura ambiente), seguido de solução gelada de paraformaldeído (PFA) 4% dissolvido em PB (tampão fosfato de sódio 100mM pH 7.4). Os volumes de perfusão foram de 350 mL/Kg e 900 mL/Kg de rato, respectivamente. Terminada a perfusão, os encéfalos foram retirados da caixa

craniana e armazenados em solução de PFA 4% gelada por 12 h a 4°C. Os encéfalos foram então lavados em PB gelado por 4 h sob agitação e transferidos para uma solução de sacarose 30% diluída em PB 100mM. Após o congelamento a -40°C com isopentano e gelo seco, os encéfalos foram cortados em secções coronais de forma seriada no criostato (Microm, HM 550), em secções de 20µm de espessura e coletados em lâminas histológicas previamente tratadas. As secções foram estocadas a -80°C até a realização da imunofluorescência.

#### 4.4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As amostras histológicas foram previamente retiradas do freezer -80°C, deixadas equilibrar à temperatura ambiente e lavadas em PBS 10mM pH7.4 (3X de 10 minutos) sob agitação. Elas foram então incubadas com tampão de bloqueio (PBS 10mM + 0.5% Triton-X + 5% NGS) por 30min e colocadas em solução de anticorpo primário diluído em tampão de bloqueio, a 4°C, por 12-14h. Na sequência, os tecidos foram lavados em PBS (3X de 10 minutos) e incubados com solução de anticorpo secundário diluído em tampão de bloqueio por 2 horas, à temperatura ambiente, protegido da luz. Após três lavagens em PBS, incubamos com solução do marcador nuclear (DAPI; Sigma, D9542) por 5 minutos e em seguida, as lâminas foram montadas com meio *anti-fading* (Fluoromount, Polisciences 18606) e estocadas a 4°C para posterior análise.

Para imunofluorescência contra BrdU, foi necessário utilizar um protocolo que permitisse a desnaturação da dupla fita de DNA para criar acesso ao BrdU incorporado. Além disso, realizamos um procedimento de recuperação antigênica. Assim, as amostras foram submetidas à incubação com tampão citrato de sódio 10mM, 60°C, durante 5 minutos. Em seguida, as mesmas foram fervidas por 40 segundos, e novamente incubadas a 60°C, durante 10 minutos. Passada essa etapa, foi aplicado HCl 2N, 37°C, por 30 minutos e, posteriormente, tampão borato de sódio 100mM gelado, duas vezes durante 15 minutos. Após o término dessas etapas, seguiu-se o mesmo protocolo utilizado anteriormente para realização da imunofluorescência.



Utilizamos os seguintes anticorpos primários nas seguintes diluições: rato anti-BrdU (1:250; AbCam, AB6326), camundongo anti-NeuN (1:100; Millipore, MAB353) e camundongo anti-parvalbumina (anti-PARV; 1:500; Sigma, p3088). Os anticorpos secundários utilizados foram Alexa Fluor 488 cabra anti-camundongo (1:1000; Invitrogen, A11001) e Alexa Fluor 546 cabra anti-rato (1:1000; Invitrogen, A11081). Utilizamos DAPI (1:1000) para marcação nuclear. As lâminas foram visualizadas e fotografadas no microscópio Zeiss Imager M.2 ApoTome2 e, analisadas com o software StereoInvestigator.

#### **4.4.3 NISSL**

Para realização da coloração por Nissl, as secções foram inicialmente descongeladas e então submersas em clorofórmio P.A. durante 10 minutos, seguido por uma bateria de álcool etílico em concentrações decrescentes (100% → 95% → 70%), 5 minutos cada, para então serem imersas em solução de ácido acético 5% (5 minutos), e então solução de cresil violeta X% por 8 minutos. Na sequência, os cortes foram re-hidratados em uma bateria de álcool etílico em concentrações crescentes (70% → 95% → 100%) por 20 segundos e finalizadas no xilol P.A durante 5 minutos. As lâminas foram montadas com o meio de montagem DPX (Sigma-Aldrich, 06522). As lâminas foram visualizadas e fotografadas no microscópio Zeiss Imager M.2 ApoTome2 e, analisadas com o software StereoInvestigator.

#### **4.4.4 CONTAGEM E DISTRIBUIÇÃO CELULAR**

A contagem de células foi realizada em três sub-regiões do córtex pré-frontal (CPFm - cingulado anterior, pré-límbica e infra-límbica), correspondendo as coordenadas antero-posterior (AP) de +3.7 a +2.7 mm, com relação ao bregma (Atlas Paxinos; Paxinos, 2007). Analisamos uma média de 4 secções do CPFm por animal (Controle, n= 6 animais; VPA, n= 6 animais). Foram contados os neurônios imunoreativos para PARV nas camadas I, II/III e V/VI do córtex cingulado anterior, córtex pré-límbico e córtex infra-límbico. Para

contagem de células de Purkinje do córtex cerebelar (AP: -10.8 a -11.8 mm, com relação ao bregma do Atlas Paxinos), foram incluídos na contagem apenas perfis densamente corados com cresil violeta. Durante todas as análises, as lâminas encontravam-se codificadas e o experimentador não teve acesso à chave de codificação até que terminassem as contagens. As contagens foram realizadas utilizando microscópio Zeiss Imager M.2 ApoTome2 e o software Stereoinvestigator.

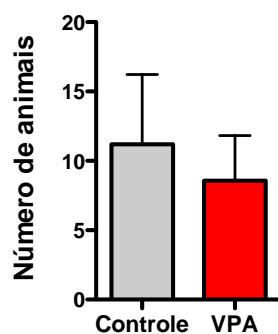
#### **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do software Graphpad Prism 5.0. Os dados foram analisados através de testes paramétricos ou não paramétricos, conforme a distribuição das medidas. Para grupos com uma variável independente, foram feitas análises através do teste *t-Student* (para amostras com distribuição paramétrica) ou teste de Mann-Whitney (para amostras com distribuição não paramétrica). Já para as análises de variância, utilizamos o ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. O grau de significância estatística adotado foi de  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

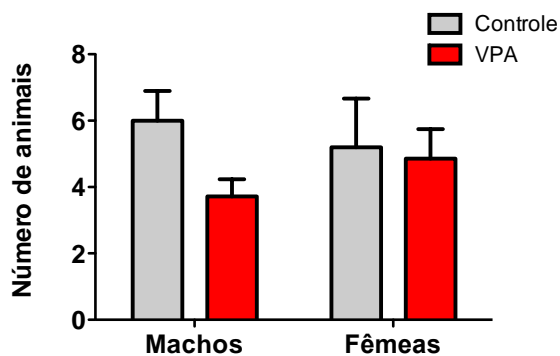
### 5.1 DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL

A observação das ninhadas nascidas das fêmeas tratadas com VPA durante a gestação não revelou diferenças entre o número de filhotes nascidos com relação às fêmeas controle. (Figura 7; teste *t*-Student,  $t_{(10)}=0,46$ ,  $p=0,65$ ).



**Figura 7:** Número médio de filhotes nascidos por rata (Controle:  $n=5$ ; VPA:  $n=7$ ;  $n$ =número de ninhadas). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão.

Avaliamos também o número de filhotes machos e fêmeas nascidos por ninhada de ratas VPA e controle. Os resultados não revelaram diferenças na fração de machos e fêmeas, porém observamos uma tendência de redução no número de machos nascidos de ratas VPA (Figura 8; ANOVA de duas vias;  $F_{(1,20)}=1,95$ ,  $p=0,18$ )



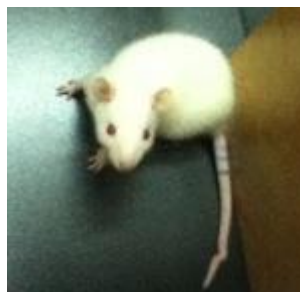
**Figura 8:** Número médio de filhotes machos e fêmeas nascidos por rata (controle: n=5; VPA: n=7; n=número de ninhadas). Dados foram analisados por ANOVA de duas vias e representam a média  $\pm$  erro padrão.

Um importante parâmetro para confirmação da ação do VPA nos animais expostos à droga durante o período embrionário é a presença de uma dobra na cauda destes animais (Sonoda T 1990). Essa característica macroscópica foi observada apenas nos animais VPA, como pode ser observado na imagem abaixo (Figura 9) :

**A**



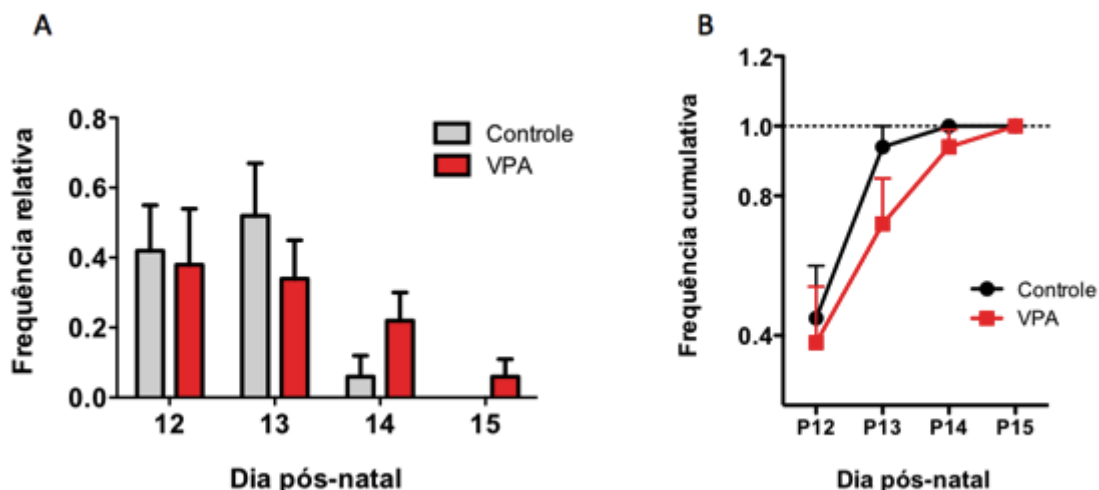
**B**



**Figura 9:** Animal **A** controle com cauda normal e **B** VPA com cauda torta após a exposição à droga durante o período embrionário.

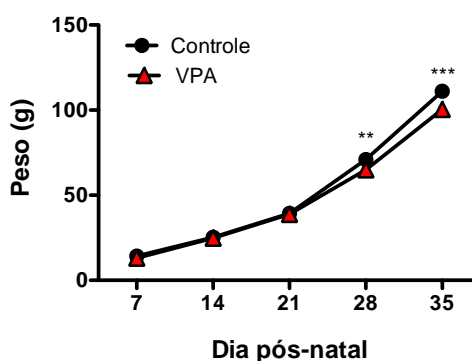
Com a finalidade de verificar o comprometimento no desenvolvimento pós-natal do nosso grupo experimental, realizamos o acompanhamento da abertura de olhos, assim como o peso dos animais durante o período pós-natal.

A abertura de olhos foi realizada entre os dias pós-natais PND12 e PND16 (Figura 10). Observamos uma tendência de atraso na abertura de olhos no grupo VPA comparado ao controle, uma vez que alguns animais VPA abriram os olhos apenas no PND15, enquanto todos animais controle tiveram os olhos abertos até PND14. Ao calcular a frequência relativa não foi encontrado resultado significativo (Figura 10A; ANOVA de duas vias;  $F_{(1,40)}=0,0$ ,  $p=1,0$ ). O mesmo pôde ser observado na frequência cumulativa (Figura 10B; ANOVA de duas vias;  $F_{(1,40)}=1,48$ ,  $p=0,23$ ).



**Figura 10:** Idade de abertura dos olhos em filhotes durante o período pós-natal PND12 a PND16. **A:** Frequência relativa e, **B:** frequência cumulativa (Controle: n=5; VPA: n=7, n=número de ninhadas). Dados foram analisados por ANOVA de duas vias e representam a média  $\pm$  erro padrão.

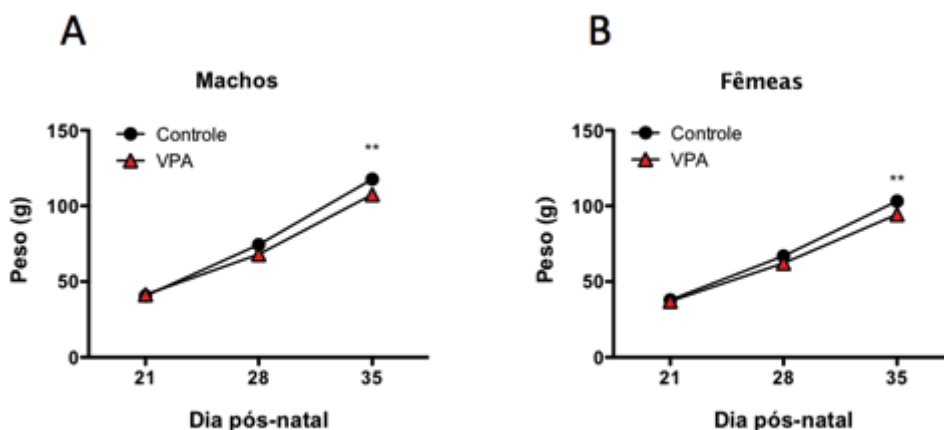
O acompanhamento do ganho de peso dos animais tratados foi avaliado nos dias PND7, PND14, PND21, PND28 e PND35. Nossos resultados mostram uma diminuição no peso do grupo VPA quando comparado com o controle nos dias PND28 e PND35 (Figura 11; PND28:  $t_{(95)}=2,96$ ,  $p=0,004$ ; PND35:  $t_{(95)}=3,64$ ,  $p=0,0004$ ; teste *t*-Student).



**Figura 11:** Acompanhamento de peso dos animais (Controle: n=40 e VPA: n=39). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão. \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$ .

A diferença de peso entre os grupos experimentais e controle também se manteve ao observarmos os dados agrupados por sexo. Nos machos

observou-se uma redução do peso nos animais VPA no PND35 (Figura 12A; ANOVA de duas vias com medidas repetidas;  $F_{(1,46)}=4,44$ ,  $p=0,04$ ). Da mesma forma, as fêmeas apresentaram redução observada apenas na idade PND35 (Figura 12B ; ANOVA de duas vias com medidas repetidas;  $F_{(1,48)}=4,38$ ,  $p=0,04$ ). O teste *post-hoc* se revelou significativo em ambos os casos ( $p<0,01$ ).

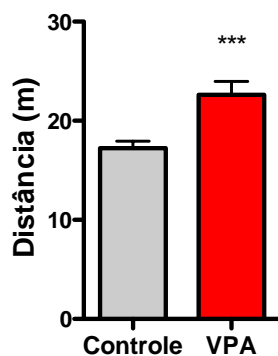


**Figura 12:** Acompanhamento de peso dos animais **A** machos (Controle:  $n=27$  e VPA:  $n=21$ ) e **B** fêmeas (Controle:  $n=23$  e VPA:  $n=27$ ). Dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, e representam a média  $\pm$  erro padrão. \*\* $p<0,01$ .

