

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

MARIA LUCILA RIBEIRO CAMPOS

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO VALPRÓICO NO
COMPORTAMENTO DE BRINCAR NA PROLE DE RATOS: UM MODELO
ANIMAL PARA AUTISMO**

**SÃO PAULO
2006**

MARIA LUCILA RIBEIRO CAMPOS

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO VALPRÓICO NO
COMPORTAMENTO DE BRINCAR NA PROLE DE RATOS: UM MODELO
ANIMAL PARA AUTISMO**

Dissertação apresentada ao corpo
docente do Programa de Pós-Graduação
em Distúrbios do Desenvolvimento da
Universidade Presbiteriana Mackenzie
como requisito necessário para a
obtenção do título de Mestre

ORIENTADOR: DR. MARCOS TOMANIK MERCADANTE

CO-ORIENTADORA: DRA. MARIA MARTHA BERNARDI

SÃO PAULO
2006

MARIA LUCILA RIBEIRO CAMPOS

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ÁCIDO VALPRÓICO NO
COMPORTAMENTO DE BRINCAR NA PROLE DE RATOS: UM MODELO
ANIMAL PARA AUTISMO**

Dissertação apresentada ao corpo
docente do Programa de Pós-Graduação
em Distúrbios do Desenvolvimento da
Universidade Presbiteriana Mackenzie
como requisito necessário para a
obtenção do título de Mestre

Aprovada em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Tomanik Mercadante
(orientador)

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi.
(co-orientadora)

Profa. Dra. Silvana Chiavegato
(banca externa)

Dedicatória

Ao Henrique e ao Gustavo, que souberam entender a minha ausência durante esse tempo.

AGRADECIMENTOS

A Deus que, na sua infinita sabedoria, nos dá oportunidades de viver as mais ricas experiências.

Ao Dr. Marcos Mercadante que, com toda a sabedoria e paciência, me mostrou os caminhos da pesquisa e de como pensar a neurociência.

À Dra. Martha Bernardi que sempre esteve à disposição com seu bom humor, sua sabedoria e sua experiência.

À Dra. Silvana Chiavegato pela rica participação na qualificação, trazendo idéias que enriqueceram o trabalho.

Aos meus pais, que me apoiaram incondicionalmente nesta jornada não só pelo exemplo de estudiosos que são, mas pela disposição em me ouvir e principalmente na disponibilidade em cuidar do Gu sempre que precisei.

À Paulinha, que me ajudou muitíssimo em tudo, sendo amiga sempre.

À equipe de pesquisadores da Faculdade de Medicina Veterinária da USP por me atenderem sempre com delicadeza e simpatia.

Ao prof. Ricardo P. Rodrigues que me ajudou com as traiçoeiras vírgulas da língua portuguesa.

À direção do Colégio Presbiteriano Mackenzie pelo apoio e reconhecimento do meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, por me mostrarem pontos de vista diferentes dos que eu tinha e me ajudarem a sempre procurar novas perspectivas.

À Carlinha, pela dedicação e carinho.

À Rosane Lowenthal, por compartilhar muito da sua experiência e principalmente pela amizade descoberta e aprofundada nesses dois anos.

À Sabrina Ribeiro, pelo bom humor, sinceridade, amizade e ótima companhia de viagem.

Aos demais colegas da turma, companheiros de xerox, trabalhos, happy hours, por todos os momentos de convivência.

À Dra. Débora Oliveira, pelo incentivo desde as primeiras idéias de projetos para esse curso e pelo carinho e dedicação com que me ajuda a cuidar do meu bem mais precioso, o Gu.

Especialmente aos Caríssimos Amigos que me mostraram caminhos antes desconhecidos e que, com isso, mudaram minha forma de ver o mundo e a mim mesma.

A todos os demais amigos, que sempre foram companheiros e me apoiaram de alguma forma para que este trabalho pudesse ser realizado, meu mais sincero muito obrigada.

RESUMO

O autismo é um transtorno invasivo do desenvolvimento caracterizado pelo prejuízo em 3 áreas: sociabilidade, comunicação e comportamentos repetitivos, cuja etiologia parece ser multicausal, incluindo fatores genéticos e ambientais. Há algum tempo o uso de ácido valpróico (VPA), durante a gestação, no tratamento de convulsões, tem sido relacionado com a ocorrência desse transtorno. Modelos animais para investigação de possíveis causas dessa condição têm sido utilizados com resultados expressivos. Esse trabalho pretende explorar o impacto no desenvolvimento da sociabilidade em sujeitos expostos a essa droga durante a gestação, permitindo avançarmos no conhecimento acerca da associação observada entre VPA durante a gestação e autismo. Para tanto, ratas prenhes receberam o VPA no 9º dia de gestação e o comportamento social da prole foi analisado. Como resultado, observou-se um prejuízo significativo em várias formas de comportamento social. A bibliografia recente apresenta indícios de alterações na migração de neurônios de serotonina nesses indivíduos, o que poderia ser uma explicação para as alterações de comportamento.

ABSTRACT

Autism is a pervasive development disorder characterized by impairment in three areas: sociability, communication and repetitive behaviors, having a multicausal etiology, including genetic and environmental agents. In the late years, the seizures treatment with VPA during pregnancy has been related to higher occurrence of autism. In order to investigate the possible causes of autism, animal models had been used with expressive results. This study explores the impact in the sociability development in animals exposed to VPA during gestation. Pregnant rats were treated VPA in the 9th day of gestation and social behavior of the offspring were analyzed. The results showed a significant impairment in several forms of social behavior. Recent publications show abnormal serotonin neuron migration associated with VPA which might be underlying the mechanisms of these behaviors.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comportamentos de exploração ambiental.....37

Tabela 2: Comportamentos sexuais.....38

Tabela 3: Comportamentos de solicitação de brincar.....40

Tabela 4: Comportamentos de pinning.....41

Lista de figuras

Figura 1: Comportamentos de exploração ambiental.....37

Figura 2: Comportamentos sexuais.....39

Figura 3: Comportamentos de solicitação de brincar.....40

Figura 4: Comportamentos de pinning.....41

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1.1 Autismo | 12 |
| 1.1.1 Caracterização..... | 12 |
| 1.1.2 Sociabilidade | 15 |
| 1.1.3 Alterações estruturais no sistema nervoso central e sociabilidade | 20 |
| 1.1.4 Aspectos do desenvolvimento da sociabilidade e modelos animais..... | 21 |
| 1.1.4.1 Comportamento de brincar (CB) | 21 |
| 1.1.4.3 Borna-Disease Vírus..... | 26 |
| 1.1.4.4 Ácido Valpróico (VPA)..... | 28 |
| 2. Objetivos e hipótese | 30 |
| 3. Justificativa do trabalho | 31 |
| 4. Materiais e método | 32 |
| 4.1 Estudo experimental..... | 32 |
| 4.1.1 Definição e tratamento da amostra..... | 32 |
| 4.1.2 –Comportamento de brincar na infância | 33 |
| 5. Resultados..... | 36 |
| 6. Discussão..... | 42 |
| 7. Conclusões | 48 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 49 |

1. Introdução

1.1 Autismo

1.1.1 Caracterização

O Transtorno Autista (TA) é um transtorno do desenvolvimento global da criança. De acordo com o *Manual de Diagnóstico e Estatística de Desordens Mentais, Quarta Edição, Revisão de Texto (DSM-IV-TR)* e a *Classificação Internacional de Doenças, Décima Revisão (CID-10)*, o autismo é caracterizado por prejuízos em três áreas de comportamento: 1) interações sociais; 2) linguagem, comunicação e imaginação; e 3) variedade de interesses e atividades. Afeta mais freqüentemente os meninos que as meninas (4:1) e os primeiros sintomas surgem antes dos 3 anos de idade. Na última década, a prevalência de autismo cresceu muito, possivelmente pela modificação nos critérios de diagnóstico, mais abrangentes, e maior conscientização da classe médica sobre os sintomas (Hill e Frith, 2003).

Embora a tríade interação social, comunicação e interesses seja aceita como sendo o padrão observado nesses indivíduos, há uma variação muito grande na intensidade e no tipo de manifestação apresentada. Existem indivíduos não-verbais com grave retardo mental e com comportamento de automutilação que são classificados como portadores de TA, até indivíduos com QI acima da média e habilidades muito desenvolvidas apesar da inadequação

social e dificuldades de comunicação (também conhecidos como SAVANTS) (Hill e Frith, 2003). Tal variação dificulta o estudo e a compreensão do autismo devido à falta de padronização de critérios para diagnóstico (Belmonte, *e col.*, 2004). Inicialmente o diagnóstico era feito a partir da interpretação do quadro clínico como apresentado em sua descrição inicial por Leo Kanner (1943). A partir da década de 80, os sistemas classificatórios, DSM e CID passaram a adotar uma perspectiva descritiva, adotando ainda linhas gerais para orientação diagnóstica. Dessa iniciativa passou-se a observar uma maior padronização diagnóstica. Mais recentemente, o avanço das técnicas de avaliação de neuroimagem, investigações genéticas, testes neuropsicológicos e modelos animais permitiram a visualização de um panorama mais amplo do transtorno. Tais dados permitem que a grande variação fenotípica observada nos casos seja explorada em maior profundidade, ainda que classificados segundo os critérios diagnósticos padronizados dos atuais manuais de classificação.

