

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Distúrbios do Desenvolvimento

GISANE FARIA NOVAES

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E COGNITIVAS EM
RATOS EXPOSTOS ÀS CRISES EPILEPTICAS INTRAUTERINAS

São Paulo

2010



GISANE FARIA NOVAES



ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E COGNITIVAS EM RATOS EXPOSTOS ÀS CRISES EPILEPTICAS INTRAUTERINAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento da Universidade Presbiteriana Mackenzie de São Paulo como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros

São Paulo

2010

N935a Novaes, Gisane Faria
Alterações comportamentais e cognitivas em ratos expostos
às crises epilépticas intrauterinas / Gisane Faria Novaes -
São Paulo, 2010
50 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Distúrbio e Desenvolvimento) -
Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2010.
Referências bibliográficas: f. 38-41.

1. Epilepsia. 2. Gestação. 3. Interação social. 4. Ansiedade.
5. Cognição. I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que com amor e sabedoria me mostraram o Caminho, a Verdade e a Vida e me ensinaram o que nenhum livro poderia ensinar;

Aos meus sobrinhos, Leonardo e Guilherme, que trazem alegria à nossa família e esperança de um amanhã melhor;

E ao meu primo Renato, prova que o ser humano não é reconhecido pelo tempo que viveu, mas sim pela sua doação.

AGRADECIMENTOS

À Deus, autor e consumidor da minha fé, por me manter com saúde e disposição para enfrentar os desafios da vida e por ser minha fortaleza nas dificuldades. Nenhuma conquista faria sentido em minha vida sem a presença Dele.

Aos meus pais, Gilson e Rosani, que me sustentaram com todo tipo de apoio e incentivo que eu precisei para concluir esse trabalho. Graças à eles hoje eu sei que o valor das conquistas é proporcional a dedicação que dispensamos à elas.

Ao meu noivo Edgard, presente mais precioso que ganhei de Deus, que tem sido meu cúmplice em meus sonhos e realizações.

Ao meu irmão Eduardo, amigo de todas as horas, com quem divido meu passado, presente e futuro e de quem sempre recebo conselhos amorosos.

À Prof^a. Roberta, pela solicitude e prontidão em me orientar em todos os momentos, me ajudando a desvendar um universo desconhecido. Por todo conhecimento agregado, incentivo e amizade, meus sinceros agradecimentos.

À banca examinadora, que contribuiu para o enriquecimento deste trabalho.

Às minhas queridas colegas de mestrado Elisângela e Adelisandra por dividirem comigo as alegrias, as dificuldades e as conquistas dessa jornada.

À Giovanna, colega de profissão e amiga de coração, alguém que eu admiro pela dedicação, competência e coragem e que mesmo distante me incentivou e me encorajou nos momentos finais deste trabalho.

Aos técnicos do Biotério: Ana Maria, Domingos e Oliveira, que nunca me negaram auxílio, me estendendo a mão sempre que necessitei.

Ao Instituto Presbiteriano Mackenzie, que através do Mack Pesquisa, financiou parte das despesas efetuadas nesta pesquisa.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt.

RESUMO

Está bem estabelecido que a exposição intraútero de teratogênicos, como o antiepiléptico ácido valpróico, aumenta o risco para o desenvolvimento dos transtornos do espectro autista. Considerando que gestantes com epilepsia fazem uso de drogas antiepilépticas, dificulta a comprovação se a epilepsia *per se*, quando não controlada, causa alterações no conceito ou se a medicação associada à predisposição genética compõe o fator responsável por essas alterações. A utilização de modelos animais permite eliminar a influência dos fatores genéticos e da exposição aos antiepilépticos. Este trabalho avaliou as conseqüências da exposição às crises epilépticas maternas durante a gestação no comportamento da prole. Modelo de epilepsia do lobo temporal foi induzido em fêmeas Wistar pela administração de pilocarpina (350 mg/kg). Animais controles receberam injeção de salina. Após a primeira crise espontânea as ratas foram acasaladas e a freqüência de crises monitorada (6h/dia). Logo após o nascimento, filhotes de mães com epilepsia e sem epilepsia foram submetidos ao *cross-fostering*. Um terceiro grupo foi também utilizado, filhotes de mães controle cuidados pela própria mãe. O número de filhotes de ratas com epilepsia foi inferior ao das ratas controles, e 15% apresentaram malformações. A partir do 60º dia pós-natal foi avaliada a ansiedade, a interação social e a cognição. Filhotes de mães com epilepsia apresentaram prejuízo cognitivo e na interação social, sem sinais de ansiedade, sugerindo que as crises epilépticas durante a gestação são prejudiciais para o desenvolvimento fetal. Estudos posteriores são necessários para uma avaliação mais ampla do repertório comportamental destes animais ao longo da vida, independentemente das crises epilépticas durante a gestação serem ou não um fator de risco para o desenvolvimento do transtorno do espectro autista.

Palavras- chaves: Epilepsia. Gestação. Interação social. Ansiedade. Cognição.

ABSTRACT

It is well established that exposure to teratogenic agents, like valproic acid, increase the risk of developing autism spectrum disorders. Considering that epileptic pregnant woman use antiepileptic therapy, it makes difficult to search evidences whether the epilepsy *per se*, when uncontrolled, produce alterations on offspring or whether the medication associated with the genetic predisposition are the factor responsible for these alterations. Animal models are useful once variables can be controlled. This study evaluated the behavior of offspring exposed to maternal convulsive seizures in utero. An experimental model of temporal lobe epilepsy was induced in female wistar by pilocarpine administration (350 mg/kg). Control animals received saline injection. After the occurrence of spontaneous seizure, the rats were mated and seizure frequency was recorded (6h/day) during the pregnancy. Early after birth, rat pups from epileptic and control dams were cross-fostered with a control dams. The third group pups born from control dams were maintained with their own mother. Number of pups per litter from epileptic dams was significantly reduced, and malformations were present in 15% of them. The animal behaviors were analyzed from postnatal days 60. Offspring from epileptic dam showed deficit in social interaction and cognition, with no changes in anxiety, suggesting that epileptic seizures during pregnancy is harmful to fetal developing. Further studies are needed for a broader assessment of animal behavior repertoire across the life span, independently the seizures during pregnancy to be or not a risk factor for developing of autism spectrum disorder.

Keywords: Epilepsy. Pregnancy. Social interaction. Anxiety. Cognition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ilustração da Caixa de Skinner	21
Figura 2. Ilustração representativa da Caixa do teste Preferência Social	23
Figura 3. Ilustração da caixa utilizada no teste do Labirinto em Cruz Elevado	24
Figura 4 A. Foto rata experimental	26
Figura 4 B. Foto rata controle	26
Figura 5 A e B. Foto filhotes experimentais	27
Figura 6. Foto filhote controle	27
Figura 7. Gráfico da pontuação na Caixa de Skinner	28
Figura 8. Gráfico do número de entradas no compartimento com rato – ECCR	29
Figura 9. Gráfico do tempo no compartimento com rato – TCCR	29
Figura 10. Gráfico dos contatos olfativos	30
Figura 11 A. Gráfico da porcentagem de entradas no braço aberto – PEBA	30
Figura 11 B. Gráfico do tempo nos braços abertos – PEBA	31
Figura 12. Gráfico do tempo total em todos os braços – TETB	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APA – American Psychiatric Association

C - Grupo Controle

CC - Grupo Controle Cross

CID-10 - *Classificação Internacional das Doenças*

CRF - Reforço Contínuo da Resposta

DAEs - Drogas Antiepilépticas

DP - Desvio Padrão

DSM-IV - *Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders*

ECCR – Entradas no Compartimento Com Rato

ELT - Epilepsia do Lobo Temporal

EXP - Grupo Experimental

LCE - Labirinto em Cruz Elevado

OMS – Organização Mundial de Saúde

PEBA – Porcentagem de Entradas no Braço Aberto

PTBA – Porcentagem de Tempo no Braço Aberto

SE - *Status Epilepticus*

TCCR – Tempo no Compartimento Com Rato

TEA - Transtorno do Espectro Autista

TETB – Total de Entrada em Todos os Braços

TID- SOE - Transtorno Invasivo do Desenvolvimento Sem Outra Especificação

TGD - Transtorno Global do Desenvolvimento

VPA – Ácido Valpróico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. ANIMAIS	18
3.2. CITOLOGIA VAGINAL E ACASALAMENTO	18
3.3. GRUPOS DE ESTUDO	19
3.4. INDUÇÃO DO MODELO DE EPILEPSIA PELA PILOCARPINA	19
3.5. PERÍODO DE PREENHEZ	20
3.6. PERÍODO IMEDIATAMENTE PÓS-PARTO	20
3.7. TESTES COMPORTAMENTAIS	21
3.7.1. EXPERIMENTO DA CAIXA DE CONDICIONAMENTO OPERANTE	21
3.7.2. TESTE DE PREFERÊNCIA SOCIAL	23
3.8. EXPERIMENTO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	24
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4. RESULTADOS	26
4.1. COMPORTAMENTO MATERNO	26
4.2. NÚMERO DE FILHOTES POR NINHADA E MALFORMAÇÕES	27
4.3. EXPERIMENTO DA CAIXA DE CONDICIONAMENTO OPERANTE	28
4.4. TESTE PREFERÊNCIA SOCIAL	28
4.5. EXPERIMENTO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO	30
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICES	42
ANEXOS	48

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o DSM-IV (*Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*) e a CID 10 (*Classificação Internacional das Doenças, 10ª edição*), o termo transtorno global do desenvolvimento (TGD) compreende um amplo espectro de distúrbios caracterizados pela presença de alterações comportamentais de início precoce com uma grande variabilidade de apresentações clínicas e graus de acometimento. Esses distúrbios têm em comum diminuição ou perda das habilidades sociais, da comunicação e a presença de interesses repetitivos e restritos. Portanto há, segundo a literatura, o comprometimento de três domínios: social, comunicativo e comportamental (APA, 1994 e OMS, 1992).