## 5.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 5.2.1 ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA

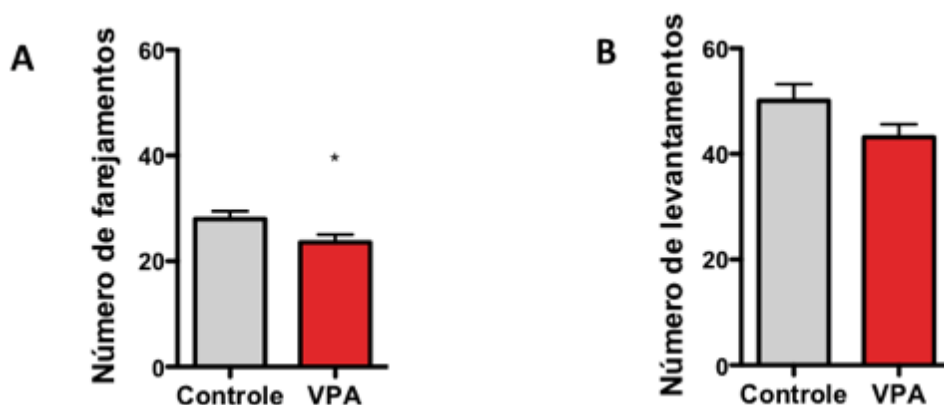
Nos testes de atividade locomotora e exploratória analisamos inicialmente a distância que os animais percorreram durante o tempo de 5 minutos nesta tarefa comportamental. Observamos um significativo aumento da distância percorrida pelos animais VPA comparados com o grupo controle (Figura 13; teste *t*-Student,  $t_{(68)}=3,82$ ,  $p=0,0003$ ).



**Figura 13:** Distância percorrida durante o teste de atividade locomotora e exploratória (Controle: n=41 e VPA: n=29). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão.\*\*\* $p < 0,001$ .

Para avaliar a capacidade dos animais em explorar o aparato experimental, quantificamos dois parâmetros comportamentais: número de movimentos de farejamento e número de levantamentos (animal sobre as duas patas posteriores) durante os 5 minutos de teste. O tempo de execução de cada uma das ações foi também quantificado.

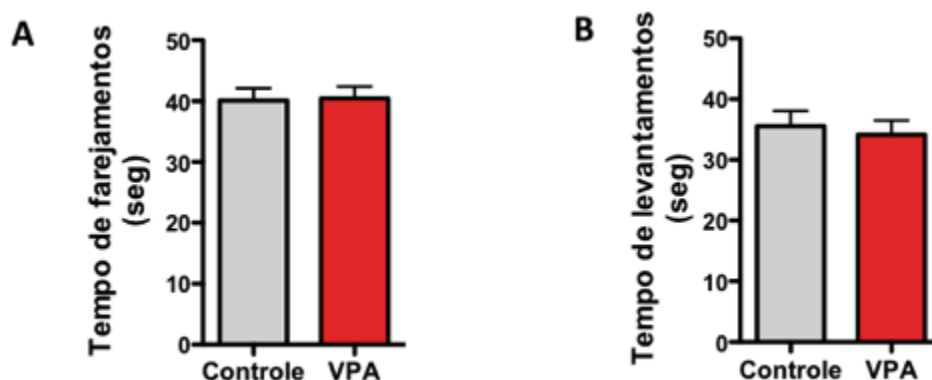
Observamos uma diminuição no número de farejadas no grupo tratado com VPA quando comparado com o grupo controle (Figura 14A; teste *t*-Student,  $t_{(66)}=2,12$ ,  $p=0,03$ ). Já o número de levantamentos não apresentou diferença estatística, embora tenha havido uma tendência à diminuição nos animais VPA (Figura 14B; Mann-Whitney,  $U=430$ ,  $p=0,05$ ).



**Figura 14:** Número de **A** farejadas e **B** levantamentos realizadas pelos animais durante o teste de atividade locomotora e exploratória (Controle: n=41 e VPA:

n=29). Dados foram analisados por teste **A** *t*-Student e **B** Mann-Whitney, e representam a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$ .

Quando quantificamos o tempo de duração destas ações, nossos dados deixam de revelar diferenças entre os grupos (Figura 15; farejadas: teste *t*-Student,  $t_{(68)}=0,12$ ,  $p=0,90$ ; levantamentos: teste *t*-Student,  $t_{(68)}=0,39$ ,  $p=0,69$ ).



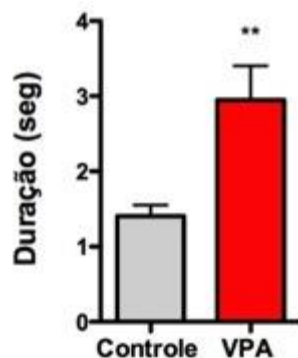
**Figura 15:** Tempo das atividades exploratórias de **A** farejamento e **B** levantamento (Controle: n=41 e VPA: n=29). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão.

### 5.2.2 AUTO-LIMPEZA

Para avaliar a presença de estereotipias e rituais motores no modelo animal de autismo analisamos o comportamento inato de auto-limpeza típico desta espécie. Para isto, quantificamos a duração média dos episódios de auto-limpeza, assim como a frequência desses eventos ao longo dos 5 minutos de teste.

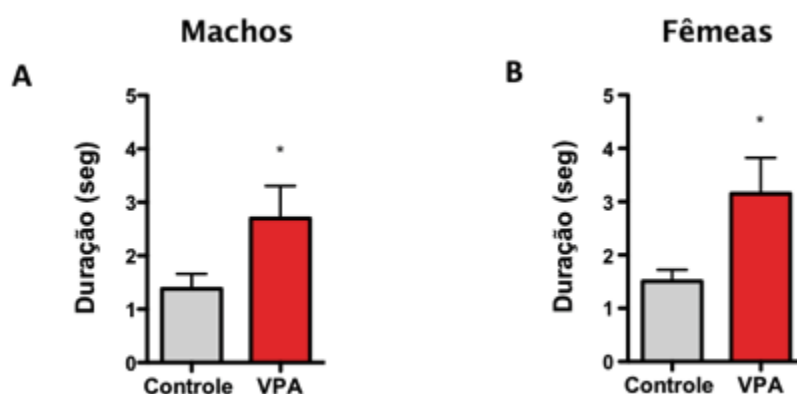
Nossos dados revelaram que a duração média dos rituais de auto-limpeza nos animais controle foi menor em relação ao grupo VPA (Figura 16; Mann-Whitney,  $U=327$ ,  $p=0,001$ ).





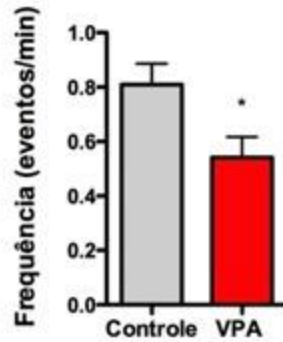
**Figura 16:** Duração média dos episódios de auto-limpeza entre os grupos (Controle: n=41 e VPA: n=29). Dados foram analisados por teste Mann-Whitney e representam a média  $\pm$  erro padrão.

Esse mesmo aumento no tempo de auto-limpeza foi observado quando comparamos machos e fêmeas (Figura 17; *machos*: Mann-Whitney,  $U=78$ ,  $p=0,002$ ; *fêmeas*: Mann-Whitney,  $U=79,5$ ,  $p=0,03$ ).



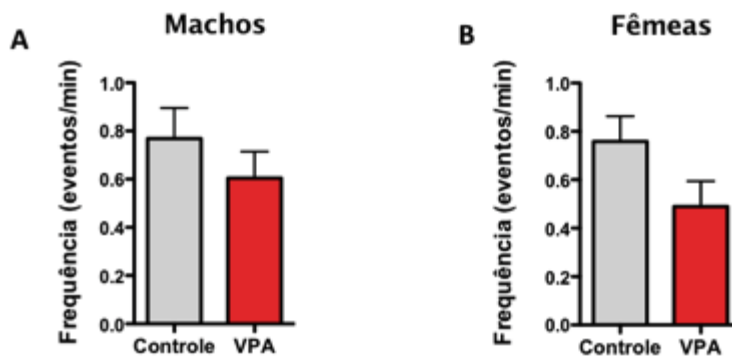
**Figura 17:** Duração dos episódios de auto-limpeza entre **A** machos (controle: n=23 e VPA: n=13) e **B** fêmeas (Controle: n=18 e VPA: n=16). Dados foram analisados por teste Mann-Whitney e representam a média  $\pm$  erro padrão.

Quanto à frequência dos eventos de auto-limpeza realizados pelos animais, nossos resultados mostram uma menor frequência no grupo tratado com VPA comparado ao grupo controle (Figura 18; teste  $t$ -Student,  $t_{(68)}=0,39$ ,  $p=0,69$ ).



**Figura 18:** Frequência dos episódios de auto-limpeza (Controle: n=41 e VPA: n=29). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão.

Ao compararmos machos e fêmeas separadamente, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos controle e VPA. Porém, os dados mostram uma tendência a menor frequência de episódios nos animais VPA mais intensamente nas fêmeas (Figura 19; *machos*: teste *t*-Student,  $t_{(34)}=0,86$ ,  $p=0,40$ ; *fêmeas*: teste *t*-Student,  $t_{(32)}=1,81$ ,  $p=0,08$ ).



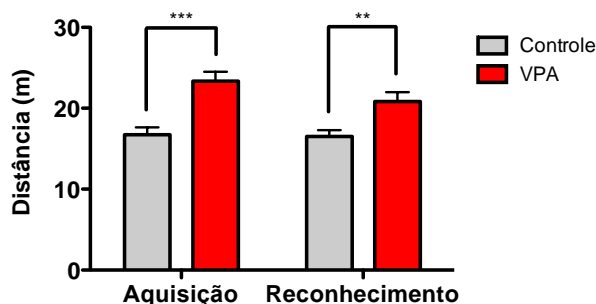
**Figura 19:** Frequência de auto-limpeza entre **A** machos (controle: n=23 e VPA: n=13) e **B** fêmeas (controle: n=18 e VPA: n=16). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão.

Em conjunto, os dados indicam que animais tratados com VPA quando se engajam em episódios de auto-limpeza, permanecem neste comportamento por mais tempo do que os animais controle, sugerindo comportamento compulsivo, repetitivo ou de hiperatividade uma vez iniciado nos animais modelo de autismo.

### 5.2.3 RECONHECIMENTO DE OBJETOS

No teste de reconhecimento de objetos analisamos 3 parâmetros comportamentais: (1) a distância total percorrida pelos animais durante o teste, (2) o tempo de exploração de cada objeto e (3) a porcentagem de tempo de exploração de cada objeto.

Verificamos que, assim como no teste de atividade locomotora e exploratória, os animais VPA novamente apresentaram um aumento na distância percorrida, presente tanto na fase de aquisição quanto na fase de reconhecimento (Figura 20; ANOVA de duas vias com medidas repetidas;  $F_{(1,48)}=4,38$ ,  $p=0,04$ ). O teste *post-hoc* foi significativo nas duas fases (aquisição:  $p<0,001$ ; reconhecimento:  $p<0,01$ ).

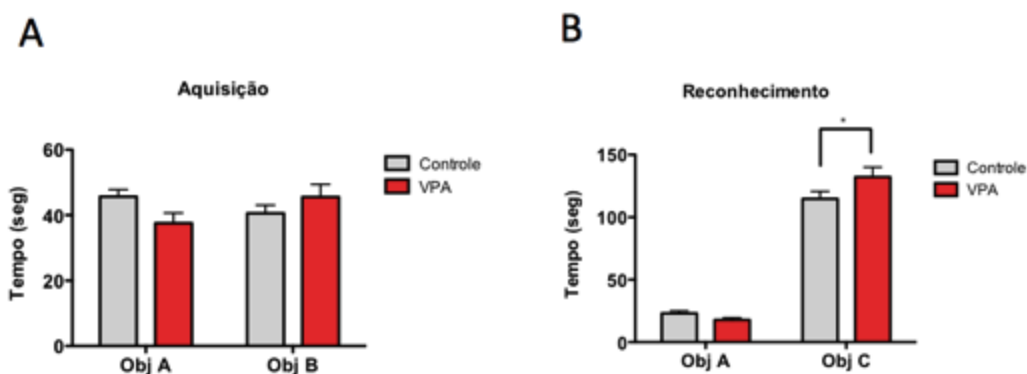


**Figura 20:** Distância total percorrida pelos animais durante o teste de reconhecimento de objetos (Controle:  $n=28$  e VPA:  $n=27$ ). Dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas e representam a média  $\pm$  erro padrão. \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

A análise do teste de reconhecimento de objetos mostrou que os animais controle e VPA foram capazes de diferenciar o objeto novo apresentado durante a segunda fase do teste (Figura 20).

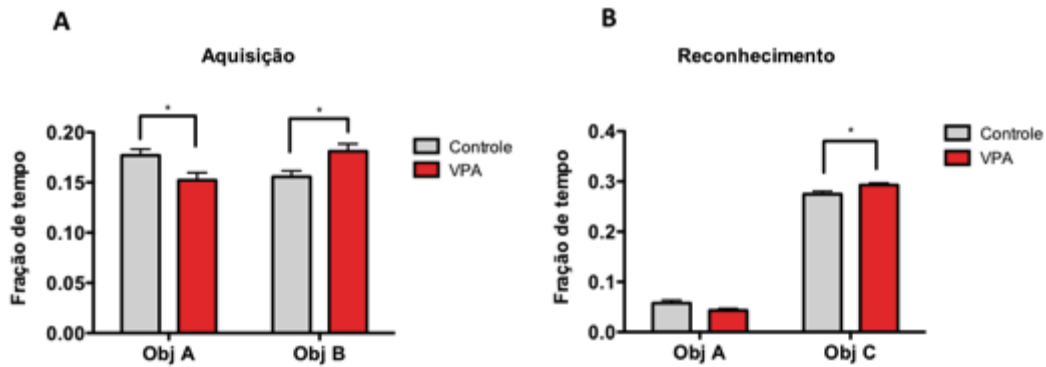
Quanto ao tempo de exploração dos objetos, observou-se que na fase de aquisição não houve diferença entre o tempo de exploração dos objetos A e B (Figura 21A; ANOVA de duas vias com medidas repetidas;  $F_{(1,53)}=0,21$ ,  $p=0,65$ ). Já na fase de reconhecimento houve diferença significativa entre os

grupos (ANOVA de duas vias com medidas repetidas;  $F_{(1,53)}=1,57$ ,  $p=0,21$ ), com teste *post-hoc* significativo ( $p<0,05$ ). Houve efeito significativo também entre os objetos (Figura 21B; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,53)} = 375,9$ ,  $p<0,0001$ ).



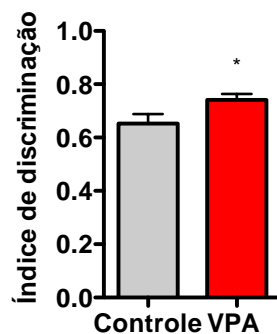
**Figura 21:** Tempo de exploração dos objetos durante as fases de **A** aquisição e **B** reconhecimento (Controle:  $n=28$ ; VPA:  $n=27$ ). Dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas e representam a média  $\pm$  erro padrão. \* $p<0,05$ .

Ao quantificar a porcentagem do tempo de exploração de cada objeto, verificamos uma diferença entre os grupos VPA e controle já na fase de aquisição, tendo o grupo VPA explorado menos o objeto A e mais o objeto B (Figura 22A; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,53)} = 0,14$ ,  $p=0,14$ ) com teste *post-hoc* significativo ( $p<0,05$ ). Ao analisar o mesmo parâmetro na fase de reconhecimento, observamos uma maior porcentagem de exploração do novo objeto pelos animais do grupo VPA (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,53)} = 9,28$ ,  $p=0,004$ ) com teste *post-hoc* significativo ( $p<0,05$ ). Houve efeito significativo também entre os objetos (Figura 22B; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,53)} = 1104$ ,  $p<0,0001$ ).



**Figura 22:** Porcentagem de exploração dos objetos durante as fases de **A** aquisição e **B** reconhecimento (Controle: n=28; VPA: n=27). Dados foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas e representam a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$ .