Alguns autores sugerem a existência de um espectro autista que inclua todos os indivíduos que apresentem os sintomas descritos classicamente em intensidades e combinações diferentes. Nessa visão, o distúrbio seria visto como um *continuum* de manifestações (Prior *e col.*, 1998), tendo sido proposto um conceito mais amplo para a compreensão dos quadros relacionados, originando o espectro do transtorno autista (ASD). Devido a essa variação, a colaboração de diferentes áreas tem sido importante para o entendimento das possíveis causas do autismo, bem como do desenvolvimento de novas e mais eficientes

propostas de intervenção terapêutica.

1.1.2 Sociabilidade

Entre os três domínios, o da sociabilidade tem apresentado uma série de estudos interessantes que vão de modelos animais, estudos genéticos de associação, ou mesmo estudos utilizando novas metodologias como o Eye Gaze[®] (Stokstad, 2001). Kanner já havia relatado que os indivíduos observados por ele não olhavam diretamente para outras pessoas e que apresentavam uma tendência ao isolamento, indicando déficit na sociabilidade (Kanner, 1943). O ponto principal nessa característica em crianças autistas é que ele surge logo no início da infância, ao contrário do que ocorre em outros distúrbios como a esquizofrenia.

A sociabilidade é construída a partir do início da vida do indivíduo na relação com outros da mesma espécie. Para que a relação social seja estabelecida e mantida, é necessário que as informações recebidas pelo sistema sensorial sejam adequadamente integradas e corretamente significadas para que haja motivação em se manter a relação com o outro. Em roedores, as informações captadas pelos órgãos sensoriais são direcionadas para o hipotálamo (olfato) ou tálamo (as demais) e, em seguida, direcionadas para o hipocampo. Nesta região, as informações são codificadas e ordenadas (Waterhouse, Fein e Modahl, 1996). Face à variedade fenotípica do ASD, fica evidente que, nesse transtorno, diferentes combinações dessas variáveis podem acontecer.

O outro ponto importante para o estabelecimento das relações sociais é a significação correta das informações recebidas e analisadas e a adequação das respostas pertinentes a cada situação. Tais funções são desempenhadas pela amígdala. Nos últimos anos, essa região tem sido alvo de inúmeros estudos na tentativa de determinação do seu papel efetivo nestas tarefas. A amígdala é uma estrutura composta por pelo menos 13 núcleos localizada na região temporal e com conexões com várias áreas do cérebro, incluindo-se o neo-córtex, hipocampo, tronco cerebral e o tálamo, entre outras (Amaral e Insausti, 1992). Macacos com amígdala lesionada apresentam menos iniciativa em contatos sociais e menor interesse em manter tal contato (Bachevalier, 1994), embora outros estudos tenham encontrado resultados contrários (Amaral *e col.*, 2003). Em humanos, indivíduos que apresentam lesões na amígdala demonstram menor capacidade de reconhecer faces humanas (Adolphs *e col.*, 1994, 1999; Schmolck e Squire, 2001) e dificuldade em memorizar conteúdos emocionais de histórias (Cahill *e col.*, 1995). Estudos em neuroimagem sustentam esses resultados. Morris *e col.* (1996) usando PET e Breiter *e col.* (1996) usando fMRI demonstraram a ativação da amígdala quando o sujeito olhava faces que expressavam emoções, principalmente de medo. Indivíduos autistas não apresentam o mesmo padrão de ativação durante tarefas de reconhecimento facial (Wang *e col.*, 2004). Os estudos desenvolvidos por Baron-Cohen *e col.* (1999) já haviam apontado para o envolvimento da amígdala no autismo. Nesse estudo, os participantes tinham que inferir os

estados emocionais de um indivíduo a partir da observação da região dos olhos, apenas. Nessa tarefa, indivíduos normais apresentaram ativação do giro temporal superior, da amígdala esquerda e da ínsula enquanto indivíduos autistas apresentaram menor ativação das áreas frontais e da amígdala.

Estudos revelam que o giro fusiforme (GF) também pode estar relacionado ao reconhecimento de faces. Observou-se a ativação dessa região em uma menina de 9 anos durante um fMRI enquanto ela observava faces que eram apresentadas de forma intercalada com objetos (Pelphrey, Adolphs e Morris, 2004), sendo que o lado direito mostrava maior grau de ativação. Estímulos elétricos aplicados diretamente nessa área provocam prosopagnosia (inabilidade de reconhecer faces) transitória (Allison *e col.*, 1994). Vários estudos mostram déficits no processamento de faces em autistas (Hobson, Outson e Lee, 1988; Loveland *e col.*, 1997). Schultz *e col.* (2000) sugerem uma relação entre amígdala e GF, propondo que um distúrbio no desenvolvimento de conexões entre a amígdala e o córtex temporal poderia resultar na perda da capacidade do reconhecimento de faces e outros sinais sociais.

Klin *e col.* (2002), utilizando a tecnologia de Eye Gaze® demonstraram que autistas não observam faces da mesma forma que indivíduos normais. Esses indivíduos não olham para a área dos olhos nas faces. Dessa forma, a diminuição da ativação do GF pode ser resultado de um padrão diferente de investigação da face. Davidson e Dalton (2003) combinaram o uso do Eye Gaze® com fMRI e também estabeleceram ligação entre hipoativação do GF e

inatenção à área dos olhos. Esses autores sugerem que a falta de atenção para os olhos é resultado de hiper-reatividade a estímulos sociais. A hiper-reatividade à região dos olhos seria resultante de alterações nos processos de regulação de reações afetivas realizados pelo córtex. A existência dessa hiper-reatividade nos indivíduos seria incômoda e isso levaria à evitação do contato visual. Em suma, indivíduos autistas não observariam faces normalmente porque o estímulo provocado por elas não seria apreciado.

Para que as relações sociais sejam mantidas, é necessário que os indivíduos apresentem apego ao semelhante, demonstrando que reconhecem a importância do outro e que há interesse em manter a interação. Existem estudos sugerindo o envolvimento de alguns neuropeptídeos na regulação das relações de apego. Os responsáveis pelo apego social são a oxitocina e a vasopressina, neurotransmissores essenciais também nos comportamentos reprodutivos, de cuidado materno e de afiliação da prole (Carter, DeVries e Getz, 1995; Insel, 1992). Evidências de níveis alterados de oxitocina em autistas foram documentados por Modahl e *col.* (1998), que mediram os níveis séricos de oxitocina em 29 crianças autistas e 30 crianças normais. Um dos problemas com esse tipo de estudo é o fato de que a medida foi realizada em sangue periférico e não no SNC.

No entanto, evidências sobre a participação desses neurotransmissores na sociabilidade são fornecidos por estudos com modelos animais. A oxitocina se relaciona com a memória de reconhecimento social e sua principal ação ocorre

através de um receptor específico. A infusão desse neurotransmissor em ratos adultos aumentou o tempo de memória de reconhecimento social (Ferguson *et al.*, 2001; Dantzer, Bluthé, LeMoal, 1988).

Um dos principais estudos a respeito do papel da oxitocina na sociabilidade foi realizado com espécies de roedores conhecidos com arganazes da pradaria e arganazes da montanha. Os primeiros são monogâmicos e vivem em grupos sociais bem estabelecidos enquanto a outra espécie não forma casais para procriação, as fêmeas abandonam os filhotes após o desmame e não há grupos sociais (Young, Pitkow e Ferguson, 2002). A análise dos encéfalos desses animais revelou a existência de quantidade muito maior de receptores para oxitocina no núcleo accumbens e no núcleo basolateral da amígdala nos arganazes da pradaria em comparação com os arganazes da montanha. Neste último, os receptores para esse nonapeptídeo existem em maior quantidade no septo lateral (Insel e Shapiro, 1992; Young, 2002). Camundongos que foram geneticamente manipulados para não produzir oxitocina (knock-out) e foram submetidos a testes de comportamento para avaliação do reconhecimento social mostraram ter um comprometimento na memória de reconhecimento social. Animais não manipulados apresentaram uma redução significativa no tempo de investigação de um parceiro a quem já tinham sido expostos. Os animais knock-out mantiveram o tempo de investigação na segunda exposição, indicando que não houve a formação de memória de reconhecimento social. Quando uma única dose de oxitocina foi injetada na região intracerebroventricular, a memória foi

restaurada e o tempo de investigação social nos ratos knock-out inoculados diminuiu significativamente (Ferguson *e col.*, 2001).

A formação dos padrões de sociabilidade, portanto, envolvem diversas áreas do sistema nervoso central (SNC) e a compreensão da integração dessas áreas se torna de suma importância. Têm sido possível também encontrar alterações nas estruturas citadas em indivíduos autistas, corroborando a importância delas no estabelecimento das relações sociais.

1.1.3 Alterações estruturais no sistema nervoso central e sociabilidade

Existe quase uma centena de trabalhos descrevendo alterações estruturais em pacientes ASD. Os trabalhos mais antigos são estudos anatômicos post-mortem, e os mais recentes exploram tecnologias de neuroimagem funcional ou mesmo estrutural baseada em derivações estatísticas, como os estudos voxel-voxel.

As primeiras alterações associadas com o ASD foram o lobo frontal medial, lobo temporal, gânglios da base e tálamo (Damásio e Maurer, 1978).