A categoria TGD inclui as seguintes condições: Síndrome de Rett, transtorno desintegrativo da infância, Síndrome de Asperger, transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação (TID-SOE) e autismo (APA, 1994).

Dentre eles, os Transtornos do Espectro Autista (TEA) são os mais conhecidos, sendo caracterizado por desenvolvimento anormal ou prejudicado na interação social, comunicação (verbal e não-verbal) e interesses restritos e repetitivos. Essa sintomatologia tem início na infância precoce, se manifestando até os três anos de idade (Gardener, Spiegelman *et al.*, 2009).

Esses déficits são, em aproximadamente 70 % dos casos, acompanhados de algum grau de deficiência mental, podendo haver anormalidades no desenvolvimento das habilidades cognitivas (Rapin, 2002).

Fombonne, (2009), revisou os resultados de 43 artigos publicados desde 1966 sobre a prevalência dos transtornos globais do desenvolvimento e observou um aumento ao longo dos últimos anos, sendo que atualmente se encontra entre 60-70/10.000, constituindo uma das mais freqüentes desordens do desenvolvimento neurológico infantil. Especificamente, a prevalência do autismo é de aproximadamente 20/10.000. Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem que a prevalência é de 3 a 4 vezes maior entre os meninos (Volkmar e Pauls, 2003).

A revisão cuidadosa da literatura permitiu inferir que o aumento da prevalência é reflexo de um conjunto de fatores que abarca a maior eficiência dos

métodos utilizados para identificação dos casos, melhoria da prática para o diagnóstico bem como da maior disponibilidade ao serviço.

Contudo, dependendo dos critérios de inclusão, a prevalência dos TGD varia consideravelmente, sendo considerado um dos mais freqüentes distúrbios do desenvolvimento neurológico infantil (Fombonne, 2009).

Após décadas de estudo, a patogênese do autismo permanece desconhecida. A etiologia do autismo é complexa, multifatorial e envolve predisposição genética e fatores ambientais (Trottier, Srivastava *et al.*, 1999). Vários estudos têm sugerido que o autismo é resultante destes dois fatores (Folstein e Piven, 1991; Folstein e Rosen-Sheidley, 2001).

A alta taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos (MZ) (36–96%) comparada à dos gêmeos dizigóticos (DZ) (0-30%) apontam para uma hereditariedade elevada. Contudo, deve-se considerar que alguns aspectos do ambiente pré-natal, assim como do pós-natal, tendem a ser mais similares nos gêmeos MZ do que nos DZ; por exemplo, aproximadamente 75% dos gêmeos MZ, mas menos de 10% dos DZ, parecem compartilhar da vascularização intrauterina (Hall, 2007). Assim, a interação gene-ambiente pode produzir uma concordância muito mais elevada nos gêmeos MZ do que nos gêmeos DZ. Contudo, o mecanismo preciso desta interação permanece desconhecido (Volkmar e Pauls, 2003; Baron-Cohen e Belmonte, 2005; Mcdougale, Erickson *et al.*, 2005).

Os fatores ambientais incluem síndrome da rubéola congênita, exposição à teratógenos como a talidomida (Stromland, Nordin *et al.*, 1994), ácido valpróico (Christianson, Chesler *et al.*, 1994 ; Williams e Hersh, 1997 ; Williams, King *et al.*, 2001) e etanol (Nanson, 1992), além de complicações neonatais e obstétricas (baixo peso ao nascer, prematuridade, injúria hipóxica-isquêmica, sangramento uterino, baixo apgar) e idade avançada dos pais. (Juul-Dam, Townsend *et al.*, 2001; Durkin, Maenner *et al.*, 2008; Watts, 2008).

Apesar do grande número de possíveis fatores de risco para o autismo, esses achados são por vezes contraditórios devido às grandes variações no método de cada estudo, amostras pequenas, variações no critério diagnóstico, distribuição de gêneros, entre outros fatores que levam a resultados imprecisos (Hultman, Sparen *et al.*, 2002).

Gardener, Spiegelman *et al.*, (2009) realizaram a primeira meta-análise de associação entre as complicações da gravidez e os fatores relacionados com o risco de autismo publicados até março de 2007. Nesta revisão, mais de 50 fatores pré-natais foram examinados e dentre eles os que tiveram maior relação com o autismo foram: idade avançada paterna ou materna ao nascimento, sangramento gestacional materno, diabetes gestacional e uso de medicação pré-natal materna. Essa mesma revisão demonstrou que o uso de medicamentos durante a gestação aumenta em 46% o risco para o autismo. Porém a maioria dos estudos considerou o uso de qualquer medicação. Somente alguns analisaram a associação com classes específicas de medicamentos, e nessa meta-análise foi positiva a associação de risco para o autismo e o uso de medicamentos psiquiátricos durante a gravidez.

Neste contexto, foi demonstrado em alguns estudos que o ácido valpróico utilizado no tratamento da epilepsia e do transtorno bipolar quando administrado no período pré-natal aumenta o risco para o desenvolvimento do autismo (Christianson, Chesler *et al.*, 1994; Williams e Hersh, 1997).

Como tem sido discutido, já se sabe que crianças autistas apresentam freqüentemente maiores complicações pré, peri e neonatais quando comparadas às crianças não afetadas (Williams, Helmer *et al.*, 2008). De semelhante modo, as mesmas complicações também estão presentes entre mulheres grávidas que apresentam epilepsia.

A epilepsia é a doença neurológica que mais requer tratamento contínuo durante a gravidez, e as drogas antiepilépticas (DAEs) constituem uma das mais freqüentes exposições crônicas teratogênicas (Holmes, 2002).

Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são afetadas pela epilepsia, sendo que cerca de 1,3 milhões de mulheres com epilepsia nos Estados Unidos estão em fase reprodutiva e dão à luz a aproximadamente 25.000 crianças por ano (Thomas, Nair *et al.*, 2009). A maioria dessas mulheres pode engravidar e ter crianças saudáveis, porém, elas apresentam risco maior para uma variedade de complicações maternas, essas complicações podem afetar diretamente o desenvolvimento fetal (Lajoie e Moshe, 2004).

Em geral, gestantes com epilepsia apresentam aumento da freqüência de crises durante a gravidez e maior incidência de doença hipertensiva específica da

gravidez (Yerby, 1991). Vários efeitos adversos já foram observados em neonatos de mães com epilepsia, como: baixo peso ao nascer; óbito fetal, neonatal ou perinatal; prematuridade; menor perímetro cefálico; menores índices de vitalidade perinatal (APGAR); malformações congênitas; retardo do desenvolvimento; dismorfismo facial, entre outros (Leavitt, Yerby *et al.*, 1992; Combs-Cantrell e Yerby, 2003).

Foi realizado um estudo investigativo sobre a freqüência de morbidades neonatais e da infância tardia em crianças expostas à DAE in útero e 20 % delas apresentaram distúrbios comportamentais ao passo que entre as crianças controle a taxa foi de 5% (Dean, Hailey *et al.*, 2002).

Considerando que mulheres grávidas com epilepsia fazem uso de drogas antiepilépticas durante a gestação, não existe comprovação se a epilepsia *per se* causa alterações no concepto ou se a medicação, associada à predisposição genética compõe o fator responsável por essas alterações.

Na realidade, os efeitos da epilepsia sobre a gravidez e vice-versa, ainda são pouco conhecidos. Contudo, sabe-se que as crises epiléticas são nocivas e altamente deletérias para o feto, elas causam elevação dos níveis pressóricos maternos (diminuindo a oxigenação sanguínea) e alterações eletrolíticas, podendo também estar associadas a abortamento espontâneo e morte intra-uterina devido a traumas decorrentes das crises (Liporace e D'abreu, 2003).

Existem vários tipos de epilepsia, sendo que a epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum na população adulta, sendo responsável por 40% de todos os casos (Gastaut, Gastaut *et al.*, 1975). Aproximadamente 30% dos pacientes com ELT apresentam crises refratárias a vários agentes antiepilépticos, mesmo quando combinados e nas doses máximas toleradas (Shorvon, 1990; Regesta e Tanganelli, 1999).