Calculamos também o índice de discriminação dos objetos, o qual consiste na razão entre a diferença do tempo de exploração e o tempo total de exploração dos objetos. Valores próximos a 1 representariam os animais que são capazes de discriminar o objeto novo do familiar, enquanto valores próximos a -1 representam animais que não discriminaram os objetos apresentados. Observamos que o índice de discriminação foi maior nos animais VPA, demonstrando que esses animais ficaram mais tempo explorando o novo objeto em relação ao grupo controle (Figura 23, teste *t*-Student,  $t_{(55)} = 0,15$ ,  $p = 0,04$ ).



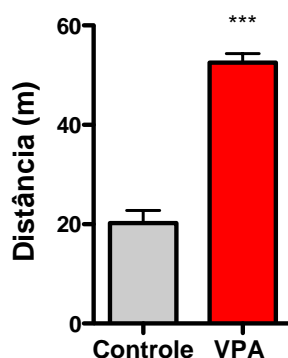
**Figura 23:** Índice de discriminação dos objetos durante a fase de reconhecimento (Controle: n=28; VPA: n=27). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$ .

## 5.2.4 INTERAÇÃO SOCIAL

No teste de interação social analisamos (1) a distância percorrida pelos animais durante o teste, (2) o tempo de permanência nas zonas do aparato e (3) a porcentagem de tempo de interação social e interação com o objeto.

### 5.2.4.1 INTERAÇÃO SOCIAL 1

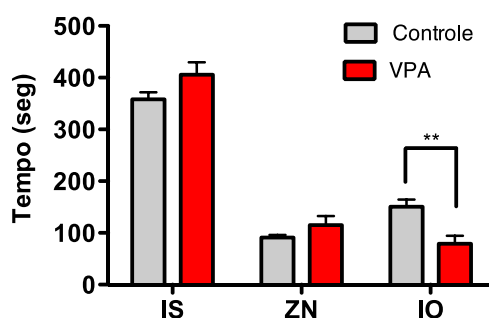
Ao avaliar a distância percorrida pelos animais durante o teste comportamental, novamente observamos um aumento na distância percorrida pelo grupo VPA quando comparado com o grupo controle (Figura 24; teste *t*-Student,  $t_{(24)}=9,13$ ,  $p<0,0001$ ).



**Figura 24:** Distância percorrida pelos animais durante o teste de interação social 1 (Controle:  $n=16$ ; VPA:  $n=10$ ). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão. \*\*\* $p<0,001$ .

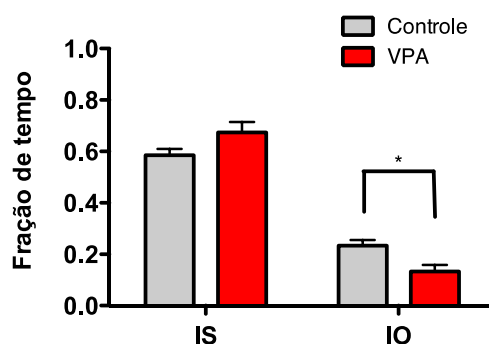
Quanto ao tempo de permanência nas zonas do aparato experimental observamos que os animais tratados com VPA permaneceram na zona de interação social (IS) pelo mesmo tempo que o grupo controle. Já o tempo gasto dentro na zona de interação com o objeto (IO), os animais VPA passaram menos tempo quando comparados ao grupo controle (Figura 25; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,48)} = 4,38$ ,  $p=0,05$ ), com teste *post-hoc* significativo ( $p<0,01$ ). Diferença estatística também foi verificada entre a

exploração das diferentes zonas do aparato comportamental (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,48)} = 148,4$ ,  $p < 0,0001$ ).



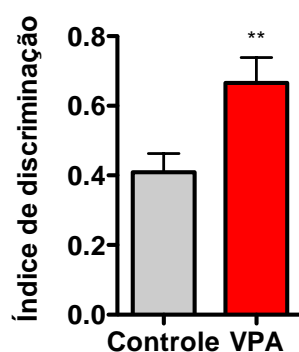
**Figura 25:** Tempo de permanência dos animais nas zonas do aparato de interação social (IS – interação social; ZN – zona neutra; IO – interação objeto) (Controle:  $n=16$ ; VPA:  $n=10$ ). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas e representam a média  $\pm$  erro padrão.  $**p < 0,01$ .

Ao analisar a porcentagem de tempo na qual os animais permaneceram na zona de interação social e interação com o objeto, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos na interação social (IS), porém o grupo VPA permaneceu por menor tempo na zona de interação com o objeto (IO) (Figura 26; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,24)} = 0,17$ ,  $p=0,68$ ), com teste *post-hoc* significativo ( $p < 0,05$ ). Diferença estatística também foi verificada entre a exploração das diferentes zonas do aparato comportamental (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,24)} = 146,7$ ,  $p < 0,0001$ ).



**Figura 26:** Porcentagem de tempo de exploração das zonas do objeto (IO) e social (IS) (Controle: n=16; VPA: n=10). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas e representam a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$ .

Também quantificamos o índice de discriminação social para esse teste, calculando a razão da diferença do tempo de interação social e interação com o objeto pelo tempo total de permanência das duas zonas. Valores próximos a 1 representam animais que tiveram preferência pela zona de interação social, enquanto valores próximos a -1 representam animais que tem preferência pela zona de interação com o objeto. Observamos que, contrariamente ao esperado, os animais VPA apresentaram uma preferência pela zona de interação social em relação aos animais controle (Figura 27, teste *t*-Student,  $t_{(24)}=2,89$ ,  $p=0,008$ ).



**Figura 27:** Índice de discriminação social entre as zonas de interação social e interação com o objeto durante o teste comportamental (Controle: n=16; VPA: n=10). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão. \*\* $p < 0,01$ .

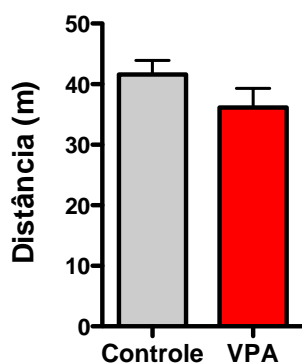
#### 5.2.4.2 INTERAÇÃO SOCIAL 2

Uma vez que a gaiola utilizada para isolar o animal não-familiar durante o teste de interação social também era um objeto que poderia servir como atrativo para os animais permanecerem na zona, resolvemos utilizar uma gaiola idêntica, porém vazia, na zona de interação com o objeto. Dessa forma,



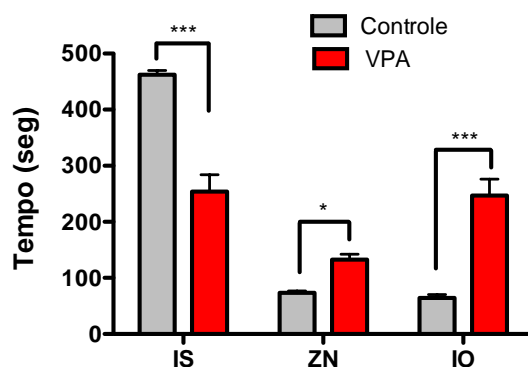
podemos saber se o tempo de permanência na zona de interação social é devido à presença do animal estranho ou do objeto que o isola.

Ao quantificar a distância total percorrida pelos animais durante o teste, não foi observada diferença estatística entre os grupos (teste *t*-Student,  $t_{(40)}=1,42$ ,  $p=0,16$ ) (Figura 28).



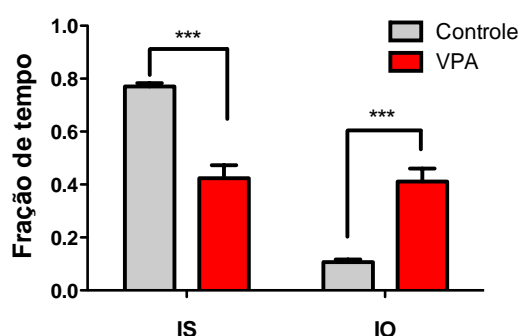
**Figura 28:** Distância total percorrida pelos animais durante o teste de interação social 2 (Controle:  $n=24$ ; VPA:  $n=18$ ). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão.

No que diz respeito ao tempo de permanência do animal nas zonas do aparato, os animais VPA permaneceram menos tempo na zona de interação social (IS) quando comparados com os animais controle. Os animais VPA também permaneceram por mais tempo na zona neutra (ZN) e de interação com o objeto (IO). Houve um efeito significativo de grupo (Figura 29; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,80)} = 10,49$ ,  $p=0,002$ ), assim como houve um efeito de zona (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,80)} = 97,57$ ,  $p<0,0001$ ). O teste *post-hoc* foi significativo nas três comparações (IS:  $p<0,001$ ; ZN:  $p<0,05$ ; IO:  $p<0,001$ ).



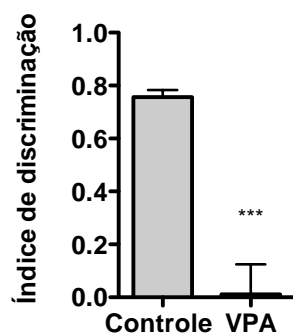
**Figura 29:** Tempo de permanência dos animais nas zonas do aparato de interação social (IS – interação social; ZN – zona neutra; IO – interação objeto) (Controle: n=24; VPA: n=18). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas e representam a média ± erro padrão. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Quanto à porcentagem de tempo que o animal permaneceu nas zonas de interação social e do objeto, observamos novamente um menor tempo de permanência do animal tratado na zona de interação social (IS) e maior tempo na zona de interação com o objeto (IO) quando em relação ao controle. Houve um efeito de grupo significativo (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,40)} = 5,97$ ,  $p=0,02$ ), assim como um efeito de zona (Figura 30; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,40)} = 59,57$ ,  $p<0,0001$ ). O teste *post-hoc* foi significativo nas duas comparações (IS:  $p<0,001$ ; IO:  $p<0,001$ ).



**Figura 30:** Porcentagem de tempo gasto pelos animais nas zonas do aparato de interação social (IS – interação social; IO – interação objeto) (Controle: n=24; VPA: n=18). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas e representam a média ± erro padrão. \*\*\*p<0,001.

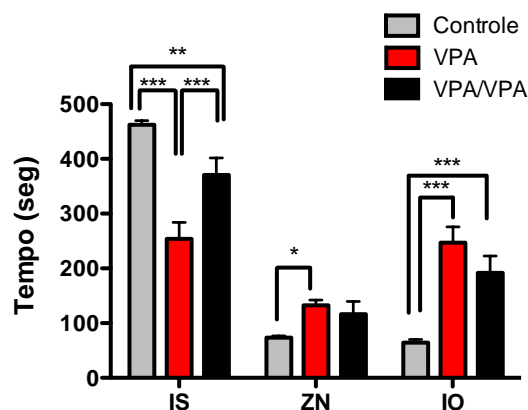
Ao calcular o índice de discriminação social para o teste de interação social 2 observamos que os animais VPA apresentaram uma preferência pela zona de interação com objeto bastante expressiva (Figura 31, teste *t*-Student,  $t_{(40)}=7,29$ ,  $p<0,0001$ ).



**Figura 31:** Índice de discriminação social entre as zonas de interação social e interação com o objeto durante o teste comportamental (Controle: n=24; VPA: n=18). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média ± erro padrão. \*\*\* $p < 0,001$ .

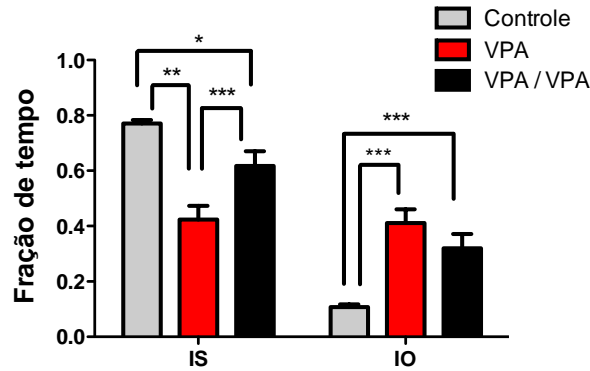
Também realizamos o teste de interação social em filhotes de ratos tratados com VPA (F1 de pais VPA; chamados de VPA/VPA) que casualmente cruzaram em nosso biotério. Este experimento não planejado nos possibilitou testar se o padrão de interação social dos animais VPA poderia ser herdado pela sua prole não exposta ao VPA durante a gestação.

Verificamos que esses animais VPA/VPA apresentaram um menor tempo de permanência na zona de interação social (IS) quando comparados com os animais controle, porém esse tempo foi superior em relação ao do grupo VPA. O tempo na zona de interação com o objeto (IO) foi estatisticamente significativo apenas quando comparado com o grupo controle, enquanto na zona neutra (ZN) não houve diferença estatística entre o grupo VPA/VPA e os outros. Observamos um efeito de grupo significativo (Figura 32; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(2,94)} = 11,36$ ,  $p < 0,0001$ ), assim como um efeito de zona (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(2,94)} = 91,38$ ,  $p < 0,0001$ ). O teste *post-hoc* foi significativo entre o grupo VPA/VPA e controle para IS ( $p < 0,01$ ) e IO ( $p < 0,001$ ), enquanto quando comparamos com o grupo VPA, esse efeito só foi significativo para IS ( $p < 0,001$ ).



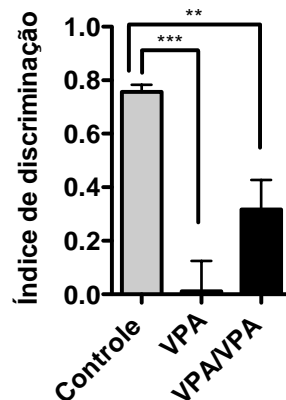
**Figura 32:** Tempo de permanência dos animais nas zonas do aparato de interação social (IS – interação social; ZN – zona neutra; IO – interação objeto) (Controle: n=24; VPA: n=18; VPA/VPA: n=8). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas e representam a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Em relação à porcentagem de tempo de interação social e com o objeto, o grupo VPA/VPA passou maior fração de seu tempo na zona de interação social (IS) quando comparado com o grupo VPA. Em relação ao grupo controle, essa porcentagem foi menor. Quanto à porcentagem de tempo de interação com o objeto (IO), este grupo passou mais tempo com o objeto do que o grupo controle, porém menor que o grupo VPA. Os dados mostram um efeito de grupo significativo (Figura 33; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(2,47)} = 10,02$ ,  $p < 0,0002$ ), assim como um efeito de zona (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(2,47)} = 53,51$ ,  $p < 0,0001$ ). O teste *post-hoc* foi significativo entre o grupo VPA/VPA e controle para IS ( $p < 0,05$ ) e IO ( $p < 0,001$ ), enquanto quando comparamos com o grupo VPA, esse efeito só foi significativo para IS ( $p < 0,001$ ).



**Figura 33:** Porcentagem de tempo gasto pelos animais nas zonas do aparato de interação social (IS – interação social; IO – interação objeto) (Controle: n=24; VPA: n=18; VPA/VPA: n=8). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas e representam a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

O índice de discriminação social para o grupo VPA/VPA revelou que estes apresentaram uma preferência pela zona de interação com objeto maior que a observada pelos animais controle, porém sem diferença estatística em relação aos animais VPA (Figura 34, ANOVA de uma via,  $F = 27,41$ ,  $p < 0,0001$ ). O teste *post-hoc* foi significativo entre o grupo VPA e controle ( $p < 0,001$ ) e VPA/VPA e controle ( $p < 0,01$ ).