A partir do surgimento dos estudos de neuroimagem, foi possível avaliar melhor as possíveis alterações cerebrais presentes no autismo. A associação dos resultados fornecidos pela neuroimagem e pelos estudos *post mortem* tem fornecido dados importantes a respeito das alterações neurobiológicas encontradas no autismo. Em 1995, estudo realizado por Rodier *e col.* descreveu

encéfalos que apresentavam ausência de vários núcleos do tronco cerebral e grande perda neuronal em áreas como o núcleo motor facial e o núcleo olival superior. No ano seguinte, Hashimoto *e col.* (1996) encontraram hipoplasia de estruturas do tronco cerebral. Estudos mais recentes continuam a demonstrar diminuição da região do tronco cerebral em autistas quando comparados a crianças normais ou com retardo mental (Hashimoto *e col.*, 1988; Hashimoto *e col.*, 1992a; Hashimoto *e col.*, 1992b). No entanto, outros estudos têm falhado em replicar esses achados (Elia *e col.*, 2000).

Anormalidades histológicas em autistas incluem maior densidade e empacotamento de células na região do lobo temporal e organização celular anormal no hipocampo (Bauman, 1991; Bauman e Kemper, 1994).

1.1.4 Aspectos do desenvolvimento da sociabilidade e modelos animais

1.1.4.1 Comportamento de brincar (CB)

Na maioria dos mamíferos, o CB é bastante comum na infância. É um comportamento complexo desenvolvido no início da vida e é um sistema motivacional distinto de outros. Por outro lado, o CB apresenta vários aspectos que se assemelham muito com outros tipos de comportamentos como o sexual ou o agressivo. Sendo assim, o CB parece estar relacionado com o treinamento e desenvolvimento do animal, permitindo que ele apresente comportamentos

sociais adequados na idade adulta, embora não haja consenso em considerá-lo como uma categoria distinta de comportamento ou apenas como uma forma de treinamento dos comportamentos adultos (Vieira e Sartorio, 2002; Vanderschuren, Niesink e Van Ree, 1997). Outras observações apontam para uma classificação do CB como um tipo diferente de comportamento, não relacionado a atividades de sociabilidade. Alguns comportamentos se apresentam nos ratos jovens da mesma forma que em ratos adultos, enquanto que outros não. Uma possível alternativa de definição seria considerar comportamentos que se modificam ao longo do amadurecimento sexual do indivíduo como CB (Vanderschuren, Niesink e Van Ree, 1997).

A partir da década de 80, vários trabalhos sobre CB foram publicados com base em observações de hamsters dourados e ratos albinos (Hole e Einon, 1984; Vieira *e col.*, 2005). Esses últimos apresentam formas mais complexas de brincadeira que incluem vários tipos de componentes (Iwaniuk, Nelson e Pellis, 2001).

O CB tem sido definido como toda atividade locomotora pós-natal, que parece não apresentar um objetivo específico para o animal. Neste comportamento, o padrão de atividade se parece com outros tipos de comportamento, mas os movimentos são exagerados, estereotipados ou exibidos fora da seqüência em que ocorreriam normalmente (Martin e Cart, 1985; Bekoff e Byers, 1998; Bekoff e Allen, 1998). Hole e Einon (1984) sugerem que os padrões alterados observados no CB são uma forma de sinalização entre os

indivíduos, de forma que o parceiro possa perceber que se trata de uma brincadeira e não do comportamento real.

Em ratos, o CB surge por volta dos 15 dias de vida, com um pico entre 30 e 35 dias, decaindo com a idade (Meaney e Stewart, 1981), sendo o primeiro comportamento não dirigido à mãe (Vanderschuren, Niesink e Van Ree, 1997). Um dado intrigante é que esse comportamento é mais freqüente em machos do que em fêmeas (Pellis, 2002).

O CB se inicia com a solicitação feita por um dos animais (*pouncing*), na qual o animal solicitante encosta o nariz ou toca a nuca do outro. Como decorrência desse comportamento, o parceiro reage perseguindo, passando sobre ou sob o outro, arremetendo contra ou ainda assumindo uma posição denominada *pinning*. Cada uma dessas reações se assemelha a um comportamento adulto. A perseguição e o *pinning* se parecem com as atividades relacionadas a comportamento agressivo (Vanderschuren, Niesink e Van Ree, 1997) e o arremeter contra o outro pode estar relacionado com comportamento sexual (Meaney, Stewart e Beatty, 1985).

O *pinning* parece ser o componente mais característico do CB sendo, portanto, o comportamento mais observado em estudos que envolvam CB (Panskepp, Sivyi e Normansell, 1984). Nesse componente, um indivíduo se deita de costas exibindo o ventre, numa posição que se assemelha a uma situação de submissão, enquanto o outro se coloca em pé sobre ele, assumindo um papel de dominação. Frequentemente os animais invertem as posições, o que caracteriza

o *pinning* como um comportamento ativo para ambos os animais envolvidos (Vanderschuren, Niesink e Van Ree, 1997). Após cada um desses comportamentos, é comum que os animais apresentem *grooming* social.

Animais que são privados do convívio com seus co-específicos apresentam maior índice de CB quando colocados novamente em contato com um parceiro. Tal alteração não é observada quando os animais são colocados com um outro indivíduo que já atingiu a maturidade sexual. Esse fato reforça a idéia de que o CB é característico de animais imaturos. Uma vez que o animal adulto não solicita e nem responde às solicitações de brincar com tanta freqüência, o outro animal perde o interesse nele. Além disso, os animais que passaram por períodos de isolamento durante o desenvolvimento, apresentam padrões alterados de comportamentos sexual e agressivo na idade adulta (Adams e Boice, 1989). Tais dados sugerem que o CB consiste de um comportamento com alto valor de recompensa e que pode ser uma forma de treinamento de habilidades sociais (Einon, Morgan, e Kibbler, 1978; Hol, Koolhaas e Spruijt, 1994; van der Berg, *e col*, 1999, Spinka, Newberry, e Bekoff, 2001). A brincadeira também parece estar relacionada com o estabelecimento de vínculos e organização social dentro de um grupo e com o desenvolvimento de habilidades comunicativas, diminuindo a agressividade entre os parceiros (Meaney, Stewart e Beatty, 1985).

1.1.4.2 Sistemas neurobiológicos em CB

Uma vez que o CB é uma modalidade do comportamento bastante complexa, é esperado que vários sistemas neurobiológicos estejam envolvidos no seu controle e desempenho. Os agonistas de acetilcolina e de opióides provocam aumento no índice de CB enquanto esse índice é diminuído pela ação de agonistas de serotonina. Os efeitos observados com o aumento nos níveis de serotonina são significativos, porque provocam importante diminuição do comportamento de *pinning* (Vanderschuren, Niesink e Van Ree, 1997) enquanto o aumento de CB observado na ação de opióides como a morfina pode estar relacionado com a diminuição de stress em um ambiente diferente ou com o aumento de significação do comportamento (Vanderschuren *e col.*, 1995; Vanderschuren *e col.*, 1996).

Da mesma forma que o CB parece envolver ação de vários tipos de neurotransmissores, diferentes áreas do SNC também parecem ter participação. Uma vez que esse comportamento parece desempenhar papel importante no desenvolvimento de habilidades sociais dos indivíduos, vários modelos de lesões de diferentes áreas do SNC têm sido desenvolvidos na tentativa de investigação da participação de cada uma delas. Em ratos, são dois os modelos mais freqüentemente estudados: inoculação de vírus como o Borna-disease vírus (BDV) e administrações de talidomida ou ácido valpróico (VPA). Esses modelos são particularmente utilizados nos estudos sobre autismo.

1.1.4.3 Borna-Disease Vírus

O Borna Disease Vírus (BDV) é um patógeno humano que causa uma infecção persistente quando inoculado intracranialmente em ratos. Os animais não apresentam reação imune a ele, mas observam-se alterações neuroanatômicas e comportamentais importantes (Pletnikov *e col.*1999) .

A relação entre CB e infecção pelo BDV foi claramente demonstrada em um experimento no qual o vírus foi inoculado intracranialmente em ratos nas primeiras 24h de vida. A partir do 28º dia de vida, os animais foram testados segundo o paradigma intruso X residente. Nesse procedimento, alguns animais que receberam inoculação de vírus e outros que receberam inoculação de um veículo inócuo são mantidos em isolamento por 6 dias antes do teste (residentes). Depois desse tempo, os animais são colocados em contato com outro que não havia sido isolado (intruso). Cada par de animais foi observado na gaiola do residente por 10 minutos por dois dias consecutivos e o comportamento foi filmado em vídeo para posterior análise. Todos os pareamentos possíveis foram considerados: intrusos inoculados X residentes inoculados; intrusos inoculados X residentes não inoculados; intrusos não inoculados X residentes não inoculados e intrusos não inoculados X residentes inoculados. Os animais não apresentaram alterações nos comportamentos exploratórios não sociais e nem nas interações *não-play*. Por outro lado, o índice de CB, especialmente do componente *pinning* foi significativamente reduzido em

todos os animais inoculados, bem como a solicitação para o CB (Pletnikov *e col.*, 1999).

Análises histoquímicas em outro trabalho revelaram intensa ativação de microglia e astrócitos e apoptose neuronal no córtex cerebral, giro dentado, cerebelo (com drástica redução no número de células de Purkinje), núcleos cerebelares, núcleo ventral coclear e colículo superior. Em conjunto com essas observações, os animais foram testados quanto a atividades locomotoras e estereotipias sendo observadas aumento em ambos os parâmetros (Hornig *e col.*, 1999).