Conforme discutido, muitos estudos acerca das conseqüências da epilepsia sobre a gestação encontram uma problemática, que é a interferência da terapia antiepiléptica nessa associação. Assim sendo, a magnitude e o efeito diferencial da epilepsia *per se* no desenvolvimento do sistema nervoso fetal é pouco explorado e permanece desconhecido, visto que é improvável na condição humana, que uma gestante com epilepsia não faça uso de DAEs. E por essa razão, não é possível

isolar a interpretação das complicações maternas e fetais em mulheres com epilepsia, do uso de medicamentos.

No entanto, os modelos experimentais permitem que diversas variáveis sejam controladas: tipo de epilepsia, frequência de crises, a inclusão ou não de terapia medicamentosa, entre outras. Particularmente, os modelos experimentais de ELT são considerados de grande utilidade por mimetizarem as alterações comportamentais, neuropatológicas e eletrográficas da condição humana.

Utilizando o modelo experimental de ELT induzido pela pilocarpina (Turski, Cavalheiro *et al.*, 1983), Vale, *et al.*, (2005) estudaram os efeitos de crises epiléticas durante a gestação no desenvolvimento pós-natal da prole de ratos Wistar e observaram que os filhotes apresentaram acidose metabólica compensada, hiperglicemia, peso reduzido, crescimento e medidas cranianas inferiores aos controles pelo menos até o vigésimo dia pós-natal. A abertura ocular, erupção dentária e o reflexo do endireitamento foram retardados nos filhotes de ratas epiléticas. A análise histológica das placentas mostrou áreas de infartos isquêmicos com comprometimento da face materna. Estes dados mostram que filhotes de mães com epilepsia apresentam déficits no desenvolvimento físico, quando comparados a filhotes de mães controle.

Amado, Berzaghi *et al.*, (2005) compararam vários aspectos do desenvolvimento da prole de ratas que apresentaram crises recorrentes espontâneas durante a gestação com filhotes submetidos a 15 min. de hipóxia uterina seguida de parto cesáreo. Em ambos os modelos observou-se significativa acidose metabólica, redução de 40% nos níveis de PO₂, atraso no desenvolvimento e atrofia cerebral principalmente no cerebelo e no hipocampo.

As evidências sugerem que embora as crises epiléticas sejam de curta duração (aproximadamente 30 segundos), tornam-se deletérias quando ocorrem em alta frequência uma vez que resultam em hipóxia fetal intermitente. Embora esse evento seja transitório e rápido, ele ocorre várias vezes e ao longo de todo o período gestacional, e por essa razão, pode ser apontado como um fator crítico para as alterações observadas nos filhotes experimentais.

A monitoração da frequência cardíaca fetal durante uma crise convulsiva materna demonstra que embora a duração da crise seja de menos de 1 minuto, isso

resulta em bradicardia fetal durante os 20 minutos subseqüentes ao episódio (Yerby, 1987). Portanto, é possível admitir que em alguns casos, a crise convulsiva materna pode levar a danos irreversíveis ao sistema nervoso central e demais órgãos do feto.

Segundo Golan, Mane *et al.*, (2009), o insulto hipóxico isquêmico pré-natal é uma das principais causas de distúrbios do desenvolvimento neurológico do recém-nascido, associado a prejuízos motores, cognitivos e comportamentais.

2. OBJETIVOS

Avaliar as conseqüências da exposição às crises epilépticas maternas durante a gestação no comportamento e aprendizado da prole.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Presbiteriana Mackenzie, processo CEUA n° 041/04/2009, conforme anexo A. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento do animal.

3.1. ANIMAIS

Para realização deste trabalho utilizamos ratos da raça Wistar, machos e fêmeas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Antes do experimento, os animais foram aclimatados no Biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie e alojados em grupos de quatro por caixa, tendo livre acesso à água e ração. As condições do biotério obedecem a um ciclo claro-escuro de 12 horas (7 – 19 horas), com temperatura ambiente constante entre $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2. CITOLOGIA VAGINAL E ACASALAMENTO

Foram utilizadas ratas Wistar, fêmeas, virgens, pesando entre 200 e 250 g, submetidas à análise do padrão do ciclo estral, através da verificação das características da citologia vaginal. O conteúdo vaginal foi obtido por meio de contagotas atraumático, contendo solução salina. A solução introduzida no conduto vaginal e posteriormente aspirada foi colocada em uma lâmina para observação através de microscópio comum. Esse procedimento foi realizado sempre no período entre 8:00 e 10:00 horas da manhã, permitindo assim somente a inclusão em etapa subsequente do experimento, dos animais que apresentarem ciclo estral regular, isto é, aparecimento da fase de estro a intervalos de 3 a 4 dias.

Após a confirmação do ciclo estral, as fêmeas foram colocadas nas gaiolas dos machos para o acasalamento. Nesse período, a coleta do conteúdo vaginal ocorreu diariamente, às 8:00 horas. A constatação de espermatozoides foi utilizada

como parâmetro de início da gestação (dia zero) e da retirada do macho da gaiola. Durante a prenhez, as fêmeas experimentais ficaram em gaiolas isoladas para evitar o risco de agressão da ninhada por outra fêmea

3.3. GRUPOS DE ESTUDO

Depois de selecionadas as fêmeas, essas foram divididas em: com epilepsia e sem epilepsia. Fez-se necessário criar outro grupo, visto que em pesquisas anteriores as fêmeas com epilepsia manifestaram o comportamento de canibalismo com sua própria ninhada. Sendo assim, o terceiro grupo consistiu de fêmeas controles que tiveram seus filhotes submetidos ao *cross-fostering* (trocados) com outra rata controle logo após o nascimento.

Sendo assim, os três grupos de estudo foram constituídos da seguinte forma: grupo controle não manipulado (C) – filhotes de rata sem epilepsia que foram cuidados pela própria mãe; grupo controle cross (CC) – filhotes de rata sem epilepsia que foram cuidados por outra rata sem epilepsia e grupo experimental (EXP) – filhotes de rata com epilepsia que foram cuidados por outra mãe sem epilepsia.

MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO PELA PILOCARPINA

Para obtenção de animais com epilepsia foi utilizado o modelo da pilocarpina (Turski, et al 1983). Com o objetivo de minimizar os efeitos periféricos provocados pela droga, os animais foram previamente tratados com metilscopolamina (1 mg/kg s.c.) e após 30 minutos receberam pilocarpina (350 mg/kg, i.p.). Após 4 horas do início do *status epilepticus* (SE), este foi interrompido mediante administração de diazepam (10 mg/kg, i.p.).

Após o período de SE, os animais receberam soro fisiológico a 0,9% 1mL i.p. e s.c., 2 vezes ao dia, além de ração triturada e misturada com solução salina que foi oferecida via oral. Os animais sobreviventes foram monitorados para a detecção

de crises espontâneas. Depois de detectada a primeira crise espontânea, as ratas foram colocadas para acasalamento, respeitando o período do estro.

3.4. PERÍODO DE PREENHEZ

Durante esse período, as fêmeas epiléticas foram monitoradas 6 horas/dia e a frequência de crises estimada.

Outro parâmetro observado nesse período foi o peso semanal das fêmeas, para que pudesse ser descartada a possibilidade de desnutrição materna e abortamento espontâneo.

3.5. PERÍODO IMEDIATAMENTE PÓS-PARTO

O principal cuidado foi na retirada logo após o parto, dos filhotes da rata epilética e a realização do *cross-fostering*. Esse processo foi feito com extrema cautela para que os filhotes fossem adotados pela rata controle com o mínimo de estresse possível. Os filhotes experimentais foram retirados da caixa e colocados um a um na caixa com uma fêmea controle recém separada de sua própria ninhada (ninhada esta que foi eutanasiada sob anestesia profunda, visto que o estudo desses filhotes não fez parte do escopo do trabalho. Da mesma forma, o *cross-fostering* também foi feito entre as ratas não epiléticas para que fosse afastada a variável do estresse da adoção sobre o crescimento e desenvolvimento dos filhotes.

Foram observados o número de animais nascidos vivos e/ou mortos e a presença de malformações grosseiras. Todas as ninhadas foram reduzidas a um número de 8 filhotes para cada fêmea, a fim de evitar o risco de desnutrição de algum dos filhotes.

3.6. TESTES COMPORTAMENTAIS

Todos os experimentos foram conduzidos após os animais completarem 60 dias.

3.6.1. EXPERIMENTO DA CAIXA DE CONDICIONAMENTO OPERANTE – CAIXA DE SKINNER

Este experimento foi utilizado para averiguação da função cognitiva, aprendizagem e memória. Para tanto, os animais foram privados de água por 38 horas antes do experimento.



Figura1: Ilustração da caixa de Skinner utilizada (marca Insight).