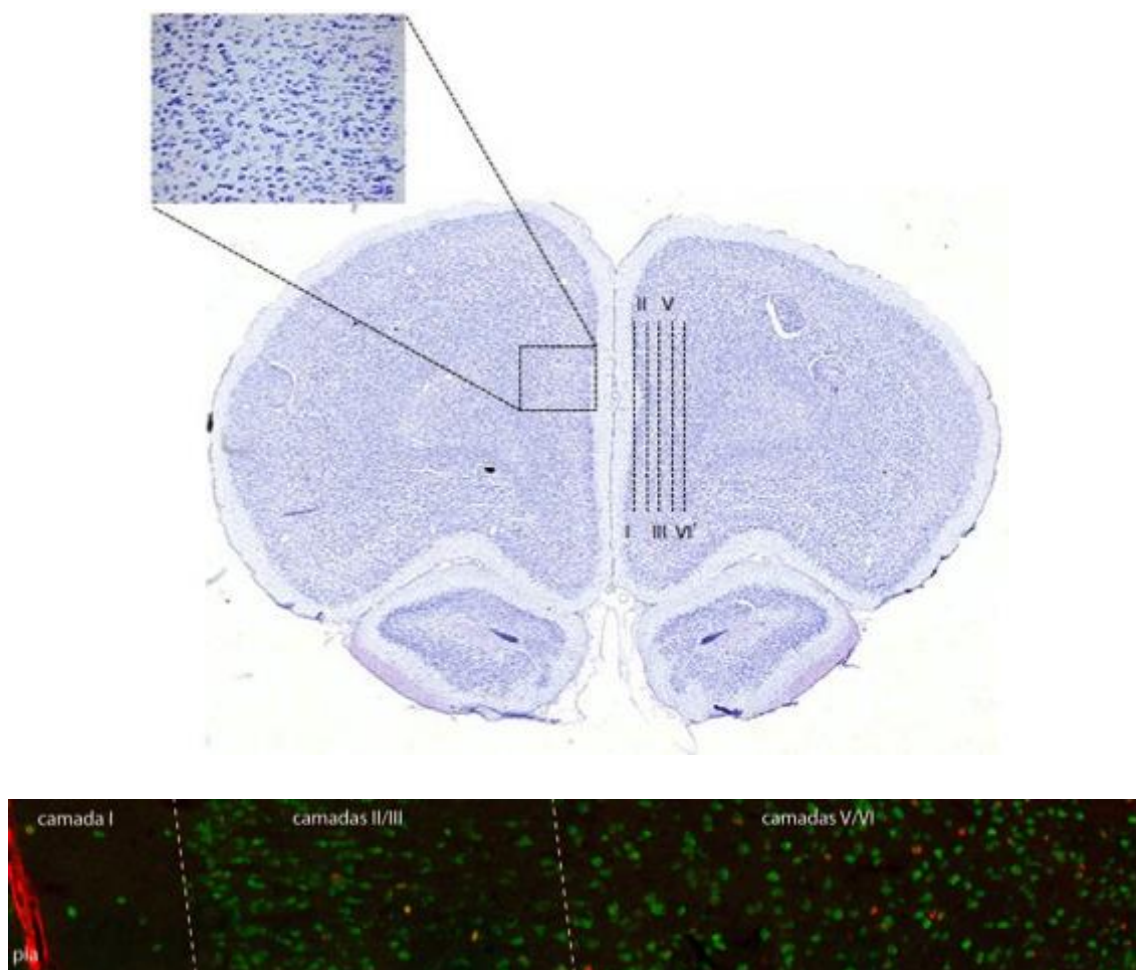


**Figura 34:** Índice de discriminação social entre as zonas de interação social e interação com o objeto durante o teste comportamental (Controle: n=24; VPA: n=18; VPA/VPA: n=8). Dados foram analisados por ANOVA de uma via e representam a média  $\pm$  erro padrão. \*\*\* $p < 0,0001$ .

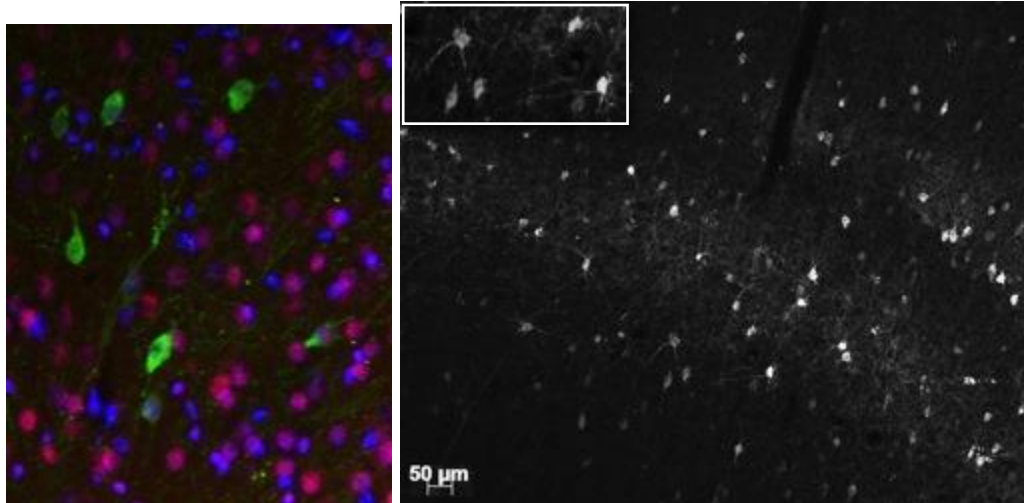
## 5.3 QUANTIFICAÇÃO CELULAR

### 5.3.1 PARVALBUMINA

Realizamos a quantificação de interneurônios parvalbumina positivos (PARV+) no córtex pré-frontal medial (CPFm) e em suas subdivisões (córtex cingulado anterior – Cg; córtex pré-límbico – PL, e córtex infra-límbico – IL). Quantificamos a densidade desses neurônios quanto à área, quanto às sub-áreas e quanto às camadas (I, II/III e V/VI), como representado no esquema abaixo (Figuras 35 e 36).

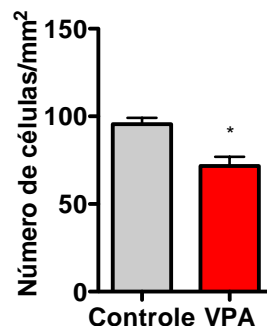


**Figura 35:** Representação histológica do CPFm em um animal VPA e suas respectivas camadas corticais.



**Figura 36:** Neurônios positivos para parvalbumina (PARV+) no córtex pré-frontal em corte coronal de um animal controle.

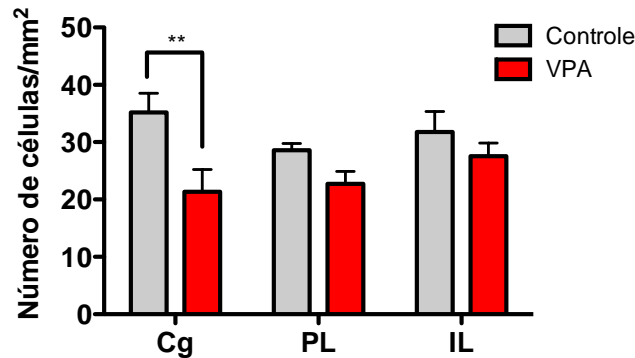
Nossos dados mostram uma redução na densidade de neurônios PARV+ no CPFm no grupo VPA quando comparamos com o grupo controle (Figura 37, Controle:  $83,58 \pm 2,42$  células/mm<sup>2</sup>; VPA:  $71,64 \pm 4,90$  células/mm<sup>2</sup>) (teste *t*-Student,  $t_{(10)}=1,42$ ,  $p=0,16$ ).



**Figura 37:** Densidade de células PARV+ no CPFm (Controle: n=6; VPA: n=6). Dados foram analisados por teste *t*-Student e representam a média  $\pm$  erro padrão. \*\* $p<0,01$ .

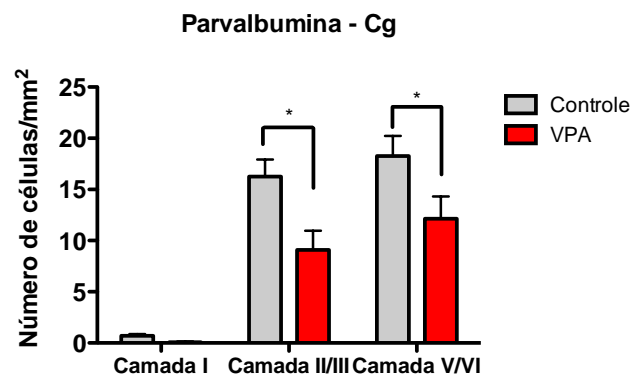
Ao quantificar a densidade de células agrupada por região do CPFm verificamos que a diminuição de neurônios PARV+ se dá principalmente no Cg (Figura 38; Controle:  $35,21 \pm 3,07$  células/mm<sup>2</sup>; VPA:  $21,33 \pm 3,60$  células/mm<sup>2</sup>) dos animais VPA. Nas demais regiões, não observamos diferença estatística embora tenha havido uma tendência a diminuição (PL: controle:  $28,61 \pm 1,07$  células/mm<sup>2</sup>; VPA:  $22,73 \pm 1,07$  células/mm<sup>2</sup>; IL: controle:  $31,75 \pm 3,33$

células/mm<sup>2</sup>; VPA: 27,57 ± 2,09 células/mm<sup>2</sup>; ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,20)} = 13,81$ ,  $p=0,004$ ). O teste *post-hoc* foi significativo entre o grupos no Cg ( $p<0,01$ ).



**Figura 38:** Densidade de neurônios PARV+ no Cg, PL e IL (Controle: n=6; VPA: n=6). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, e representam a média ± erro padrão. \*\* $p<0,01$ . Cg: córtex cingulado anterior; PL: córtex pré-límbico, e IL: córtex infra-límbico.

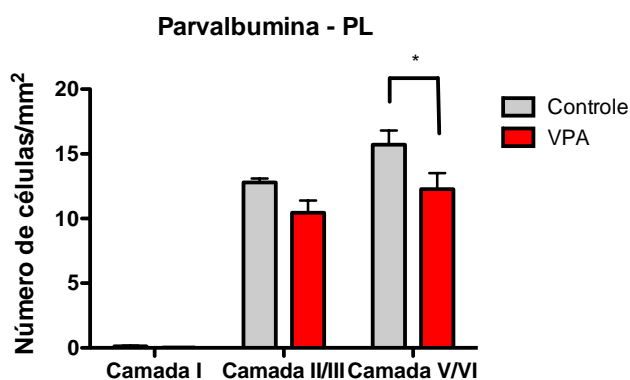
Quantificamos também a densidade de células PARV+ nas diferentes camadas dessas sub-regiões. Os resultados mostram que, no grupo VPA, a redução dos interneurônios no Cg ocorreu tanto nas camadas II/III, como nas camadas V/VI (Figura 39; camada I: controle: 0,70 ± 0,17 células/mm<sup>2</sup>; VPA: 0,08 ± 0,08 células/mm<sup>2</sup>; camada II/III: controle: 16,25 ± 1,69 células/mm<sup>2</sup>; VPA: 9,10 ± 1,87 células/mm<sup>2</sup>; camada V/VI: controle: 18,25 ± 2,00 células/mm<sup>2</sup>; VPA: 12,14 ± 2,19 células/mm<sup>2</sup>) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,20)} = 7,40$ ,  $p=0,002$ ). O teste *post-hoc* foi significativo entre as camadas II/III, assim como nas V/VI ( $p<0,05$ ).





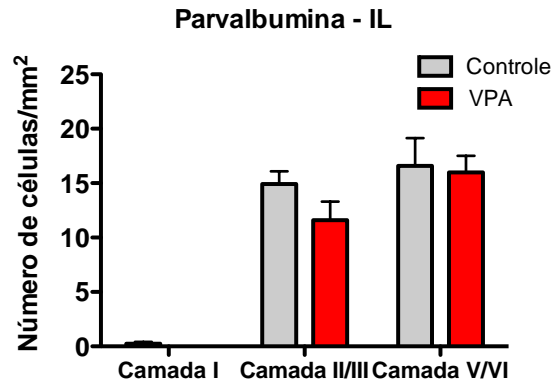
**Figura 39:** Densidade de células PARV+ no Cg (Controle: n=6; VPA: n=6) (Cg: córtex cingulado anterior). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, e representam a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$

No PL, foi verificado uma redução na densidade de interneurônios PARV+ apenas nas camadas V/VI do grupo VPA (Figura 40; camada I: controle:  $0,12 \pm 0,05$  células/mm<sup>2</sup>; VPA:  $0,02 \pm 0,96$  células/mm<sup>2</sup>; camada II/III: controle:  $12,79 \pm 0,30$  células/mm<sup>2</sup>; VPA:  $15,70 \pm 1,11$  células/mm<sup>2</sup>; camada V/VI: controle:  $15,70 \pm 1,11$  células/mm<sup>2</sup>; VPA:  $12,28 \pm 1,23$  células/mm<sup>2</sup>) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,20)} = 5,83$ ,  $p = 0,06$ ). O teste *post-hoc* foi significativo entre as camadas II/III, assim como nas V/VI ( $p < 0,05$ ).



**Figura 40:** Densidade de células PARV+ no PL (Controle: n=6; VPA: n=6) (PL: córtex pré-límbico). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, e representam a média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,05$

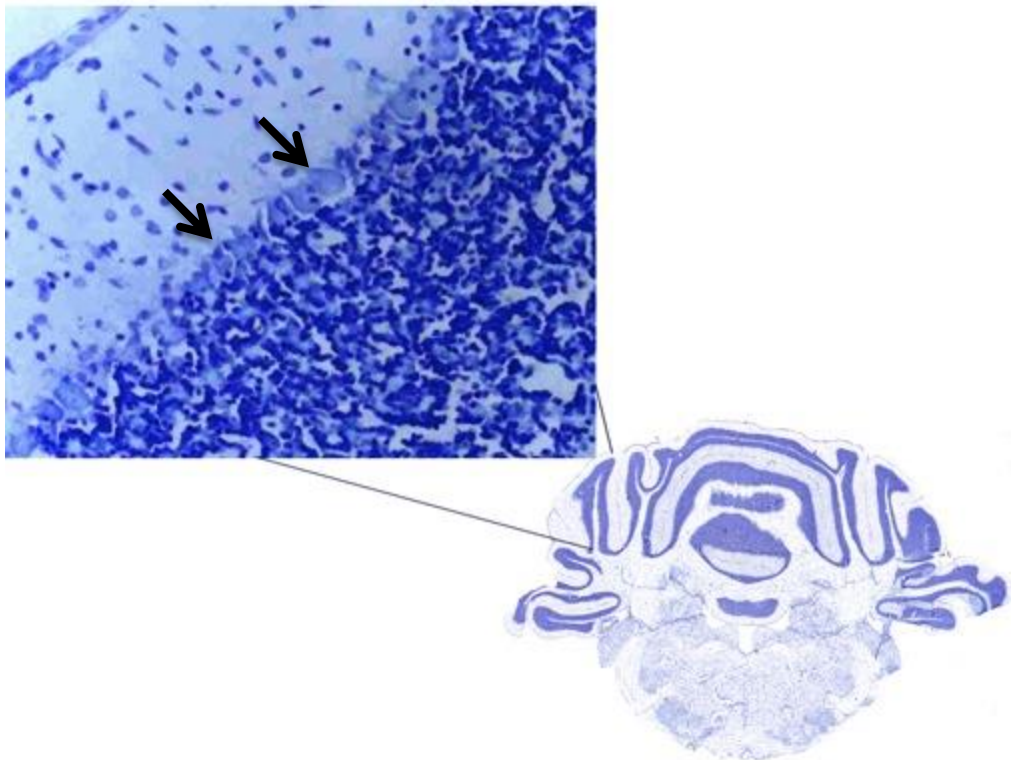
Já no IL não houve diferença significativamente estatística entre os grupos para nenhuma das camadas (Figura 41; camada I: controle:  $0,23 \pm 0,17$  células/mm<sup>2</sup>; VPA:  $0,00 \pm 0,00$  células/mm<sup>2</sup>; camada II/III: controle:  $14,93 \pm 1,17$  células/mm<sup>2</sup>; VPA:  $11,58 \pm 1,73$  células/mm<sup>2</sup>; camada V/VI: controle:  $16,59 \pm 2,56$  células/mm<sup>2</sup>; VPA:  $15,99 \pm 1,53$  células/mm<sup>2</sup>) (ANOVA de duas vias com medidas repetidas,  $F_{(1,20)} = 0,97$ ,  $p = 0,35$ ).