Pletnikov *e col.* (2003) inocularam ratos nas primeiras 24-48h após o nascimento e observaram que o vírus provoca danos em locais específicos do SNC como o cerebelo, o giro dentado e o neocórtex. Especificamente no cerebelo, observa-se uma extensa perda de células de Purkinje apesar da organização celular nessa região se mostrar preservada. No hipocampo, verificou-se um prejuízo no desenvolvimento pós-natal, o giro dentado também apresentou perda neuronal. O córtex cerebral e o bulbo olfatório também se apresentam afetados. Uma vez que o cerebelo se encontra particularmente afetado, observou-se que os animais apresentavam déficits de geotropismo e de integração de informações auditivas e somato-sensoriais (Reação de sobressalto).

1.1.4.4 Ácido Valpróico (VPA)

O VPA é um teratígeno conhecido por provocar anormalidades no desenvolvimento da face, sistemas respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, geniturinário e esquelético. Recentemente o uso dessa droga também foi relacionado ao autismo (Williams e Hersh, 1997; Williams *e col.*, 2001; Bescoby Chambers, Forster e Bates, 2001). Modelos animais em ratos mostraram alterações neuroanatômicas semelhantes às encontradas em encéfalos de autistas: diminuição de número de neurônios motores em nervos craniais, diminuição da região caudal e aumento na região rostral do núcleo do nervo facial, diminuição do volume cerebelar com menor quantidade de células de Purkinje e redução do núcleo interpositus (Rodier *e col.*, 1996, 1997; Ingram *e col.*, 2000).

Ratas prenhes foram expostas ao VPA no 12,5º dia de gestação e as ninhadas foram avaliadas quanto a comportamentos de geotaxia, atividade locomotora geral, marcha sensório-motora e comportamentos sociais na infância (CB) e na idade adulta. Os animais expostos apresentaram déficits em praticamente todas as provas especialmente no número de *pinnings* e no número de comportamentos sociais, que foram diminuídos (Schneider e Przewłocki, 2005).

As análises neuroanatômicas e *in vitro* sugerem que a droga prejudica o desenvolvimento do sistema serotoninérgico. Embriões de ratos expostos à

droga no 9º dia de gestação apresentaram alterações na migração e maturação de neurônios de serotonina no tronco cerebral. Nos animais tratados com a droga, esses neurônios permaneceram em uma posição mais caudal no núcleo dorsal da rafe, quando comparados aos animais controle. No mesmo estudo, células precursoras desses neurônios foram cultivadas na presença ou na ausência do ácido valpróico. O número de neurônios de serotonina maduros nas culturas com o ácido foi significativamente menor do que no controle (Miyazaki, Narita e Narita, 2005). Estudos recentes com PET demonstraram alterações na síntese de serotonina em cérebros de autistas (Chugani *e col*, 1997). A administração de inibidores de recaptção de serotonina em autistas provoca melhora nos quadros de estereotipias desses pacientes (Hollander *e col*, 2003).

Tais observações tornam o estudo da ação dessa droga um ponto importante por sugerirem uma relação entre as alterações no desenvolvimento desse sistema neuroquímico e as alterações observadas no autismo. Dessa forma, o presente trabalho visa explorar as alterações provocadas por essa droga em animais. O déficit no desenvolvimento do sistema serotoninérgico poderia ser compatível com as alterações de sociabilidade observadas em indivíduos autistas.

2. Objetivos e hipótese

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação da influência da administração de VPA no comportamento da prole de ratos. O principal comportamento a ser observado é o brincar, tanto na forma de solicitação quanto na resposta de brincar propriamente dita.

Os animais que foram expostos ao VPA durante a gestação solicitariam menos e realizariam menos comportamentos de brincar.

3. Justificativa do trabalho

O ASD tem sido alvo de inúmeras investigações nos últimos anos, devido à melhora na tecnologia científica. Trata-se, porém, de um transtorno cujas bases neurobiológicas são ainda pouco conhecidas. Desta forma, o estudo das alterações neurológicas em áreas do cérebro possivelmente relacionadas ao transtorno pode auxiliar na compreensão tanto de etiologias como do desenvolvimento da condição. Por ser um dos domínios prejudicados nos indivíduos com ASD, o estudo de como se forma a sociabilidade é de grande importância para o estabelecimento de uma visão mais ampla do ASD.

Face às limitações éticas dos estudos em humanos, a utilização de modelos animais pode ser útil como referência para as alterações de comportamento observadas em sujeitos com ASD.

4. Materiais e método

4.1 Estudo experimental

4.1.1 Definição e tratamento da amostra

Foram alojadas em ambiente climatizado, 20 ratas da raça Wistar, cedidas pelo biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno cristal (transparente) forradas com maravalha, com ventilação constante, controle de temperatura ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) e submetidas a um ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 7:00h da manhã). Água e ração foram fornecidos à vontade. O ciclo estral foi acompanhado conforme descrito por Manson e Kang (1989) e as fêmeas foram colocadas na companhia de machos quando se apresentaram em pró-estro. Foi realizado o lavado vaginal para verificação da presença de espermatozóides. As fêmeas prenhes foram separadas das demais. O dia da verificação de espermatozóides foi contado como dia de gestação 1 (DG1).

O peso de cada fêmea foi medido nos dias DG1, DG8, DG9, DG10, DG15 e DG21. No DG9, 800mg/kg de VPA ou solução fisiológica foi administrada oralmente a cada fêmea prenhe. A administração foi feita por gavagem com sonda urinária tamanho 6 presa a uma seringa de 2ml (Miyazaki, Narita e Narita, 2005).

No DG21, as fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais. No 2º dia pós natal (PN2), a prole foi contada, sexada e padronizada com 4 machos e 4 fêmeas quando possível.

4.1.2 –Comportamento de brincar na infância

A análise deste comportamento foi padronizada de acordo com Pletnikov *e col* (1999). Sabe-se que o isolamento social aumenta a interação social (Ikemoto *e col.* 1992; Niesink *e col.*, 1992). Assim, após o desmame (21 dias), os animais dos grupos tratados ou não foram mantidos em 2 condições de alojamento: um isolado e outro em grupos de até 5 animais por gaiola. Os animais isolados foram denominados de residentes (isolados por 7 dias antes do teste) e os agrupados de intrusos. Portanto formaram-se 4 grupos: dois isolados, um tratado (TR) e outro não (NTR), e outros dois agrupados, um tratado (TI) e outro não (NTI). Para as observações, foram pareados um animal residente com um intruso de cada grupo e com pesos similares.

Imediatamente antes do início do teste, as gaiolas de um residente e de um agrupado foram colocadas na sala de observação para aclimatação por 5 minutos. Após este período, um intruso foi colocado na gaiola do residente. Cada par foi testado por 10 minutos/dia. Os testes foram feitos pela tarde, entre as 14 e 18 horas. Os animais residentes foram testados por dois dias consecutivos com o mesmo intruso, sendo que os residentes não tratados foram

colocados em contato com intrusos não tratados e os residentes tratados, com os intrusos tratados. Um único intruso foi utilizado para cada par. O comportamento dos animais foi filmado e analisado ao final das sessões.

Os comportamentos podem ser divididos nas três áreas nas quais os autistas apresentam prejuízos (interação social, comunicação e comportamentos repetitivos) (Murcia, Gulden e Herrup, 2005). Dentre os comportamentos classificados como sociais foram analisados a monta, investigação anogenital e farejar/lamber, tendo sido computado o número de vezes em que cada um desses comportamentos foi observado em cada animal do par. Passar sobre ou sob o outro e perseguir foram classificados como comportamentos de solicitação de brincadeira e o *pinning* como principal componente da brincadeira (Vanderschuren, Niesink e Van Ree, 1997). Nesses casos também foi contado o número de vezes em que cada um desses comportamentos ocorre.

Além desses, os comportamentos de exploração ambiental (levantar e tempo de locomoção) também foram analisados. Tais comportamentos podem apresentar alterações compatíveis com aquelas observadas em autistas, já que esses indivíduos freqüentemente apresentam menos interesse em exploração do ambiente.

Nenhum comportamento que pudesse ser analogamente relacionado à comunicação foi avaliado.

4.2 Análise estatística

Os dados foram lançados no programa SPSS, versão 13. Observou-se distribuição normal dos dados. O teste de qui-quadrado foi utilizado para a comparação entre grupos. As variáveis foram comparadas pelo teste T Student e ANOVA. Significância de 5% foi adotada.

5. Resultados

Das 20 ratas utilizadas, 13 emprenharam. Destas, 7 receberam solução fisiológica (controles) e 6 receberam a droga (experimentais). No 21º dia de vida as ninhadas foram separadas da mãe e alojadas nas seguintes condições: um animal de cada uma das ninhadas, tanto controle quanto experimentais foram isolados, sendo os demais mantidos agrupados em grupos de 5 irmãos. Dessa forma, 13 animais estavam isolados (7 do grupo controle e 6 do grupo experimental).

Os grupos foram comparados, levando-se em consideração a condição de alojamento (isolado ou agrupado), o dia da observação e o grupo ao qual o animal pertence (controle ou experimental).

1) Comportamentos exploratórios ambientais:

a) Levantar: há uma diferença significativa nos intrusos entre o grupo controle e o experimental no primeiro dia; essa diferença não é observada no segundo dia.

b) Tempo de locomoção: não houve diferenças significativas em nenhum dos grupos.