O protocolo experimental utilizado foi dividido em 3 etapas seqüenciais: registro do nível operante, treino do bebedouro (modelagem) e reforço contínuo da resposta de pressão à barra.

O nível operante, com duração aproximada de 15 minutos, teve como objetivo verificar o comportamento do animal antes de qualquer intervenção experimental. Nesse período foram registrados os seguintes comportamentos: pressionar a barra, tocar a barra, farejar, levantar-se e limpar-se. Imediatamente após, foi dado início ao treinamento ao bebedouro que tem o intuito de fazer com que o animal associe o ruído do bebedouro à apresentação da água. A modelagem pretendeu levar o animal à aquisição do comportamento de pressão à barra por meio do reforço (apresentação de água). Assim, o animal foi treinado a pressionar à barra por meio do reforço. O reforço dependeu do comportamento que o rato apresentou desde o início da sessão, como por exemplo: olhar e caminhar em direção à barra, cheirar, lambear, morder ou tocar a barra. A modelagem foi encerrada após o rato pressionar a barra 10 vezes sem interrupção e sem reforço. Após a modelagem iniciou-se o reforço contínuo da resposta de pressão à barra (CRF). O objetivo do CRF é fortalecer a resposta de pressão à barra, e mantê-la em alta frequência no repertório do comportamento animal, sem a intervenção do experimentador. Assim, cada vez que o rato pressionou a barra, o comportamento foi reforçado pela liberação automática da água

Neste experimento foi avaliado o número de sessões, com duração de 15 minutos, para que o rato aprendesse o comportamento desejado. Durante os procedimentos, a intensidade de luz dentro da caixa foi mantida reduzida a 50% e a mesma permaneceu dentro de uma caixa de isolamento, a fim de evitar interferência de ruídos externos.

Com a finalidade de analisar estatisticamente os dados, o valor numérico das sessões necessárias para a aquisição do comportamento de pressão à barra foi transformado em pontuação da seguinte forma: pontuação 0 para animais que não aprenderam após 4 sessões, pontuação 1 para animais que aprenderam na 3ª ou 4ª sessão e pontuação 2 para animais que aprenderam na 1ª ou 2ª sessão.

3.6.2. TESTE DE PREFERÊNCIA SOCIAL

Este teste é uma adaptação daquele descrito por Crawley, (2007). Ele foi realizado em uma caixa de acrílico dividida em três compartimentos de igual tamanho (altura 39 cm x largura 26 cm x profundidade 41 cm) interligados por portas de correr. Durante todo o teste o compartimento central se manteve vazio, ao passo que cada um dos compartimentos laterais foi provido de uma gaiola de arame (ambas idênticas), porém em uma delas ficou retido um rato não familiar (rato B) àquele que foi avaliado (rato A). O rato B caracterizou-se por um macho com a mesma idade do rato A. A gaiola de arame permitiu que os ratos estabelecessem contato visual, olfativo e tátil. Sendo assim, durante o teste o rato avaliado pôde detectar pistas sociais emitidas pelo rato desconhecido e iniciar uma série de componentes de interação social.

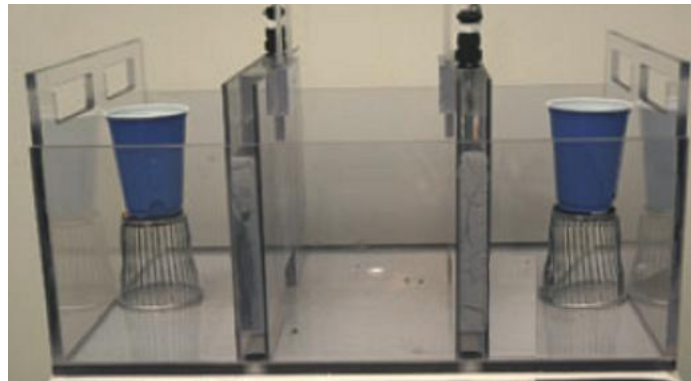


Figura 2 - Ilustração representativa do aparato utilizado. As modificações se referem ao tamanho da caixa, tendo em visto que a original descrita por Crawley (2007) foi projetada para camundongos.

No início do teste, o rato A foi colocado no centro da caixa para habituação. Esse período teve 10 minutos de duração e as portas dos compartimentos laterais ficaram fechadas, de modo que o rato só pôde explorar o compartimento central. Imediatamente após, se iniciou o período de sociabilidade, quando as portas foram abertas e o rato pôde explorar livremente todos os três compartimentos da caixa. Durante esse período (10 minutos), foram registrados o número de entradas e o

tempo de permanência em cada um dos compartimentos laterais e também a frequência de farejadas (quando o focinho do rato A, tocou o focinho do rato B). Após o término do teste os ratos foram retirados da caixa e a mesma foi limpa com solução de etanol 5 % para posterior utilização. Durante o teste a intensidade de luz ambiente foi rebaixada, sendo que os animais foram habituados a essa condição por 30 minutos precedentes a sessão.

3.7. EXPERIMENTO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O Labirinto em cruz elevado (LCE) é amplamente utilizado para avaliação do comportamento tipo-ansioso. O teste apresenta ao animal o conflito entre sua tendência natural de explorar um novo ambiente e sua relutância em se expor em território aberto no qual o risco de quedas e predadores é maior. Como consequência, os menos ansiosos exploram mais o braço aberto. O LCE é composto de 4 braços, sendo 2 abertos (10 x 50 cm) e dois fechados (10 x 50 x 45 cm), arranjados de forma que os braços de mesmo tipo fiquem em oposição entre si, ligados por uma área central (10 x 10 cm). O aparelho está elevado a 40 cm do chão.



Figura 3 – Labirinto em cruz elevado utilizado para realização do teste (marca Insight)

Cada animal foi submetido a uma única sessão de 10 minutos no labirinto. O teste foi feito com iluminação rebaixada, sendo que os animais foram habituados a essa condição por 30 minutos precedentes a sessão. Eles foram colocados no centro da plataforma com a face voltada para o braço aberto. No intervalo entre as sessões, o aparelho foi limpo com uma solução de 5% de etanol.

O teste foi filmado e posteriormente foram registrados o tempo de permanência e o número de entradas em cada braço, assim como foi calculada a porcentagem de entradas e de permanência em cada braço. Com o intuito de avaliar a atividade locomotora dos animais, portanto não se referindo a análise do comportamento tipo ansioso, foi comparado o total de entradas em todos os 4 braços do LCE (TETB) entre os grupos.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey e considerados significantes para um valor de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. COMPORTAMENTO MATERNO

Ratas com epilepsia do lobo temporal apresentaram agressividade aparente na manipulação das mesmas e também no momento em que foram colocadas junto ao macho para o acasalamento. Elas não permitiam a aproximação do macho, o que dificultou o acasalamento.

Conforme já relatado na literatura (Gurgel, 2007) o comportamento materno das ratas experimentais foi de total descuido com relação à ninhada. Após o parto, os filhotes foram encontrados espalhados pela caixa, frios, hipoativos e alguns ainda ligados à placenta e ensangüentados. Muitos deles apresentaram sinais de agressão por parte da mãe, enquanto outros foram mortos (figura 4 A).

Ratas fêmeas com epilepsia do lobo temporal frequentemente manifestam prática de canibalismo sobre a própria ninhada. Das 4 fêmeas experimentais que participaram desse estudo, apenas 1 apresentou comportamento materno esperado para a espécie.

Além dessas alterações, é importante salientar que o comportamento materno pode ter sido alterado também pela situação de estresse crônico provocado pelas crises convulsivas durante o período gestacional.



Figura 4 A: Foto de uma das ratas experimental alguns minutos após o parto, demonstrando total alienação à própria ninhada.

Figura 4 B: Foto de uma das ratas controle após o parto, demonstrando cuidado e proteção à ninhada.

4.2. NÚMERO DE FILHOTES POR NINHADA E MALFORMAÇÕES

Observamos nesse estudo que o número de filhotes experimentais por ninhada ($9,75 \pm 0,95$) foi significativamente inferior ao observado no grupo controle ($13,2 \pm 1,3$; $p < 0,003$). Em aproximadamente 15% dos filhotes de mães com epilepsia observou-se malformações e/ou natimortos.

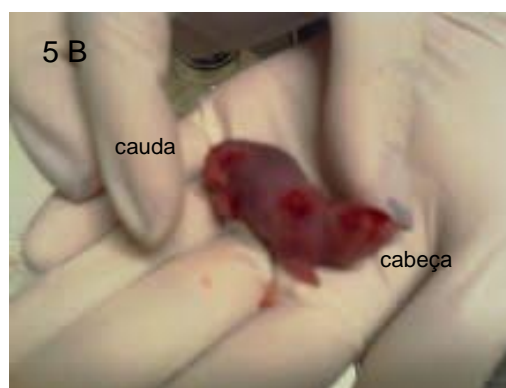


Figura 5 A: Foto de um filhote de rata experimental sem as patas traseiras e dianteiras e sem a cauda.