**Figura 41:** Densidade de células PARV+ no IL (controle: n=6; VPA: n=6) (IL: córtex infra-límbico). Dados foram analisados por teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, e representam a média  $\pm$  erro padrão.

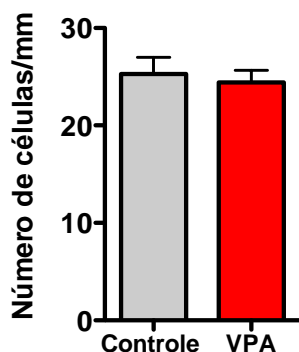
### 5.3.2 CÉLULAS DE PURKINJE

Realizamos a quantificação de células de Purkinje na área Crus 1 do cerebelo (Figura 42). Essa região tem sido relatada por estar envolvida com resposta a estimulação táctil na face, além de estar envolvida em projeções para o CPFm (Bart P. Vos 1999) (Antonia L. Edge 2003).



**Figura 42:** Representação histológica das células de Purkinje na região Crus 1 do cerebelo em um animal VPA.

Nossos dados mostraram que não houve diferença estatística entre a densidade de células de Purkinje entre os grupos (Figura 43; teste *t*-Student,  $t_{(5)}=0,40$ ,  $p=0,70$ ).

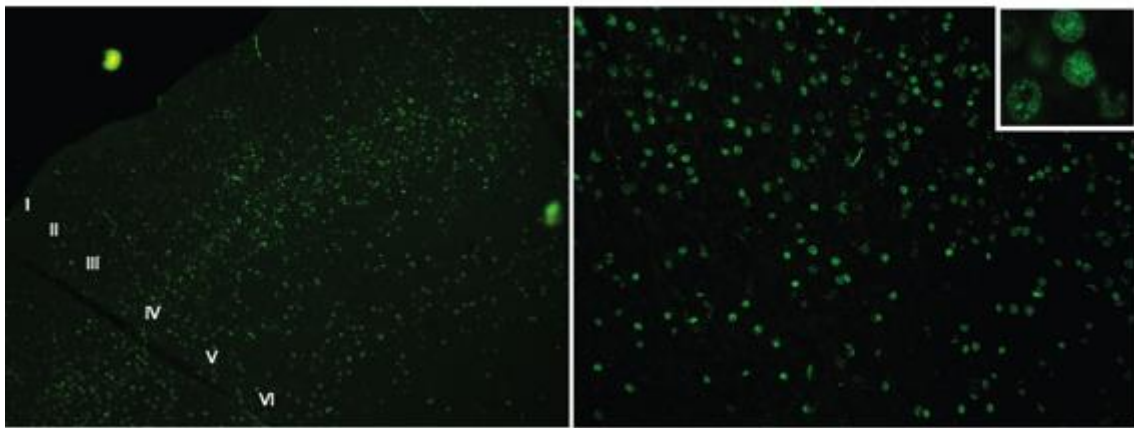


**Figura 43:** Densidade de células de Purkinje na região Crus 1 do cerebelo (Controle:  $n=6$ ; VPA:  $n=6$ ). Dados foram analisados por teste *t*-Student, e representam a média  $\pm$  erro padrão.

#### 5.4 PROLIFERAÇÃO NEURONAL

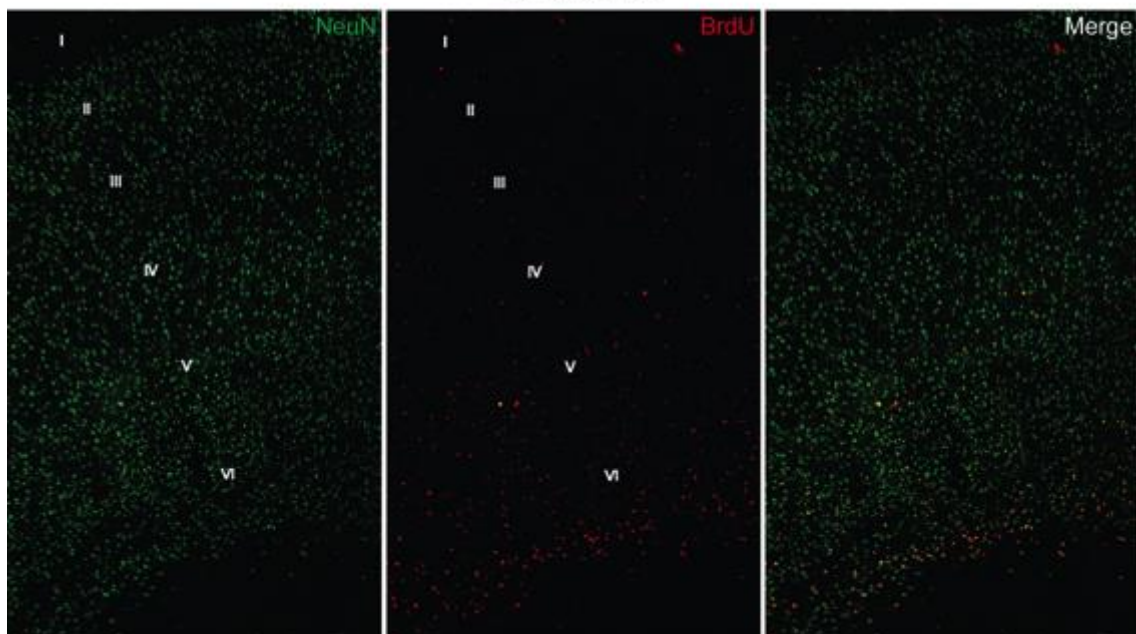
Em experimento-piloto mostramos que a injeção de BrdU em E15 marcou uma grande população de neurônios corticais quando analisamos em PND15 (Figura 44). Portanto, procedemos com a injeção de BrdU em animais controle e VPA em dois momentos: no dia embrionário E12 (BrdU/E12) e em E15 (BrdU/E15) com o objetivo de marcar proliferação neuronal no córtex. Encontramos células positivas para BrdU e NeuN em ambos grupos controle BrdU/E12 e BrdU/E15. A marcação em E12 ocorreu predominantemente nas camadas profundas, V-VI (Figura 45), enquanto a marcação após injeção em E15 ocorreu tanto em camadas profundas quanto nas camadas mais superficiais II/III (Figura 46).

Controle BrdU E15 - Análise em P15

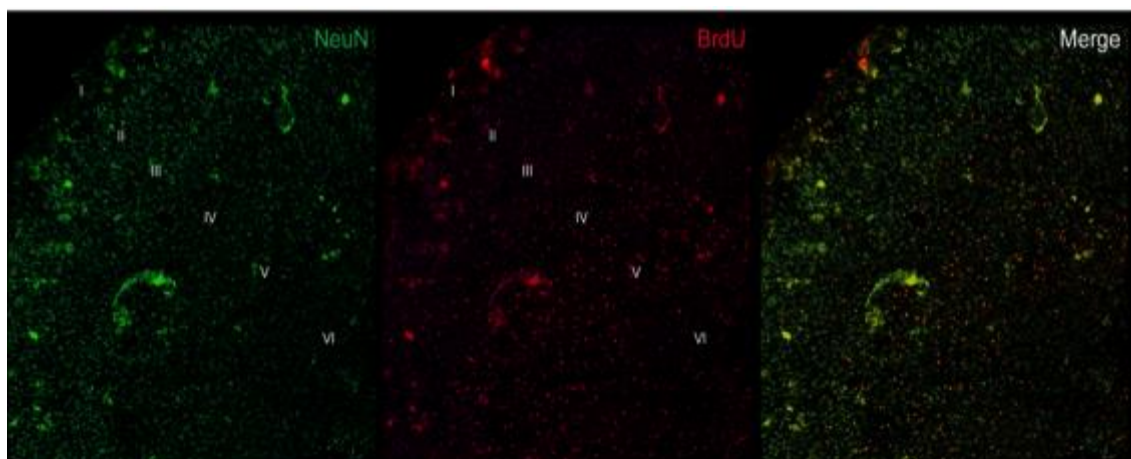


**Figura 44:** Padronização de Imunofluorescência para BrdU (verde) no cortex de animal controle BrdU/E15 e foi perfundido em PND15.

Controle E12



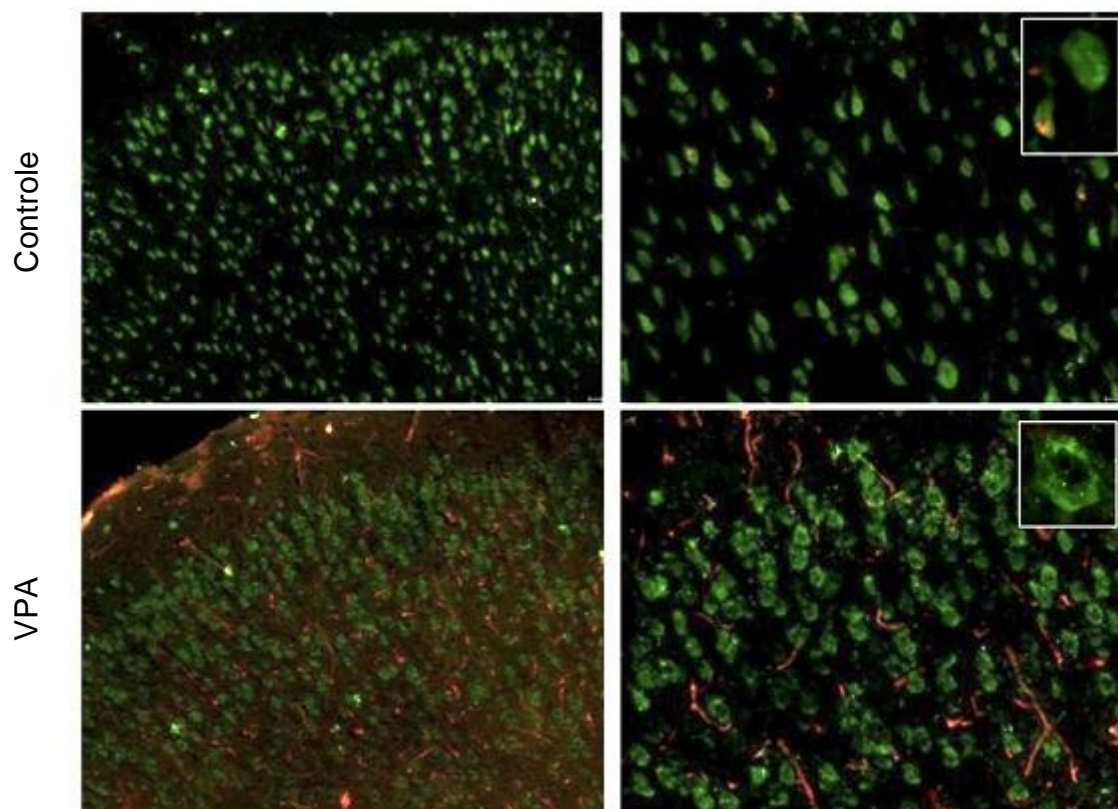
**Figura 45:** Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) no cortex motor em animal controle BrdU/E12.



**Figura 46:** Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) no córtex motor em animal controle BrdU/E15.

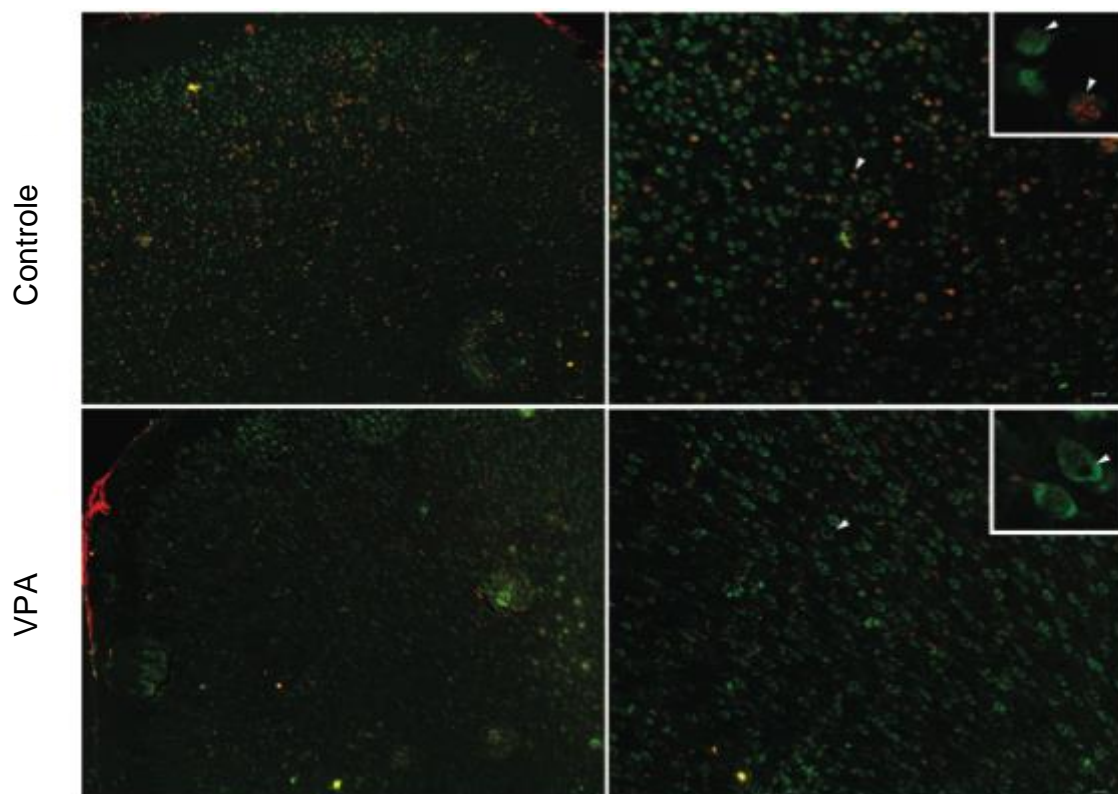
Ao analisar a imunofluorescência para BrdU e NeuN nos animais VPA, observamos que esta apresentou um padrão de marcação diferente do observado nos animais controle, como mostrado nas figuras 47 e 48. Não foi realizada a quantificação de células marcadas positivamente para BrdU e NeuN nos grupos estudados, porém a análise qualitativa dessas amostras revelou que a marcação para BrdU no córtex (incluindo CPFm e córtex motor) foi praticamente inexistente no grupo VPA. Isto foi observado tanto no grupo que recebeu injeção de BrdU em E12 quanto no grupo que recebeu injeção em E15. Acreditamos que a ausência de marcação para BrdU nos ratos VPA não foi decorrente de problemas na administração/absorção da droga ou a problemas com o anticorpo, uma vez que observamos marcação em neurônios de Purkinje no cerebelo destes animais (Figura 49). Além disto, observamos que grande parte dos neurônios corticais marcados com NeuN no grupo VPA apresentaram marcação tipicamente distribuída no citoplasma, enquanto nos animais controle o número de células com este padrão de marcação foi visivelmente menor (ver insets nas Figuras 47 e 48). Pretendemos confirmar este fenômeno e quantificá-lo em um novo conjunto de tecidos.

BrdU em E12

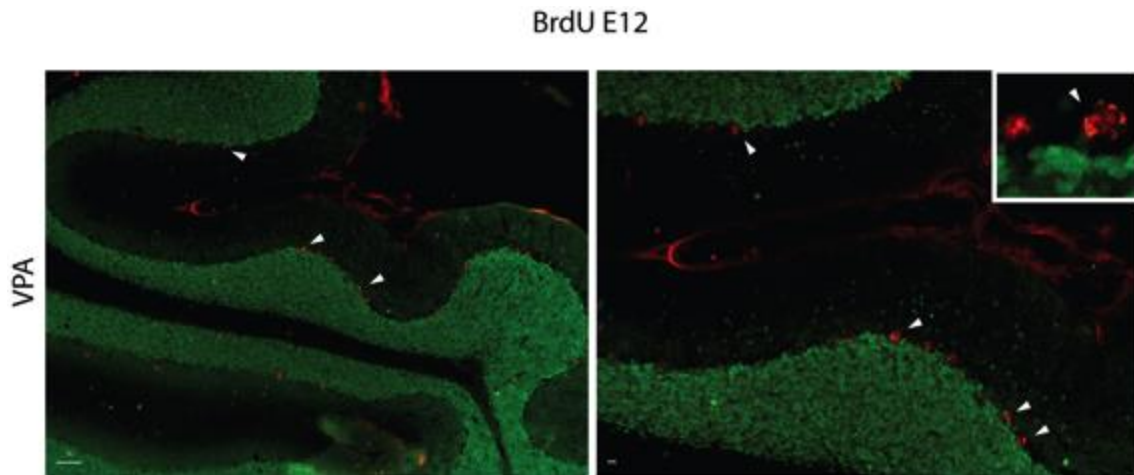


**Figura 47:** Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) no córtex motor em animal controle e VPA BrdU/E12.

BrdU em E15



**Figura 48:** Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) no córtex motor em animal controle e VPA BrdU/E15.



**Figura 49:** Imunofluorescência para BrdU (vermelho) e NeuN (verde) na região PFI do hemisfério cerebelar de um animal VPA BrdU/E12. As pontas das setas indicam células de Purkinje BrdU-positivas. PFI: Parafloculo.

## 6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho buscamos validar o modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao VPA em tarefas comportamentais de caráter exploratório, cognitivo e social, assim como caracterizar a densidade de interneurônios PARV+ no córtex pré-frontal medial e cerebelo no modelo animal.

Nossos resultados mostraram que a exposição pré-natal ao VPA foi capaz de promover modificações de caráter comportamental e morfológico nesses animais. (1) O efeito do VPA pôde ser observado durante a gestação das ratas, uma vez que algumas não chegaram a dar à luz, assim como houve o nascimento de animais com más-formações graves, os quais foram canibalizados pelas suas mães (dados não quantificados); (2) os animais que foram expostos ao VPA durante o período pré-natal apresentaram, em grande parte, a cauda torta, o que é um bom marcador morfológico da ação da droga durante o período gestacional; (3) houve redução do peso nos animais VPA; (4) comportamento de hiperlocomoção; (5) déficit de interação social, assim como (6) redução de interneurônios PARV+ nos animais VPA pré-púberes.

Não foi observada alteração desencadeada pelo VPA quanto ao número de animais nascidos por prole, assim como diferença do número de machos e fêmeas gerados por prole. A observação macroscópica dos animais revelou a presença da cauda torta nos animais expostos ao VPA no período pré-natal, característica já relatada em trabalhos prévios (Sonoda, 1990) (Kim et al, 2013). Na avaliação do desenvolvimento pós-natal não houve atraso na abertura de olhos desses animais, fato contrário ao observado por Schneider e colaboradores. Porém, pudemos observar uma diminuição significativa no peso dos animais a partir de 21 dias pós-natal (P21). Essa diferença entre o grupo controle e tratado permaneceu quando comparamos machos e fêmeas separadamente, mostrando não haver influência do sexo para esse parâmetro.

Há relatos na literatura de diminuição do peso corporal dos animais VPA, sendo essa diferença estatisticamente significativa a partir de P23 (Schneider et al, 2005). Outros pesquisadores já não encontraram diferença no peso



corporal entre os animais controle e tratado, e sim no peso do encéfalo desses animais, havendo nesse caso influência do tratamento e do sexo dos animais (Mychasiuk et al, 2012).

No teste de atividade exploratória e locomotora verificamos um aumento na distância percorrida pelos animais VPA, demonstrando um perfil de hiperlocomoção nesses animais. Esse perfil já foi relatado por outros grupos que induzem o autismo pela exposição intra-uterina ao VPA (Kim, Park et al. 2013), assim como nos modelos genéticos, como é o caso dos camundongos knockout para *CNTNAP2* (Penagarikano et al, 2011). Quando analisamos o número de explorações realizadas pelo animal, observamos uma redução no número de farejamentos nos animais VPA. Ao analisar o tempo de permanência nas atividades de exploração não observamos diferença entre os grupos para nenhum dos aspectos. Estes achados estão de acordo relatos da literatura. Schneider e colaboradores observaram uma maior locomoção nos animais VPA durante a tarefa comportamental, assim como também foi observado uma redução no comportamento exploratório desses animais, tanto no número de levantadas como no número de farejadas realizadas (Schneider et al, 2005).

O comportamento de auto-limpeza foi o parâmetro que utilizamos para avaliar a ocorrência de movimentos repetitivos e estereotipados realizados pelos animais. Ao avaliar a auto-limpeza no grupo VPA, observamos uma menor frequência de eventos realizados, porém o tempo de permanência nesses eventos se mostrou prolongado quando comparamos com o grupo controle. Esse tipo de comportamento também é observado no modelo animal de camundongos da linhagem BTBR, o qual apresenta déficits comportamentais semelhantes aos observados em pacientes com autismo (McFarlane et al, 2008).

No teste de reconhecimento de objetos tivemos como interesse principal avaliar a capacidade dos animais em distinguir objetos familiares do não-familiar, de forma a detectar a possível ocorrência de déficit na memória de trabalho dos mesmos. Inicialmente observamos que os animais VPA apresentaram hiperlocomoção nas duas fases do teste (aquisição e

reconhecimento), confirmando resultados anteriormente no campo aberto. Quanto aos parâmetros de exploração dos objetos, tanto o grupo VPA como o controle foram capazes de reconhecer o novo objeto, demonstrando que não há comprometimento na memória de trabalho desses animais. Um fato interessante a ser observado é que quando analisamos a porcentagem do tempo de exploração dos objetos (Figura 21), os animais VPA apresentaram interesse restrito por um dos objetos expostos durante a fase de aquisição: houve uma preferência em explorar mais o objeto B do que o objeto A, mesmo os dois sendo idênticos. Já na fase de reconhecimento, o grupo VPA apresentou maior interesse em explorar o novo objeto quando comparado com o grupo controle.

Em recente trabalho desenvolvido por Mychasiuk e colaboradores, os pesquisadores utilizaram ratos Long-Evans e realizaram o teste de reconhecimento de objetos nesses animais. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos quanto ao tempo de exploração do objeto familiar e não-familiar. A única diferença encontrada foi quanto ao número de explorações realizadas pelo animal VPA no novo objeto, que se mostrou superior à quantidade de explorações realizadas pelos animais controle. Esse fato se assemelha aos nossos dados, já que os animais VPA também exploraram mais o novo objeto durante a fase de reconhecimento (Mychasiuk et al, 2012).

O teste de interação social avalia a preferência do animal em interagir com um objeto ou interagir com um animal desconhecido. Realizamos dois testes de interação social, modificando apenas o objeto utilizado para servir de interação com o animal teste. No teste de interação social 1, o primeiro parâmetro que medimos foi o de distância percorrida e nele observamos que os animais VPA novamente apresentaram um padrão de hiperlocomoção quando comparados com os controles. Ao avaliar o tempo de permanência dos animais em cada zona do aparato experimental, observamos que o grupo tratado permaneceu na zona de interação social de maneira semelhante ao grupo controle. A diferença entre os grupos foi observada apenas na interação com o objeto, onde os animais VPA permaneceram por menos tempo na área do objeto quando comparados com o grupo controle. O mesmo se repetiu quando

avaliamos a porcentagem de tempo que os animais permaneceram em interação social ou em interação com o objeto.

O fato de ter havido menor exploração do objeto pelos animais VPA levantou as seguintes hipóteses: (1) os animais VPA realmente preferem interagir com o animal estranho, ou (2) os animais VPA têm preferência por interagir com um objeto sensorialmente simples como a gaiola metálica a interagir com o objeto sensorialmente mais rico, presente na zona oposta. Como forma de resolver esse questionamento, realizamos um novo teste de interação social, no qual o objeto posicionado na zona de interação com o objeto foi uma gaiola idêntica à utilizada para isolar o animal estranho na zona de interação social.

Os novos dados revelaram inicialmente que, ao contrário do observado em todos os outros testes comportamentais realizados, não houve uma hiperlocomoção apresentada pelos animais VPA. Ao analisar o tempo de permanência nas zonas, verificamos uma redução significativa no tempo de permanência na zona de interação social pelos animais VPA, assim como um aumento de permanência na zona neutra e na de interação com o objeto. Assim, acreditamos que os animais VPA, no teste de interação social 1, evitaram interagir com o objeto sensorialmente rico, e se deslocaram para o objeto mais simples que restringia o animal não familiar. Este efeito aversivo pode ser explicado pela hipersensibilidade sensorial observada em animais VPA (Schneider et al, 2005, Markram et al, 2010). A análise da porcentagem de tempo de interação social e interação com o objeto novamente revelou um menor tempo de interação com o rato não familiar comparando a interação com o objeto.

Nossos achados confirmam resultados anteriores mostrando uma redução na preferência por interação social em animais tratados com VPA. O primeiro relato foi realizado por Schneider e colaboradores (Schneider et al, 2005), onde os autores observaram uma maior latência para inicialização da interação social entre pares de animais VPA ou controles, quando foram permitidos interagir numa arena por 15 minutos. Esta diferença foi observada tanto em ratos na fase pré-púbere (P30-P35), como na fase adulta (a partir de

P90). Bambini-Júnior e colaboradores também realizaram em sua pesquisa testes de interação social no modelo VPA. A metodologia utilizada foi a mesma utilizada em nosso trabalho, na qual utilizou um aparato experimental subdividido em três zonas de interação com um animal não familiar em uma extremidade e uma gaiola de contenção na outra. Seus resultados revelaram que os animais tratados com VPA apresentaram um menor tempo de interação com o não-familiar quando comparado com os ratos controle. Porém não foi observada diferença quanto à exploração do objeto entre os grupos experimentais (Bambini-Junior et al, 2011).

Ainda com relação ao comportamento social dos animais expostos ao VPA, avaliamos a sociabilidade na geração F1 VPA - ou seja, em animais nascidos do cruzamento de dois ratos expostos ao VPA durante o período embrionário, e denominados VPA/VPA. No teste de interação social observamos que estes animais apresentaram um padrão comportamental intermediário ao observado nos animais controle e VPA. Eles tiveram uma maior permanência na zona de interação social quando comparados com o grupo VPA, porém significativamente menor quando comparados ao grupo controle. Também observamos uma maior permanência na zona de interação com o objeto se comparado ao grupo controle, e não houve diferença estatística quando comparados com o grupo VPA. A análise da porcentagem de tempo de interação social e interação com o objeto também revelou um comportamento intermediário dos animais VPA/VPA, nos quais a porcentagem de interação social foi maior que a apresentada pelo grupo VPA, e menor quando comparada com o controle. Já a porcentagem de interação com o objeto foi significativamente maior quando comparamos com o grupo controle.

Até o presente momento, este é o primeiro relato da possibilidade de transmissão parental de sociabilidade em modelos experimentais de autismo. Um possível mecanismo que explicaria este fenômeno seria a ocorrência de modificações epigenéticas devido a exposição ao VPA que estariam sendo transmitidas para os animais da geração F1, levando ao surgimento de alterações comportamentais, porém com efeitos mais discretos do que os observados nos pais. Esses dados reforçam ainda mais a interação entre

fatores ambientais e a modulação de base genética presente na expressão do autismo.

Alterações histopatológicas no modelo animal de autismo induzido por VPA têm sido relatadas desde o início da sua descoberta por Rodier em 1996, mostrando-se tanto macroscópicas quanto microscópicas. Neste modelo observou-se tanto uma redução do volume cerebral (Ingram et al, 2000), quanto uma redução do peso encefálico (Rodier et al, 1996). Além disso, o VPA parece promover modificações na estrutura cortical dos animais. Hara e colaboradores observaram uma redução do número de células no córtex somatosensorial de machos VPA, não tendo sido observado este efeito nas fêmeas expostas à droga durante o período intra-uterino. Ao quantificar as células no CPFm, por sua vez, os autores mostraram uma diminuição do número global de células independente do sexo dos animais (Hara et al, 2012).

O CPFm de roedores corresponde hodológica e neuroquimicamente ao CPF dorso-lateral de primatas, e tem importante papel na formação de memórias, atenção, planejamento de ações futuras e controle de comportamento social, que envolve coordenação cognitivo-emocional. Algumas destas funções estão diretamente relacionados com a fisiopatologia do autismo. O CPFm é subdividido em três regiões com características funcionais específicas. O córtex cingulado anterior (Cg), é responsável principalmente pela regulação do controle motor e memória; o córtex pré-límbico (PL), recebe projeções do hipocampo amígdala, e está envolvido principalmente na integração de funções cognitivas e, por fim, o córtex infra-límbico (IL), responsável pela integração de informações viscerais. Importante ressaltar que lesões no CPFm podem levar, entre outros sintomas, à perda de habilidades sociais em primatas não-humanos (Bachevalier et al, 1986).

Uma vez que não existem relatos na literatura sobre alterações neuronais no CPFm de animais tratados com VPA durante a gestação, quantificamos a distribuição de interneurônios imunorreativos para parvalbumina no CPFm destes animais. Realizamos a quantificação destas células com o propósito de investigar a presença de um possível desbalanço entre excitação e inibição neuronal nesta circuitaria cortical. Nosso trabalho

mostrou uma redução do número de interneurônios parvalbumina-positivos no CPFm de ratos tratados com VPA. Ao analisar essa distribuição nas sub-regiões do CPFm, verificamos uma redução principalmente no córtex cingulado (Cg), no qual há um menor número tanto nas camadas II/III como nas camadas V/VI. Já o córtex pré-límbico (PL) apresentou diminuição de neurônios parvalbumina-positivos apenas nas camadas V/VI. O córtex infra-límbico (IL) não apresentou alteração estatisticamente significativa.

Considerando que 40% dos neurônios GABAérgicos corticais são imunorreativos para parvalbumina e que estas células possuem campos de projeção axonal restritos ao soma e ao segmento inicial do axônio, sua influência inibitória sobre os neurônios piramidais do córtex é muito forte (Gonchar et al, 2007). Além disso, aferentes talâmicos, hipocampais, tegmentais (da área tegmental ventral, VTA) e amígdalóides terminam predominantemente nas camadas III e V do CPFm (Jay et al, 1991; Carr et al, 1996; Kuroda et al, 1996), modulando o processamento fronto-cortical. Assim, a redução de neurônios PARV-positivos observada neste estudo principalmente nas camadas II/III e V/VI sugerem uma hiper-excitabilidade local no CPFm que podem afetar a comunicação e o processamento de informações entre estas áreas. Estes efeitos poderiam a princípio, levar a disfunções cognitivas, emocionais e motivacionais, algumas delas já observadas no modelo VPA (Schneider et al, 2005, Rinaldi et al, 2008).

Gogolla e colaboradores recentemente quantificaram imunorreatividade para parvalbumina no córtex parietal em dois modelos de autismo: no induzido por VPA em camundongos e no camundongo *knockout* para o gene da neuroigina-3. Seus resultados mostraram uma redução significativa no número global de neurônios do córtex parietal-occipital, presente particularmente em um dos hemisférios. Os autores também quantificaram no hipocampo, mas não observaram alteração do número de neurônios na região CA1 (Gogolla et al, 2009). Portanto, a redução quantitativa de neurônios inibitórios em estruturas corticais que estão constantemente recebendo projeções excitatórias do tálamo suporta a teoria proposta pelo grupo de Markram de que a sintomatologia do autismo seria reflexo de um encéfalo altamente excitável a nível local (Rinaldi et al, 2008).

Observamos uma alteração no padrão de marcação para BrdU na imunofluorescência dos grupos VPA que receberam a injeção de BrdU em E12 e em E15 quando comparamos com os controles. Não observamos marcação no córtex desses animais, e ao analisar o bulbo olfatório encontramos células que incorporaram o BrdU apenas no grupo que recebeu a injeção em E12. No grupo VPA cuja injeção de BrdU ocorreu em E15, encontramos marcação em células de Purkinje, porém os dados não estão quantificados.

Estudos em cultura de células analisaram os efeitos do VPA na proliferação de progenitores neurais do córtex cerebral de ratos, e observaram que a droga, na concentração de 1mM foi capaz de induzir diferenciação e reduzir a proliferação desses progenitores. O VPA foi capaz de reduzir em quase 60% o número de células marcadas com BrdU, e que estavam em processo de proliferação celular (Jung et al, 2008).

Baseado nesses dados, podemos trabalhar com a hipótese de que o VPA estar promovendo a morte das células que incorporaram o BrdU no período da injeção, ou que esse efeito pode estar ocorrendo pela redução da proliferação neuronal induzida pelo VPA durante esse período. Novas análises necessitam ser feitas para responder esta pergunta.

As novas descobertas realizadas em modelos animais tem como principal objetivo propor terapias que busquem reduzir as alterações fisiopatológicas do autismo através de um equilíbrio na excitação e inibição neuronal. Uma proposta recente para reverter a sintomatologia autista em modelos animais foi proposta por Kim e colaboradores. Eles examinaram o efeito da administração de extrato vermelho de Ginseng da Coreia durante o período intra-uterino. Foram realizadas administrações diárias desse extrato em fêmeas grávidas durante os dias embrionários E10 a E15. O VPA foi administrado em E12, como proposto no modelo animal de autismo. Os resultados mostraram que a injeção do Ginseng foi capaz de (1) reverter a alteração na cauda dos animais expostos ao VPA, traço característico do modelo, (2) não provocou alteração no número de filhotes nascidos por gestação e (3) reverteu o déficit social dos animais VPA tanto no teste de interação social, como na preferência social. Assim, o extrato vermelho de

Ginseng da Coréia se mostrou um importante neuroprotetor, evitando o aparecimento de alterações fisiopatológicas induzidas pelo VPA (Kim et al, 2013).

Muito ainda há de ser elucidado no modelo animal de VPA: modificações eletrofisiológicas em estruturas importantes como hipocampo, amígdala e CPFm, assim como as projeções entre as mesmas. Há a necessidade de se investigar possíveis modificações no processo de neurogênese e migração neuronal influenciadas pela injeção do VPA, de forma a compreender melhor a fisiopatologia do autismo.



## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta resultados mostrando que o tratamento de ratas durante a gestação com VPA é capaz de induzir um quadro de alterações comportamentais e celulares nos animais compatíveis com algumas características do autismo. A quantificação de interneurônios parvalbumina-positivos revelou que a exposição à droga reduziu o número desses neurônios inibitórios no CPFm, principalmente no córtex cingulado. As alterações também se refletiram a nível comportamental, com a ocorrência de hiperlocomoção, comportamento repetitivo, além de déficit de interação social. Dessa forma, nossos dados reforçam a validade de face do modelo de autismo induzido pelo VPA, assim como também apoiam a teoria da hiper-excitabilidade neuronal como importante fator envolvido na fisiopatologia do autismo. Novas pesquisas que demonstrem a atividade neuronal nesse modelo podem ser bastante esclarecedoras e podem também revelar a influência da circuitaria no padrão comportamental peculiar apresentado por esses animais. É de interesse de todos que as descobertas realizadas na pesquisa básica possam, em um futuro próximo, contribuir para uma melhor qualidade de vida para aqueles que enfrentam o autismo.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Amaral, D. G., C. M. Schumann et al (2008). "Neuroanatomy of autism." Trends Neurosci **31**(3): 137-145.
2. Anderson, G. M., Horne, W. C. et al (1990). "The Hyperserotonemia of Autism." Annals New York Academy of Sciences **600**: 331-40.
3. Ardinger HH, Atkin, J. F. et al. (1988). "Verification of the fetal valproate syndrome phenotype." Am J Med Genet **29**(1): 171-85
4. Arndt, T., C. Stodgell et al. (2005). "The teratology of autism." International Journal of Developmental Neuroscience **23**(2-3): 189-199.
5. Association, A. P. (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V
6. Bachevalier J, Mishkin. M. (1986). "Visual recognition impairment follows ventromedial but not dorsolateral prefrontal lesions in monkeys." Behav Brain Res **20**(3): 249-61.
7. Bambini-Junior, V., L. Rodrigues, G. A. et al. (2011). "Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters." Brain Res **1408**: 8-16.
8. Bauman, M. L., T. L. Kemper (2005). "Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions." Int J Dev Neurosci **23**(2-3): 183-7.
9. Bristot Silvestrin, R., V. Bambini-Junior, F. et al (2013). "Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: altered glutamate metabolism in the hippocampus." Brain Res **1495**: 52-60.
10. Carr, D. B., Sesack, S. R. (1996). "Hippocampal afferents to rat prefrontal cortex: Synaptic targets and relation to dopamine terminals." J. Comp. Neurol. **369** (1): 1-15.
11. Casanova, M. F., I. A. van Kooten, I. A. et al (2006). "Minicolumnar abnormalities in autism." Acta Neuropathol **112**(3): 287-303.
12. Christianson AL, C. N., Kromberg JG. (1994). "Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs." Dev Neuro Child Neurol **36**(4): 361-9.

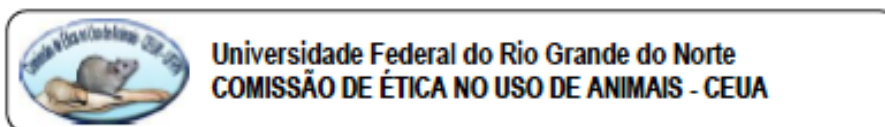
13. Courchesne, E., Mouton, P. R., et al (2011). "Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism." Journal of American Medical Association **306**(18): 2001-10.
14. Courchesne, E., Pierce, K., et al (2007). "Mapping early brain development in autism." Neuron **56**(2): 399-413.
15. Dufour-Rainfray, D., Vourc'h, P et al (2010). "Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: A model for autism." Neuroscience Letters **470**(1): 55-59.
16. Durand, C. M. C. B., Boeckers, T. M. et al (2007). "Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders." Nature Genetics **39**(1): 25-7.
17. Edge, A. L., Marple-Horvat D. E, et al (2003). "Lateral cerebellum: functional localization within crus I and correspondence to cortical zones." Federation of European Neuroscience Societies **18**:(6):1468-85.
18. Garcia-Penás, J. J. (2009). "Autismo , epilepsia y patología del lóbulo temporal." Revista de Neurología **48**: 35-45.
19. Gogolla, N., Leblanc, J. J. et al (2009). "Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism." J Neurodev Disord **1**(2): 172-181.
20. Gonchar, Y., Wang, Q.. et al (2007). "Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining." Frontiers in Neuroanatomy **1**: 3.
21. Göttlicher M, Minucci, S. et al (2001). "Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells." EMBO J **20**(24): 6969-78.
22. Gyung-Ah Jung, Yonn J. Y. et al (2008). "Valproic acid induces differentiation and inhibition of proliferation in neural progenitor cells via the beta-catenin-Ras-ERK-p21Cip/WAF1 pathway." BMC Cell Biology **9**(66): 12.
23. Hara, Y., Maeda, Y. et al (2012). "Effect of Prenatal Valproic Acid Exposure on Cortical Morphology in Female Mice." Journal of Pharmacological Sciences **118**(4): 543-546.

24. Hutsler, J. J., Zhang, H. (2010). "Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders." Brain Research **1309**: 83-94.
25. Ingram, J. L., Peckham, S. M., et al (2000). "Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism." Neurotoxicology and Teratology **22** (3):319-24
26. Jay, T. M., Witter, M; P. (1991). "Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin." J. Comp. Neurol. **313**(4):574-86
27. Kanner, L. (1943). "Autistic Disturbances of Affective Contact." Pathology: 34.
28. Kim, P., Park, J. H. et al (2013). "Effects of Korean red ginseng extracts on neural tube defects and impairment of social interaction induced by prenatal exposure to valproic acid." Food Chem Toxicol **51**: 288-296.
29. Klauck, S. M., Poustka, A. (2006). "Animal models of autism." Drug Discovery Today: Disease Models **3**(4): 313-318.
30. Kuroda, M., K. Murakami, H. et al (1996). "The convergence of axon terminals from the mediodorsal thalamic nucleus and ventral tegmental area on pyramidal cells in layer V of the rat prelimbic cortex." Eur. J. Neurosci. **8**(7): 1390-9.
31. Markram, H., Rinaldi, T. et al (2007). "The intense world syndrome: an alternative hypothesis for autism." Frontiers in Neuroscience **1**(1): 77-96.
32. Markram, K., H. Markram (2010). "The intense world theory - a unifying theory of the neurobiology of autism." Front Hum Neurosci **4**: 224.
33. McFarlane, H. G., Kusek, G. K. et al (2008). "Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice." Genes Brain Behav **7**(2): 152-163.
34. Mi Ra Jeong, R. H., Senatorov, V. V. et al (2003). "Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition." FEBS Letters **542**: 5.
35. Mychasiuk, R., Richards, S. et al (2012). "Effects of rat prenatal exposure to valproic acid on behaviour and neuro-anatomy." Dev Neurosci **34**(2-3): 268-276.

36. Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D et al (2009). "Sodium valproate: an old drug with new roles." Trends in pharmacological sciences **30**(10): 509-514.
37. Pardo, C. A., Eberhart, C. G. (2007). "The neurobiology of autism." Brain Pathol **17**(4): 434-447.
38. Paula, C. S., Ribeiro, S. H. et al (2011). "Brief report: prevalence of pervasive developmental disorder in Brazil: a pilot study." J Autism Dev Disord **41**(12): 1738-1742.
39. Penagarikano, O., Abrahams, B. S. et al (2011). "Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits." Cell **147**(1): 235-246.
40. Pohl-Guimaraes, F., Krahe T. E. et al (2011). "Early valproic acid exposure alters functional organization in the primary visual cortex." Exp Neurol **228**(1): 138-148.
41. Rinaldi, T., Kulangara, K. et al (2007). "Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13501-13506.
42. Rinaldi, T., Perrodin, C. et al (2008). "Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic Acid animal model of autism." Front Neural Circuits **2**: 4.
43. Rodier, P. M. Ingram, J. L. et al (1996). "Embryological Origin for Autism: Developmental Anomalies of the Cranial Nerve Motor Nuclei." The Journal of Comparative Neurology **370**(2):247-261.
44. Rout, U. K., Clausen, P.. (2009). "Common increase of GATA-3 level in PC-12 cells by three teratogens causing autism spectrum disorders." Neuroscience Research **64**: 8.
45. Schneider, T., Przewlocki, R. (2005). "Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism." Neuropsychopharmacology **30**(1): 80-89.
46. Schultz, R. T. (2005). "Developmental deficits in social perception in autism: the role of the amygdala and fusiform face area." Int J Dev Neurosci **23**(2-3): 125-141.

47. Shao, Y., Cuccaro, M. L. et al (2003). "Fine Mapping of Autistic Disorder to Chromosome 15q11-q13 by Use of Phenotypic Subtypes." Am. J. Hum. Genet. **72** (3):539-48.
48. Sonoda T., Ohdo, S. et al (1990). "Teratogenic effects of sodium valproate in the Jcl: ICR mouse fetus." Acta Paediatr Jpn **32**(5): 5.
49. Südhof, T. C. (2008). "Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease." Nature **455**(7215): 903–911.
50. Sweeten, T. L., Posey, D. J., et al (2002). "The amygdala and related structures in the pathophysiology of autism." Pharmacology, Biochemistry and Behavior **71**: 449–455.
51. Tuchman, R., Cuccaro, M. (2011). "Epilepsy and Autism: Neurodevelopmental Perspective." Current Neurology and Neuroscience Reports. **11**(4): 428-34
52. Tuchman, R., Rapin, I. (2002). "Epilepsy in autism." The Lancet Neurology **1**(6): 352-358.
53. Turk, J., Bax, M. et al (2009). "Autism spectrum disorder in children with and without epilepsy: impact on social functioning and communication." Acta Paediatrica **98**(4):675-81
54. Vos, B. P., Volny-Luraghi A (1999). "Cerebellar Golgi cells in the rat: receptive fields and timing of responses to facial stimulation." European Neuroscience Association **11**(8): 2621-34
55. Williams, P. G., Hersh, J. H. (1997). "A male with fetal valproate syndrome and autism." Dev Med Child Neurol. **39**(9): 2.
56. Wolterink, G., Daenen, L. E. et al (2001). "Early amygdala damage in the rat as a model for neurodevelopmental psychopathological disorders." European Neuropsychopharmacology **11**: 51–59.
57. Xu, X., Roby, K. D. et al (2010). "Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: Three chemically distinct classes of inhibitory cells." J Comp Neurol **518**(3): 26.
58. Yip, J., Soghomonian, J. J. et al (2007). "Decreased GAD67 mRNA levels in cerebellar Purkinje cells in autism: pathophysiological implications." Acta Neuropathologica **113**(5): 559-568.

## 9 ANEXOS



### PROTOCOLO N.º 044/2011

Professor/Pesquisador: *RODRIGO ROMCY-PEREIRA*

Natal (RN), 21 de março de 2012.

Prezado Professor/Pesquisador,

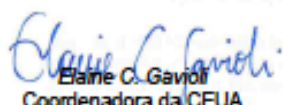
Vimos, através deste documento, informar que o projeto "ESTUDO DAS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS NA COMUNICAÇÃO HIPOCAMPO-CÓRTEX PRÉ-FRONTAL E DE MIGRAÇÃO CELULAR EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO EM RATOS", protocolo nº 044/2011, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

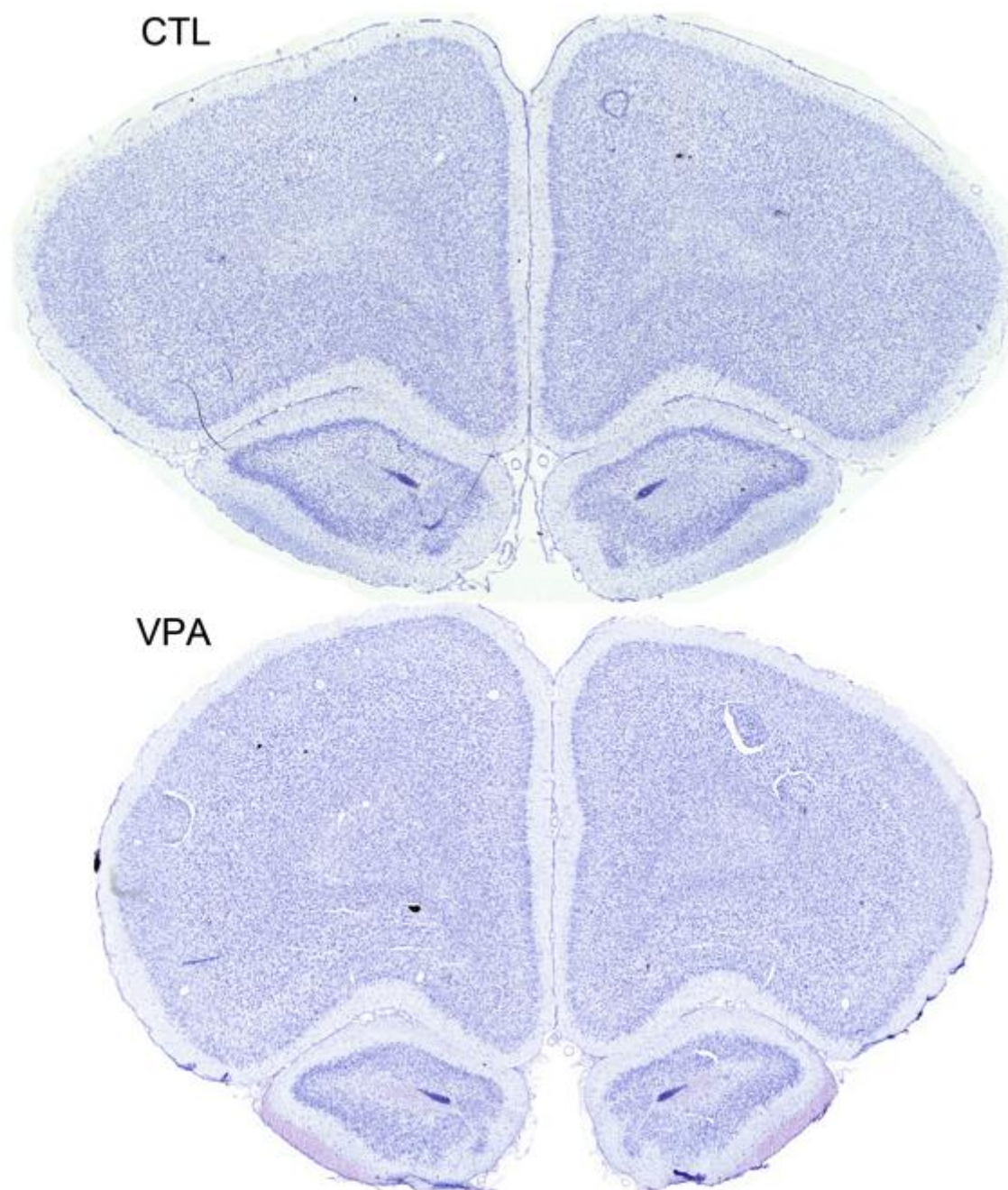
- Relatório Final: FEVEREIRO DE 2014 (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,

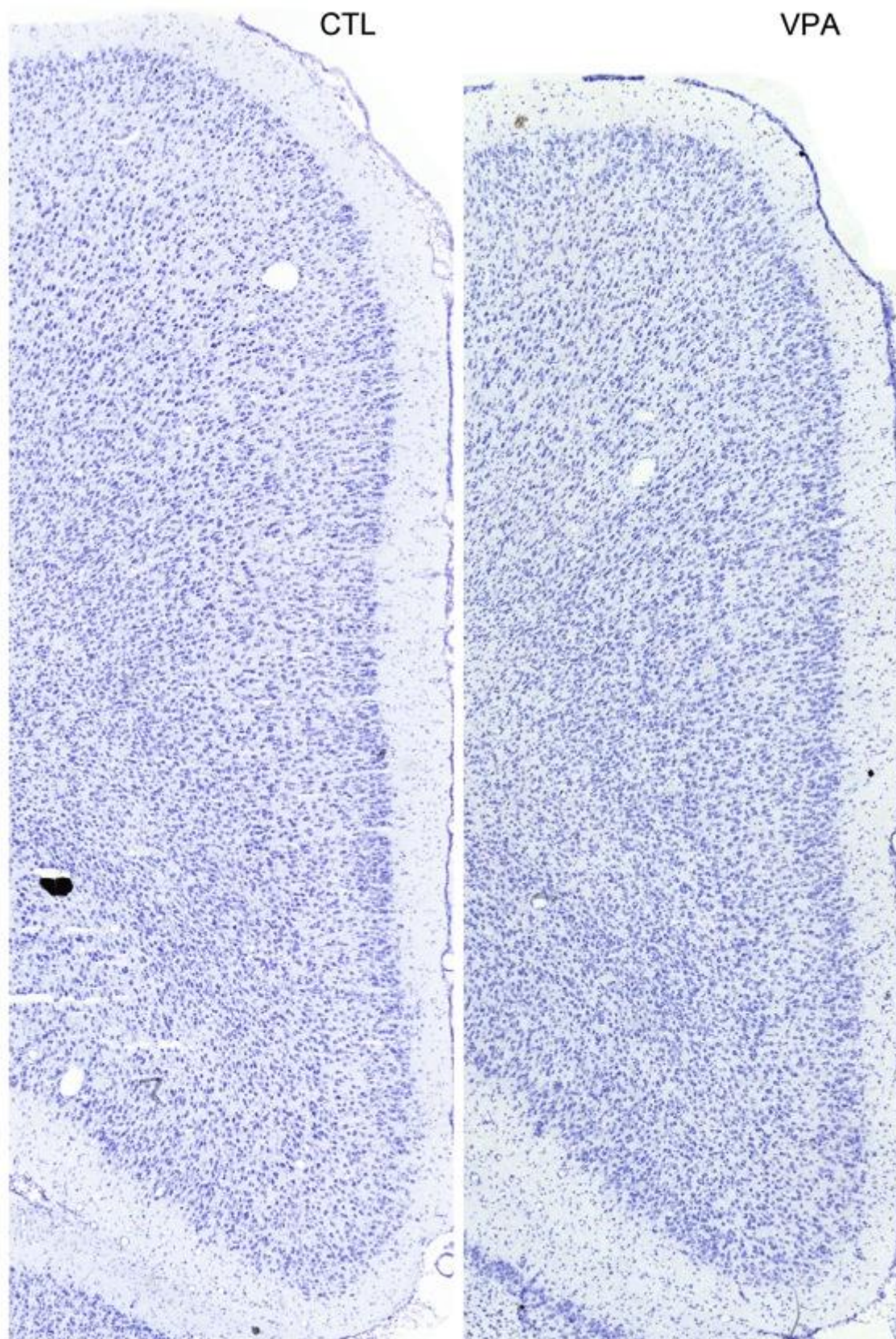
  
Elaine C. Gavioli  
Coordenadora da CEUA

10 FIGURAS SUPLEMENTARES

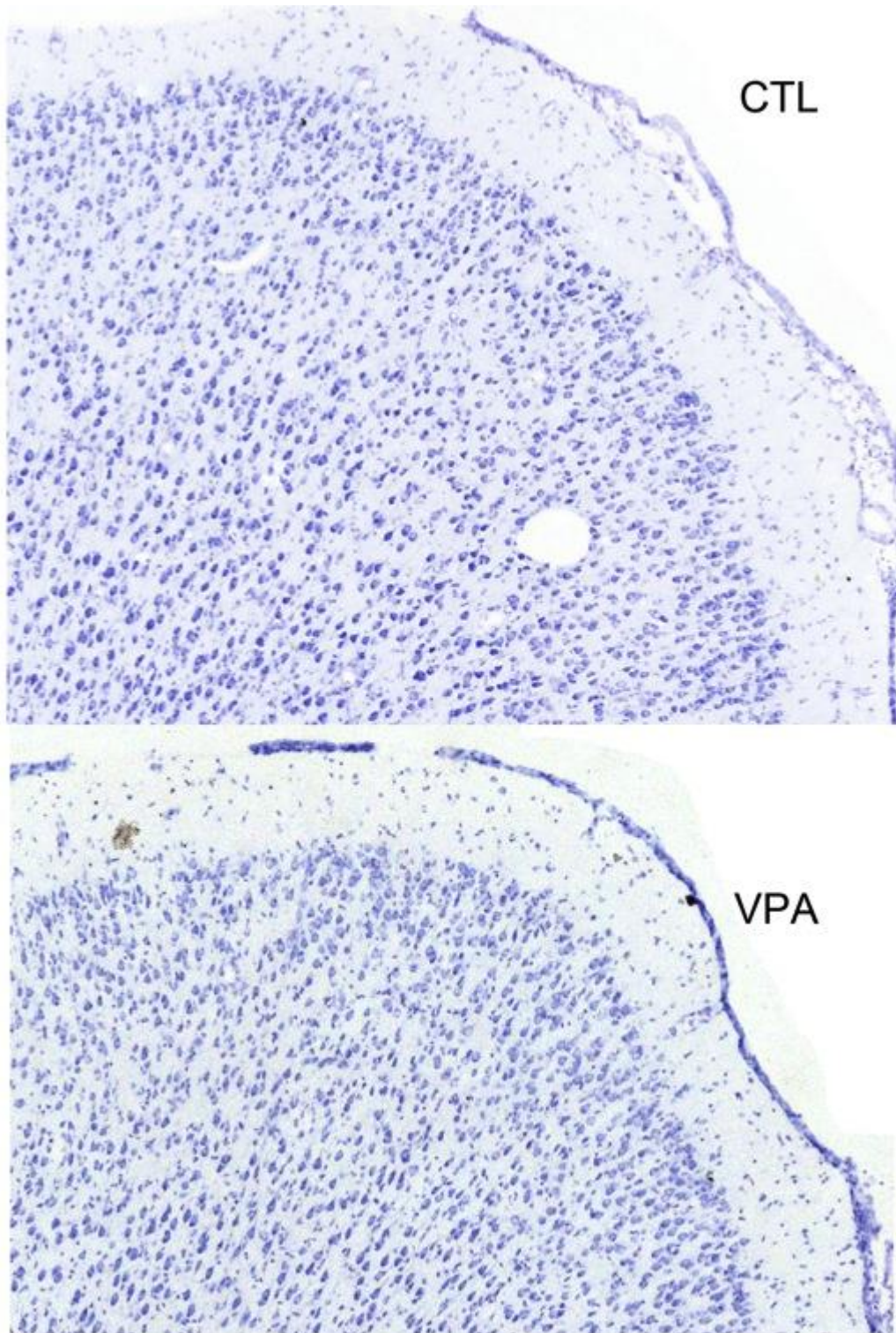


**Figura S1:** Coloração de Nissl no córtex pré-frontal de um animal controle e um animal VPA em PND35.



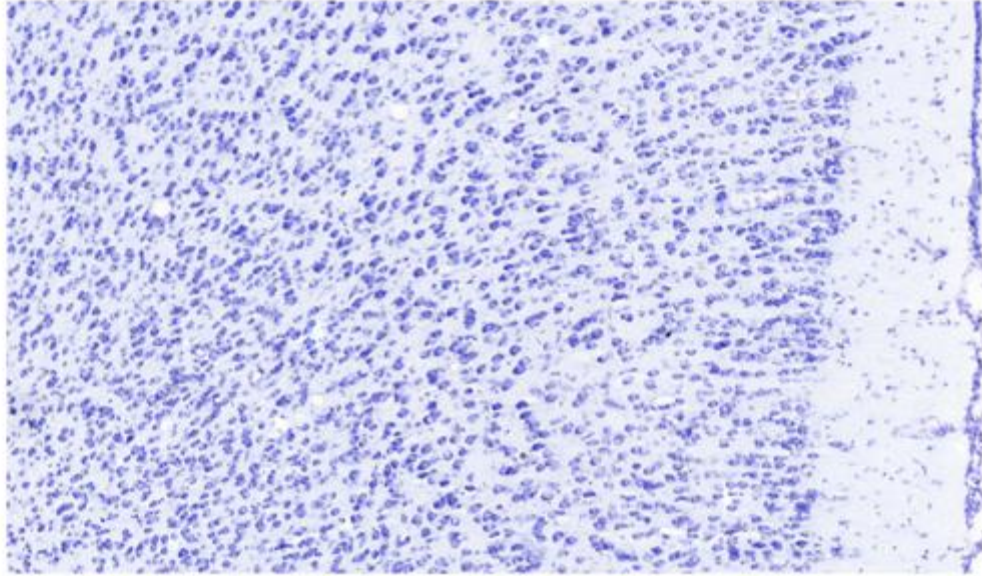


**Figura S2:** Coloração de Nissl no CPFm de um animal controle e um animal VPA em PND35.

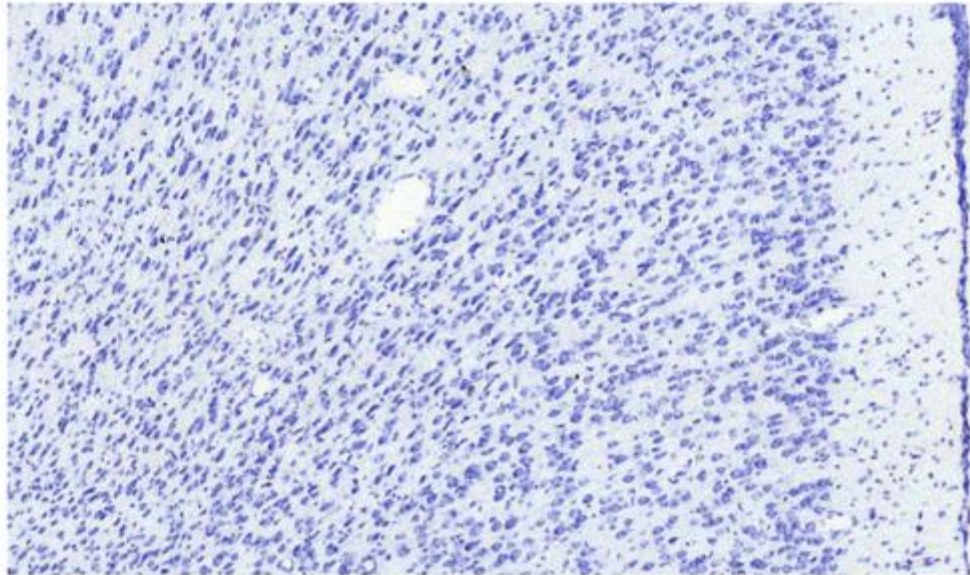


**Figura S3:** Coloração de Nissl no córtex cingulado anterior de um animal controle e um animal VPA em PND35.

CTL



VPA



**Figura S4:** Coloração de Nissl na região pré-límbica (PL) do CPFm de um animal controle e um animal VPA em PND35