Tabela 1: Comportamentos de exploração ambiental: Número de vezes em que cada animal se levantou (levantar) e tempo de locomoção geral nos dois dias de observação. São apresentadas as médias e os erros padrão. ($p < 0,05$)

| | | INTRUSO | | RESIDENTE | | |
|----------------------|----------------------------------|----------|-------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|
| | | controle | experimental | controle | experimental | |
| EXPLORAÇÃO AMBIENTAL | LEVANTAR | dia 1 | 44,17 ± 4,85 | 23,00* (p= 0,005) ± 3,74 | 39,17 ± 6,71 | 32,86 ± 8,21 |
| | | dia 2 | 34,17 ± 4,64 | 28,29 ± 4,09 | 29,83 ± 5,12 | 27,57 ± 4,36 |
| | TEMPO DE LOCOMOÇÃO (em segundos) | dia 1 | 115,46 ± 20,97 | 141,08 ± 20,97 | 109,08 ± 17,31 | 182,78 ± 37,07 |
| | | dia 2 | 126,61 ± 16,47 | 124,99 ± 11,57 | 113,49 ± 18,91 | 103,23 ± 13,79 |

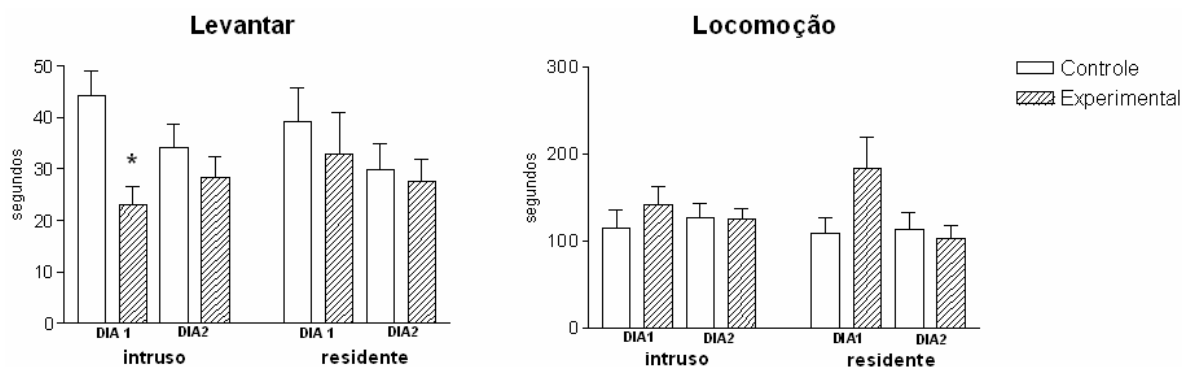


Figura 1: Comportamentos de exploração ambiental. * indica diferença significativa entre animais do grupo controle e do grupo experimental. ($p < 0,05$)

2) Comportamentos sexuais:

a) Monta: entre os animais do grupo controle, há uma diferença no número de montas entre os que são intrusos e os que são residentes, sendo maior nos intrusos. Os animais residentes experimentais apresentaram uma diferença significativa no número de montas em relação aos animais do grupo controle.

b) Investigação anogenital: significativamente menor no residente experimental no segundo dia de observação.

c) Farejar/lamber: entre os intrusos, observa-se uma redução no grupo experimental no segundo dia. Entre os residentes, embora esse comportamento não apresente diferenças significativas, a frequência desse comportamento entre os animais experimentais é muito menor, existindo grande variabilidade entre os indivíduos.

Tabela 2: Comportamentos sexuais: Número de vezes em que cada animal realizou monta sobre o outro, investigou a região anogenital no outro e apresentou comportamento de farejar ou lamber o outro. São apresentadas as médias e os erros padrão. ($p < 0,05$)

| | | INTRUSO | | RESIDENTE | | |
|-----------------|----------------------------|----------|-----------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|
| | | controle | experimental | controle | experimental | |
| COMP. SEXUAL | MONTAR | dia 1 | 0,83 ± 0,40 | 1,14 ± 0,77 | 8,17 ± 2,88 | 4,43 ± 2,38 |
| | | dia 2 | 1,33 ± 0,42 | 0,71 ± 0,36 | 10,33 ± 3,35 | 2,29* ($p=0,02$) ± 0,78 |
| | INVESTIGAÇÃO ANOGENITAL | dia 1 | 3,50 ± 0,96 | 5,43 ± 1,27 | 7,67 ± 1,33 | 6,57 ± 1,73 |
| | | dia 2 | 6,67 ± 1,69 | 4,00 ± 2,08 | 6,17 ± 1,08 | 2,71* ($p=0,03$) ± 0,97 |
| | FAREJAR/ LAMBER | dia 1 | 10,83 ± 0,79 | 11,86 ± 2,39 | 13,50 ± 4,48 | 15,43 ± 3,96 |
| | | dia 2 | 12,83 ± 1,38 | 6,86* ($p=0,03$) ± 1,91 | 20,17 ± 3,63 | 12,29 ± 4,40 |

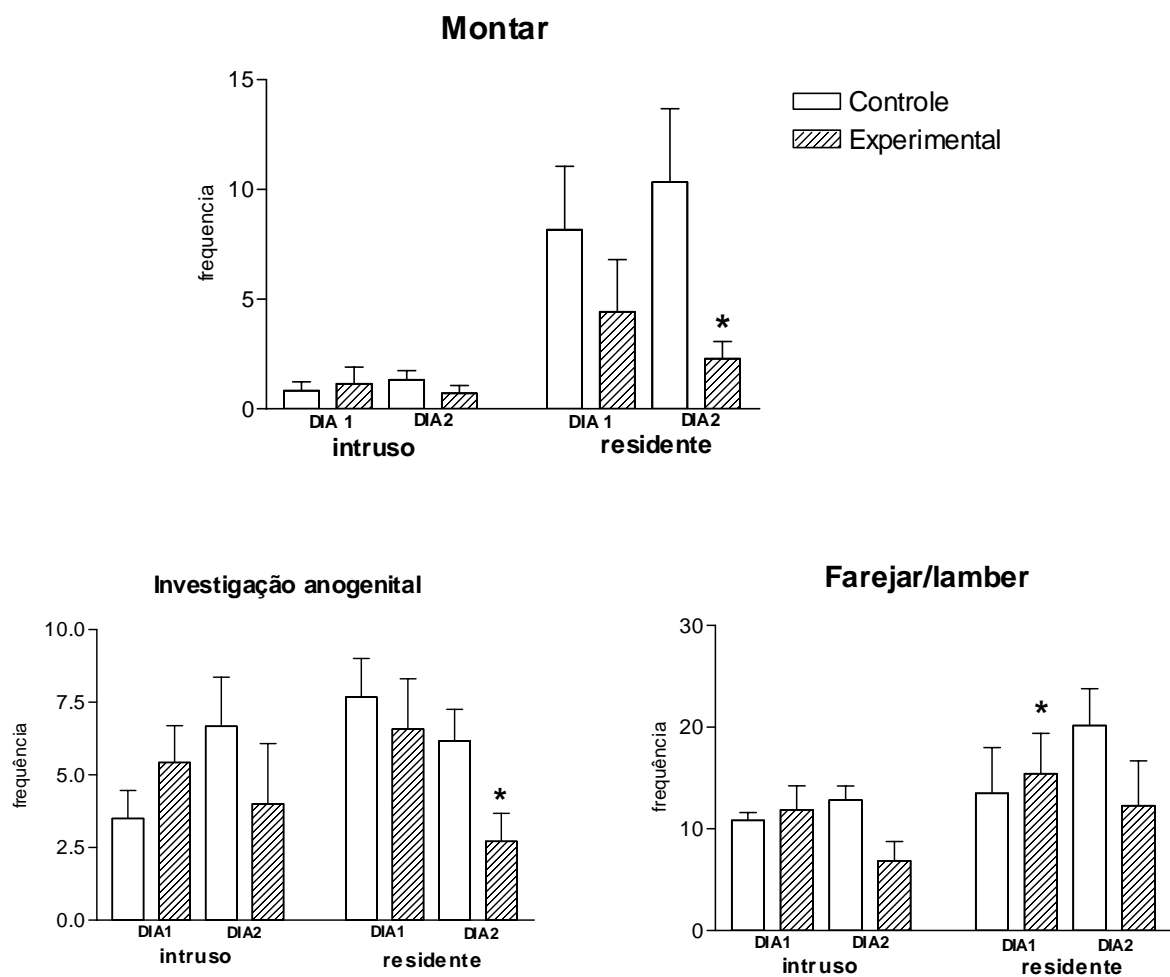


Figura 2: Comportamentos sexuais. * indica diferença significativa entre animais do grupo controle e do grupo experimental. ($p < 0,05$)

3) Comportamento de solicitação de brincar

a) Passar sobre ou sob o outro: os animais do grupo experimental apresentaram um número reduzido desse comportamento no segundo dia de observação.

b) Perseguir: no primeiro dia de observação, os animais experimentais apresentaram menos comportamentos de perseguição, embora os resultados não sejam muito significativos. Diferenças significativas entre os animais do grupo controle e experimental foram observadas no segundo dia.