Figura 5 B: Foto de um filhote de rata experimental nascido sem a cauda e com malformações nas patas (dianteiras e traseiras), adicionalmente houve prática de canibalismo por parte da mãe.



Figura 6: Foto de um filhote de rata controle nascido sem malformações

4.3. EXPERIMENTO DA CAIXA DE CONDICIONAMENTO OPERANTE – CAIXA DE SKINNER

A pontuação obtida pelos animais do grupo experimental ($0,81 \pm 0,87$) relativa à aprendizagem para aquisição do comportamento de pressão à barra foi significativamente menor comparativamente aos grupos controle ($1,53 \pm 0,51$) e controle cross ($1,5 \pm 0,51$). Os resultados sugerem que o grupo experimental apresentou déficit cognitivo.

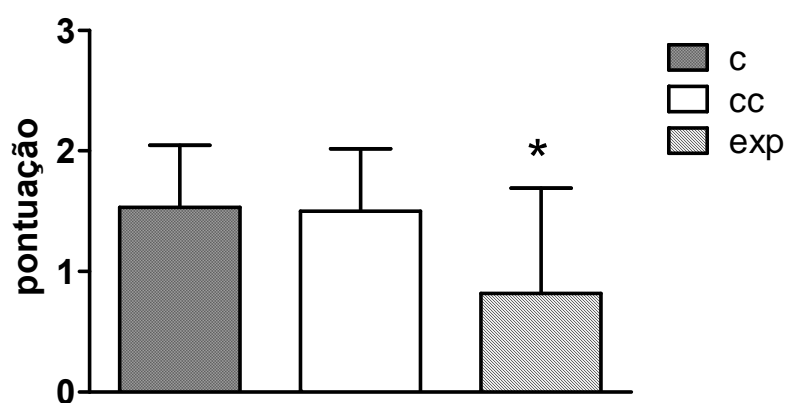


Figura 7: Pontuação referente ao número de sessões necessárias para a aquisição do comportamento de pressão à barra dos grupos controle (n=15), controle/cross (n=14) e experimental (n=11). Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$ comparativamente aos controles.

4.4. TESTE PREFERÊNCIA SOCIAL

Neste teste foram avaliados três parâmetros: o número de entradas e o tempo de permanência no compartimento com rato, bem como o número de contatos olfativos.

O número de entradas dos animais experimentais no compartimento com rato ($2,72 \pm 2,24$) foi significativamente inferior quando comparado aos grupos controle ($4,93 \pm 1,38$) e controle cross ($4,78 \pm 2,08$) (fig.8). Da mesma maneira, o tempo de permanência dos animais experimentais no compartimento com rato ($226,72 \pm 182,5$) foi significativamente menor quando comparado aos grupos controle ($345,53$

$\pm 68,01$) e controle cross ($344,85 \pm 99,5$) (fig. 9). Ainda, o número de contatos olfativos do grupo experimental ($4,72 \pm 4,07$) foi significativamente reduzido em comparação aos grupos controle ($9,73 \pm 2,86$) e controle cross ($11,42 \pm 3,36$) (fig 10).

Importante salientar que 36% dos animais experimentais apresentaram comportamento de *freezing* (imobilidade) permanecendo no compartimento central durante todo o período de avaliação. O conjunto dos resultados sugere que os animais experimentais apresentaram prejuízo na interação social.

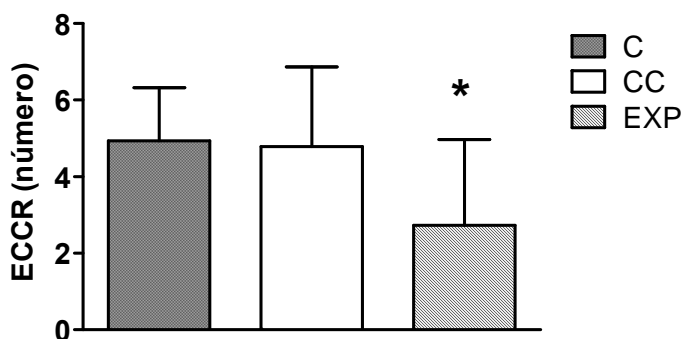


Figura 8: Número de entradas no compartimento com rato (ECCR) dos grupos controle (n=15), controle/cross (n=14) e experimental (n=11) no teste de preferência social. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão * $p < 0,05$ comparativamente aos controles.

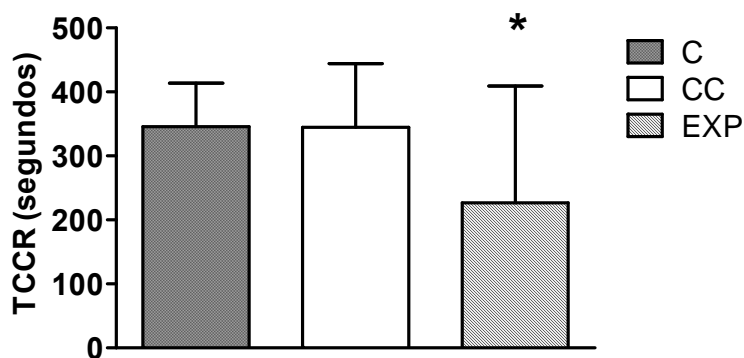


Figura 9: Tempo no compartimento com rato (TCCR) dos grupos controle (n=15), controle/cross (n=14) e experimental (n=11) no teste de preferência social. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão * $p < 0,05$ comparativamente aos controles.

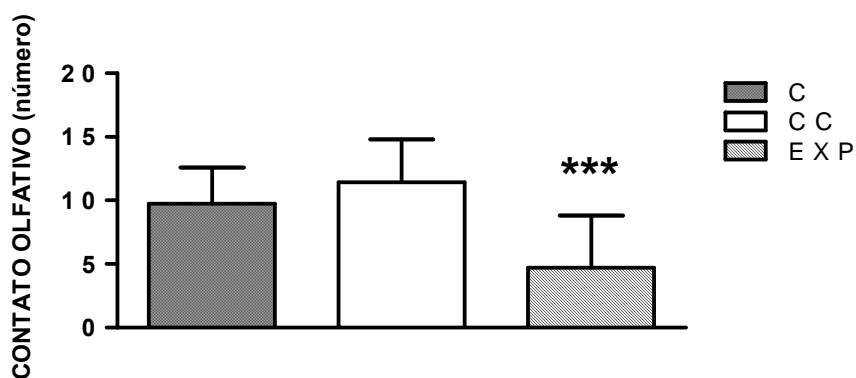
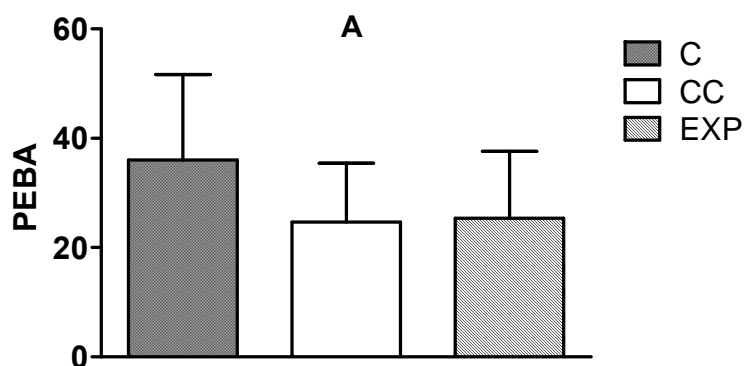


Figura 10: Número de contatos olfativos dos grupos controle (n=15), controle/cross (n=14) e experimental (n=11) no teste de preferência social. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. *** $p < 0,0001$ comparativamente aos controles.

4.5. TESTE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO

Animais do grupo experimental (EXP) não apresentaram sinais de ansiedade, visto que a análise de variância não revelou diferença estatisticamente significativa no que se refere à percentagem de entradas nos braços abertos – PEBA (figura 11 A) e percentagem de tempo nos braços abertos – PTBA (figura 11 B) comparativamente aos grupos controle (C) e controle cross (CC).



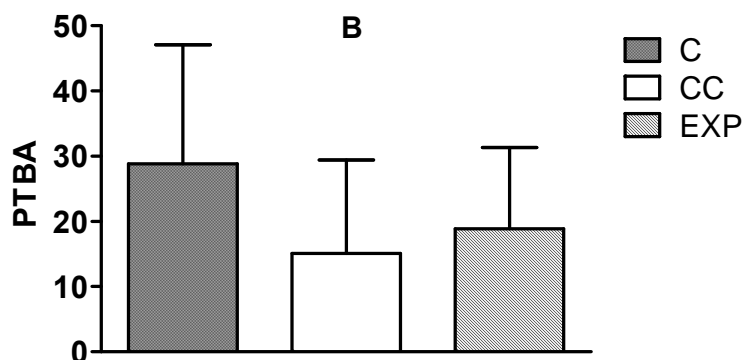


Figura 11 A: Percentagem de entradas nos braços abertos (PEBA) dos grupos C, CC e EXP.