Tabela 3: Comportamentos de solicitação de brincar: Número de vezes em que foram observados comportamentos de solicitação de brincar nos dois dias de observação. São apresentadas as médias e os erros padrão. ($p < 0,05$)

| | | INTRUSO | | RESIDENTE | | |
|-------------|-----------|----------|----------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------|
| | | controle | experimental | controle | experimental | |
| SOLICITAÇÃO | PASSAR | dia 1 | 4,17 ± 1,01 | 2,71 ± 1,11 | 12,67 ± 3,46 | 12,14 ± 5,41 |
| | | dia 2 | 7,33 ± 1,20 | 1,43* ($p=0,001$) ± 0,69 | 16,17 ± 4,25 | 4,86* ($p=0,03$) ± 2,40 |
| | PERSEGUIR | dia 1 | 5,17 ± 2,70 | 0,00* ($p=0,06$) ± 0,01 | 7,33 ± 2,04 | 2,86* ($p=0,08$) ± 1,26 |
| | | dia 2 | 8,33 ± 1,90 | 1,57* ($p=0,004$) ± 0,61 | 6,50 ± 1,52 | 2,57* ($p=0,04$) ± 0,84 |

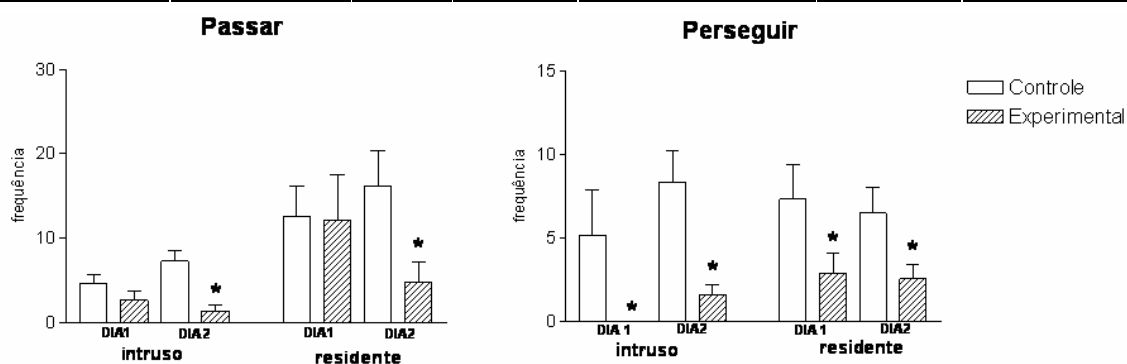


Figura 3: Comportamentos de solicitação de brincar. * indica diferença significativa entre animais do grupo controle e do grupo experimental. ($p < 0,05$)

4) Comportamento de brincar (*pinning*)

Esse comportamento foi o que apresentou maior diferença, apesar de não ser estatisticamente significativa no primeiro dia. O dado a ser ressaltado é a inexistência desse comportamento entre os animais experimentais tanto no primeiro quanto no segundo dias.

Tabela 4: Comportamentos de pinning: Número de vezes em que foram observados comportamentos de *pinning* nos dois dias de observação. São apresentadas as médias e os erros padrão. ($p < 0,05$)

| | | PAR | | |
|---------|----------------|----------|------------------------------|----------------|
| | | controle | experimental | |
| BRINCAR | <i>PINNING</i> | dia 1 | 2,17 ± 1,38 | 0,00 ± 0,00 |
| | | dia 2 | 2,50* ($p=0,03$) ± 0,88 | 0,00 ± 0,00 |

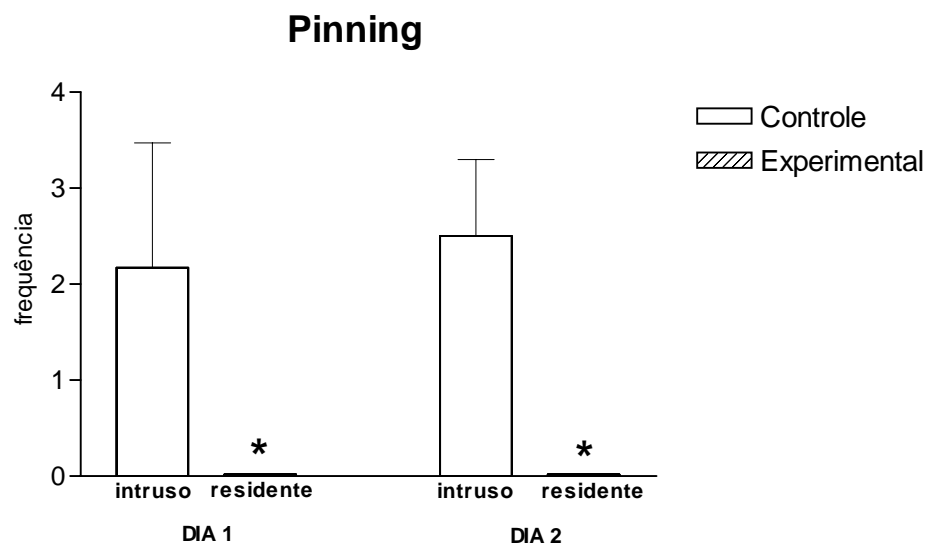


Figura 4: Comportamentos de pinning. * indica diferença significativa entre animais do grupo controle e do grupo experimental. ($p < 0,05$)

6. Discussão

Os resultados sugerem que o VPA tem um papel no desenvolvimento cerebral de roedores evidenciado por uma diminuição principalmente de comportamentos sociais. Esses resultados parecem guardar relação com a condição de alojamento do animal e com o dia de exposição ao estímulo.

Na gaiola, o animal apresenta dois tipos principais de comportamento: um deles voltado para a exploração do ambiente, que inclui movimentos verticais (levantar) e horizontais (locomoção) e outro direcionado a um eventual companheiro.

Em relação aos comportamentos exploratórios, observou-se diferença significativa no número de vezes em que o animal intruso se levanta no primeiro dia. Esse resultado poderia ser atribuído ao fato de que os animais do grupo experimental não se "interessam" tanto por explorar o novo ambiente, como fazem os animais controle. Essa diferença desaparece no segundo dia, possivelmente à custa da diminuição de investigação realizada pelos animais controles que talvez tenham se habituado ao procedimento (Hole, 1991). O ambiente desconhecido no primeiro dia provoca um gasto de maior de tempo em atividades exploratórias, diminuindo no segundo dia de experimento.

Em relação ao comportamento de exploração horizontal, não se observaram diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que o VPA não interfere na qualidade e capacidade de locomoção dos animais. Essa diferença

entre capacidade de explorar e "interesse" por explorar poderia ser conseqüência de alterações no substrato anatômico dos circuitos que garantem a "curiosidade" nos animais. Esse tipo de comportamento complexo é de extremo interesse para o estudo do autismo, uma vez que portadores dessa condição tendem a se interessar menos pelo novo, diminuindo sua atividade exploratória como um todo.

Os comportamentos sociais apresentaram alterações mais significativas especialmente nos animais experimentais.

A monta tem conotação sexual (Murcia, Gulden e Herrup, 2005). A condição de alojamento pode ter sido um dos fatores que provocou a diferença significativa no número de montas entre os animais residentes e os intrusos. Quando o animal é mantido agrupado, esse comportamento se estabelece e se desenvolve no grupo, independentemente do animal ser do grupo controle ou do grupo experimental. Como o isolamento ocorre durante a puberdade do animal (que se inicia por volta do 18º dia), esse padrão de comportamento não se estabelece, resultando num alto índice de montas tanto no primeiro como no segundo dias.

Ao se fazer ANOVA de 1 via e comparando-se controle residente e controle intruso, observa-se que o residente apresenta altos níveis de monta. A diferença produzida pelo tratamento com VPA só é evidente nos animais residentes no 2º dia na forma de uma resposta significativamente menor no grupo experimental. Privado, o animal tenta estabelecer o padrão no primeiro dia

(embora menor e não significativo no grupo experimental). Levando-se em consideração que o padrão de comportamento é uma característica determinada por um padrão genético (Murcia, Gulden e Herrup, 2005), os animais residentes do grupo experimental apresentam essa característica expressa no seu genoma. O tratamento com VPA pode ter provocado uma diminuição na capacidade de estabelecer esse tipo de padrão de comportamento devido a uma possível alteração na organização dos circuitos neuronais relacionados com os comportamentos sociais. Uma vez que os comportamentos sexuais constituem um dos componentes da sociabilidade, a incapacidade de estabelecimento desse padrão de comportamento pode ser considerada como um indício de prejuízo social.

Em relação ao comportamento de investigação anogenital, observou-se o mesmo padrão de redução no segundo dia nos animais tratados residentes. Nos outros animais, o número de vezes em que esse comportamento foi observado não apresentou redução do primeiro para o segundo dia. Da mesma forma que a monta, a investigação também pode ter conotação sexual e a privação do contato com outros animais bem como o tratamento com VPA podem ser fatores que contribuem para a redução nesse comportamento entre os animais tratados, podendo ser relacionados com prejuízo na sociabilidade.

Além disso, esses resultados abrem a possibilidade de criarmos modelos que verifiquem a interação entre gene e ambiente. Se confirmados que os residentes experimentais comparados aos intrusos experimentais apresentam

diferença nesse tipo de comportamento, poderemos explorar quais condições ambientais seriam responsáveis por resgatar esse comportamento prejudicado pelo VPA. Schneider e col. (2006) administraram VPA a ratas no 12,5º DG. Uma parte dos filhotes foi mantida em gaiolas comuns e outra parte em gaiolas com ambiente enriquecido. Nesses últimos, observou-se um aumento nos comportamentos de exploração ambiental e de comportamentos sociais. Tais resultados sugerem que a manipulação do ambiente pode ser capaz de atenuar os efeitos da droga, recuperando ao menos uma parte dos comportamentos sociais normalmente observados nos animais. Essa hipótese, caso se mostre válida, pode resultar no desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas para indivíduos portadores de autismo.