Figura 11 B: Percentagem de tempo nos braços abertos (PTBA) dos grupos C, CC e EXP. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados

Da mesma forma, a atividade locomotora do grupo experimental avaliado pelo número total de entradas em todos os braços (TETB) não diferiu dos grupos controles, conforme ilustrado na figura 12.

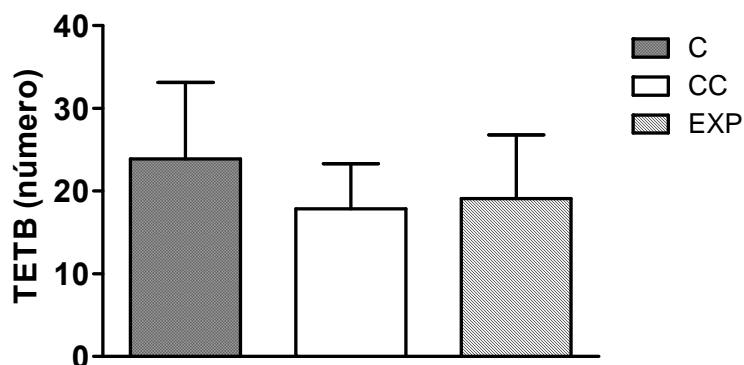


Figura 12 – Total de entradas em todos os braços (TETB) dos grupos controle (n=15), controle/cross (n=14) e experimental (n=11) no teste LCE. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

Um desenvolvimento cerebral prejudicado pode acarretar transtornos do espectro autista (TEA), que por sua vez, alteram o estabelecimento da interação social recíproca, da comunicação verbal e não verbal e são acompanhados por comportamentos repetitivos e padrões anormais de interesses e atividades. A ampla heterogeneidade na clínica dos indivíduos afetados dificulta as pesquisas que visam identificar a etiologia dos TEAs (Folstein e Piven, 1991; Donaldson e Young, 2008). A patogênese do autismo permanece desconhecida, apesar de se reconhecer a importância dos fatores genéticos e ambientais. A utilização de modelos animais tem proporcionado a ampliação do conhecimento acerca dos fatores neurobiológicos.

O ácido valpróico (VPA), medicamento antiepiléptico, é reconhecido como um fator ambiental envolvido com a etiologia do autismo (Christianson, Chesler *et al.*, 1994; Williams e Hersh, 1997; Williams, King *et al.*, 2001; Dean, Hailey *et al.*, 2002; Rasalam, Hailey *et al.*, 2005). Em ratos, uma única injeção intraperitoneal de VPA na rata prenha em um período correspondente ao fechamento do tubo neural produz nos filhotes um fenótipo comportamental e anatômico similar à condição humana. Os filhotes exibem redução no número de células de Purkinje no cerebelo, prejuízo na interação social, comportamentos repetitivos e estereotipados, limiar aumentado para estímulos nociceptivos, sensibilidade aumentada para estimulação sensorial, aumento da ansiedade e do medo (Rodier, Ingram *et al.*, 1996; Rodier, Ingram *et al.*, 1997; Schneider e Przewlocki, 2005; Schneider, Turczak *et al.*, 2006; Markram, Rinaldi *et al.*, 2008), todos os sintomas que são comuns no autismo.

Considerando que gestantes com epilepsia fazem uso de drogas antiepiléticas, não existe comprovação se a epilepsia *per se*, quando não controlada, causa alterações no conceito ou se a medicação, extremamente teratogênica, associada à predisposição genética compõe o fator responsável por essas alterações.

Este trabalho avaliou as conseqüências da exposição às crises convulsivas espontâneas maternas durante a gestação no comportamento da prole. O uso deste modelo permite eliminar a influência de fatores genéticos e da exposição às drogas.

O número de filhotes nascidos de mães com epilepsia foi inferior ao observado no grupo controle. Tem-se sugerido que as crises epiléticas no decorrer da gestação propiciam a redução do aporte de oxigênio para a circulação fetal, e que o hipofluxo placentário pode comprometer o desenvolvimento intrauterino. De fato, Lima *et al.*, (2010, *in press*) observaram áreas de infarto nas placentas das fêmeas com epilepsia, sugerindo a ocorrência de hipofluxo placentário. Neste sentido, nossos resultados são corroborados por (Perrin, Mamet *et al.*, 2004 e Maresova, Valkounova *et al.*, 2001) que observaram diminuição no número de filhotes nascidos de mães expostas à hipóxia comparados ao de mães não expostas. Adicionalmente, observamos malformações em 15% dos filhotes de mães com epilepsia, em concordância com os resultados obtidos por Vale (2005).

A avaliação comportamental revelou que os animais do grupo experimental não apresentaram sinais de ansiedade. Estes resultados são corroborados por Lima *et al.*, (2010, *in press*). Contudo, Raffo, De Vasconcelos *et al.*, (2009) não observaram quaisquer alterações no desenvolvimento ou no comportamento da prole de mães com epilepsia e concluíram que as crises durante a gestação não são prejudiciais para o desenvolvimento fetal.

Em humanos, vários estudos foram realizados para avaliar o desempenho motor em crianças com autismo e as mesmas, frequentemente apresentam déficits significativos (Ming, Brimacombe *et al.*, 2007 ; Pan, Tsai *et al.*, 2009). No entanto, neste trabalho não utilizamos protocolos específicos para avaliar o desempenho motor dos animais, porém se houve esse tipo de prejuízo, o mesmo não afetou a atividade locomotora dos animais. No estudo de Lima *et al.*, (2010, *in press*) os filhotes adultos apresentaram prejuízo na coordenação motora, que foram atribuídos aos eventos hipóxicos resultantes das crises epiléticas no decorrer da gestação. De fato, os autores observaram sinais de infarto nas placentas das fêmeas com epilepsia.

Corroborando com estes resultados, vários estudos nos quais eventos hipóxicos foram induzidos pela obstrução do fluxo da aorta descendente ou pela câmara hipobárica os filhotes apresentaram prejuízo motor, cognitivo e comportamento tipo-ansioso (Golan e Huleihel, 2006). Trofimova, Graf *et al.*, (2010) demonstraram que animais de ambos os gêneros submetidos à hipóxia intermitente antenatal (13 episódios com duração de 1 minuto em um intervalo de 2 horas)

durante o período da organogênese (9-10^o da gestação) apresentaram redução da atividade locomotora e aumento do nível de ansiedade. Interessantemente, os machos mostraram-se mais sensíveis a influência da hipóxia.

Considerando que os danos provocados pelas crises epiléticas no desenvolvimento fetal estão vinculados aos eventos hipóxicos, a extensão destes prejuízos dependem da frequência, duração, período de ocorrência das crises ao longo da gestação e da susceptibilidade tecidual e individual à hipóxia. Neste trabalho, bem como no de Lima et al., (2010, *in press*) a frequência de crises das ratas prenhes foi de 4-5 por semana com duração média de 30 segundos. Estas considerações sugerem que os eventos hipóxicos que comprometem o desenvolvimento fetal da prole de mães com epilepsia não controlada, são de magnitude inferior aos presentes nos modelos de hipóxia pré-natal descritos acima, uma vez que os prejuízos observados nos filhotes são menos abrangentes.

Outra questão a considerar é que a duração da gestação nos ratos é de 21 dias e, portanto, o período de exposição para os eventos hipóxicos intermitentes é menor comparativamente a espécie humana que tem um desenvolvimento mais lento, o que aumenta o período de vulnerabilidade. Apesar da utilidade deste modelo na medicina translacional como ferramenta para apontar os prejuízos das crises ao longo da gestação no desenvolvimento fetal, ele é limitado. É provável que uma condição similar na espécie humana produzisse prejuízos mais abrangentes. Neste trabalho, bem como no de Lima et al., (2010, *in press*) e Raffo et al., (2009) não se correlacionou ocorrência das crises com a idade gestacional, para se investigar quais as janelas de vulnerabilidade para os eventos hipóxicos.

No teste da sociabilidade, animais do grupo experimental apresentaram déficit na interação social. Salieta-se que 4 animais do grupo experimental, representando 36% da amostra, não se deslocaram do compartimento central ao término do período de habituação, o que sugere desinteresse ou sinal de estresse frente à novidade social. Markram, Rinaldi *et al.*, (2008) relataram que animais submetidos ao modelo de autismo pela exposição antenatal ao ácido valpróico reagiram ao medo condicionado (como por exemplo mudança visual do ambiente) apresentando um aumento significativamente maior no comportamento de imobilidade.

Aparentemente o prejuízo na coordenação motora, conforme observado por Lima et al., (2010, *in press*), não afetou o desempenho na tarefa, uma vez que a

atividade locomotora não foi diferente entre os grupos, sugerindo que os animais experimentais exibiram menor interesse em interagir socialmente. Baixo nível de interação em um único teste é insuficiente para se recomendar o modelo como apropriado para estudo do autismo ou para se vincular o evento etiológico como envolvido na neuropatologia do autismo, mesmo porque déficit na interação social não é um sintoma exclusivo nem único dos transtornos do espectro autista. No entanto, esses resultados estimulam estudos posteriores com a utilização de outras ferramentas para avaliação da sociabilidade ao longo da vida.