Prejuízos expressivos foram ainda observados nos comportamentos de brincadeira. Os comportamentos de solicitação apresentaram diferenças mais significativas nos animais tratados no segundo dia de observação. No primeiro dia, a presença de um animal diferente pode representar um estímulo para a interação social, mas a segunda exposição ao mesmo animal provoca uma acentuada diminuição no interesse, o que não foi observado entre os animais do grupo controle. Em relação ao comportamento de pinning, a diferença entre grupo controle e o grupo experimental foi ainda mais acentuada.

Os resultados observados nesse experimento podem estar relacionados aos efeitos conhecidos do VPA no desenvolvimento cerebral. Miyazaki e col (2005) demonstraram que o VPA provoca alterações na migração e maturação

de neurônios de serotonina em ratos. Por volta do 9º DG, as células precursoras começam a se diferenciar em neurônios serotoninérgicos ou dopaminérgicos na linha central do tronco cerebral. A partir desse dia, observa-se a migração dos neurônios de serotonina em direção à região caudal da porção dorsal dos núcleos da rafe. O início da produção desse neuropeptídeo é observado a partir do 12º DG primeiramente na porção rostral. Em animais tratados com VPA no 9º DG, observou-se maior migração dessas células na direção dos núcleos caudais e menor maturação dessas células. Sugere-se então que o VPA seria capaz de afetar a migração das células precursoras de serotonina. Para tanto, o VPA seria transferido da mãe para o feto através da placenta e perturbaria a expressão de fatores de transcrição dessa monoamina, alterando a quantidade desse neuropeptídeo no cérebro em desenvolvimento (Narita *e col.*, 2002). O mecanismo através do qual essa alteração se processa ainda não é totalmente compreendido, mas é possível supor a participação de receptores neuronais para serotonina (5-HT1A e 5-HT2A) e de receptores *Shh*, todos envolvidos no processo de migração e maturação dos precursores desses neurônios (Miyazaki, Narita e Narita, 2005).

Receptores 5-HT1A existem em maior quantidade em células imaturas. A diminuição na quantidade desse receptor pode ser devida ao aumento na quantidade de serotonina, uma vez que se observa um mecanismo de autoinibição. A serotonina ligada a esse receptor provoca uma inibição na proliferação celular, permitindo que o neurônio se diferencie (Azmitia, 2001;

Whitaker-Azmitia, 2005). Uma possível explicação para o menor número de neurônios maduros é a incapacidade dos precursores neuronais em responder ao mecanismo de feedback negativo provocado pela secreção de serotonina. Como não há maturação, a secreção desse neurotransmissor não é regulada e uma consequência desse fato poderia ser a diminuição no número de neurônios de serotonina maduros.

Um outro dado relacionado a essas alterações no desenvolvimento do SNC é a hiperserotonemia observada em indivíduos autistas. Níveis séricos desse peptídeo são 50-70 % mais altos em autistas.

Em um estudo, ratas receberam talidomida ou VPA no 9º DG e mortos no 35º dia de vida para medidas da concentração de serotonina no sangue e no SNC (hipocampo, córtex frontal, medula e cerebelo). Observou-se um aumento significativo na quantidade de serotonina no hipocampo, no cerebelo e no córtex frontal dos animais tratados com VPA. Uma vez que essas áreas fazem parte dos circuitos envolvidos na sociabilidade, é possível especular que um aumento na quantidade desse neurotransmissor nessas áreas durante o período de desenvolvimento embrionário também possam alterar o padrão de citoarquitetura e portanto, ser responsável pelas alterações no comportamento dos indivíduos afetados.

7. Conclusões

Os resultados mostram que o VPA provoca alterações de comportamento social em ratos compatíveis com aqueles observados em indivíduos com transtorno autista.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, N., BOICE, R., Development of dominance in domestic rats in laboratory and seminatural environments, *Behav Proc*, v. 19, p. 127-142, 1989

ADOLHPS, R. *e col.*, Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdale, *Nature*, v. 372, p. 669-672, 1994

ADOLPHS, R. *e col.*, Recognition of facial emotions in nine individuals with bilateral amygdale damage, *Neuropsychologia*, v. 37, p. 1111-1117, 1999

ALLISON, T. *e col.*, Human extrastriate visual cortex and the perception of faces, words, numbers and colours, *Cerebral Cortex*, v. 4, p. 544-554, 1994

AMARAL, D.G., INSAUSTI, R., Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex, *Exp Brain Res*, v. 88, p. 375-388, 1992

AMARAL, D.G. *e col.*, The amygdala: is it an essential component of the neural network for social cognition?, *Neuropsychologia*, v. 41, p. 517-522, 2003

BACHEVALIER, J., Medial temporal lobe structures and autism: A review of clinical and experimental findings, *Neuropsychologia*, v. 32, p. 627-648, 1994

BAUMAN, M.L., Microscopic neuroanatomic abnormalities in autism. *Pediatrics*, v. 87, p. 791-796, 1991

BAUMAN, M.L., Neuroanatomic observations of the brain in autism, *The neurobiology of autism*, Johns Hopkins university Press, p. 119-145, 1994

BARON-COHEN, S. *e col.*, Social Intelligence in the normal and autistic brain: an fMRI study, *Eur J Neurosci*, v. 11, p. 1891-1898, 1999

BEKOFF, M., & BYERS, J. A. (Orgs.). *Play: Evolutionary, comparative and ecological perspectives*. Cambridge: Cambridge University Press.; (1998)

BEKOFF, M., & ALLEN, C. Intentional communication in social play: how and why animals negotiate and agree to play. In M. Bekoff & J. A. Byers (Orgs.), *Play: Evolutionary, comparative and ecological perspectives* (p. 97-114). Cambridge: Cambridge University Press.) (1998)

BELMONTE, M.K. *e col.*, Autism and abnormal development of brain connectivity, *The Journal of Neuroscience*, n. 24, v. 42, p. 9228-9231, 2004

BESCOBY CHAMBERS, N., FORSTER, P., BATES, G., Fetal valproate syndrome and autism, additional evidence of an association, *Dev Med Child Neurol*, v. 43, p. 847, 2001

BREITER, H.C. *e col.*, Response and habituation of the human amygdala during visual processing of facial expression, *Neuron*, v. 17, p. 875-887, 1996

CAHILL, L. *e col.*, The amygdala and emotional memory. *Nature*, v. 377, p. 295-296, 1995

CARTER, C.S., DE VRIES, A.C., GETZ, L.L., Physiological substrates of mammalian monogamy: The prairie vole model. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, v. 19, p. 303-314, 1995

CHUGANI, D.C. *e col.*, Altered serotonin synthesis in the dentatohalamocortical pathway in autistic boys, *Ann Neurol*, v.42, p. 666-669, 1997

CID-10. Critérios diagnósticos para pesquisa/Organização Mundial da Saúde. Tradução: Maria Lúcia Domingues. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. Original inglês

CID-10. Diretrizes diagnósticas e de tratamento para transtornos mentais em cuidados primários/Organização Mundial da Saúde. Tradução: Maria Cristina Monteiro. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998, Original inglês

CID-10. Organização Mundial da Saúde. Tradução: Centro colaborador da OMS para a Classificação de Doenças em Português. 8ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2000. Original inglês

COSTA-PINTO, F.A. *e col.*, Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma, *Brain, Behavior and Immunity*, v. 19, p. 52-60, 2005

DAMÁSIO, A.R., MAURER, R.G. A neurological model for childhood autism. *Arch neurol.*, v. 35, p. 777-786, 1978

DANTZER, R., BLUTHE, R.M., LEMOAL, M., Experimental assessment of drug-induced changes in cognitive function: vasopressin as a case study. *Neurotoxicology*, v. 9, p. 471-477, 1988

DAVIDSON, R.J., DALTON, K. Dysfunction in neural circuitry of emotional face processing in individuals with autism, *Psychophysiology*, v. 40, s3, 2003

DSM-IV. Manual diagnóstico e estatístico da transtornos mentais. Tradução: Dayse Batista. 4ª ed. Porto Alegre: *Artes Médicas*, 1995

EINON, D.F., MORGAN, M.J., KIBBLER, C.C., Brief periods of socialization and later behavior in the rat, *Dev. Psychobiol.*, v. 11, p. 213-225, 1978

ELIA, M., *e col.*, Clinical correlates of brain morphometric features of subjects with low-functioning autistic disorder. *J. Child Neurol.*, v. 15, p. 504–508, 2000

FELICIO, L.F., FLORIO, J.C., BRIDGE, R. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats, *Brain Research Bulletin*, v. 40, n. 4, p. 253-256, 1996

FERGUSON, J.N. *e col.* Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse, *The Journal of Neuroscience*, n. 21, v. 20, p. 8278-8285, 2001

HASHIMOTO, M., *e col.*, Magnetic resonance imaging in autism: preliminary report. *Neuropediatrics*, v. 20, p. 142–146, 1988

HASHIMOTO, M., *e col.*, Reduced brainstem size in children with autism. *Brain Dev.*, v. 14, p. 94–97, 1992a

HASHIMOTO, M., *e col.*, Magnetic resonance imaging of the brain structures in the posterior fossa in retarded autistic children. *Acta Paediatr.*, v. 81, p. 1030–1034, 1992b

HASHIMOTO, T. *e col.*, Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients, *J Autism Dev Disord*, v.25, p.1-18, 1995

HILL, E.L., FRITH, U. Understanding autism: insights from mind and brain, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, v. 358, p. 281-289, 2003

HOBSON, R.P., OUTSON, J., LEE, A., What's in a face? The case of autism, *Br J Psychol*, v. 79, p. 441-453, 1998

HOL, T., KOOLHAAS, J.M., SPRUIJT, B.M., Consequences of short term isolation after weaning on later adult behavioral and neuroendocrine reaction to social stress, *Behav. Pharmacol.*, v. 5, suppl. 1, p. 88-89, 1994

HOLE, G., EINON, D.F., Play in rodents. In SMITH, P.K. (org), Play in animals and humans, p. 95-117, Oxford, Basil Blackwell, 1984

HOLE, G., Effects of social deprivation on levels of social play in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*), *Behavioral processes*, n. 25, p. 41-53, 1991

HOLLANDER, E., PHILLIPS, A.T., YEH, C.C., Targeted treatments for symptom domains in child and adolescent autism, *Lancet*, v. 362, p. 732-734, 2003

HORNIG, M. *e col.* An infection-based model of neurodevelopmental damage, *PNAS*, v. 96, n. 21, p. 12102-12107, 1999

IKEMOTO, S., PANKSEPP, J. The effects of early social isolation on the motivation for social play in juvenile rats. *Dev Psychobiol*, v. 25, n. 4, p. 261-274, 1992

INGRAM, J.L., *e col.*, Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol teratol*, v. 22, p. 319-324, 2000

INSEL, T.R., Oxytocin – a neuropeptide for affiliation: Evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies, *Psychoneuroendocrinology*, v. 17, p. 3-35, 1992

INSEL, T.R., SHAPIRO, L.E., Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. *Proc Natl Acad Sci*, v. 89, n. 13, p. 5981-5985, 1992

IWANIUK, A.N., NELSON, J.E., PELLIS, S.M., Do big-brained animals play more? Comparative analyses of play and relative brain size in mammals, *Journal of Comparative Psychology*, v. 115, p. 29-41, 2001

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

KLIN, A. *e col.*, Visual fixation patterns during viewing of naturalistic social situations as predictor social competence in individuals with autism, *Arch Gen Psychiatry*, v. 59, p. 809-816, 2002

LOVELAND, K.A. *e col.*, Emotion recognition in autism: verbal and nonverbal information, *Dev psychopatol*, v. 9, p. 579-593, 1997

MANSON, J.M., KANG, Y.J., Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology, in *Principles and methods of toxicology*, Second Edition, Raven Press, 1989

MARTIN, P.; CART, T. M., On the functions of play and its role in behavioral development. *Adv. Study Behav.* v. 15, p. 59-103, 1985

MEANEY, M.J., STEWART, J., A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). *Animal Behavior*, v. 29, p. 35-45, 1981

MEANEY, M.J., STEWART, J., BEATTY, W.W., Sex differences in social play, the socialization of sex roles, *Adv. Study Behav.*, v. 15, p. 1-58, 1985

MIYAZAKI, K., NARITA, N., NARITA M. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implications for pathogenesis of autism. *Int. J. Devl. Neuroscience*, v. 23, p. 287-297, 2005

MODAHL, C. *e col.*, Oxytocin levels in autistic children, *Biol Psychiatry*, v. 43, n. 4, p. 270-277, 1998

MORRIS, J.S. *e col.*, A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions, *Nature*, v. 383, p. 812-815, 1996

MURCIA, C.L., GULDEN, F., HERRUP, K. A question of balance: a proposal for new mouse models of autism, *Int J Devl Neuroscience*, v. 23, p. 265-275, 2005

NARITA, N. *e col.*, Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rats: putative animal models for autism. *Pediatric research*, v. 52, n. 4, p. 576-579, 2002

NIESINK, R.J.M., VAN REE, J.M., Short-term isolation increases social interactions of male rats: a parametric analysis. *Physiol Behav*, v. 29, p. 819-825, 1992

ONISHI, T. *e col.*, Abnormal regional cerebral blood flow in childhood autism. *Brain*, v. 123, p. 1838-1844, 2000

PANKSEPP, J., SIVIY, S., NORMANSELL, L. The psychobiology of play: theoretical and methodological perspectives. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 8, p. 465-492, 1984

PELPHREY, K., ADOLPHS, R., MORRIS, J.P., Neuroanatomical substrates of social cognition dysfunction in autism, *Mental Retardation and Developmental Disabilities*, v. 10, p. 259-271, 2004

PELLIS, S.M., Sex differences in play fighting revisited: traditional and nontraditional mechanisms of sexual differentiation in rats. *Arch Sex Behav.*, n. 31, v. 1, p. 17-26, 2002

PLETNIKOV, M.V. *e col.* Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behavioural Brain Research*, v. 100, p. 43-50, 1999

PLETNIKOV, M.V. *e col.* Exploring the cerebellum with a new tool: neonatal Borna disease virus (BDV) infection of the rat brain. *The Cerebellum*, v. 2, p. 62-70, 2003

PRIOR, M. *e col.* Are there subgroups within the autistic spectrum? A cluster analysis of a group of children with autistic spectrum disorders. *J Child Psychol Psychiatry*, n. 39, v. 6, p. 893-902, 1998

RICE, D., BARONE, S.J., Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.*, n. 108, p. 511-533, 2000.

RODIER, P.M. *e col.*, Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei, *J Comp Neurol*, v. 370, p. 247-261, 1996

RODIER, P.M. *e col.*, Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod Toxicol*, v. 11, p. 417-422, 1997

SCHNEIDER, M., KOCH, M. Deficient social and play behavior in juveniles and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. *Neuropsychopharmacology*, v. 30, n. 5, p. 944-957, 2004

SCHNEIDER, T., PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. *Neuropsychofarmacology*, v. 30, p. 80-89, 2005

SCHNEIDER T, TURCZAK J, PRZEWŁOCKI R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology*. v. 31, p. 36-46, 2006

SCHMOLCK, H., SQUIRE, L.R., Impaired perception of facial emotions following bilateral damage to the temporal lobe. *Neuropsychology*, v. 15, p. 30-38, 2001

SCHULTZ, R.T. *e col.*, Abnormal ventral temporal cortical activity during face discrimination among individuals with autism and Asperger Syndrome. *Arch Gen Psychiatry*, v. 57, p. 331-340, 2000

SPINKA, M., NEWBERRY, R.C., BEKOFF, M., Mammalian play: training for the unexpected. *Quarterly Review of Biology*, v. 76, p. 141-168, 2001

STOKSTAD, E. New hints into the biological basis of autism, *Science*, v. 294, p. 34-37, 2001

THOR, D. H., HOLLOWAY Jr., W. R. Play-solicitation behavior in juvenile male and female rats. *Anim Learn Behav*, v. 11, p.173-178, 1983

VAN DER BERG, C.L. *e col.*, Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Development psychobiology*, n. 34, p. 129-138, 1999

VANDERSCHUREN, L. J. M. J. *e col.* Effects of morphine on different aspects of social play in juvenile rats. *Psychopharmacology*, v. 11, p. 225-231, 1995

VANDERSCHUREN, L. J. M. J. *e col.* Sequential analysis of social play behavior in juvenile rats: effects of morphine. *Behav. Brain Res*, v. 72, p. 89-95, 1996

VANDERSCHUREN, L.J.M.J., NIESINK, R.J.M., VAN REE, J.M. The neurobiology of social play in rats. *Neuroscience and behavioral reviews*, v. 21, n. 3, p. 309-326, 1997

VIEIRA, M.L. *e col.*, Effects of different opportunities for social interaction on the play fighting behavior in male and female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), *Dev Psychobiol.*, v. 47, n. 4, p. 345-353, 2005.

VIEIRA, M.L., SARTORIO, R. Análise motivacional, causal e funcional da brincadeira em duas espécies de roedores. *Estudos de Psicologia*, n. 7, v. 1, p. 189-196, 2002

WANG, A.T. *e col.*, Neural correlates of facial processing in children and adolescents with autism spectrum disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, v. 43, p. 481-190, 2004

WATERHOUSE, L., FEIN, D., MODAHL, C. Neurofunctional mechanisms in autism, *Psychological Review*, v. 103, n. 3, p. 457-489, 1996

WILLIAMS, P.G., HERSH, J.H., A male with fetal valproate syndrome and autism, *Dev Med Child Neurol*, v.43, p. 632-634, 1997

WILLIAMS, G. *e col.* Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Developmental Medicine and Child Neurology*, v. 43, p. 202-206, 2001

YOUNG, L.J., The neurobiology of social recognition, approach and avoidance. *Biol Psychiatry*, v. 51, p. 18-26, 2002

YOUNG, L. J., PITKOW, L. J., FERGUSON, J. N., Neuropeptides and social behavior: animal models relevant to autism, *Mol Psychiatry*, v. 7, suppl 2:p. 538-539, 2002

ZILBOVICIUS, M. *e col.* Temporal lobe dysfunction in childhood autism: A PET study. Positron emission tomography, *Am J Psychiatry*, v. 157, p. 1988-1993, 2000