No que tange a tarefa de aprendizagem, os animais do grupo experimental necessitaram de maior número de sessões para aquisição do comportamento de pressão à barra, sugerindo prejuízo cognitivo. O déficit cognitivo observado é compatível com a ocorrência de episódios de hipóxia antenatal (Golan e Huleihel, 2006). No entanto, não podemos descartar a hipótese de que o prejuízo na coordenação motora (Lima et al., 2010, *in press*) muito embora não tenha comprometido a deambulação dos animais, possa ter comprometido o desempenho na tarefa que depende da coordenação motora fina, uma vez os animais precisam se apoiar nas patas traseiras e pressionar a barra com as patas dianteiras.

Tumanova et al., (2004) estudaram o desenvolvimento fisiológico e comportamental de ratos submetidos à hipóxia no 13,5^o dia da embriogênese e constataram que esses animais apresentavam atrasos no desenvolvimento e alterações estruturais no córtex sensorio motor durante o primeiro mês de vida. Ainda que as alterações tenham sido parcialmente compensadas com a idade, os animais adultos submetidos a hipóxia aguda pré-natal se mostraram menos capazes de aprender novos movimentos complexos. Adicionalmente, animais experimentais se mostraram mais reativos e recuavam ao ouvirem o ruído da caixa de Skinner. Perrin, Mamet *et al.*, (2004) observaram que filhotes de mães submetidas à hipóxia antenatal apresentaram maior reatividade às condições inesperadas. Por outro lado, medos e fobias embora não façam parte dos sintomas centrais do autismo, frequentemente estão presentes (Muris, Steerneman *et al.*, 1998 ; Gillott, Furniss *et al.*, 2001) e a amígdala tem sido extensivamente associada com o medo condicionado em humanos e em animais (Davis e Whalen, 2001). Ainda, aumento da sensibilidade para estímulos sensoriais (estímulos auditivos) é frequentemente observado no autismo e pode estar relacionado à ineficiência da modulação inibitória

dos impulsos sensoriais, resultando em esquiva ativa para estimulação externa e dificuldade para habituação, tanto em humanos (Orekhova, Stroganova *et al.*, 2008) como em modelos animais de autismo (Markram, Rinaldi *et al.*, 2008).

Desta maneira, não se pode descartar que o déficit cognitivo observado na caixa de condicionamento operante seja específico dos processos cognitivos ou que resultam também de outras alterações (sensoriais, motoras e da emocionalidade) que podem agir como artefato na interpretação dos resultados.

6. CONCLUSÃO

Ratos adultos de mães com crises epiléticas durante a gestação apresentaram prejuízo cognitivo e na interação social, sem sinais de ansiedade, sugerindo que as crises epiléticas durante a gestação são prejudiciais para o desenvolvimento fetal. Estudos posteriores são necessários para uma avaliação mais ampla do repertório comportamental destes animais ao longo da vida, independentemente das crises epiléticas serem ou não um fator de risco para o desenvolvimento do transtorno do espectro autista.

REFERÊNCIAS

- AMADO, D. et al. Seizure-associated brain injury in term newborns and in offspring of mothers with epilepsy. **Epilepsia** [S.I.], v. 46, p. 198-198, 2005.
- BARON-COHEN, S.; BELMONTE, M. K. Autism: A window onto the development of the social and the analytic brain. **Annual Review of Neuroscience** [S.I.], v. 28, p. 109-126, 2005.
- CHRISTIANSON, A. L. et al. Fetal valproate syndrome - clinical and neurodevelopmental features in 2 sibling pairs. **Developmental Medicine and Child Neurology** [S.I.], v. 36, n. 4, p. 361-369, 1994.
- COMBS-CANTRELL, D. T.; YERBY, M. S. Case reports of women with epilepsy. **Epilepsia** [S.I.], v. 44, p. 41-44, 2003.
- DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: vigilance and emotion. **Molecular Psychiatry** [S.I.], v. 6, n. 1, p. 13-34, 2001.
- DEAN, J. C. S. et al. Long term health and neurodevelopment in children exposed to antiepileptic drugs before birth. **Journal of Medical Genetics** [S.I.], v. 39, n. 4, p. 251-259, 2002.
- DONALDSON, Z. R.; YOUNG, L. J. Oxytocin, Vasopressin, and the Neurogenetics of Sociality. **Science** [S.I.], v. 322, n. 5903, p. 900-904, 2008.
- DURKIN, M. S. et al. Advanced Parental Age and the Risk of Autism Spectrum Disorder. **American Journal of Epidemiology** [S.I.], v. 168, n. 11, p. 1268-1276, Dec 2008.
- FOLSTEIN, S. E.; PIVEN, J. Etiology of autism - genetic influences. **Pediatrics** [S.I.], v. 87, n. 5, p. 767-773, 1991.
- FOLSTEIN, S. E.; ROSEN-SHEIDLEY, B. Genetics of autism: Complex aetiology for a heterogeneous disorder. **Nature Reviews Genetics** [S.I.], v. 2, n. 12, p. 943-955, 2001.
- FOMBONNE, E. Epidemiology of Pervasive Developmental Disorders. **Pediatric Research** [S.I.], v. 65, n. 6, p. 591-598, Jun 2009.
- GARDENER, H. et al. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. **British Journal of Psychiatry** [S.I.], v. 195, n. 1, p. 7-14, 2009.
- GASTAUT, H. et al. Relative frequency of different types of epilepsy - study employing classification of international league against epilepsy. **Epilepsia** [S.I.], v. 16, n. 3, p. 457-461, 1975.

GILLOTT, A. et al. Anxiety in high-functioning children with autism. **Autism** [S.I.], v. 5, n. 3, p. 277-286, 2001.

GOLAN, H.; HULEIHEL, M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. **Developmental Science** [S.I.], v. 9, n. 4, p. 338-349, 2006.

GOLAN, M. H. et al. Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. **Neuropharmacology** [S.I.], v. 57, n. 5-6, p. 511-522, 2009.

HOLMES, L. B. The teratogenicity of anticonvulsant drugs: a progress report. **Journal of Medical Genetics** [S.I.], v. 39, n. 4, p. 245-247, 2002.

HULTMAN, C. M. et al. Perinatal risk factors for infantile autism. **Epidemiology** [S.I.], v. 13, n. 4, p. 417-423, 2002.

JUUL-DAM, N. et al. Prenatal, perinatal, and neonatal factors in autism, pervasive developmental disorder-not otherwise specified, and the general population. **Pediatrics** [S.I.], v. 107, n. 4, p. art. no.-e63, 2001.

LAJOIE, J.; MOSHE, S. L. Effects of seizures and their treatment on fetal brain. **Epilepsia** [S.I.], v. 45, p. 48-52, 2004.

LEAVITT, A. M. et al. Epilepsy in pregnancy - developmental outcome of offspring at 12 months. **Neurology** [S.I.], v. 42, n. 4, p. 141-143, 1992.

LIMA, D. C. et al. Behavioral evaluation of adult rats exposed in utero to maternal epileptic seizures. **Epilepsy and Behavior**. *In press*. 2005

LIPORACE, J.; D'ABREU, A. Epilepsy and women's health: Family planning, bone health, menopause, and menstrual-related seizures. **Mayo Clinic Proceedings** [S.I.], v. 78, n. 4, p. 497-506, 2003.

MARESOVA, D. et al. Excitability changes of cortical neurons during the postnatal period in rats exposed to prenatal hypobaric hypoxia. **Physiological Research** [S.I.], v. 50, n. 2, p. 215-219, 2001.

MARKRAM, K. et al. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. **Neuropsychopharmacology** [S.I.], v. 33, n. 4, p. 901-912, 2008.

MCDOUGLE, C. J. et al. Neurochemistry in the pathophysiology of autism. 2005. p.9-18.

MING, X. et al. Prevalence of motor impairment in autism spectrum disorders. **Brain & Development** [S.I.], v. 29, p. 565-570, 2007.

MURIS, P. et al. Comorbid anxiety symptoms in children with pervasive developmental disorders. **Journal of Anxiety Disorders** [S.I.], v. 12, n. 4, p. 387-393, Jul-Aug 1998.

NANSON, J. L. Autism in fetal alcohol syndrome - a report of 6 cases. **Alcoholism-Clinical and Experimental Research** [S.I.], v. 16, n. 3, p. 558-565, 1992.

OREKHOVA, E. V. et al. Sensory gating in young children with autism: Relation to age, IQ, and EEG gamma oscillations. **Neuroscience Letters** [S.I.], v. 434, n. 2, p. 218-223, 2008.

PAN, C. Y. et al. Fundamental Movement Skills in Children Diagnosed with Autism Spectrum Disorders and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Journal of Autism and Developmental Disorders** [S.I.], v. 39, n. 12, p. 1694-1705, 2009.

PERRIN, D. et al. Long-term prenatal hypoxia alters maturation of brain catecholaminergic systems and motor behavior in rats. **Synapse** [S.I.], v. 54, n. 2, p. 92-101, 2004.

RAFFO, E. et al. Neurobehavioral maturation of offspring from epileptic dams: Study in the rat lithium-pilocarpine model. **Experimental Neurology** [S.I.], v. 219, n. 2, p. 414-423, 2009.

RAPIN, I. The autistic-spectrum disorders. **New England Journal of Medicine** [S.I.], v. 347, n. 5, p. 302-303, 2002.

RASALAM, A. D. et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. **Developmental Medicine and Child Neurology** [S.I.], v. 47, n. 8, p. 551-555, 2005.

REGESTA, G.; TANGANELLI, P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. **Epilepsy Research** [S.I.], v. 34, n. 2-3, p. 109-122, 1999.

RODIER, P. M. et al. Linking etiologies in humans and animal models: Studies of autism. **Reproductive Toxicology** [S.I.], v. 11, n. 2-3, p. 417-422, 1997.

_____. Embryological origin for autism: Developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. **Journal of Comparative Neurology** [S.I.], v. 370, n. 2, p. 247-261, 1996.

SCHNEIDER, T.; PRZEWLOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Animal model of autism. **Neuropsychopharmacology** [S.I.], v. 30, n. 1, p. 80-89, 2005.

SCHNEIDER, T. et al. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Issues for a therapeutic approach in autism. **Neuropsychopharmacology** [S.I.], v. 31, n. 1, p. 36-46, 2006.

SHORVON, S. D. Epidemiology, classification, natural-history, and genetics of epilepsy. **Lancet** [S.I.], v. 336, n. 8707, p. 93-96, 1990.

STROMLAND, K. et al. Autism in thalidomide embryopathy - a population study. **Developmental Medicine and Child Neurology** [S.I.], v. 36, n. 4, p. 351-356, 1994.

THOMAS, S. V. et al. Risk of major congenital malformations in the offsprings of women with epilepsy is not related to family history. **Epilepsy Research** [S.I.], v. 83, n. 1, p. 52-57, 2009.

TROFIMOVA, L. K. et al. Postnatal behavioral consequences of antenatal intermittent hypoxia experienced during early organogenesis in mature rats. **Biology Bulletin** [S.I.], v. 37, n. 1, p. 44-48, 2010.

TROTTIER, G. et al. Etiology of infantile autism: a review of recent advances in genetic and neurobiological research. **Journal of Psychiatry & Neuroscience** [S.I.], v. 24, n. 2, p. 103-115, 1999.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats - behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research** [S.I.], v. 9, n. 3, p. 315-335, 1983.

VALE, T. G. et al. Effects of seizures during pregnancy on post-natal development of offspring. **Epilepsia** [S.I.], v. 46, p. 370-370, 2005.

VOLKMAR, F. R.; PAULS, D. Autism. **Lancet** [S.I.], v. 362, n. 9390, p. 1133-1141, 2003.

WATTS, T. J. The Pathogenesis of Autism. Clinical Medicine: **Pathology** [S.I.], v. 1, p. 5, 2008.

WILLIAMS, G. et al. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. **Developmental Medicine and Child Neurology** [S.I.], v. 43, n. 3, p. 202-206, 2001.

WILLIAMS, K. et al. Perinatal and maternal risk factors for autism spectrum disorders in New South Wales, Australia. **Child Care Health and Development** [S.I.], v. 34, n. 2, p. 249-256, 2008.

WILLIAMS, P. G.; HERSH, J. H. A male with fetal valproate syndrome and autism. **Developmental Medicine and Child Neurology** [S.I.], v. 39, n. 9, p. 632-634, 1997.

YERBY, M. S. Problems and management of the pregnant woman with epilepsy. **Epilepsia** [S.I.], v. 28, p. S29-S36, 1987.

_____. Pregnancy and epilepsy. **Epilepsia** [S.I.], v. 32, p. S51-S59, 1991.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela dos resultados individuais do experimento da caixa de condicionamento operante – Caixa de Skinner.

Animais	Número de sessões	Pontuação
Controle 1	3	1
Controle 2	2	2
Controle 3	3	1
Controle 4	3	1
Controle 5	3	1
Controle 6	2	2
Controle 7	3	1
Controle 8	3	1
Controle 9	2	2
Controle 10	2	2
Controle 11	1	2
Controle 12	1	2
Controle 13	3	1
Controle 14	2	2
Controle 15	2	2
Cross 1	3	1
Cross 2	1	2
Cross 3	4	1
Cross 4	4	1
Cross 5	3	1
Cross 6	4	1
Cross 7	2	2
Cross 8	2	2
Cross 9	1	2
Cross 10	3	1
Cross 11	2	2
Cross 12	2	2
Cross 13	2	2
Cross 14	3	1
Exp 1	Não aprendeu	0
Exp 2	Não aprendeu	0
Exp 3	Não aprendeu	0
Exp 4	2	2
Exp 5	1	2
Exp 6	1	2
Exp 7	Não aprendeu	0
Exp 8	3	1
Exp 9	3	1
Exp 10	4	1
Exp 11	Não aprendeu	0

APÊNDICE B – Tabela dos resultados individuais do teste de preferência social.

Animais	Entradas no compartimento COM rato	Tempo no compartimento COM rato	Entradas no compartimento SEM rato	Tempo no compartimento SEM rato	Contatos olfativos
Controle 1	4	353	3	68	11
Controle 2	4	330	3	74	9
Controle 3	6	228	5	67	7
Controle 4	7	290	5	100	8
Controle 5	4	464	2	44	12
Controle 6	5	421	3	58	8
Controle 7	3	327	2	47	10
Controle 8	4	354	4	57	6
Controle 9	4	319	3	58	11
Controle 10	6	451	4	53	17
Controle 11	5	344	6	83	7
Controle 12	6	414	6	62	13
Controle 13	4	330	3	31	8
Controle 14	4	309	4	138	11
Controle 15	8	249	10	128	8
Cross 1	8	326	5	100	10
Cross 2	6	413	3	56	10
Cross 3	2	198	2	53	8
Cross 4	4	331	3	133	12
Cross 5	4	457	2	42	13
Cross 6	4	290	4	207	8
Cross 7	3	301	3	102	10
Cross 8	4	204	2	17	6
Cross 9	2	568	1	5	18
Cross 10	7	406	3	22	12
Cross 11	5	262	1	6	9
Cross 12	5	312	5	79	16

Animais	Entradas no compartimento COM rato	Tempo no compartimento COM rato (segundos)	Entradas no compartimento SEM rato	Tempo no compartimento SEM rato (segundos)	Contatos olfativos
Cross 13	4	362	4	133	15
Cross 14	9	398	4	53	13
Exp 1	5	370	2	103	5
Exp 2	4	391	5	108	8
Exp 3	3	277	2	60	5
Exp 4	0	0	0	0	0
Exp 5	0	0	0	0	0
Exp 6	0	0	0	0	0
Exp 7	5	364	5	125	10
Exp 8	4	384	0	0	0
Exp 9	5	329	4	77	7
Exp 10	4	379	3	93	7
Exp 11	0	0	0	0	0

APÊNDICE C – Tabela dos resultados do teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE).

Animais	Entradas no braço aberto	Tempo no braço aberto (segundos)	Entradas no braço fechado	Tempo no braço fechado (segundos)
Controle 1	3	52	7	414
Controle 2	2	35	8	492
Controle 3	1	10	13	416
Controle 4	2	35	15	457
Controle 5	9	146	13	310
Controle 6	9	128	15	303
Controle 7	7	107	5	416
Controle 8	10	118	16	309
Controle 9	12	182	15	235
Controle 10	16	198	17	232
Controle 11	10	121	20	209
Controle 12	20	243	16	176
Controle 13	17	238	17	213
Controle 14	6	56	25	388
Controle 15	15	211	18	245
Cross 1	2	30	14	358
Cross 2	4	55	15	367
Cross 3	7	86	10	366
Cross 4	6	218	6	171
Cross 5	2	32	8	445
Cross 6	2	18	10	394
Cross 7	3	21	12	471
Cross 8	2	9	12	389
Cross 9	7	77	18	374
Cross 10	6	81	20	289
Cross 11	3	10	19	360
Cross 12	5	97	15	323

Animais	Entradas no braço aberto	Tempo no braço aberto (segundos)	Entradas no braço fechado	Tempo no braço fechado (segundos)
Cross 13	4	29	11	393
Cross 14	9	108	18	305
Exp 1	5	54	8	290
Exp 2	2	28	10	367
Exp 3	0	0	7	498
Exp 4	3	60	11	375
Exp 5	3	62	12	353
Exp 6	8	110	24	324
Exp 7	11	133	17	246
Exp 8	11	188	14	231
Exp 9	5	61	16	320
Exp 10	7	72	18	301
Exp 11	4	69	14	368

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa