

MARIANNA MANES

**Aspectos comportamentais e neuroquímicos do modelo de autismo  
induzido por ácido valpróico em ratas**

São Paulo

2023

MARIANNA MANES

**Aspectos comportamentais e neuroquímicos do modelo de autismo  
induzido por ácido valpróico em ratas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Departamento:**

Patologia

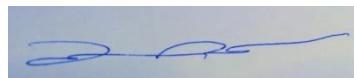
**Área de concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientador:**

Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

De acordo:



Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4316  
FMVZ

Manes, Marianna.

Aspectos comportamentais e neuroquímicos do modelo de autismo induzido por ácido valpróico em ratas / Marianna Manes. – 2023.  
127 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2023.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Freitas Felício

1. Transtorno do Espectro Autista. 2. Modelo animal. 3. Comportamento animal. 4. Cuidados maternos. 5. Neurotransmissão. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Aspectos comportamentais e moleculares do comportamento materno em modelo de autismo com ácido valproílico", protocolada sob o CEUA nº 7561140119 (ID 006744), sob a responsabilidade de **Luciano Freitas Felício e equipe; Marianna Manes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 02/07/2019.

We certify that the proposal "Behavioral and molecular aspects of maternal behavior in a model of autism with valproic acid", utilizing 971 Isogenic rats (463 males and 508 females), protocol number CEUA 7561140119 (ID 006744), under the responsibility of **Luciano Freitas Felício and team; Marianna Manes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/02/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2019** a **11/2021**

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem:	Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP			
Espécie:	Ratos isogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 60 a 90 dias N: 508
Linhagem:	Wistar			Peso: 300 a 350 g
Origem:	Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP			
Espécie:	Ratos isogênicos	sexo:	Machos	idade: 60 a 90 dias N: 463
Linhagem:	Wistar			Peso: 400 a 450 g

Local do experimento: Biotério do Departamento de Patologia Experimental e Comparada

São Paulo, 19 de novembro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes  
Secretária  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MANES, Marianna

Título: **Aspectos comportamentais e neuroquímicos do modelo de autismo induzido por ácido valpróico em ratas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 1772921.

Agradeço primeiramente aos meus animais que doaram suas vidas para a realização desse trabalho. Sem eles, nem esse e nem tantos outros trabalhos existiriam.

Agradeço a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Freitas Felício por ter aceitado me orientar e ter me acolhido durante todos esses anos. Obrigada por tanto!

Agradeço a Luana Carvalho Cezar, por me ensinar tanto e me apresentar a esse novo mundo.

Agradeço a Magali Caetano, pelos conselhos, broncas e conversas, você fez isso tudo ser mais leve.

Agradeço a cada uma das pessoas que trabalha no departamento por sempre terem me ajudado, em especial Milena, Herculano, Luciana e Nelsinho.

Agradeço a Esther Lopes Ricci por ter me apresentado a esse mundo da pesquisa e por ter acreditado em mim. Você sempre me ajudou e por isso eu jamais poderei agradecer o suficiente.

Agradeço a todos os colegas e amigos da pós-graduação do VPT, em especial ao Gabriel Ramos de Abreu pelas conversas, risadas e ajuda.

Agradeço as alunas de iniciação científica: Emilly e Laís, obrigada pela ajuda, meninas.

Agradeço ao meu noivo, André, por todo apoio, por acreditar mais em mim do que eu mesma e por ser minha certeza no meio de tantas dúvidas. Te escolher e ser escolhida por você foi uma das melhores coisas que já me aconteceu, não me imagino fazendo nada disso sem você. Te amo!

Agradeço a Julia Zaccarelli Magalhães por todos esses anos juntas. Dizer que eu não estaria aqui sem você não é exagero. Obrigada por toda ajuda e apoio ao longo dos anos. Do Mackenzie para a vida, você sempre esteve e sempre estará ao meu lado, não tenho dúvidas.

Agradeço a minha família por apoiar minhas escolhas, entender minhas ausências e torcerem por mim em cada passo. Ao meu pai, Giuseppe, obrigada por ser um exemplo de trabalho duro e caráter, tenho certeza que o nonno está orgulhoso do homem que você é. A minha nonna, Maria Aparecida, que mesmo não entendendo muito sempre se orgulhou de mim. Amo vocês!

Agradeço a minha melhor amiga e irmã de alma, Carolini, por uma vida ao meu lado, não sei o que é viver sem você e nem quero. Obrigada por sempre me levantar, por acreditar em mim e por me apoiar em cada passo. Te amo!

Por último, mas certamente, não menos importante, agradeço às mulheres da minha vida, minha tia Cristiana e minha mãe Amália. A minha tia, Cristiana, obrigada pelos casquinhos, pelas viagens, idas ao hospital e em cada uma das minhas lembranças. Você está presente em cada passo da minha vida e eu tenho orgulho de ser sua sobrinha. A minha mãe, Amália, nada do que eu possa escrever faz jus ao que realmente você merece, você é a melhor mãe do mundo que alguém poderia ter. Obrigada por cuidar de mim, me proteger, me mimar e ser meu porto seguro. Tenho muito orgulho de ser sua filha. Te amo mais que tudo!

## RESUMO

MANES, M. **Aspectos comportamentais e neuroquímicos do modelo de autismo induzido por ácido valpróico em ratas**. 2023. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O transtorno do espectro autista (TEA) é caracterizado por déficits comportamentais, sendo mais comumente diagnosticado em homens do que em mulheres. Apesar da ampla variedade de estudos sobre o tema, ainda não é possível determinar a exata causa do TEA. O diagnóstico é clínico e realizado por meio da observação dos comportamentos e do desenvolvimento do indivíduo. Por ser diagnosticado majoritariamente nas populações masculinas, acredita-se que as mulheres têm menor probabilidade de se enquadrar dentro do espectro e por isso são menos estudadas. Dessa forma, esse trabalho propõe-se a caracterizar o modelo de autismo em ratas fêmeas e avaliar o comportamento materno das mesmas, utilizando o modelo de exposição pré-natal ao ácido valpróico (VPA). No Capítulo 1 foi feita a caracterização do fenótipo tipo-autista na prole feminina de ratas expostas ao VPA no período pré-natal. Para isso, ratas adultas foram tratadas com VPA (400 mg/kg) no dia de gestação 12,5 por via intraperitoneal e o comportamento da prole feminina foi estudada através dos testes vocalização ultrassônica, labirinto em T, comportamento de brincar, *grooming* espontâneo e *splash test*, que são relacionados com a sintomatologia apresentada em indivíduos com TEA. Os resultados mostraram que a exposição pré-natal ao VPA foi capaz de causar prejuízos na comunicação, comportamentos repetitivos/estereotipados e déficits em relação a socialização, além de diminuir o comportamento de *grooming* na prole feminina, sugerindo que o modelo de VPA foi capaz de mimetizar o comportamento expresso por indivíduos autista. No Capítulo 2 foi feita a avaliação dos cuidados maternos e da neuroquímica cerebral de ratas tipo-autista. Para isso, foram utilizadas as mesmas ratas do Capítulo 1, que foram acasaladas com machos saudáveis. Após o nascimento da prole foram realizados os testes de comportamento materno e comportamento materno agressivo para avaliação dos



cuidados maternos e, ao final da lactação, os animais foram submetidos a eutanásia para coleta de diferentes estruturas cerebrais para a avaliação da neuroquímica. Os resultados mostraram que a exposição pré-natal ao VPA não foi capaz de alterar o comportamento materno, porém causou pequenas alterações no comportamento materno agressivo e na neuroquímica cerebral, entretanto sem significado biológico, sugerindo que esse modelo não modifica os cuidados maternos exibidos por esses animais.

**Palavras-chave:** Transtorno do Espectro Autista. Modelo animal. Comportamento animal. Cuidados maternos. Neurotransmissão.

## ABSTRACT

MANES, M. **Behavioral and neurochemical aspects of the model of autism induced by valproic acid in rats**. 2023. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Autism spectrum disorder (ASD) is characterized by behavioral deficits, being more commonly diagnosed in men than in women. Despite the wide variety of studies on the subject, it is still not possible to determine the exact cause of ASD. The diagnosis is clinical and carried out by observing the behavior and development of the individual. Because it is mostly diagnosed in male populations, it is believed that women are less likely to fit within the spectrum and therefore are less studied. Thus, this work proposes to characterize the model of autism in female rats and to evaluate their maternal behavior, using the model of prenatal exposure to valproic acid (VPA). In Chapter 1, the characterization of the autistic-type phenotype was carried out in the female offspring of rats exposed to VPA in the prenatal period. For this, adult rats were treated with VPA (400 mg/kg) on day 12.5 of gestation intraperitoneally and the behavior of the female offspring was studied through the ultrasonic vocalization tests, T-maze, playing behavior, spontaneous grooming and splash test, which are related to the symptomatology presented in individuals with ASD. The results showed that prenatal exposure to VPA was able to cause impairments in communication, repetitive/stereotyped behaviors and deficits in relation to socialization, in addition to decreasing grooming behavior in female offspring, suggesting that the VPA model was able to mimic the behavior expressed by autistic individuals. In Chapter 2, the evaluation of maternal care and brain neurochemistry of autistic female rats was carried out. For this, the same rats from Chapter 1 were used, which were mated with healthy males. After the birth of the offspring, tests of maternal behavior and aggressive maternal behavior were performed to evaluate maternal care and, at the end of lactation, the animals were euthanized to collect different brain structures for neurochemical evaluation. The results showed that prenatal exposure to VPA was not able to change maternal behavior, but caused small changes in maternal aggressive behavior and brain neurochemistry, however without biological

significance, suggesting that this model does not modify the maternal care displayed by these animals.

**Key words:** Autism spectrum disorder. Animal model. Animal behavior. Maternal behavior. Neurotransmission.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Sinais e sintomas observados em crianças com autismo.....	28
Figura 1.2 – Labirinto em T.....	40
Figura 1.3 – Ilustração do teste de comportamento de <i>grooming</i> .....	42
Figura 1.4 - Parâmetros mensurados no teste de vocalização ultrassônica por 5 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	46
Figura 1.5 - Escores mensurados no labirinto em T de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	48
Figura 1.6- Parâmetros mensurados no teste de comportamento de brincar de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	50
Figura 1.7 - Parâmetros mensurados na avaliação do <i>grooming</i> espontâneo por 5 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	53
Figura 1.8 - Parâmetros mensurados na avaliação do <i>grooming</i> espontâneo por 10 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	56
Figura 1.9 - Parâmetros mensurados na avaliação do <i>grooming</i> induzido no <i>splash test</i> por 5 minutos de expostas de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	59
Figura 2.1 – Parâmetros do comportamento maternal em ratas. Agrupamento de filhotes (A), preparo da postura para amamentação (B), “ <i>crouching</i> ” ou cifose fisiológica (C) e comportamento maternal total (D).....	82
Figura 2.2 – Perfis hormonais de roedores e mulheres durante o ciclo	

estral/menstrual e os períodos de gestação e lactação.....	84
Figura 2.3 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 9 salinas/ N= 13 VPA.....	97
Figura 2.4 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno agressivo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas/ N= 13 VPA.....	100
Figura 2.5 - Análise de níveis de neurotransmissores do córtex de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas e 10 VPA.....	103
Figura 2.6 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipocampo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas e 12 VPA.....	106
Figura 2.7 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipotálamo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas e 10 VPA.....	109
Figura 2.8 - Análise de níveis de neurotransmissores do corpo estriado de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 9 salinas e 13 VPA.....	112
Figura 2.9 - Análise de níveis de neurotransmissores da substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas e 10 VPA.....	115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Parâmetros mensurados no teste de vocalização ultrassônica por 5 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	45
Tabela 1.2 - Parâmetros mensurados no teste de vocalização ultrassônica por 5 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	45
Tabela 1.3 - Escores mensurados no teste do labirinto em T de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	47
Tabela 1.4 - Escores mensurados no teste do labirinto em T de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	47
Tabela 1.5 - Parâmetros mensurados no teste de interação social de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	49
Tabela 1.6 - Parâmetros mensurados no teste de interação social de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	49
Tabela 1.7 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de <i>grooming</i> espontâneo por 5 minutos. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	51
Tabela 1.8 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de <i>grooming</i> espontâneo por 5 minutos. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	52
Tabela 1.9 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de <i>grooming</i> espontâneo por 10 minutos. São apresentados as médias e os	

respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	54
Tabela 1.10 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de <i>grooming</i> espontâneo por 10 minutos. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	55
Tabela 1.11 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de <i>grooming</i> no <i>splash test</i> . São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	57
Tabela 1.12 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de <i>grooming</i> no <i>splash test</i> . São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA.....	58
Tabela 2.1 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 9 salinas/ N= 13 VPA.....	95
Tabela 2.2 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites N= 9 salinas/ N= 13 VPA.....	96
Tabela 2.3 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno agressivo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas/ N= 13 VPA.....	98
Tabela 2.4 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno agressivo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites N= 8 salinas/ N= 13 VPA.....	99
Tabela 2.5 - Análise de níveis de neurotransmissores do córtex de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas e 10 VPA.....	101
Tabela 2.6 - Análise de níveis de neurotransmissores do córtex de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites N= 8 salinas/ N= 13	

VPA.....	102
Tabela 2.7 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipocampo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas e 12 VPA.....	104
Tabela 2.8 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipocampo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 8 salinas e 12 VPA.....	105
Tabela 2.9 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipotálamo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas e 10 VPA.....	107
Tabela 2.10 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipotálamo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 8 salinas e 10 VPA.....	108
Tabela 2.11 - Análise de níveis de neurotransmissores do corpo estriado de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 9 salinas e 13 VPA.....	110
Tabela 2.12 - Análise de níveis de neurotransmissores do corpo estriado de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 9 salinas e 13 VPA.....	111
Tabela 2.13 - Análise de níveis de neurotransmissores da substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas e 10 VPA.....	113
Tabela 2.14 - Análise de níveis de neurotransmissores da substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 8 salinas e 10 VPA.....	114



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 - Parâmetros mensurados no teste de vocalização ultrassônica de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5.....	38
Quadro 1.2 - Parâmetros utilizados na avaliação do comportamento de brincar de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5.....	41
Quadro 1.3 - Parâmetros utilizados na avaliação do comportamento de <i>grooming</i> de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5.....	42
Quadro 2.1 - Parâmetros utilizados na avaliação do comportamento materno de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5.....	90
Quadro 2.2 - Parâmetros utilizados na avaliação do comportamento materno agressivo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5.....	91

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	22
1.1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1.1 Autismo.....	24
1.1.2 Causas.....	25
1.1.3 Neuropatologia.....	26
1.1.4 Diagnóstico e tratamento.....	27
1.1.5 Autismo feminino.....	29
1.1.6 Modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico.....	33
1.1.7 Justificativa.....	35
1. 2. OBJETIVOS.....	36
1.2.1 Objetivo geral.....	36
1.2.2 Objetivos específicos.....	36
1.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
1.3.1 Animais.....	37
1.3.2. Procedimentos.....	37
1.3.2.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez.....	37
1.3.2.2 Tratamento com VPA.....	37
1.3.2.3 Vocalização ultrassônica.....	38
1.3.2.4 Labirinto em T.....	39
1.3.2.5 Comportamento de brincar.....	40
1.3.2.6 Comportamento de <i>grooming</i> espontâneo.....	41
1.3.2.7 <i>Splash test</i> .....	42
1.3.3 Delineamento experimental.....	43
1.3.3.1 Experimento 1: Validação do modelo animal de autismo induzido por VPA pré-natal.....	43
1.3.3.2 Experimento 2: Avaliação do uso do <i>grooming</i> como ferramenta de medição de comportamento estereotipado causado pela exposição pré-natal ao VPA.....	43
1.3.4 Análise estatística.....	43
1.4 RESULTADOS.....	44
1.4.1 Experimento 1: Validação do modelo animal de autismo induzido	

<b>por VPA pré-natal</b> .....	44
1.4.1.2 Vocalização ultrassônica.....	44
1.4.1.3 Labirinto em T.....	47
1.4.1.4 Comportamento de brincar.....	48
<b>1.4.2 Experimento 2: Avaliação do uso do <i>grooming</i> como ferramenta de medição de comportamento estereotipado causado pela exposição pré-natal ao VPA em ratas fêmeas</b> .....	51
1.4.2.1 Comportamento de <i>grooming</i> espontâneo.....	51
1.4.2.2 <i>Splash test</i> .....	57
1.5 DISCUSSÃO.....	60
1.6 CONCLUSÃO.....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	79
2.1.1 Comportamento materno em mamíferos.....	80
2.1.2 Fisiologia do comportamento materno.....	83
2.1.3 Comportamento materno e TEA.....	86
2.1.4 Justificativa.....	87
2. 2. OBJETIVOS.....	88
<b>2.2.1 Objetivo geral</b> .....	88
<b>2.2.2 Objetivos específicos</b> .....	88
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	89
<b>2.3.1 Animais</b> .....	89
<b>2.3.2. Procedimentos</b> .....	89
2.3.2.1. Comportamento materno.....	89
2.3.2.2 Comportamento materno agressivo.....	90
2.3.2.3 Avaliação neuroquímica.....	91
<b>2.3.3 Delineamento experimental</b> .....	92
<b>2.3.4 Análise estatística</b> .....	93
2. 4 RESULTADOS.....	94
2.4.1 Comportamento materno.....	94
2.4.2 Comportamento materno agressivo.....	97
2.4.3 Avaliação neuroquímica.....	100
2.5 DISCUSSÃO.....	116

2.6 CONCLUSÃO.....	122
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>123</b>

## APRESENTAÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um complexo transtorno do neurodesenvolvimento, caracterizado por diversos prejuízos comportamentais e que geralmente pode ser diagnosticado antes dos três anos de idade. Atualmente ainda não há um tratamento eficaz para esse transtorno, sendo que a abordagem clínica multiprofissional é a mais comumente utilizada, assim como, o uso de fármacos para amenizar aspectos específicos da sintomatologia.

O diagnóstico do TEA é realizado através da observação dos comportamentos do indivíduo, entretanto, a maioria dos marcadores comportamentais são estabelecidos em populações majoritariamente masculinas, o que faz com que a população feminina seja menos diagnosticada (razão 4:1). Isso se deve, pois, a expressão do fenótipo feminino de TEA é diferente do masculino, sendo, muitas vezes, mais sutis. Assim, muitas dessas mulheres acabam sendo subdiagnosticadas.

Atualmente existem diversos modelos animais experimentais propostos para o estudo do TEA, que são de extrema relevância para o avanço das descobertas sobre esse transtorno. O modelo de exposição pré-natal ao ácido valpróico foi desenvolvido e validado para essa finalidade, pois apresenta alterações comportamentais semelhantes às exibidas por pacientes com TEA, o que o torna um modelo de extrema importância para o estudo desse transtorno.

Assim, no presente trabalho propõe-se a caracterizar o modelo de autismo em ratas fêmeas e avaliar o comportamento materno das mesmas, utilizando o modelo de exposição pré-natal ao ácido valpróico. Para tanto, o trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o Capítulo 1 referente à caracterização do fenótipo em ratas fêmeas e o Capítulo 2 à avaliação dos cuidados maternos e da neuroquímica cerebral dessas ratas.

## CAPÍTULO I

### CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO TIPO-AUTISTA EM RATAS WISTAR: MODELO DE AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPRÓICO

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Autismo

A palavra autismo vem do grego autós (αὐτός, significando "auto") e foi usada pela primeira vez em 1910 pelo psiquiatra suíço Eugen Bleuler. Ele a utilizou para descrever os pacientes com esquizofrenia que “retiravam-se para o seu mundo de fantasia” (KUHN, 2004).

Em 1943, Leo Kanner, um psiquiatra austríaco, descreveu sob o nome de “distúrbios autísticos de contato afetivo” um quadro observado em crianças que apresentavam estereotípias, obsessividade e ecolalia (KANNER, 1943). Em 1944, Kanner continuou a descrever o quadro, relatando que os exames laboratoriais e clínicos não foram capazes de fornecer dados com relação à etiologia, porém todos os pacientes apresentavam um denominador comum: a incapacidade de se relacionar; os pais descreviam seus filhos como “autossuficientes”, “mais felizes quando deixados sozinhos”, “como uma concha” e agindo como se as pessoas ao seu redor não estivessem lá (KANNER, 1944).

Atualmente, o autismo é definido como um distúrbio de neurodesenvolvimento que se manifesta tipicamente no início da primeira infância (DSM-V, 2014). A constatação do distúrbio ocorre geralmente antes dos três anos de idade, sendo alguns dos sintomas já perceptíveis aos seis meses de idade (FOMBONNE, 2005). Devido à variabilidade presente nas manifestações sintomáticas o termo “transtorno do espectro autista” (TEA) foi criado, e inclui a Síndrome de Asperger, o transtorno de Rett, o transtorno global do desenvolvimento sem outra especificação e o transtorno desintegrativo (DSM-V, 2014).

As estimativas de prevalência do autismo são continuamente atualizadas; atualmente estima-se que 1 a cada 160 crianças tenha TEA, essa é uma estimativa do valor médio e a prevalência varia substancialmente entre os estudos (WHO, 2022).

O Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) afirma que o TEA é diagnosticado quatro vezes mais frequentemente em homens do que em mulheres (DSM-V, 2014). Essa proporção de gênero de 4:1 é amplamente citada e deriva do trabalho que calculou a razão média entre homens e mulheres da

população mundial de pacientes. Embora esse número seja útil como aproximação da estimativa homem-mulher, não foram levados em conta fatores importantes como o tamanho da amostra ou o método de averiguação dos casos (LOOMES; HULL; MANDY, 2017).

### 1.1.2 Causas

Apesar da ampla variedade de estudos sobre o tema, ainda não é possível determinar a exata causa do TEA; a literatura científica aponta para uma etiologia complexa, com ampla variedade de fatores genéticos e ambientais que podem acarretar em fenótipos semelhantes (RATAJCZAK, 2011).

Existem estudos de associação gênica, realizados em gêmeos e irmãos de pacientes autistas que demonstram que o TEA apresenta alta herdabilidade, tendo o maior índice dentre os transtornos neuropsiquiátricos (WILLIAMS, 2012; RODIER, 2020). Estudos com gêmeos monozigóticos mostraram que, caso um seja autista, a probabilidade do outro gêmeo apresentar alguma forma de autismo é de 60-92%, e em casos de gêmeos dizigóticos, essa probabilidade cai para 0-10% (DEFRANCESCO, 2001; MUHLE; TRENTACOSTE; RAPIN, 2004; RATAJCZAK, 2011). Isso sugere que a interação entre diversos genes causam o autismo “idiopático”, porém os fatores epigenéticos e a exposição a fatores ambientais podem contribuir para a expressão de traços relacionados ao autismo (RATAJCZAK, 2011).

Estudos mostraram que diversos genes estão associados à forma hereditária monogênica de autismo, incluindo os genes *SHANK2*, *NLGN3*, *NLGN4*, *NRXN1*, *MeCP2* e *HOXA1*, além do gene *FMR-1*, que também é responsável pela Síndrome do X Frágil (FARZIN et al., 2006; CAGLAYAN, 2010; RATAJCZAK, 2011).

Possivelmente o achado genético mais relevante para o autismo é a identificação do gene responsável pela Síndrome de Rett, uma vez que ela é um transtorno do neurodesenvolvimento associada à perda de habilidades de comunicação e atraso mental, além de possuir características autistas que variam conforme os estágios de desenvolvimento da criança (RATAJCZAK, 2011). Diferentemente do autismo, que é mais comumente diagnosticado em meninos, a



Síndrome de Rett é quase exclusivamente observada em meninas (VAN ACKER; LONCOLA; VAN ACKER, 2005).

O fato de que a combinação dos genes conhecidos ou das doenças genéticas associadas ao autismo ser responsável por aproximadamente 1-2% dos casos propõe a definição como uma síndrome do neurodesenvolvimento para a qual não há uma causa genética principal, mas diversas e raras mutações (DEFRANCESCO, 2001; MILES, 2011). Até o momento, não foi encontrado um único gene responsável pelo autismo, uma vez que existem outros fenômenos que podem causar mutações nos genes ou alteração na expressão gênica, com o resultado final sendo o autismo.

Cada vez mais fica claro e evidente que os fatores ambientais apresentam um importante papel no TEA, os tornando tão relevantes quanto os fatores genéticos para o desenvolvimento desse transtorno (SANDIN et al., 2014).

### **1.1.3 Neuropatologia**

Existem diversos estudos de imagem, anatômicos e histológicos que revelam a presença de padrões morfológicos característicos em pacientes com autismo. As avaliações por ressonância magnética demonstram aumento no volume da amígdala e diminuição no número de neurônios (BAUMAN; KEMPER, 2005). As principais alterações incluem aumento do volume cerebral no decorrer dos primeiros anos de vida, perda das células de Purkinje, anormalidades nos núcleos dos nervos cranianos, hipoplasia de estruturas do tronco cerebral e alterações em regiões cerebrais, principalmente na amígdala, no hipocampo e no córtex frontal (SCHULTZ, 2005).

Algo que também foi observado é o crescimento do encéfalo do paciente com autismo, que sofre rápido aumento durante o período pós-natal inicial, seguido de desaceleração progressiva conforme a idade (COURCHESNE et al., 2007). Em alguns casos, pode ser observada uma terceira fase em certas regiões cerebrais de indivíduos pré-adolescentes, caracterizada por degeneração neuronal (COURCHESNE et al., 2007). Em estudo de Courchesne et al. (2011), foi encontrado aumento no peso médio do cérebro de crianças autistas, assim como aumento no número global de neurônios no córtex pré-frontal, porém sem diferenças em relação ao tamanho.

Análises *post-mortem* do encéfalo de pacientes com autismo mostraram alterações no padrão de organização cortical, tais como distúrbios no padrão da distribuição celular da camada III do córtex pré-frontal dorsolateral, correspondendo a aumento na densidade neuronal de até 23% quando comparados com pacientes neurotípicos (CASANOVA et al., 2006).

#### **1.1.4 Diagnóstico e tratamento**

O diagnóstico clínico é feito através de uma detalhada anamnese e uma equipe interdisciplinar. Os critérios são geralmente baseados em questionários como o ADI-R (*Autism Diagnosis Interview-Revised*) e no DSM-V (BECKER et al., 2012).

O diagnóstico é feito exclusivamente através da avaliação comportamental do paciente. Para que seja constatado o TEA é necessário que o indivíduo apresente no mínimo seis déficits comportamentais, sendo, pelo menos, dois relacionados com interação social, um relacionado com comunicação e um comportamento estereotipado (SILVA; MULICK, 2009; LANDRIGAN, 2010; FRAZIER et al., 2012; TAHERI; PERRY, 2012). A Figura 1.1 ilustra alguns dos sintomas que afetam o comportamento de crianças autistas segundo a Associação Americana de Autismo (*Autism Society of America*) (KIRSTEN, 2012).

Figura 1.1 - Sinais e sintomas observados em crianças com autismo



Fonte: Kirsten T. B. (2012).

Atualmente não há um tratamento eficaz para o TEA. A abordagem clínica padrão inclui diversos profissionais como médicos, psicólogos, fonoaudiólogos, terapeutas ocupacionais, nutricionistas entre outros, e também o uso de fármacos para amenizar aspectos específicos da sintomatologia, como o controle do comportamento agressivo, alterações de humor, distúrbios do sono e outras comorbidades (RIESGO; GOTTFRIED; BECKER, 2013). Concomitante ao uso de medicamentos é recomendado o uso de terapias comportamentais como o TEACCH (*Treatment and Educational of Autistic and related Communication-handicapped*

*Children*), que visa adaptar e organizar o ambiente e a rotina de modo que a criança possa entender de forma mais fácil e a ABA (*Applied Behavior Analysis*), que visa ensinar habilidades ausentes nas crianças.

### **1.1.5 Autismo feminino**

O diagnóstico do autismo tem sido tradicionalmente mais comum durante a infância, quando as diferenças entre os neurotípicos podem ser observadas de maneira óbvia (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020). No entanto, nos últimos anos houve aumento significativo na taxa de diagnóstico em adultos, uma vez que os critérios foram ampliados, com a integração de categorias anteriormente separadas, como autismo e a Síndrome de Asperger, acarretando em uma nova classificação de “transtorno do espectro autista”; com isso, indivíduos que não foram diagnosticados durante a infância, atendem aos critérios de diagnóstico atuais (HAPPÉ et al., 2016; MURPHY et al., 2016).

O autismo é mais comumente diagnosticado em homens do que em mulheres em todas as faixas etárias (FOMBONNE, 2009; RUSSELL; STEER; GOLDING, 2011). Ao tentar explicar as discrepâncias nos diagnósticos, pesquisadores se basearam em duas ideias distintas que, apesar de contrastantes, não são mutuamente exclusivas (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020). Uma argumenta que há algo inerente em ser mulher que as “protege” da probabilidade de desenvolver autismo (ROBINSON et al., 2013). A outra propõe que mulheres podem ser mais propensas a desenvolver autismo do que estimado atualmente, mas que os vieses do diagnóstico e a variação nas formas como o autismo é expresso em mulheres faz com que não seja detectado tão facilmente como em homens (DWORZYNSKI et al., 2012; RUSSELL; STEER; GOLDING, 2011).

A teoria do efeito protetivo feminino deriva de pesquisas sobre os fatores genéticos e ambientais que possivelmente afetam o desenvolvimento de autismo e propõe que as mulheres requerem um risco ambiental e/ou genético maior do que homens para expressar o mesmo grau de características do TEA e, portanto, estão “protegidas” dos sintomas do TEA em relação aos homens (ROBINSON et al., 2013).

Outra proposta do fator de proteção é o cromossomo X, com um gene protetor expresso no cromossomo de origem paterna, que aumenta o limiar de expressão do autismo em mulheres em relação aos homens (SKUSE et al., 2009), entretanto, nenhum gene protetor específico foi identificado (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020).

Mesmo que existam fatores biológicos capazes de reduzir a probabilidade de autismo em mulheres, há também evidências que sugerem que os processos de diagnóstico são menos propensos a identificar o TEA em mulheres, especialmente àquelas que não apresentam deficiência intelectual (RUSSELL; STEER; GOLDING, 2011). As mulheres parecem demonstrar maiores dificuldades do que homens para receber o diagnóstico de autismo, mesmo apresentando níveis equivalentes de características autistas (DWORZYNSKI et al., 2012, HULL; PETRIDES; MANDY, 2020). Além disso, diversas mulheres diagnosticadas com autismo somente recebem o diagnóstico em uma idade mais avançada (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020).

Uma questão fundamental no processo de diagnóstico atual são os marcadores comportamentais que são utilizados como critérios e são estabelecidos com base em concepções pré-existentes de como são os comportamentos autistas. Esses critérios foram desenvolvidos com base na população predominantemente masculina e ignoram que as mulheres podem ser menos propensas a atender esses mesmos critérios (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020), resultando em diagnósticos de distúrbios do desenvolvimento mais amplos ao invés de autismo, mesmo quando apresentam características clínicas significativas (WILSON et al., 2016).

Características individuais podem interagir com o gênero para reduzir a probabilidade de diagnóstico de autismo em mulheres, como por exemplo, o quociente de inteligência (QI); mulheres com QI baixo são mais propensas a receber o diagnóstico do que as com QI alto (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020). As taxas totais de diagnóstico têm aumentado com o passar do tempo, o que indica ampliação dos critérios para incluir indivíduos com uma variação maior, porém o aumento de diagnósticos aparenta ser principalmente de meninos sem deficiência intelectual (BLUMBERG et al., 2013). Existem também evidências que sugerem que mulheres adultas estão procurando e recebendo diagnósticos em maior número do que homens, em concordância com o argumento de que essas mulheres não foram

diagnosticadas quando mais novas de forma errônea (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020).

Uma explicação para o subdiagnóstico feminino é que a manifestação do quadro de autismo é qualitativamente diferente do que encontrada tipicamente nos indivíduos do sexo masculino (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020). A expressão do fenótipo feminino de autismo apresenta características semelhantes às descritas nos critérios de diagnóstico atuais (dificuldades de interação social e comunicação, comportamentos restritos e repetitivos e, também, respostas sensoriais incomuns), porém, essas características podem ser expressas de maneiras que diferem dos critérios tradicionais de diagnóstico (HULL et al., 2017; KIRKOVSKI; ENTICOTT; FITZGERALD, 2013; LAI et al., 2011).

Mulheres também podem expressar outros comportamentos ou características adicionais que não estão incluídas nos critérios de diagnóstico atual (HULL et al., 2017). Dificuldades com relacionamentos sociais são uma marca registrada do autismo e a teoria do fenótipo do autismo feminino sugere que a natureza dessas dificuldades pode ser diferente dependendo do gênero do indivíduo (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020). Algumas pesquisas sugerem que as mulheres autistas podem apresentar menos deficiências sociais do que homens, uma vez que mulheres autistas tendem a ter maiores níveis de motivação social do que homens (HEAD; MCGILLIVRAY; STOKES, 2014; HILLER; YOUNG; WEBER, 2014).

Existem também algumas pesquisas sobre as diferenças de gênero em interesses restritos e/ou repetitivos, que sugerem que mulheres autistas apresentam níveis mais baixos desses interesses (HATTIER et al., 2011; LAI et al., 2015). Porém, outros autores argumentam que os interesses das mulheres autistas podem estar em áreas diferentes dos homens e, assim, são subestimados durante as avaliações ou caso esses interesses não sejam considerados como “atípicos” (ANTEZANA et al., 2019; MANDY et al., 2012). Pesquisas adicionais compararam os interesses de homens e mulheres com TEA e puderam perceber que os interesses masculinos estão mais concentrados em tópicos mecânicos, como veículos, computadores e física, enquanto os interesses femininos estão mais relacionados a personagens fictícios, animais ou psicologia (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020).

Outro aspecto com relação ao fenótipo do autismo feminino é o fenômeno da camuflagem, que se refere ao uso de estratégias, de forma consciente ou

inconsciente, que podem ser aprendidas ou desenvolvidas, para minimizar as características do autismo em um ambiente social, tais como imitar as expressões faciais da pessoa com quem está conversando ou forçar-se a fazer contato visual (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020). Um conceito semelhante é o de compensação, que descreve o uso de estratégias cognitivas alternativas para superar as dificuldades comportamentais ou sociocognitivas do autismo que incluem aprender a reconhecer diferentes expressões faciais (LIVINGSTON; HAPPÉ, 2017).

As primeiras referências relacionadas à camuflagem do autismo ou conceitos semelhantes aparecem no início da década de 1980 e tentam descrever ou explicar a disparidade de gênero em relação ao diagnóstico, especialmente entre indivíduos sem deficiência intelectual (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020). Em 1981, Lorna Wing, médica psiquiatra inglesa, levantou a hipótese que algumas meninas autistas que não apresentavam deficiência intelectual poderiam não ser diagnosticadas e isso pode estar relacionado ao fato de que mulheres parecem ter melhores habilidades sociais e de comunicação em comparação aos homens (WING, 1981); essa ficou conhecida como a “hipótese da camuflagem” (HULL; PETRIDES; MANDY, 2020).

Nesse mesmo trabalho, Wing (1981) também descreveu estudos de caso de indivíduos de ambos os sexos usando estratégias para aprender regras ou comportamentos sociais, através de programas de televisão ou livros, que os fazem parecer neurotípicos à primeira vista e acaba por dificultar o diagnóstico. Historicamente, há relatos de mulheres autistas descrevendo comportamentos relacionados às suas próprias experiências ao se camuflarem, Liane Holliday Willey, uma escritora, educadora, e palestrante norte-americana, descreveu “fingir ser normal” por muitos anos até ser diagnosticada (HOLLIDAY WILLEY, 1999).

A hipótese de estratégias específicas usadas por meninas para mascarar as dificuldades sociais também foi observada nos estudos de caso de Kopp e Gillberg (1992), com ênfase no comportamento social superficialmente típico, mas, após um exame mais profundo, foi possível identificar dificuldades subjacentes (KOPP; GILLBERG, 1992). Os autores sugerem que esses comportamentos representam parte de um “fenótipo feminino” de Asperger, o que pode exigir métodos de avaliação adaptados, este conceito foi estendido em outros trabalhos buscando

identificar apresentações mais sutis de dificuldades de comunicação e sociais em meninas autistas (KOPP; GILLBERG, 2011).

### 1.1.6 Modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico

Atualmente existem diversos modelos experimentais propostos para o estudo do autismo, modelos baseados em animais geneticamente modificados, modelos baseados em lesões de estruturas específicas do cérebro, tais como o hipocampo ventral e a amígdala, e os modelos baseados na exposição pré-natal a agentes tóxicos, como álcool, a talidomida e o ácido valpróico (VPA) (KLAUCK; POUSTKA, 2006).

O VPA é um ácido graxo que foi sintetizado pela primeira vez em 1882 para o uso como solvente orgânico. Suas propriedades anticonvulsivantes foram descobertas ao acaso em 1962, e em 1978 seu uso clínico com essa finalidade foi aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) (GOTTFRIED et al., 2013). Atualmente, o VPA é utilizado para o tratamento de epilepsia, transtorno bipolar, Doença de Alzheimer e Síndrome de Tourette (MELLOW; SOLANO-LOPEZ; DAVIS, 1993; CHIU et al., 2013; RICKETTS et al., 2019).

Do ponto de vista farmacológico, segundo Sousa (2013, p. 10):

[...] o VPA pertence à classe de inibidores da enzima histona desacetilase (HDAC) com ação também sobre canais iônicos e transportadores de GABA e pode atuar alterando expressão gênica através de controle epigenético. A regulação da acetilação de lisinas na porção C-terminal das moléculas de histonas presentes nos nucleossomos altera o estado de compactação e a estrutura da cromatina. O aumento da acetilação de histonas produz descompactação do DNA, aumentando o acesso da RNA polimerase II e proteínas acessórias necessárias à transcrição. O efeito é observado através do aumento da expressão de genes comumente silenciados. Assim, o equilíbrio entre as funções das enzimas HDAC e histona acetilase (HAC), além das DNA metil-transferases, que controlam o grau reestruturação da cromatina e o nível de transcrição de regiões cromossômicas específicas, fica comprometido. A exposição de uma droga com alto poder de regulação da expressão gênica durante o período de neurogênese pode levar então a uma modificação nos padrões de expressão de genes relacionados ao neurodesenvolvimento. A inibição das proteínas histonas desacetilases induzidas pelo VPA tem se mostrado importante na neuroproteção de cultura de neurônios corticais do VPA, aumentando a viabilidade dessas células *in vitro*.

Estudos da literatura evidenciaram que a exposição de seres humanos ao VPA durante o primeiro trimestre de gestação pode acarretar em alterações neurais no feto e está associada a aumento da prevalência de casos do TEA (DALENS;



RAYNAUD; GAULME, 1980; RODIER, 2002; GOTTFRIED et al., 2013). A utilização deste fármaco durante esse período crítico da gestação levou ao nascimento de diversas crianças com más formações e problemas cognitivos, esse conjunto de sintomas e sinais ficou conhecido como Síndrome do Valproato Fetal (ARDINGER, 1988). Dentre as más formações é possível destacar a espinha bífida, defeitos urogenitais, anomalias crânio faciais, do sistema respiratório e esquelético, e também atraso no neurodesenvolvimento (WILLIAMS et al., 2001).

Com base nessas evidências Rodier e colaboradores (1997) desenvolveram um modelo animal para a indução do autismo, no qual ratas prenhes foram expostas a dose única de VPA (350 mg/kg) no dia de gestação (DG) 12,5 que levou a alterações morfológicas e comportamentais na prole, semelhantes àquelas exibidas por pacientes com o TEA. Esse modelo apresenta validade de face, por ser capaz de reproduzir os aspectos comportamentais e histopatológicos característicos do quadro humano de TEA em roedores, se tornando um modelo amplamente utilizado em pesquisas sobre esse transtorno (RODIER et al., 1997).

Trabalhos com roedores também mostraram que a exposição ao VPA *in utero* causa efeitos a longo prazo, incluindo alterações comportamentais, endócrinas e imunológicas (SCHNEIDER et al., 2008). Os experimentos realizados por Schneider e Przewlocki (2005) foram capazes de demonstrar que a prole masculina de ratas que receberam uma única dose de VPA no DG 12,5 de gestação apresentavam amplo espectro de deficiências semelhantes aos pacientes autistas, tais como 1) diminuição do número de explorações e aumento da latência de comportamentos sociais, indicando déficits sociais; 2) aumento das atividades repetitivas/estereotipadas; 3) menor sensibilidade a estímulos dolorosos na coluna vertebral e maior sensibilidade a estímulos não dolorosos, sugerindo déficits no sistema sensorial; e 4) diminuição no pré-pulso do reflexo de sobressalto acústico, indicando prejuízos relacionados atenção e processamento de informação, bem como déficits sensorimotores, resultando em reações a estímulos ambientais que podem levar a aumento de comportamentos repetitivos e estereotipados. Além disso, em relação ao desenvolvimento físico, é possível destacar a abertura tardia dos olhos, menor peso corporal, atraso no desenvolvimento motor e resposta tardia de busca de ninho, mediada pelo sistema olfativo que sugere déficits de discriminação olfativa (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005).

### **1.1.7 Justificativa**

O autismo é um transtorno do desenvolvimento caracterizado por diversos prejuízos comportamentais que acomete majoritariamente indivíduos do sexo masculino. O diagnóstico é clínico e realizado pela observação dos comportamentos e do desenvolvimento dos indivíduos, porém a maioria dos marcadores comportamentais utilizados são estabelecidos em populações predominantemente masculinas. Dessa forma, acredita-se que as mulheres têm uma menor probabilidade de se enquadrar dentro do espectro e por isso são menos estudadas. Assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o modelo de autismo em ratas fêmeas.

## 1. 2. OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar o fenótipo tipo-autista em ratas utilizando o modelo de autismo induzido por VPA pré-natal.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Caracterizar o fenótipo tipo-autista na prole feminina de ratas expostas ao VPA no período pré-natal através das avaliações:

- De comunicação, por meio da vocalização ultrassônica;
- Do comportamento repetitivo/restritivo no teste de alternância espontânea no labirinto em T;
- Da interação social, por meio do comportamento de brincar;
- Dos padrões quantitativos e qualitativos de *grooming*.

## 1.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), de aproximadamente 90 dias de vida, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (43 x 23 x 16 cm), mantidos em uma sala com a temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade entre 55-65% e com o ciclo de doze horas de claro e escuro (luz acesa às 07h00). Os animais tiveram água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da FMVZ/USP, sob protocolo de número 7561140119.

### 1.3.2. Procedimentos

#### 1.3.2.1 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

As ratas foram colocadas nas gaiolas dos machos ao final da tarde (17h00 – 18h00), na proporção de duas ratas por macho, e lá mantidas durante o período noturno. Para a detecção da prenhez foi realizado o lavado vaginal no começo da manhã (7h00 – 8h00) do dia seguinte. Considerou-se como dia de gestação (DG) 0 quando foi constatada a presença de espermatozoides no lavado vaginal. A partir desse momento cada rata foi acondicionada individualmente em uma gaiola.

#### 1.3.2.2 Tratamento com VPA

O valproato de sódio (Depacon®) foi usado para reproduzir o modelo experimental de autismo. A dose de 400 mg/kg foi baseada em estudos que avaliaram os potenciais efeitos de dosagens moderadas de VPA (COHEN, et al., 2013; CUSMANO; MONG, 2014; WELLMANN; VARLINSKAYA; MOONEY, 2014), que reduziram a toxicidade e a reabsorção dos filhotes em ratas prenhes de doses mais elevadas (500 e 600 mg/kg) (FAVRE et al., 2013). O VPA foi administrado em

ratas fêmeas prenhes por via intraperitoneal no dia DG 12,5 e a solução salina (0,9% de NaCl estéril) foi administrada no grupo controle. A administração foi realizada no período da tarde, entre 14h00 e 16h00 (CEZAR et al., 2018).

O parto ocorreu de forma natural e o primeiro dia de vida dos filhotes foi definido como dia de vida pós-natal (DPN) 1. Durante o DPN 1 nenhuma manipulação foi realizada, uma vez que se trata de período crítico de estresse para a mãe. Os filhotes permaneceram com as mães até o DPN 21, quando foi realizado o desmame. Os filhotes do sexo feminino foram separados, isolados e mantidos em gaiolas. Para os experimentos realizados no presente trabalho foram utilizados dois filhotes de cada ninhada para evitar os efeitos individuais maternos na ninhada (PEREIRA; BERNARDI; GERARDIN, 2006).

### 1.3.2.3 Vocalização ultrassônica

O teste de vocalização ultrassônica foi realizado de acordo com Kirsten et al. (2015). No DPN 11 os filhotes foram colocados em uma gaiola de polipropileno (30x20x12 cm) e levados para a sala de teste com a temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). A vocalização foi detectada utilizando um microfone ultrassônico modelo D940, Pettersson Elektronik AB®, Uppsala, Sweden, por um período de 5 minutos. Os parâmetros avaliados estão descritos no Quadro 1.1.

Quadro 1.1 - Parâmetros mensurados no teste de vocalização ultrassônica de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5

<b>Parâmetro</b>	<b>Unidade de medida</b>
Número total de eventos	Frequência
Duração total da vocalização	Tempo (segundos)
Duração média da vocalização	Tempo (segundos)
Duração máxima da vocalização	Tempo (segundos)
Duração total do silêncio	Tempo (segundos)
Duração média do silêncio	Tempo (segundos)
Duração máxima do silêncio	Tempo (segundos)

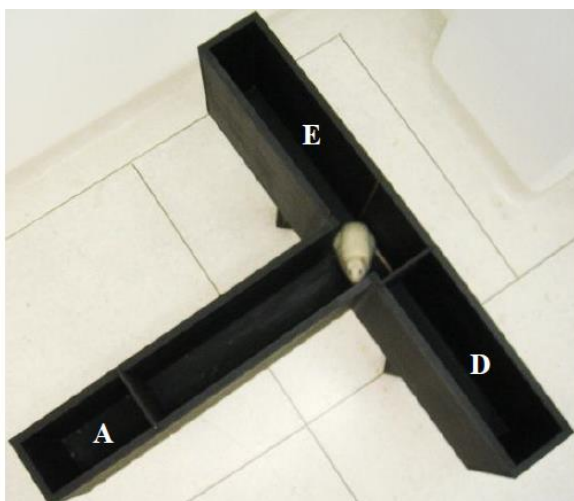
#### 1.3.2.4 Labirinto em T

O labirinto em T foi realizado no DPN 29 nos mesmos filhotes avaliados na vocalização ultrassônica. Esse teste foi realizado em um aparato feito de madeira com três braços em forma de T (90°), com 10 cm de largura e paredes com 30 cm de altura. Um dos braços contém um compartimento inicial de 20 cm de comprimento separado do resto do braço por uma parede removível – Figura 1.2.

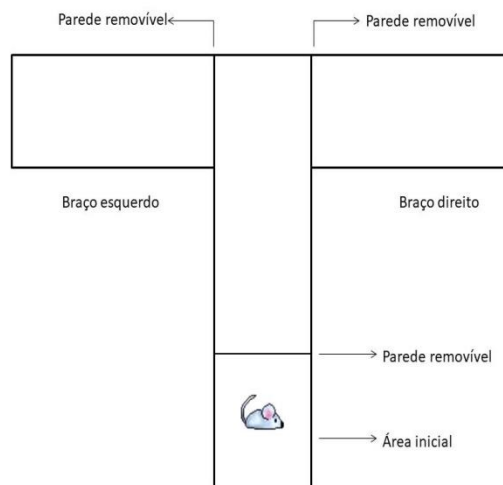
Os animais foram colocados na área de início durante 10s. Após esse período de tempo inicial a barreira foi elevada, e foi permitido à rata explorar o labirinto durante 30 segundos. Uma vez que o animal entrou em um dos braços de livre escolha, a barreira foi inserida para bloquear o animal naquele braço durante 30 segundos. Posteriormente, o animal foi reposicionado na área de início, iniciando outra sessão. Se a rata não entrasse em nenhum dos braços de livre escolha após 30 segundos, ela era colocada novamente na área de início e a sessão era reiniciada. Cinco sessões foram realizadas para cada rata. Para cada sessão, foi avaliada a primeira escolha do animal nos braços de livre escolha, isto é, se a rata entrou primeiro nos braços esquerdo ou direito. O parâmetro analisado foi a porcentagem (%) de alternância entre os braços esquerdo e direito, que foi sempre avaliada em relação ao braço visitado na sessão anterior. (KIRSTEN et al., 2015).

Este modelo baseia-se na propensão natural dos roedores a alternar entre os braços visitados em cada ensaio ao longo de uma série de ensaios sucessivos (DEACON; RAWLINS, 2006). Assim, uma maior porcentagem de alternância entre os braços foi considerada como comportamento normal dos animais, enquanto um menor número de alternâncias indicou inflexibilidade cognitiva e comportamento repetitivo. Para análise estatística, estes dados foram transformados em escores: 0 = sem alternâncias, visitando repetidamente o mesmo braço para todas as cinco sessões; 1 = uma alternância; 2 = duas alternâncias; 3 = três alternâncias; 4 = quatro alternâncias, isto é, sempre alternando entre os braços visitados para todas as cinco sessões.

Figura 1.2 – Labirinto em T



Fonte: Kirsten (2012) e Manes (2023).



### 1.3.2.5 Comportamento de brincar

O teste de comportamento de brincar foi baseado nos estudos de Kirsten (KIRSTEN et al., 2015). Após o desmame, no DPN 21, duas fêmeas de cada ninhada foram isoladas individualmente em gaiolas moradia. Esse isolamento social ocorre para aumentar a motivação em iniciar o comportamento de brincar (PANKSEPP; BEATTY, 1980). No DPN 30 esse comportamento foi avaliado; para isso, cada filhote isolado foi pareado com um filhote *naïve* que estava previamente agrupado, com diferença do peso de até 10 gramas entre a dupla pareada. O filhote agrupado *naïve* foi sempre inserido na gaiola-moradia do isolado, onde o experimento foi realizado. Cada sessão teve duração de 10 minutos. O comportamento dos animais foi filmado e, posteriormente, analisado. Os parâmetros avaliados estão descritos no Quadro 1.2.

Quadro 1.2 - Parâmetros utilizados na avaliação do comportamento de brincar de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5

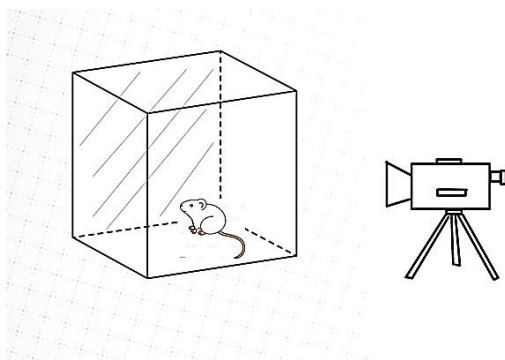
Parâmetro	Comportamento
<i>Pinnings</i>	Corresponde ao número de vezes que o filhote residente se deita de costas (com seu dorso encostado no chão) mostrando seu ventre para o intruso, que fica sobre ele, ocorrendo interação social entre ambos
<i>Darts</i>	Número de vezes que o filhote se movimenta rapidamente, correndo em direção, em paralelo, ou se distanciando do intruso
Passar sobre/sob	Corresponde ao número de vezes que o filhote passa por cima ou por baixo do intruso que pode estar parado ou em movimento
Perseguir	Corresponde ao total de tempo (em segundos) que o filhote gasta perseguindo o intruso, ou seja, se movimenta em direção ao outro, quando o animal perseguido também está se movimentando
Farejar	Corresponde ao total de tempo (em segundos) que o filhote gasta farejando o intruso
Levantar	Corresponde ao número de vezes que o filhote se sustentava apenas pelas patas traseiras, de maneira a explorar a gaiola, sem qualquer tipo de interação ou contato com o intruso

### 1.3.2.6 Comportamento de *grooming* espontâneo

A avaliação do comportamento de *grooming* foi realizado no DPN 60. No dia anterior ao teste, os animais foram colocados na caixa onde o teste ocorreu para que pudessem se aclimatar adequadamente – Figura 1.3. Essa caixa consiste em três paredes de vidro e uma parede espelhada, para que, mesmo quando o animal está de costas, é possível enxergar seus movimentos. No dia do experimento, os animais foram levados a sala de experimentos com uma hora de antecedência com a mesma finalidade (SMOLINSKY et al., 2009). Cada animal foi observado por 10 minutos, e as observações divididas entre os primeiros 5 minutos e o tempo total de teste. Os parâmetros avaliados estão descritos no Quadro 1.3.



Figura 1.3 – Ilustração do teste de comportamento de *grooming*



Fonte: Manes (2023).

Quadro 1.3 - Parâmetros utilizados na avaliação do comportamento de *grooming* de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5

Parâmetro	Comportamento
Tempo total de <i>grooming</i>	Corresponde ao tempo total que o animal realiza o comportamento de <i>grooming</i> , seja de cabeça ou de corpo
<i>Grooming</i> de cabeça	Corresponde ao número de vezes e a duração em segundos que o animal realiza o comportamento de <i>grooming</i> na cabeça
<i>Grooming</i> de corpo	Corresponde ao número de vezes e a duração em segundos que o animal realiza o comportamento de <i>grooming</i> no corpo
Levantar	Corresponde ao número de vezes que o animal se sustentava apenas pelas patas traseiras, de maneira a explorar a caixa
Frequência de <i>grooming</i>	Corresponde ao número de vezes que o animal realiza o comportamento de <i>grooming</i> seja de cabeça ou de corpo
Frequência da sequência completa	Corresponde ao número de vezes que o animal realiza a sequência completa de <i>grooming</i> , da fase 1 a 4, sem interrupções

### 1.3.2.7 Splash test

O *splash test* foi realizado no DPN 61. Para isso uma solução de sacarose 10% foi esguichada na região dorsal do animal e observou-se se o comportamento de *grooming* (SMOLINSKY et al., 2009). O aparato utilizado e os parâmetros observados foram os mesmos do item anterior.

### **1.3.3 Delineamento experimental**

#### 1.3.3.1 Experimento 1: Validação do modelo animal de autismo induzido por VPA pré-natal

Dezenove ratas foram divididas em dois grupos, o grupo controle (SAL) e o grupo experimental (VPA). Foi realizado o acasalamento das ratas fêmeas adultas e determinado como o DG 0 o dia que foram encontrados espermatozoides no lavado vaginal. Essas ratas foram mantidas isoladas em suas gaiolas moradia e no DG 12,5 foram tratadas com solução salina ou VPA. Após o nascimento da prole foram realizados experimentos comportamentais para a caracterização do fenótipo tipo autista. Os testes comportamentais foram realizados do DPN 11 ao DPN 30. Os experimentos realizados foram: avaliação da comunicação por meio da vocalização ultrassônica, avaliação do comportamento de brincar, avaliação no labirinto em T.

#### 1.3.3.2 Experimento 2: Avaliação do uso do *grooming* como ferramenta de medição de comportamento estereotipado causado pela exposição pré-natal ao VPA

As mesmas dezenove ratas foram mantidas divididas em dois grupos, o grupo controle (SAL) e o grupo experimental (VPA). No DPN 59 os animais foram levados para a caixa onde seria realizado o teste para ambientação. Os testes comportamentais foram realizados no DPN 60 e 61 para a avaliação do *grooming* espontâneo e induzido (*splash test*).

### **1.3.4 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 6® (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA). O teste utilizado foi o teste t e o teste de Mann-Whitney não pareado. O nível de significância para as análises foi considerado  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão ou mediana (mínimo e máximo).

## 1. 4 RESULTADOS

São apresentados, a seguir, os resultados obtidos.

### **1.4.1 Experimento 1: Validação do modelo animal de autismo induzido por VPA pré-natal**

#### 1.4.1.2 Vocalização ultrassônica

As Tabelas 1.1 e 1.2 e a Figura 1.4 mostram os resultados do teste de vocalização ultrassônica utilizado para a validação do modelo de indução do autismo em ratas fêmeas pela exposição pré-natal ao VPA. O teste t mostrou que as ratas do grupo VPA apresentaram diminuição no número de eventos ( $p < 0,0001$ ) e dos parâmetros de mensuração da vocalização [duração da vocalização ( $p < 0,0001$ ), duração média da vocalização ( $p = 0,0006$ ) e duração máxima da vocalização ( $p = 0,0027$ )], e aumento dos parâmetros de mensuração de silêncio [duração do silêncio ( $p < 0,0001$ ), duração média do silêncio ( $p = 0,0001$ ) e duração máxima do silêncio ( $p = 0,0003$ )] em comparação com as ratas do grupo controle.

Tabela 1.1 - Parâmetros mensurados no teste de vocalização ultrassônica por 5 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Número de eventos	490,9 ± 40,96	154,8 ± 34,87****
Duração da vocalização (s)	93,95 ± 12,35	16,84 ± 4,034****
Duração média da vocalização (s)	0,1783 ± 0,0182	0,09653 ± 0.009679****
Duração máxima da vocalização (s)	1,322 ± 0,2444	0,4148 ± 0,09865****
Duração do silêncio (s)	208,7 ± 12,70	284,2 ± 4,034****
Duração média do silêncio(s)	582,6 ± 114,5	3546 ± 737,6****
Duração máxima em silêncio (s)	7351 ± 1347	41686 ± 9212****

Fonte: (MANES, 2023).

\*\*\*\*p<0,0001, teste t.

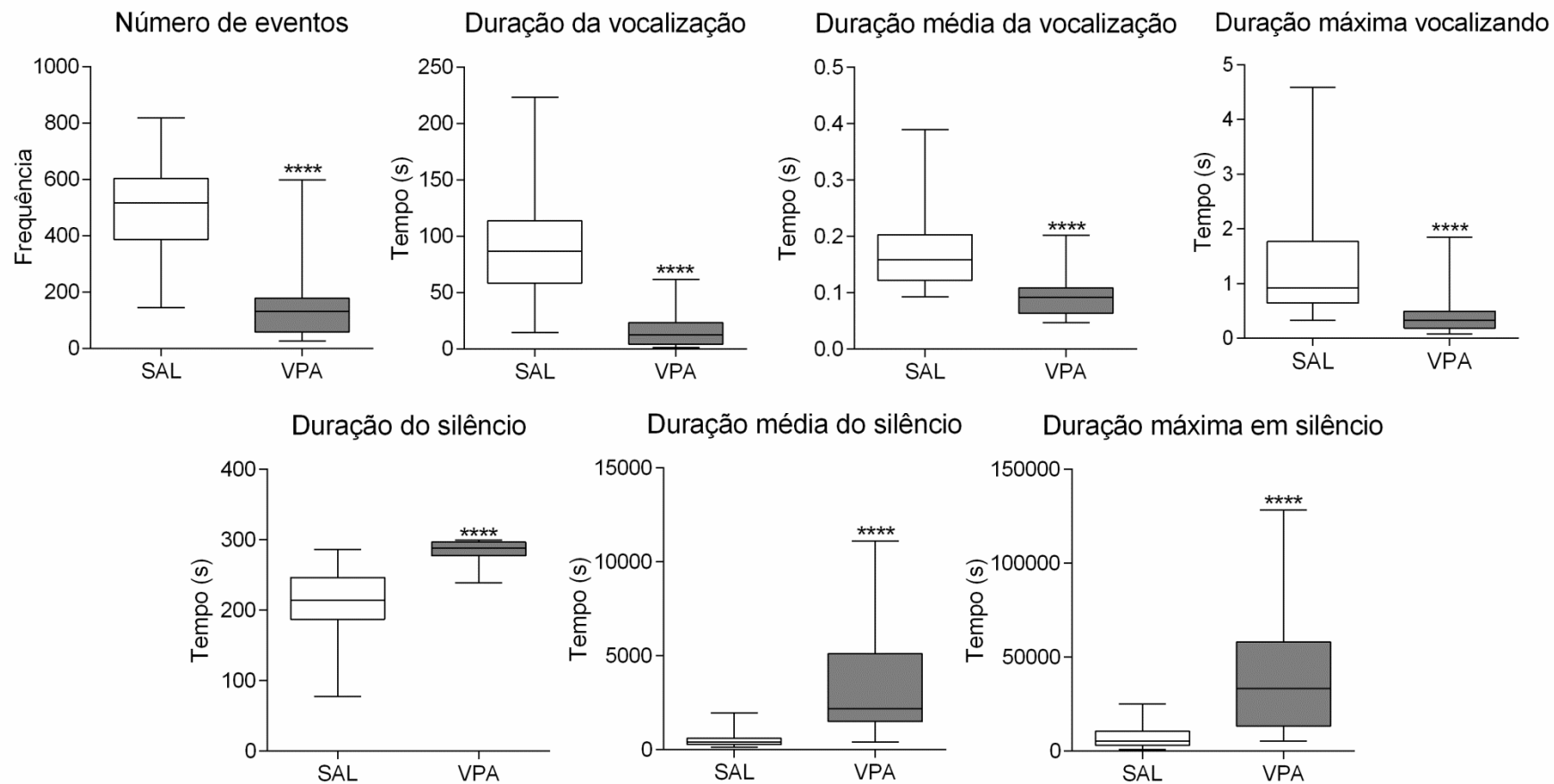
Tabela 1.2 - Parâmetros mensurados no teste de vocalização ultrassônica por 5 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Número de eventos	516 (145-819)	131 (26-598) ****
Duração da vocalização (s)	86,54 (14,41-223,4)	12,42 (1,272-61,80) ****
Duração média da vocalização (s)	0,159 (0,093-0,3900)	0,092 (0,047-2020) ****
Duração máxima da vocalização (s)	0,9175 (0,3260-4,585)	0,3260 (0,0830-1,851) ****
Duração do silêncio (s)	214,5 (77,63-286,6)	288,6 (239,2-299,7) ****
Duração média do silêncio(s)	409,5 (136-1952)	2198 (401-1110) ****
Duração máxima em silêncio (s)	5348 (760-25147)	33305 (5317-1284) ****

Fonte: (MANES, 2023).

\*\*\*\*p<0,0001, teste t.

Figura 1.4 - Parâmetros mensurados no teste de vocalização ultrassônica por 5 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA



Fonte: (MANES, 2023).  
 \*\*\*\*p<0,0001, teste t.

### 1.4.1.3 Labirinto em T

As Tabelas 1.3 e 1.4 e a Figura 1.5 mostram os resultados dos escores avaliados no teste do labirinto em T utilizado para a validação do modelo de indução do autismo em ratas fêmeas pela exposição pré-natal ao VPA. O teste de Mann-Whitney apontou que as ratas do grupo VPA tiveram escores mais baixos nesse teste do que as ratas do grupo controle ( $p=0,0060$ ).

Tabela 1.3 - Escores mensurados no teste do labirinto em T de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

	SAL	VPA
Número de eventos	2,7 ± 0,19	1,6 ± 0,25**

Fonte: (MANES, 2023).

\*\* $p<0,01$ , teste de Mann Whitney.

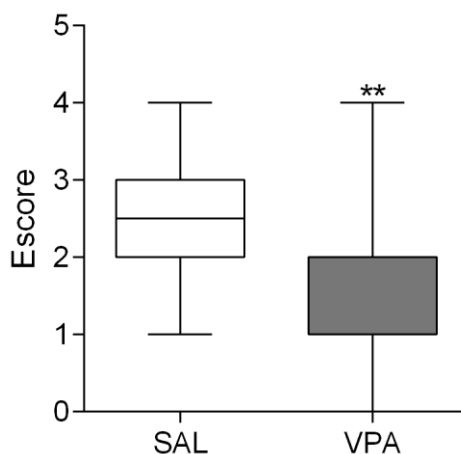
Tabela 1.4 - Escores mensurados no teste do labirinto em T de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

	SAL	VPA
Escore	3 (1-4)	1 (0-4)**

Fonte: (MANES, 2023).

\*\* $p<0,01$ , teste de Mann Whitney.

Figura 1.5 - Escores mensurados no labirinto em T de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA



Fonte: (MANES, 2023).

\*\*p<0,01, teste de Mann Whitney.

#### 1.4.1.4 Comportamento de brincar

As Tabelas 1.5 e 1.6 e a Figura 1.6 mostram os resultados dos parâmetros avaliados no teste de avaliação da socialização e do comportamento de brincar utilizado para a validação do modelo de indução do autismo em ratas fêmeas pela exposição pré-natal ao VPA. O teste t mostrou que as ratas do grupo VPA apresentaram diminuição nos parâmetros perseguir ( $p=0,0007$ ), *pinnings* ( $p=0,0260$ ), passar sobre/sob ( $p=0,0448$ ) e farejar ( $p<0,0001$ ) em comparação com as ratas do grupo controle. O teste t não mostrou diferenças nos demais parâmetros: *darts* ( $p=0,9263$ ) e levantar ( $p=0,5208$ ).

Tabela 1.5 - Parâmetros mensurados no teste de interação social de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Perseguir (s)	53,6 ± 2,2	43,1 ± 1,7***
Darts	3,9 ± 0,4	3,8 ± 0,5
Pinnings	19,1 ± 1,8	14,2 ± 1,5*
Passar sobre/sob	25,1 ± 1,9	20,3 ± 1,9
Farejar	61,1 ± 1,5	43,7 ± 2,5****
Levantar	40,7 ± 1,7	42,5 ± 2,2

Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, teste t.

Tabela 1.6 - Parâmetros mensurados no teste de interação social de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

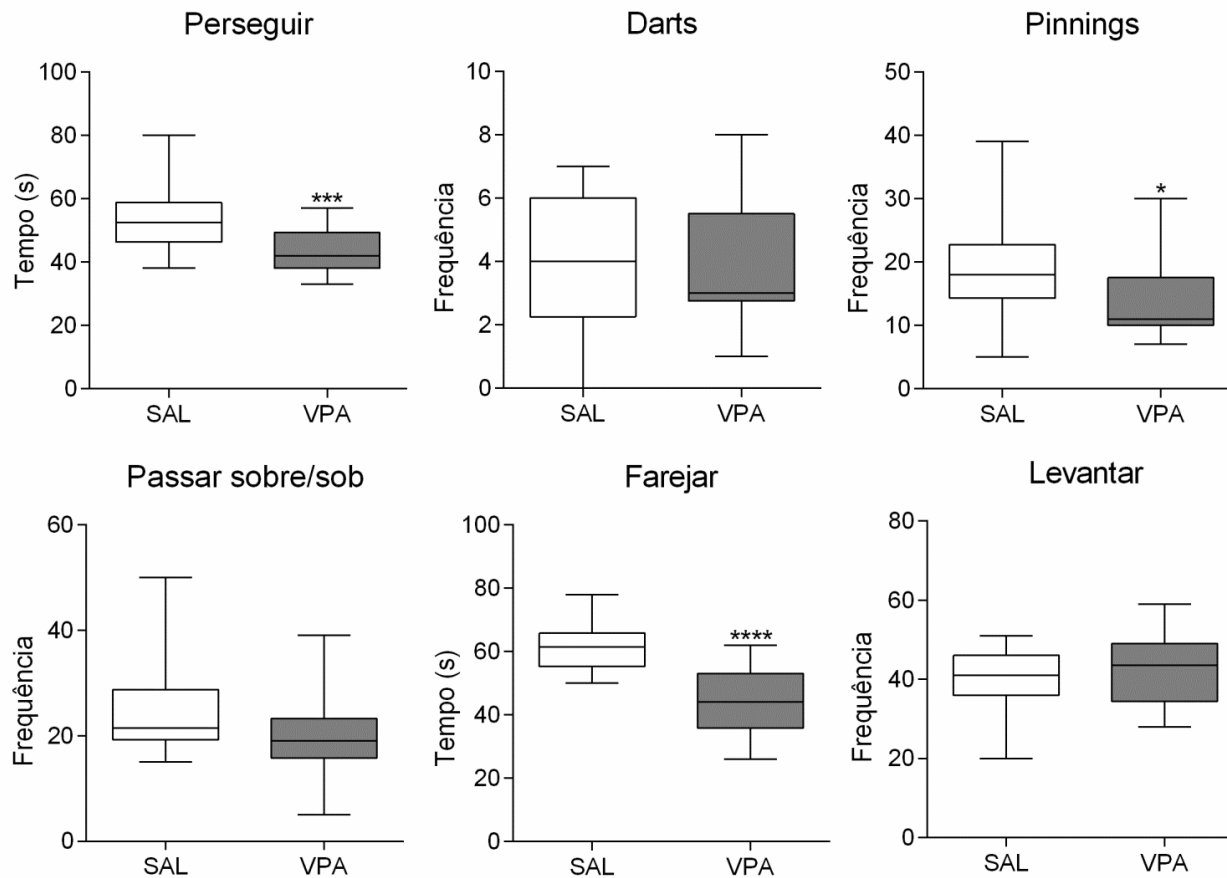
Parâmetros	SAL	VPA
Perseguir (s)	52,5 (38-80)	42 (33-57) ***
Darts	4 (0-7)	3 (1-8)
Pinnings	18 (5-39)	11 (7-30) *
Passar sobre/sob	21,5 (15-50)	19 (5-39)
Farejar	61,5 (50-78)	44 (26-62) ****
Levantar	41 (20-51)	43 (28-59)

Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, teste t.



Figura 1.6- Parâmetros mensurados no teste de comportamento de brincar de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA



Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, teste t.

## 1.4.2 Experimento 2: Avaliação do uso do *grooming* como ferramenta de medição de comportamento estereotipado causado pela exposição pré-natal ao VPA em ratas fêmeas

### 1.4.2.1 Comportamento de *grooming* espontâneo

As Tabelas 1.7 e 1.8 e a Figura 1.7 mostram os resultados dos parâmetros avaliados no teste de *grooming* espontâneo de ratas fêmeas expostas VPA no período pré-natal, em 5 minutos de observação. O teste t mostrou que as ratas do grupo VPA apresentaram diminuição com relação à frequência da sequência completa de *grooming* ( $p=0,0435$ ), porém não mostrou diferenças em nenhum dos outros parâmetros avaliados: [tempo total de *grooming* ( $p=0,3866$ ), tempo de *grooming* de cabeça ( $p=0,3514$ ), tempo de *grooming* de corpo ( $p=0,5742$ ), frequência de *grooming* de cabeça ( $p=0,6923$ ), frequência de *grooming* de corpo ( $p=0,2897$ ), levantar ( $p=0,1498$ ), frequência total de *grooming* ( $p=0,4803$ )].

Tabela 1.7 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de *grooming* espontâneo por 5 minutos. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Tempo total de <i>grooming</i> (s)	14,9 ± 2,6	11,6 ± 2,5
Tempo de <i>grooming</i> de cabeça (s)	10,5 ± 1,6	8,1 ± 1,8
Tempo de <i>grooming</i> de corpo (s)	4,4 ± 1,2	3,5 ± 1
Levantar	44,3 ± 2,4	38,6 ± 3
Frequência total de <i>grooming</i>	0,75 ± 0,2	0,2 ± 0,1
Frequência de <i>grooming</i> de cabeça	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,5
Frequência de <i>grooming</i> de corpo	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,2
Frequência da sequência completa de <i>grooming</i>	0,75 ± 0,2	0,2 ± 0,1*

Fonte: (MANES, 2023).

\* $p<0,05$ , teste t.

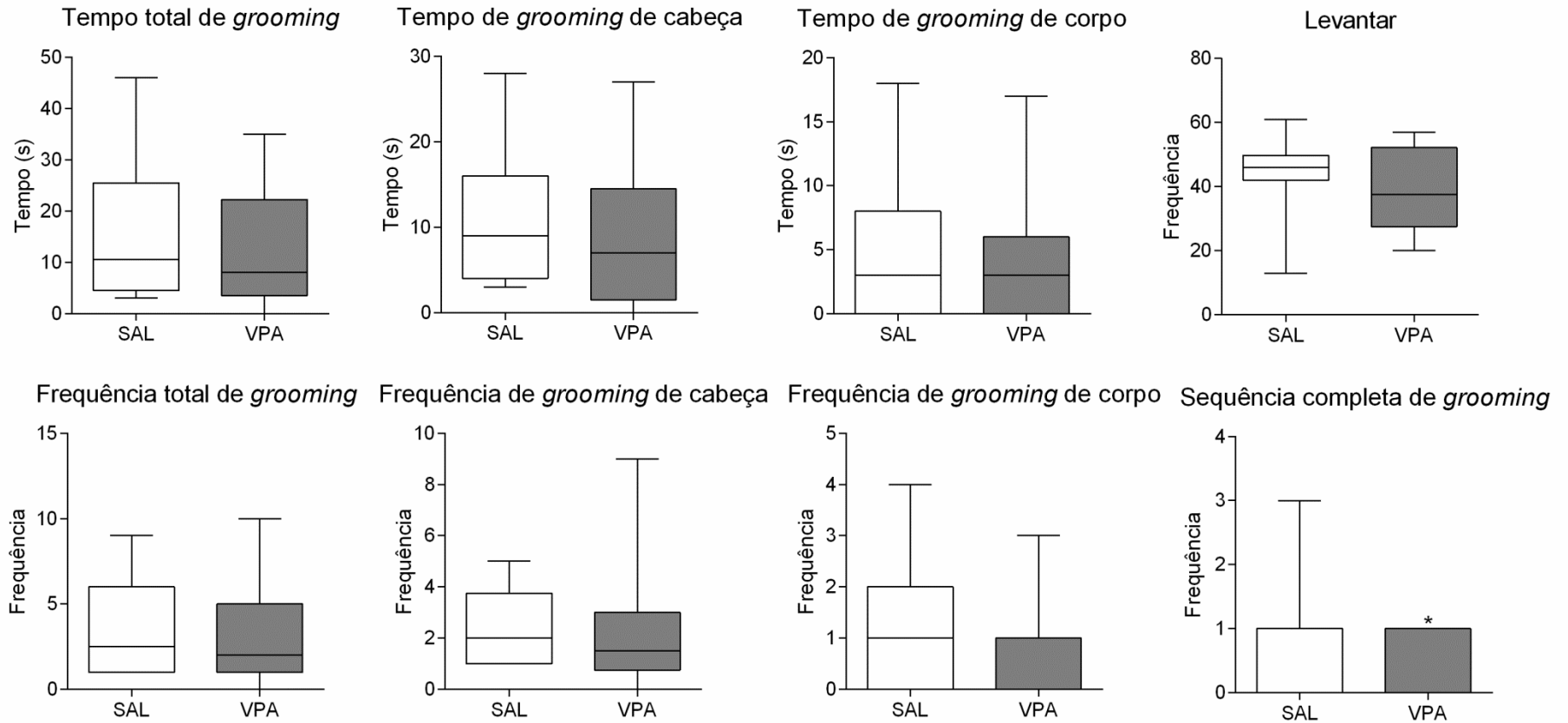
Tabela 1.8 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de *grooming* espontâneo por 5 minutos. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Tempo total de <i>grooming</i> (s)	10,5 (3-46)	8 (0-35)
Tempo de <i>grooming</i> de cabeça (s)	9 (3-28)	7 (0-27)
Tempo de <i>grooming</i> de corpo (s)	3 (0-18)	3 (0-17)
Levantar	46 (13-61)	37,5 (20-57)
Frequência total de <i>grooming</i>	2,5 (1-9)	2 (0-10)
Frequência de <i>grooming</i> de cabeça	2 (1-5)	1,5 (0-9)
Frequência de <i>grooming</i> de corpo	1 (0-4)	1 (0-3)
Frequência da sequência completa de <i>grooming</i>	1 (0-3)	0 (0-1)*

Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, teste t.

Figura 1.7 - Parâmetros mensurados na avaliação do *grooming* espontâneo por 5 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA



Fonte: (MANES, 2023).

\* $p < 0,05$ , teste t.

As Tabelas 1.9 e 1.10 a Figura 1.8 mostram os resultados da avaliação de *grooming* espontâneo de ratas fêmeas expostas VPA no período pré-natal, em 10 minutos de observação. O teste t mostrou que as ratas do grupo VPA apresentaram diminuição em todos os parâmetros analisados [tempo total de *grooming* ( $p < 0,0001$ ), tempo de *grooming* de cabeça ( $p < 0,0001$ ), tempo de *grooming* de corpo ( $p = 0,0002$ ), frequência de *grooming* de cabeça ( $p < 0,0001$ ), frequência de *grooming* de corpo ( $p < 0,0001$ ), levantar ( $p < 0,0001$ ), frequência total de *grooming* ( $p < 0,0001$ ) e frequência da sequência completa de *grooming* ( $p = 0,0307$ )] em comparação com as ratas do grupo controle.

Tabela 1.9 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de *grooming* espontâneo por 10 minutos. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Tempo total de <i>grooming</i> (s)	48,6 ± 6,3	11,6 ± 2,5****
Tempo de <i>grooming</i> de cabeça (s)	28,5 ± 3,2	8 ± 1,8****
Tempo de <i>grooming</i> de corpo (s)	20 ± 3,6	3,5 ± 1****
Levantar	69 ± 4,3	38 ± 3****
Frequência total de <i>grooming</i>	12 ± 1,5	3 ± 0,6****
Frequência de <i>grooming</i> de cabeça	7 ± 0,8	2 ± 0,5****
Frequência de <i>grooming</i> de corpo	5 ± 0,7	0,8 ± 0,2****
Frequência da sequência completa de <i>grooming</i>	2 ± 0,3	1 ± 0,2*

Fonte: (MANES, 2023).

\* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , teste t.

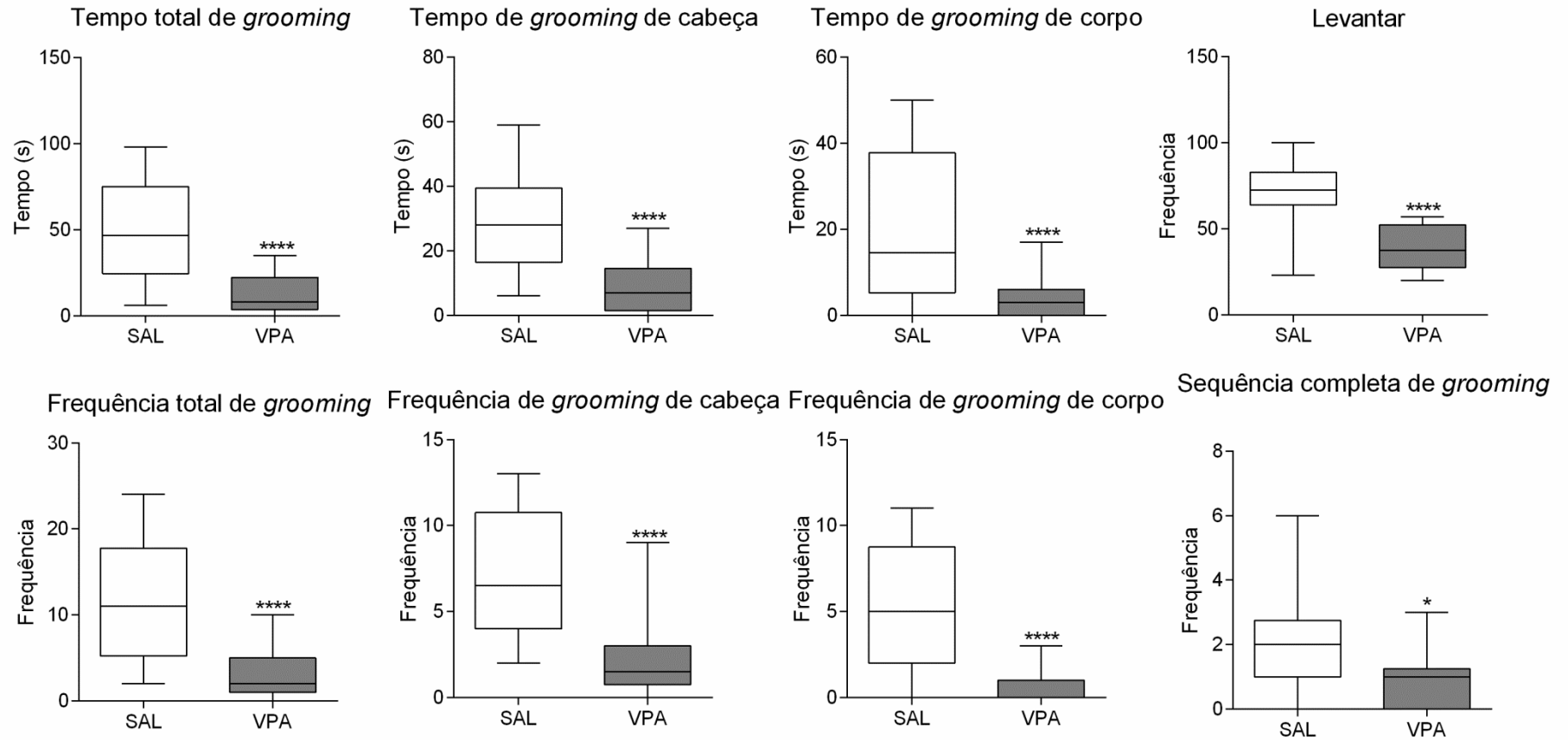
Tabela 1.10 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de *grooming* espontâneo por 10 minutos. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Tempo total de <i>grooming</i> (s)	46,5 (6-98)	8 (0-35)****
Tempo de <i>grooming</i> de cabeça (s)	28 (6-59)	7 (0-27)****
Tempo de <i>grooming</i> de corpo (s)	14,5 (0-50)	3 (0-17)****
Levantar	72,5 (23-100)	37,5 (20-57) ****
Frequência total de <i>grooming</i>	11 (2-24)	2(0-10)****
Frequência de <i>grooming</i> de cabeça	6,5 (2-13)	1,5 (0-9) ****
Frequência de <i>grooming</i> de corpo	5 (0-11)	1 (0-3)****
Frequência da sequência completa de <i>grooming</i>	2 (0-6)	1 (0-3)*

Fonte: (MANES, 2023).

\* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , teste t.

Figura 1.8 - Parâmetros mensurados na avaliação do *grooming* espontâneo por 10 minutos de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA



Fonte: (MANES, 2023).  
 \*p<0,05, \*\*\*\*p<0,0001, teste t.

### 1.4.2.2 Splash test

As Tabelas 1.11 e 1.12 e a Figura 1.9 mostram os resultados da avaliação do comportamento de *grooming* induzido pelo *splash test* de ratas expostas VPA no período pré-natal. O teste t mostrou não mostrou diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados: [tempo total de *grooming* ( $p=0,2979$ ), tempo de *grooming* de cabeça ( $p=0,3901$ ), tempo de *grooming* de corpo ( $p=0,3202$ ), frequência de *grooming* de cabeça ( $p=0,1219$ ), frequência de *grooming* de corpo ( $p=0,1423$ ), levantar ( $p=0,9460$ ), frequência total de *grooming* ( $p=0,1435$ ) e frequência da sequência completa de *grooming* ( $p=0,0661$ )].

Tabela 1.11 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de *grooming* no *splash test*. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Tempo total de <i>grooming</i> (s)	76,9 ± 5,7	65,7 ± 9,3
Tempo de <i>grooming</i> de cabeça (s)	25,6 ± 1,7	22,8 ± 2,8
Tempo de <i>grooming</i> de corpo (s)	51,3 ± 4,5	42,8 ± 7,2
Levantar	33,3 ± 2,2	33,1 ± 2,5
Frequência total de <i>grooming</i>	17,7 ± 1,2	14,5 ± 1,8
Frequência de <i>grooming</i> de cabeça	9,7 ± 0,6	7,9 ± 0,9
Frequência de <i>grooming</i> de corpo	8,3 ± 0,7	6,5 ± 0,9
Frequência da sequência completa de <i>grooming</i>	5,2 ± 0,6	3,5 ± 0,5

Fonte: (MANES, 2023).  
 $p>0,05$ , teste t.

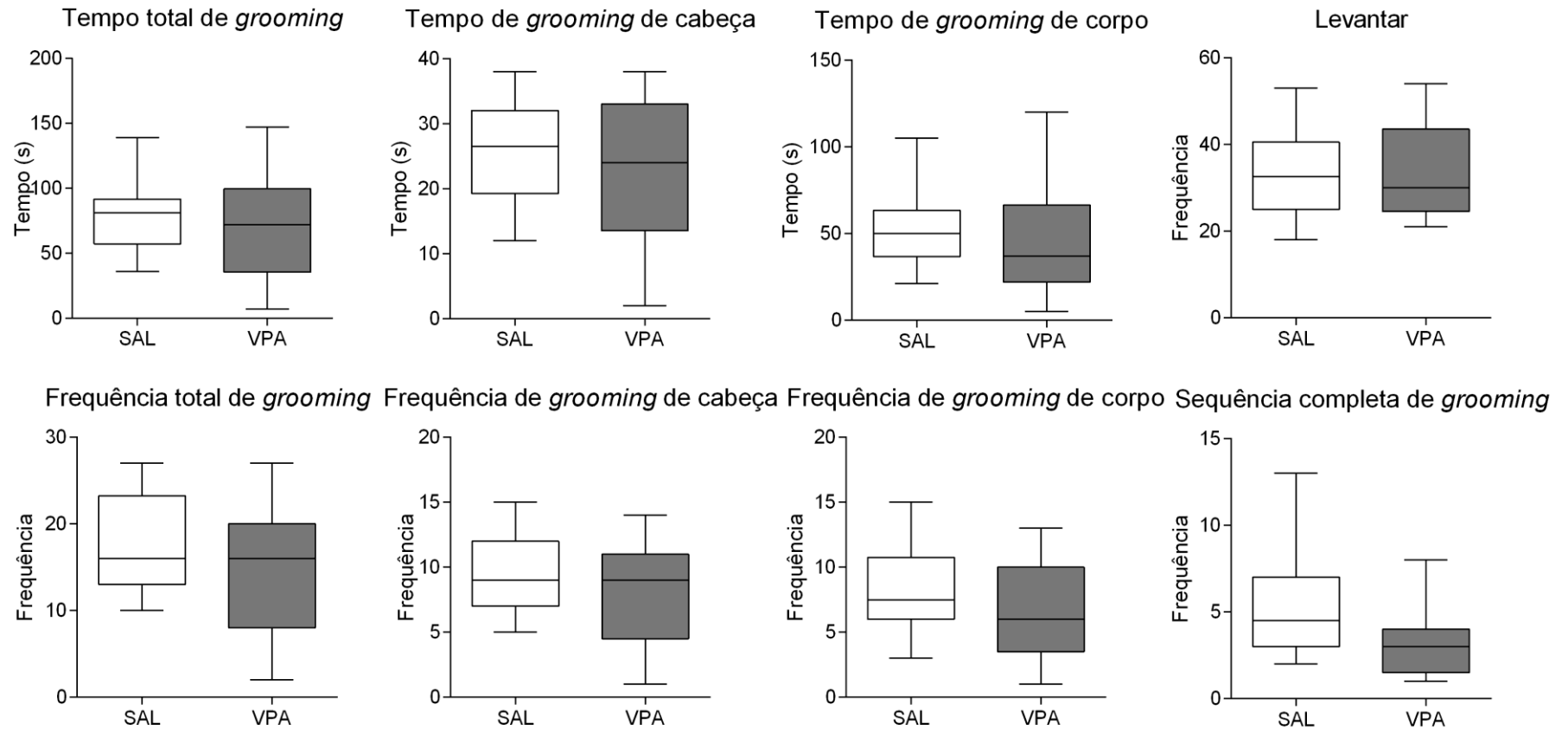


Tabela 1.12 - Parâmetros mensurados na avaliação do comportamento de *grooming* no *splash test*. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 20 salinas/ N= 18 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Tempo total de <i>grooming</i> (s)	81 (36-139)	72 (7-147)
Tempo de <i>grooming</i> de cabeça (s)	26,5 (12-38)	24 (2-38)
Tempo de <i>grooming</i> de corpo (s)	50 (21-105)	37 (5-120)
Levantar	32,5 (18-53)	30 (21-54)
Frequência total de <i>grooming</i>	16 (10-27)	16 (2-27)
Frequência de <i>grooming</i> de cabeça	9 (5-15)	8 (1-14)
Frequência de <i>grooming</i> de corpo	7,5 (3-15)	6 (1-13)
Frequência da sequência completa de <i>grooming</i>	4,5 (2-13)	3 (1-8)

Fonte: (MANES, 2023).  
 $p > 0,05$ , teste t.

Figura 1.9 - Parâmetros mensurados na avaliação do *grooming* induzido no *splash test* por 5 minutos de expostas de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 20 salinas/ N= 18 VPA



Fonte: (MANES, 2023).  
 $p > 0,05$ , teste t.

## 1.5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que a exposição pré-natal ao VPA (400mg/kg no GD 12,5) foi capaz de prejudicar a comunicação, de induzir comportamento repetitivo/restrito e inflexibilidade cognitiva, de prejudicar a socialização na prole feminina, além de causar diminuição no comportamento de *grooming*. Existem diversos modelos experimentais propostos para o estudo das bases neurofisiológicas do autismo, como os modelos baseados em lesões límbicas, os modelos baseados em animais geneticamente modificados e os modelos baseados na exposição pré-natal a agentes tóxicos (KLAUCK; POUSTKA, 2006).

O modelo animal de exposição pré-natal ao VPA, diferentemente de outros agentes tóxicos, como a talidomida, é capaz de mimetizar os aspectos comportamentais e histopatológicos característicos no quadro humano de autismo, bem como apresentar alterações anatômicas *post-mortem* semelhantes às encontradas em pacientes com autismo (RODIER et al., 1997; SCHNEIDER, ŁABUZ; PRZEWŁOCKI, 2001). Assim, o VPA é um modelo fidedigno, validado na literatura, usado para ajudar na compreensão da psicopatologia do espectro autista.

O uso do VPA como medicamento, quando utilizado no primeiro trimestre de gestação, levou ao nascimento de inúmeros bebês com problemas cognitivos e de má formação (ARDINGER, 1988). Em um estudo preliminar de Christianson e colaboradores (1994), foi observado que crianças de mães que utilizaram o VPA durante esse período, também apresentaram o diagnóstico do espectro autista; a partir disso, o uso desse fármaco foi suspenso durante a gestação.

Em 2005, Schneider e Przewłocki realizaram uma bateria de testes comportamentais para avaliar o desenvolvimento pós-natal de animais expostos ao VPA no período pré-natal e concluíram que esses animais, em relação ao grupo controle, apresentaram alterações no desenvolvimento pós-natal, seguido de menor sensibilidade à dor e de atividade exploratória, além de apresentarem comportamento repetitivo e hiperatividade locomotora. Os animais apresentaram também maior aversão social medida pela diminuição no tempo de interação com outros animais. O conjunto desses resultados demonstra que esse modelo apresenta características comportamentais que se assemelham aos observados em humanos (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI 2005).

Nesse trabalho foram utilizados os testes de vocalização ultrassônica, labirinto em T e comportamento de brincar para validar o modelo de exposição pré-natal ao VPA na prole feminina de ratas. Esses testes comportamentais são amplamente utilizados na literatura com essa finalidade (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005; SCHNEIDER, TURCZAK, PRZEWŁOCKI, 2006; SCHNEIDER et al., 2008; KIRSTEN et al., 2010; CEZAR et al., 2018).

Com o intuito de avaliar possíveis anormalidades na comunicação foi realizado o teste de vocalização ultrassônica. Para isso foi utilizado um microfone ultrassônico ajustado na frequência de 40 kHz. Essa frequência foi escolhida, pois, quando isolados das mães, os filhotes de ratos emitem uma frequência de banda entre 30-50 kHz que são consideradas as solicitações de interações maternas (KIRSTEN, 2012). Esse teste foi realizado no DPN 11, uma vez que nesse dia, as emissões de chamados são independentes de qualquer variabilidade externa ou interna, como por exemplo, temperatura e fome (BRUNELLI et al., 1996; BRUNELLI et al., 1997; NEVES et al., 2013).

Nossos resultados mostraram que as proles femininas expostas ao VPA no período pré-natal solicitaram menos suas mães quando isoladas, sugerindo prejuízos relacionados à comunicação. Crawley (2007), sugere a vocalização ultrassônica como um dos testes utilizados para a caracterização de modelos animais de autismo, uma vez que a dificuldade de comunicação é um sintoma típico para o diagnóstico do TEA. Além disso, esse teste é válido para demonstrar a redução dos chamados dos filhotes, indicando déficits semelhantes aos que ocorrem em autistas (HARMON et al., 2008). Dessa forma, a diminuição na solicitação das mães pelos filhotes, pode ser interpretado como um prejuízo na comunicação, equivalente ao que ocorre no autismo.

O teste de alternância espontânea no labirinto em T foi utilizado para a avaliação do comportamento repetitivo/restritivo. Ele é utilizado em diversos estudos para avaliar possíveis prejuízos relacionados ao transtorno do espectro autista em modelos animais, pois leva em conta a resistência a mudanças, comportamentos repetitivos e inflexibilidade cognitiva tipicamente apresentada em indivíduos com esse espectro (KIRSTEN et al., 2010; DSM-V, 2013; CEZAR et al., 2018).

O protocolo do teste T utilizado nesse trabalho foi adaptado dos estudos do grupo de Timofeeva et al (2008), que é baseado na propensão natural do rato em alternar a escolha do braço visitado em cada sessão, ao longo de sucessivas

sessões (DUDCHENKO, 2004; TIMOFEEVA et al, 2008). Nos resultados do presente trabalho, os animais tratados apresentaram insistência de visitação à mesma localização espacial e, conseqüentemente, menor alternância entre os braços do labirinto. No trabalho de Moy et al. (2008), o teste do labirinto em T, assim como o labirinto aquático de Morris, é utilizado para avaliar o comportamento repetitivo/restritivo. Padrões comportamentais persistentes, tais como obsessões e compulsões, são um forte indicativo de autismo, e compõe a avaliação comportamental do paciente. A resistência para a mudança pode ser análoga à inflexibilidade cognitiva característica do TEA. Assim, esses resultados indicam que a prole feminina exposta ao VPA no período pré-natal apresenta prejuízos em relação ao comportamento repetitivo/restrito.

O comportamento de brincar foi avaliado no DPN 30, pois é durante o período entre os 30-35 dias de vida que os ratos exibem esse comportamento com maior intensidade (PLETNIKOV et al., 1999). Esse comportamento é exacerbado quando o animal é isolado previamente (FILE; SETH, 2003) e por essa razão no DPN 21 esses animais foram isolados após o desmame; cada animal permaneceu em uma caixa moradia isolado, mas na mesma sala com outros animais. Nos resultados do presente trabalho o VPA pré-natal diminuiu a expressão dos comportamentos de perseguir, *pinnings* e farejar. O *pinning* é considerado a brincadeira social; já o perseguir e o farejar são considerados comportamentos de investigação social (PLETNIKOV et al., 1999). Esses resultados mostram que os filhotes expostos pré-natalmente ao VPA apresentaram prejuízos em relação à socialização e a investigação social.

Apesar de ratas fêmeas serem menos vulneráveis aos efeitos da exposição pré-natal ao VPA foi-se observado que o fenótipo encontrado na prole feminina de ratas expostas ao VPA pré-natal se assemelha aos sintomas encontrados em pacientes do sexo feminino diagnosticadas com o transtorno do espectro autista (FAVRE et al., 2013; MELANCIA et al., 2018). Deste modo, os resultados do presente trabalho mostram que o VPA foi capaz de prejudicar a comunicação, causou comportamento repetitivo/restrito e afetou a socialização e investigação social em relação ao grupo controle. Esses dados em conjunto sugerem fortemente que o nosso modelo foi capaz de induzir comportamentos do tipo autista em ratas fêmeas, da mesma forma que os trabalhos de Cohen et al. (2013), Cusmano e Mong

(2014); Wellmann; Varlinskaya, Mooney (2014) e Cezar et al. (2018) em ratos machos.

O comportamento de *grooming* em roedores pode ser considerado um comportamento estereotipado, com movimentos repetitivos, rítmicos, coordenados e padronizados em humanos, um sintoma comum que pode ocorrer no TEA ou TOC (WURZMAN et al., 2015). Esse comportamento é de extremo valor para a neurociência translacional e que pode ser utilizado como medida para a análise de comportamentos estereotipados, que são alguns dos sintomas mais típicos do autismo (KIRSTEN; BERNARDI, 2017; KALUEFF et al., 2016).

O *grooming* em animais é um comportamento inato que está envolvido na manutenção da higiene e outros processos fisiologicamente importantes, tais como termorregulação, comunicação social, redução de excitação (*dearousal*), remoção de ectoparasitas, redução de infecções, estimulação da cicatrização de feridas, termorregulação e a espalhar secreções pela pelagem (KALUEFF; LA PORTE; BERGNER, 2010; KALUEFF et al., 2016). É um dos comportamentos mais observados em roedores acordados; estima-se que muitos mamíferos terrestres podem passar entre 20% a 40% do dia se limpando (SPRUIJT; VAN HOOFF; GISPEN, 1992). O *grooming* também pode transmitir informações para o sexo oposto, manter ligações entre os pares, facilitar interações com os coespecíficos e até influenciar as ações de animais do mesmo sexo (KALUEFF; LA PORTE; BERGNER, 2010).

O *grooming* é um comportamento que possui uma organização padronizada e sequencial com progressão cefalocaudal extremamente característica (KALUEFF et al., 2016). Nos humanos, esse tipo de comportamento mostra alguma semelhança com o observado em outros animais, porém pode se tornar patológico, por exemplo, em certos distúrbios neuropsiquiátricos (KALUEFF et al., 2007; BERRIDGE; ALDRIDGE, 2000; SPRUIJT; GISPEN, 1984).

A avaliação do *grooming* em roedores é potencialmente útil para as pesquisas que envolvem neurociência translacional, uma vez que o comportamento de *grooming* anormal pode ser relacionado a distúrbios humanos nos quais a autolimpeza anormal é um sintoma, como Doença de Huntington, Transtorno Obsessivo Compulsivo, Síndrome de Tourette, tricotilomania e o TEA (KALUEFF et al., 2016).

O comportamento de *grooming* em ratos e camundongos apresenta alto nível de complexidade comportamental e organização que envolve uma série de movimentos individuais que formam sequências funcionais, incluindo comportamentos altamente estereotipados (KALUEFF et al., 2016). Nos primeiros dias pós-natais dos roedores já é possível observar esse comportamento presente, porém ainda de forma isolada com variações de simetria e amplitude; durante as semanas seguintes há um desenvolvimento que inclui movimentos simétricos com menor amplitude utilizando as duas patas e, finalmente amadurece na sequência típica da espécie (GOLANI; FENTRESS, 1985). Dessa forma, nos estágios iniciais do desenvolvimento, o *grooming* consiste apenas na limpeza facial, porém com o tempo, passa a incluir a limpeza de toda a cabeça, pescoço e tronco e, já na fase adulta é possível perceber movimentos de *grooming* facial mais flexíveis e menos estereotipados (GOLANI; FENTRESS, 1985).

A cadeia de preparação para o *grooming* é caracterizada por 4 fases previsíveis. A fase 1 consiste em 5-9 movimentos elípticos rápidos no nariz e vibrissas com duração de segundos. A fase 2 é caracterizada por pequenos movimentos assimétricos de amplitude crescente. A fase 3 consiste em movimentos bilaterais onde o animal leva em torno de 2-3 segundos para completar. As fases 1, 2 e 3 também podem ser referidas como *grooming* de cabeça. Já a fase 4 consiste em uma volta postural seguida de um período onde o animal lambe o próprio corpo (KALUEFF et al., 2007).

O comportamento estereotipado consiste em movimentos repetitivos sem finalidade aparente (CARLINI, 2011). Em roedores esse comportamento se apresenta por ações de morder, cheirar, lambe, ambulação constante e *grooming* (CARLINI, 2011; KALUEFF et al., 2016). Esse comportamento representa de 15-50% do comportamento dos roedores enquanto acordados, sendo desencadeado pela exposição a predadores, novidade, dor, natação ou comportamento sexual (SMOLINSKY et al., 2009).

A cadeia do *grooming* apresenta características semelhantes às de outros padrões de ação fixa, tais como comportamentos sexuais ou agressivos, que apresentam uma ordem altamente estereotipada e, uma vez iniciadas, prosseguem até a sua conclusão sem a necessidade de um *feedback* sensorial (KALUEFF et al., 2007). Em uma cadeia típica em roedores, geralmente ocorre uma série de 20 ou mais movimentos, e, quatro fases distintas e previsíveis que seguem a mesma

progressão cefalocaudal; a estrutura dessas cadeias é repetitiva e estável em termos de ordem e tempo, dessa forma, uma vez iniciada a primeira fase, todo o padrão sequencial segue de forma prenunciável através das demais fases (KALUEFF et al., 2007). Durante a avaliação do comportamento de *grooming*, uma sessão de 5 minutos é um período muito curto para avaliar de forma adequada, portanto uma sessão de 10 minutos foi utilizada (ESTANISLAU, 2012).

Existem diversas regiões específicas envolvidas na regulação do *grooming* de roedores; dentre elas podemos destacar os gânglios da base, especialmente o estriado, o neocórtex, o cerebelo, a amígdala, o hipotálamo e o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) (KALUEFF et al., 2016). Em relação aos gânglios da base, os circuitos que formam essa região cerebral, incluindo o estriado, substância nigra, nucleus accumbens e globo pálido, têm sido fortemente associados com o controle motor, incluindo o comportamento de *grooming* (KALUEFF et al., 2016).

Diversos estudos apontam o papel do cerebelo na regulação do *grooming*. Trabalho de Watson (1978) mostrou que estimulação elétrica é capaz de provocar o comportamento de *grooming*. Strazielle e Lalonde (1998), utilizando camundongos mutantes Lurcher (Lc) que possuem degeneração de células de Purkinje, uma das anormalidades neuroanatômicas observadas mais comuns em análises *post-mortem* de cérebros de indivíduos com TEA (FATEMI et al., 2012), mostraram redução em relação à duração do *grooming*, mas sem alterar a sua sequência. Berridge e Whishaw (1992) observaram que lesões feitas no neocórtex e no cerebelo foram capazes de causar déficits com relação ao tempo e anormalidades nos movimentos sem afetar a sequência da cadeia de movimentos.

O papel do cerebelo na propriocepção e no controle motor fino está bem estabelecido, mas estudos recentes implicam fortemente na sua função cognitiva de ordem superior, como a linguagem, processamento cognitivo e regulação afetiva (DONOVAN; BASSON, 2017). A base neurológica pela qual a disfunção cerebelar pode dar origem ao TEA ainda é fortemente debatida (BAUMAN; KEMPER, 2005; BASSON; WINGATE, 2013).

O *grooming* também é modulado pela amígdala (KALUEFF et al., 2016), uma estrutura cerebral do sistema límbico envolvida na regulação de respostas como medo, desejo e ansiedade (HONG; KIM; ANDERSON, 2014). Em pacientes com TEA são relatados possíveis prejuízos nessa estrutura que, dentro do espectro, se manifesta como prejuízos na interação social e reconhecimento facial, entre outros



(DAVIS; WHALEN, 2001). Em um estudo realizado por Schumann e Amaral (2006), a análise *post-mortem* de cérebros de adultos do sexo masculino diagnosticados com TEA não encontrou diferenças no volume total ou no tamanho das células da amígdala, porém uma redução no número de neurônios foi encontrada nas amígdalas de indivíduos autistas em comparação com controles pareados por idade (SCHUMANN; AMARAL 2006). Em estudos posteriores foram relatadas mudanças no tamanho relativo da amígdala, especialmente em crianças. Análises realizadas por ressonância magnética em crianças com o diagnóstico confirmado, entre as idades de 1 a 5 anos de idade, mostrou que o tamanho da amígdala em relação ao volume total do cérebro estava aumentado (MUNSON et al., 2006; MOSCONI et al., 2009; SCHUMANN et al., 2009).

O mecanismo de ação do VPA ainda não é totalmente conhecido, porém já se sabe que esse fármaco é capaz de provocar aumento nos níveis cerebrais de GABA (ORNOY, 2009; DUFOUR-RAINFRAY et al., 2010). A base farmacológica da ação antiepiléptica do VPA e seu mecanismo tem sido relacionada a vários efeitos que contribuem para a redução da excitabilidade neuronal, entre eles o aumento da atividade GABAérgica (MONTI; POLAZZI; CONTESTABILE; 2009).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central e possui papel importante na regulação do comportamento de *grooming* (NIN et al., 2012; BARROS et al., 1994; DUNN et al., 1981). Drogas que aumentam os níveis cerebrais de GABA, em doses baixas (que não provocam sedação), provocam redução do comportamento de *grooming*, já drogas que inibem o GABA são capazes de aumentar o *grooming* em roedores e também podem reverter os efeitos que são produzidos por agentes intensificadores de GABA (KALUEFF et al., 2016).

O GABA é sintetizado em neurônios pré-sinápticos e armazenado em vesículas sinápticas, durante a ativação neuronal é liberado das vesículas e pode atuar nos seus receptores nos neurônios pré-sinápticos ou se difundir no meio extracelular e ativar os receptores extra-sinápticos dos neurônios pós-sinápticos (JIN et al., 2003). O GABA interage com duas classes principais de receptores, os receptores ionotrópicos e os metabotrópicos e, dentro destas classes de receptores, existem três diferentes tipos de receptores específicos do GABA identificados no cérebro: A, B e C (BORMANN, 2000). O GABA e os receptores GABA<sub>A</sub> estão envolvidos na regulação de diversos mecanismos cerebrais e patológicos, como o

sono, memória, emoções, epilepsia e vários outros comportamentos (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005) incluindo o *grooming* (BARROS et al., 1992, 1994).

O padrão de *grooming* em roedores é sensível a drogas GABAérgicas: drogas que inibem a sinalização geralmente desorganizam o padrão, enquanto drogas que aumentam essa sinalização, tendem a normalizar a resposta (KALUEFF et al., 2016). Drogas ansiolíticas que aumentam a função GABAérgica (como o valproato) demonstram diminuir as atividades relacionadas ao *grooming* no campo aberto (BARROS et al., 1992; 1994). No teste do campo aberto, o diazepam foi capaz de inibir o comportamento de *grooming* em camundongos quando os animais estavam nos cantos e quinas, enquanto a doramectina, um antiparasitário pertencente à classe das avermectinas com propriedades ansiolíticas/anticonvulsivantes GABAérgicas, foi capaz de reduzir a duração e a frequência do comportamento de *grooming* em ratos (DE SOUZA SPINOSA; GERENUTTI; BERNARDI, 2000; KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Em contraste, diversas drogas ansiogênicas que são capazes de inibir a transmissão GABAérgica central, foram capazes de aumentar o comportamento de *grooming* (KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Dessa forma, sugere-se que a redução na expressão do comportamento de *grooming* observado nesse trabalho pode ser explicado pelo mecanismo de ação do VPA por ser um fármaco que provoca aumento das concentrações cerebrais de GABA.

## 1.6 CONCLUSÃO

Os presentes resultados mostraram que a exposição pré-natal ao VPA (400mg/k no DG 12,5) foi capaz de causar na prole feminina:

- Prejuízos na comunicação;
- Comportamentos repetitivos/estereotipados;
- Déficits de sociabilização;
- Diminuição no comportamento de *grooming*.

## REFERÊNCIAS

- ANTEZANA, L.; FACTOR, R. S.; CONDY, E. E.; STREGE, M. V.; SCARPA, A.; RICHEY, J. A. Gender differences in restricted and repetitive behaviors and interests in youth with autism. **Autism Research**, v. 12, n. 2, p. 274-283, 2019.
- ARDINGER, H. H.; ATKIN, J. F.; BLACKSTON, R. D.; ELSAS, L. J.; CLARREN, S. K.; LIVINGSTONE, S.; FLANNERY, D. B.; PELLOCK, J. M.; HARROD, M. J.; LAMMER, E. J.; MAJEWSKI, F.; SCHINZEL, A.; TORIELLO, H. V.; HANSON, J. W. Verification of the fetal valproate syndrome phenotype. **American journal of medical genetics**, v. 29, n. 1, p. 171-185, 1988.
- BARROS, H. M.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, M. A.; TANNHAUSER, M. Effect of sodium valproate on the open-field behavior of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 3, p. 281-287, 1992.
- BARROS, H. M. T.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, M. A. L.; TANNHAUSER, M. A. L. L. The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. **Pharmacology & toxicology**, v. 74, n. 4-5, p. 339-344, 1994.
- BASSON, M. A.; WINGATE, R. J. Congenital hypoplasia of the cerebellum: developmental causes and behavioral consequences. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 7, p. 29, 2013.
- BAUMAN, M. L.; KEMPER, T. L. (Ed.). **The neurobiology of autism**. JHU Press, 2005.
- BECKER, M. M.; WAGNER, M. B.; BOSA, C. A.; SCHMIDT, C.; LONGO, D.; PAPAPIO, C.; RIESGO, R. S. Translation and validation of Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) for autism diagnosis in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 70, n. 3, p. 185-190, 2012.
- BERRIDGE, K. C.; ALDRIDGE, J. W. Super-stereotypy II: Enhancement of a complex movement sequence by intraventricular dopamine D1 agonists. **Synapse**, v. 37, n. 3, p. 205-215, 2000.
- BERRIDGE, K. C.; WHISHAW, I. Q. Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a grooming sequence. **Experimental brain research**, v. 90, n. 2, p. 275-290, 1992.
- BLUMBERG, S. J.; BRAMLETT, M. D.; KOGAN, M. D.; SCHIEVE, L. A.; JONES, J. R.; LU, M. C. **Changes in prevalence of parent-reported autism spectrum disorder in school-aged US children: 2007 to 2011-2012**. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, 2013.
- BORMANN, J. The 'ABC' of GABA receptors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, n. 1, p. 16-19, 2000.
- BRUNELLI, S. A.; KEATING, C. C.; HAMILTON, N. A.; HOFER, M. A. Development of ultrasonic vocalization responses in genetically heterogeneous National Institute of

Health (N:NIH) rats. I. Influence of age, testing experience, and associated factors. **Developmental Psychobiology**, v. 29, n. 6, p. 507-516, 1996.

BRUNELLI, S. A.; VINOCUR, D. D.; SOO-HOO, D.; HOFER, M. A. Five generations of selective breeding for ultrasonic vocalization (USV) responses in N:NIH strain rats. **Developmental Psychobiology**, v. 31, n. 4, p. 255-265, 1997.

CAGLAYAN, A. O. Genetic causes of syndromic and non-syndromic autism. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 52, n. 2, p. 130-138, 2010.

CASANOVA, M. F.; VAN KOOTEN, I. A.; SWITALA, A. E.; VAN ENGELAND H.; HEINSEN, H.; STEINBUSCH, H. W. M. HOF, P.R.; TRIPPE, J.; STONE, J.; SCHMITZ, C. Minicolumnar abnormalities in autism. **Acta neuropathologica**, v. 112, n. 3, p. 287-303, 2006.

CEZAR, L. C., KIRSTEN, T. B., DA FONSECA, C. C. N., DE LIMA, A. P. N., BERNARDI, M. M., FELICIO, L. F. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 84, p. 173-180, 2018.

CHIU, C. T.; WANG, Z.; HUNSBERGER, J. G.; CHUANG, D. M. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. **Pharmacological reviews**, v. 65, n. 1, p. 105-142, 2013.

CHRISTIANSON, A. L.; CHESLER, N.; KROMBERG, J. G. Fetal valproate syndrome: clinical and neuro-developmental features in two sibling pairs. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 36, n. 4, p. 361–369, 1994.

COHEN, O.S., VARLINSKAYA, E.I., WILSON, C.A., GLATT, S.J., MOONEY, S.M. Acute prenatal exposure to a moderate dose of valproic acid increases social behavior and alters gene expression in rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 740-750, 2013.

COURCHESNE, E.; MOUTON, P. R.; CALHOUN, M. E.; SEMENDEFERI, K.; AHRENS-BARBEAU, C.; HALLET, M. J.; BARNES, C. C.; PIERCE, K. Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. **Jama**, v. 306, n. 18, p. 2001-2010, 2011.

COURCHESNE, E.; PIERCE, K.; SCHUMANN, C. M.; REDCAY, E.; BUCKWALTER; J. A., KENNEDY; D. P.; MORGAN, J. Mapping early brain development in autism. **Neuron**, v. 56, n. 2, p. 399-413, 2007.

CRAWLEY, J. N. Mouse behavioral assays relevant to the symptoms of autism. **Brain Pathology**, v. 17, n. 4, p. 448–459, 2007.

CUSMANO, D. M.; MONG, J. A. In utero exposure to valproic acid changes sleep in juvenile rats: a model for sleep disturbances in autism. **Sleep**, v. 37, n. 9, p. 1489-1499, 2014.

DALENS, B.; RAYNAUD, E. J.; GAULME, Teratogenicity of valproic acid. **Journal of Pediatrics**, v. 97, p. 332-333, 1980.

DAVIS, M.; WHALEN, P. J. The amygdala: vigilance and emotion. **Molecular psychiatry**, v. 6, n. 1, p. 13-34, 2001.

DEACON, R.M.J.; RAWLINS, J.N.P. T-maze alternation in the rodent. **Nat Protoc** 1:7–12, 2006.

DEFRANCESCO, L. Autism on the rise. **The Scientist**, v. 15, n. 10, p. 16-16, 2001.

DE SOUZA SPINOSA, H.; GERENUTTI, M.; BERNARDI, M. M. Anxiolytic and anticonvulsant properties of doramectin in rats: behavioral and neurochemistic evaluations. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 359-366, 2000.

DSM-V. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. In: (Ed.) **Diagnostic and statistical manual of mental disorders**. 5. ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2014.

DONOVAN, A.P.A.; BASSON, M. Albert. The neuroanatomy of autism—a developmental perspective. **Journal of anatomy**, v. 230, n. 1, p. 4-15, 2017.

DUDCHENKO, P. A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 7, p. 699–709, 2004.

DUFOUR-RAINFRAY, D.; VOUREC'H, P.; LE GUIQUET, A. M.; GARREAU, L.; TERNANT, D.; BODARD, S.; JAUMAIN, E.; GULHAN, Z.; BELZUNG, C.; ANDRES, C. R.; CHALON, S.; GUILLOTEAU, D. Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: A model for autism. **Neuroscience Letters**, v. 470, n. 1, p. 55–59, 2010.

DUNN, A. J.; GUILD, A. L.; KRAMARCY, N. R.; WARE, M. D. Benzodiazepines decrease grooming in response to novelty but not ACTH or  $\beta$ -endorphin. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 15, n. 4, p. 605-608, 1981.

DWORZYNSKI, K.; RONALD, A.; BOLTON, P.; HAPPÉ, F. How different are girls and boys above and below the diagnostic threshold for autism spectrum disorders? **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 51, n. 8, p. 788-797, 2012.

ESTANISLAU, C.; VELOSO, A. W.; FILGUEIRAS, G. B.; MAIO, T. P.; DAL-CÓL, M. L.; CUNHA, D. C.; KLEIN, R.; CARMONA, L. F.; FERNÁNDEZ-TERUEL, A. Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and perseveration: Evidence for a self-grooming trait. **Physiology & behavior**, v. 209, p. 112585, 2019.

FARZIN, F., PERRY, H., HESSL, D., LOESCH, D., COHEN, J., BACALMAN, S., GANE, L., TASSONE, F., HAGERMAN, P., AND HAGERMAN, R. Autism spectrum disorders and attention-deficit/hyperactivity disorder in boys with the fragile X premutation. **Journal of developmental & behavioral pediatrics**, v. 27, n. 2, p. S137-S144, 2006.

FATEMI, S. H.; ALDINGER, K. A.; ASHWOOD, P.; BAUMAN, M. L.; BLAHA, C. D.; BLATT, G. J.; CHAUHAN, A.; CHAUHAN, V.; DAGER, S. T.; DICKSON, P. E.; ESTES, A. M.; GOLDOWITZ, D.; HECK, D. H.; KEMPER, T.L.; KING, B. H.; MARTIN, L. A.; MILLEN, K. J.; MITTLEMAN, G.; MOSCONI, M. W.; PERISCO, A. M.; SWEENEY, J. A.; WEBB, S. J.; WELSH, J. P. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. **The Cerebellum**, v. 11, n. 3, p. 777-807, 2012.

FAVRE, M. R., BARKAT, T. R., MENDOLA, D. L., KHAZEN, G., MARKRAM, H., MARKRAM, K. General developmental health in the VPA-rat model of autism. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, p. 88, 2013.

FILE, S. E.; SETH, P. A review of 25 years of the social interaction test. **European journal of pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 35-53, 2003.

FRAZIER, T. W.; YOUNGSTROM, E. A.; SPEER, L.; EMBACHER, R.; LAW, P.; CONSTANTINO, J.; FINDLING, R.L.; HARDAN, A.Y.; ENG, C. Validation of proposed DSM-5 criteria for autism spectrum disorder. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 28-40. e3, 2012.

FOMBONNE, E. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 66, Supplement, 10, p. 3-8, 2005.

FOMBONNE, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. **Pediatric research**, v. 65, n. 6, p. 591-598, 2009.

GOLANI, I.; FENTRESS, J. C. Early ontogeny of face grooming in mice. **Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology**, v. 18, n. 6, p. 529-544, 1985.

GOTTFRIED, C., BAMBINI-JUNIOR, V., BARONIO, D., ZANATTA, G., SILVESTRIN, R. B., VACCARO, T., RIESGO, R. Valproic acid in autism spectrum disorder: from an environmental risk factor to a reliable animal model. In: **Recent Advances in Autism Spectrum Disorders-Volume I**. IntechOpen, 2013.

HAPPÉ, F. G.; MANSOUR, H.; BARRETT, P.; BROWN, T.; ABBOTT, P.; CHARLTON, R. A. Demographic and cognitive profile of individuals seeking a diagnosis of autism spectrum disorder in adulthood. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 46, n. 11, p. 3469-3480, 2016.

HARMON, K. M.; CROMWELL, H. C.; BURGDORF, J.; MOSKAL, J. R.; BRUDZYNSKI, S. M.; KROES, R. A.; PANKSEPP, J. Rats selectively bred for low levels of 50 kHz ultrasonic vocalizations exhibit alterations in early social motivation. **Developmental Psychobiology**, v. 50, n. 4, p. 322-331, 2008.

HATTIER, M. A.; MATSON, J. L.; TURECK, K.; HOROVITZ, M. The effects of gender and age on repetitive and/or restricted behaviors and interests in adults with autism spectrum disorders and intellectual disability. **Research in Developmental Disabilities**, v. 32, n. 6, p. 2346-2351, 2011.

HEAD, A. M.; MCGILLIVRAY, J. A.; STOKES, M. A. Gender differences in emotionality and sociability in children with autism spectrum disorders. **Molecular autism**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2014.

HILLER, R. M.; YOUNG, R. L.; WEBER, N. Sex differences in autism spectrum disorder based on DSM-5 criteria: evidence from clinician and teacher reporting. **Journal of abnormal child psychology**, v. 42, n. 8, p. 1381-1393, 2014.

HOLLIDAY WILLEY, L. Pretending to be normal: Living with Asperger's syndrome. **London: Jessica Kingsley**, 1999.

- HONG, W.; KIM, D-W.; ANDERSON, D J. Antagonistic control of social versus repetitive self-grooming behaviors by separable amygdala neuronal subsets. **Cell**, v. 158, n. 6, p. 1348-1361, 2014.
- HULL, L.; PETRIDES, K. V.; ALLISON, C.; SMITH, P.; BARON-COHEN, S.; LAI, M. C.; MANDY, W. "Putting on my best normal": Social camouflaging in adults with autism spectrum conditions. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 47, n. 8, p. 2519-2534, 2017
- HULL, L.; PETRIDES, K. V.; MANDY, W. The female autism phenotype and camouflaging: A narrative review. **Review Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 7, n. 4, p. 306-317, 2020.
- JIN, H.; WU, H.; OSTERHAUS, G.; WEI, J.; DAVIS, K.; SHA, D.; FLOOR, E.; HSU, C.C.; KOPKE, R. D.; WU, J.Y. Demonstration of functional coupling between  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 4293-4298, 2003.
- KALUEFF, A. V.; ALDRIDGE, J. W.; LAPORTE, J. L.; MURPHY, D. L.; TUOHIMAA, P. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. **Nature protocols**, v. 2, n. 10, p. 2538, 2007.
- KALUEFF, A. V.; LA PORTE, J. L.; BERGNER, C. L. (Ed.). **Neurobiology of grooming behavior**. Cambridge University Press, 2010.
- KALUEFF, A. V., STEWART, A. M., SONG, C., BERRIDGE, K. C., GRAYBIEL, A. M., FENTRESS, J. C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. Nature reviews. **Neuroscience**, v.17, p. 45-59, 2016.
- KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. **European journal of pharmacology**, v. 508, n. 1-3, p. 147-153, 2005.
- KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **The Nervous Child**, v. 2, p. 217–250, 1943.
- KANNER, L. Early infantile autism. **The Journal of Pediatrics**, p. 211-217, 1944.
- KIRKOVSKI, M.; ENTICOTT, P. G.; FITZGERALD, P. B. A review of the role of female gender in autism spectrum disorders. **Journal of autism and developmental disorders**, v. 43, n. 11, p. 2584-2603, 2013.
- KIRSTEN, T. B. **Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais**. 2012. 195 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- KIRSTEN, T. B.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: repetitive self-grooming and stereotypies. **Behavioural brain research**, v. 331, p. 25-29, 2017.



KIRSTEN, T.B.; GALVÃO, M.C.; REIS-SILVA, T.M.; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.; BERNARDI, M.M. Zinc prevents sickness behavior induced by lipopolysaccharides after a stress challenge in rats. **PLoS one**, v. 10, n. 3, 2015.

KIRSTEN, T. B.; TARICANO, M.; MAIORKA, P. C.; PALERMO-NETO, J.; BERNARDI, M. M. Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 4, p. 240–251, 2010.

KLAUCK, S. M.; POUSTKA, A. Animal models of autism. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 3, n. 4, p. 313-318, 2006.

KOPP, S.; GILLBERG, C. Girls with social deficits and learning problems: Autism, atypical Asperger syndrome or a variant of these conditions. **European Child & Adolescent Psychiatry**, v. 1, n. 2, p. 89-99, 1992.

KOPP, S.; GILLBERG, C. The Autism Spectrum Screening Questionnaire (ASSQ)-Revised Extended Version (ASSQ-REV): an instrument for better capturing the autism phenotype in girls? A preliminary study involving 191 clinical cases and community controls. **Research in developmental disabilities**, v. 32, n. 6, p. 2875-2888, 2011.

KUHN, R. Eugen Bleuler's concepts of psychopathology. **History of Psychiatry**, v. 15, n. 3, p. 361-366, 2004.

LAI, M. C.; LOMBARDO, M. V.; PASCO, G.; RUIGROK, A. N.; WHEELWRIGHT, S. J.; SADEK, S. A.; CHAKRABARTI, B.; BARON-COHEN, S. A behavioral comparison of male and female adults with high functioning autism spectrum conditions. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e20835, 2011.

LAI, M. C.; LOMBARDO, M. V.; AUYEUNG, B.; CHAKRABARTI, B.; BARON-COHEN, S. Sex/gender differences and autism: setting the scene for future research. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 11-24, 2015.

LANDRIGAN, P. J. What causes autism? Exploring the environmental contribution. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 22, n. 2, p. 219-225, 2010.

LIVINGSTON, L. A.; HAPPÉ, F. Conceptualising compensation in neurodevelopmental disorders: Reflections from autism spectrum disorder. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 80, p. 729-742, 2017.

LOOMES, R.; HULL, L.; MANDY, W. P. L. What is the male-to-female ratio in autism spectrum disorder? A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 56, n. 6, p. 466-474, 2017.

MANDY, W.; CHILVERS, R.; COMORBIDITY, H. Á. Sex Differences in Autism Spectrum Disorder : Evidence from a Large Sample of Children and Adolescents. **Journal of Autism and Developmental Disorders** v. 42, n. 7, p. 1304–1313, 2012.

MELANCIA, FRANCESCA; SCHIAVI, SARA; SERVADIO, MICHELA; CARTOCCI, VERONICA; CAMPOLONGO, PATRIZIA; PALMERY, MAURA; PALLOTTINI, VALENTINA; TREZZA, VIVIANA. Sex-specific autistic endophenotypes induced by

- prenatal exposure to valproic acid involve anandamide signalling. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 18, p. 3699-3712, 2018.
- MELLOW, A. M.; SOLANO-LOPEZ, C.; DAVIS, S. Sodium valproate in the treatment of behavioral disturbance in dementia. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, v. 6, n. 4, p. 205-209, 1993.
- MILES, J. H. Autism spectrum disorders—a genetics review. **Genetics in Medicine**, v. 13, n. 4, p. 278-294, 2011.
- MONTI, B.; POLAZZI, E.; CONTESTABILE, A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. **Current Molecular Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 95–109, 2009.
- MOSCONI, M. W.; CODY-HAZLETT, H.; POE, M. D.; GERIG, G.; GIMPEL-SMITH, R.; PIVEN, J. Longitudinal study of amygdala volume and joint attention in 2-to 4-year-old children with autism. **Archives of general psychiatry**, v. 66, n. 5, p. 509-516, 2009.
- MOY, S. S.; NADLER, J. J.; YOUNG, N. B.; NONNEMAN, R. J.; SEGALL, S. K.; ANDRADE, G. M.; CRAWLEY, J. N.; MAGNUSON, T. R. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. **Behavioural Brain Research**, v. 191, n. 1, p. 118-129, 2008.
- MUHLE, R.; TRENTACOSTE, S. V.; RAPIN, I. The genetics of autism. **Pediatrics**, v. 113, n. 5, p. e472-486, 2004.
- MUNSON, J.; DAWSON, G.; ABBOTT, R.; FAJA, S.; WEBB, S. J.; FRIEDMAN, S. D.; SHAW, D.; ARTRU, A.; DAGER, S. R. Amygdalar volume and behavioral development in autism. **Archives of general psychiatry**, v. 63, n. 6, p. 686-693, 2006.
- MURPHY, C. M.; WILSON, C. E.; ROBERTSON, D. M.; ECKER, C.; DALY, E. M.; HAMMOND, N.; GALANOPOULOS, A.; DUD, I.; MURPHY, D. G.; MCALONAN, G. M. Autism spectrum disorder in adults: diagnosis, management, and health services development. **Neuropsychiatric disease and treatment**, 2016.
- NEVES, S. M. P.; ONG, F. M. P.; RODRIGUES, L. D.; SANTOS, R. A.; FONTES, R. S.; SANTANA, R. O. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP / São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.**
- NIN, M. S., COUTO-PEREIRA, N. S., SOUZA, M. F., AZEREDO, L. A., FERRI, M. K., DALPRÁ, W. L., DALPRÁ, W. L.; GOMEZ, R.; BARROS, H. M. Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. **European journal of pharmacology**, v. 684, n. 1-3, p. 95-101, 2012.
- ORNOY, A. Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 1, p. 1–10, 2009.
- PANKSEPP, J.; BEATTY, W. W. Social deprivation and play in rats. **Behavioral and neural biology**, v. 30, n. 2, p. 197–206, 1980.

PEREIRA, O. C. M.; BERNARDI, M. M.; GERARDIN, D. C. C. Could neonatal testosterone replacement prevent alterations induced by prenatal stress in male rats? **Life sciences**, v. 78, n. 24, p. 2767-2771, 2006.

PLETNIKOV, M. V.; RUBIN, S. A.; VASUDEVAN, K.; MORAN, T. H.; CARBONE, K. M. 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, n. 1–2, p. 43–50, 1999.

RATAJCZAK, H. V. Theoretical aspects of autism: Causes—A review. **Journal of immunotoxicology**, v. 8, n. 1, p. 68-79, 2011.

RICKETTS, E. J.; WU, M. S.; LEMAN, T. Y.; PIACENTINI, J. A Review of Tics Presenting Subsequent to Traumatic Brain Injury. **Current Developmental Disorders Reports**, v. 6, n. 3, p. 145-158, 2019.

RIESGO, R.; GOTTFRIED, C.; BECKER, M.. Clinical approach in autism: Management and treatment. In: **Recent Advances in Autism Spectrum Disorders- Volume I**. IntechOpen, 2013.

ROBINSON, E. B.; LICHTENSTEIN, P.; ANCKARSÄTER, H.; HAPPÉ, F.; RONALD, A. Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 13, p. 5258-5262, 2013.

RODIER, P. M.; BRYSON, S. E.; WELCH, J. P. Minor malformations and physical measurements in autism: data from Nova Scotia. **Teratology**, v. 55, n. 5, p. 319–325, 1997.

RODIER, P. M. Converging evidence for brain stem injury in autism. **Development and Psychopathology**, v. 14, n. 3, p. 537–557, 2002.

RUSSELL, G.; STEER, C.; GOLDING, J. Social and demographic factors that influence the diagnosis of autistic spectrum disorders. **Social psychiatry and psychiatric epidemiology**, v. 46, n. 12, p. 1283-1293, 2011.

SANDIN, S.; LICHTENSTEIN, P.; KUJA-HALKOLA, R.; LARSSON, H., HULTMAN; C. M.; REICHENBERG, A. The familial risk of autism. **Jama**, v. 311, n. 17, p. 1770-1777, 2014.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 1, p.80–89, 2005.

SCHNEIDER, T.; ROMAN, A.; BASTA-KAIM, A.; KUBERA, M.; BUDZISZEWSKA, B.; SCHNEIDER, K.; PRZEWŁOCKI, R. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 6, p. 728–740, 2008.

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, n. 1, p. 36–46, 2006.

SCHULTZ, R. T. Developmental deficits in social perception in autism: the role of the amygdala and fusiform face area. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, n. 2-3, p. 125-141, 2005.

SCHUMANN, C. M.; AMARAL, D. G. Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 29, p. 7674-7679, 2006.

SCHUMANN, C. M.; BARNES, C. C.; LORD, C.; COURCHESNE, E. Amygdala enlargement in toddlers with autism related to severity of social and communication impairments. **Biological psychiatry**, v. 66, n. 10, p. 942-949, 2009.

SILVA, M.; MULICK, J. Diagnosticando o transtorno autista: aspectos fundamentais e considerações práticas. **Psicologia Ciência e Profissão**, v. 29, n. 1, p. 116–131, 2009.

SKUSE, D. H.; MANDY, W.; STEER, C.; MILLER, L. L.; GOODMAN, R.; LAWRENCE, K.; EMOND, A.; GOLDING, J. Social communication competence and functional adaptation in a general population of children: preliminary evidence for sex-by-verbal IQ differential risk. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 48, n. 2, p. 128-137, 2009.

SMOLINSKY, A. N.; BERGNER, C. L.; LAPORTE, J. L.; KALUEFF, A. V. Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. In: **Mood and anxiety related phenotypes in mice**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 21-36, 2009.

SOUSA, J. A. B. M. **Caracterização comportamental e distribuição de neurônios inibitórios em um modelo animal de autismo induzido por ácido valpróico**. 2013. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

SPRUIJT, B. M.; GISPEN, W. H. Behavioral sequences as an easily quantifiable parameter in experimental studies. **Physiology & behavior**, v. 32, n. 5, p. 707-710, 1984.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J.A.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiological reviews**, v. 72, n. 3, p. 825-852, 1992.

STRAZIELLE, C.; LALONDE, R. Grooming in Lurcher mutant mice. **Physiology & behavior**, v. 64, n. 1, p. 57-61, 1998.

TAHERI, A.; PERRY, A. Exploring the proposed DSM-5 criteria in a clinical sample. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 42, n. 9, p. 1810–7, set. 2012.

TIMOFEEVA, O. A.; ROEGGE, C. S.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A.; LEVIN, E. D. Persistent cognitive alterations in rats after early postnatal exposure to low doses of the organophosphate pesticide, diazinon. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 30, n. 1, p. 38-45, 2008.

VAN ACKER, R.; LONCOLA, J. A.; VAN ACKER, E. Y. Rett syndrome: A pervasive developmental disorder. **Handbook of autism and pervasive developmental disorders**, v. 1, p. 126-164, 2005.

WATSON, P. J. Behavior maintained by electrical stimulation of the rat cerebellum. **Physiology & Behavior**, v. 21, n. 5, p. 749-755, 1978.

WELLMANN, K. A.; VARLINSKAYA, E. I.; MOONEY, S. M. D-Cycloserine ameliorates social alterations that result from prenatal exposure to valproic acid. **Brain research bulletin**, v. 108, p. 1-9, 2014.

WILLIAMS, G.; KING, J.; CUNNINGHAM, M.; STEPHAN, M.; KERR, B.; HERSH, J. H. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 43, n. 3, p. 202–206, 2001.

WILLIAMS, S. C.P. Genetics: searching for answers. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. S4-S6, 2012.

WILSON, C. E.; MURPHY, C. M.; MCALONAN, G.; ROBERTSON, D. M.; SPAIN, D.; HAYWARD, H.; WOODHOUSE, E.; DEELEY, P.Q.; GILLAN, N.; OHLSEN, J.C.; ZINKSTOK, J.; STOENCHEVA, V.; FAULKNER, J.; YILDIRAN, H.; BELL, V.; HAMMOND, N.; CRAIG, M.C.; MURPHY, D. G. D. Does sex influence the diagnostic evaluation of autism spectrum disorder in adults?. **Autism**, v. 20, n. 7, p. 808-819, 2016.

WING, L. Sex ratios in early childhood autism and related conditions **Psychiatry research**, v. 5, n. 2, p. 129-137, 1981.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Autism spectrum disorders. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders#:~:text=Epidemiology,figures%20that%20are%20substantially%20higher>>. Acesso em: 16 jan. de 2023.

WURZMAN, R.; FORCELLI, P. A.; GRIFFEY, C. J.; KROMER, L. F. Repetitive grooming and sensorimotor abnormalities in an ephrin-A knockout model for Autism Spectrum Disorders. **Behavioural brain research**, v. 278, p. 115-128, 2015.

## CAPÍTULO II

### AVALIAÇÃO DOS CUIDADOS MATERNOS E NEUROQUÍMICA CEREBRAL DE RATAS TIPO-AUTISTAS INDUZIDAS POR ÁCIDO VALPRÓICO

## 2.1 INTRODUÇÃO

### 2.1.1 Comportamento materno em mamíferos

Nos mamíferos, o conjunto de cuidados que a mãe promove aos seus filhotes é denominado de comportamento materno (TEODOROV, 2008). A sobrevivência do recém-nascido baseia-se na mãe e em sua capacidade de fornecer água, calor, abrigo, alimento e proteção contra os predadores (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006). Em mamíferos placentários a sincronização do comportamento materno com o parto e a lactação assegura que a mãe responda as necessidades da prole no tempo apropriado (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006). O cuidado maternal é um comportamento espontâneo, complexo, instintivo e apresenta características espécie-específicas determinadas por modificações fisiológicas que ocorrem pouco antes ou logo após o parto (TEODOROV, 2008).

O comportamento materno surge geralmente no ou próximo ao parto e pode ser caracterizado como o comportamento de uma espécie em relação a um membro imaturo para garantir que o mesmo sobreviva até a maturidade (KOHL; AUTRY; DULAC, 2017). Na literatura, diversos estudos foram realizados sobre a evolução do comportamento materno em roedores, o primeiro, data de 1925, onde Sturman-Hulbe e Stone publicaram um trabalho intitulado “*Maternal behavior in the albino rat*”, no qual os autores estudaram os aspectos comportamentais envolvidos no período de 5 dias antes do nascimento e cuidados envolvidos da mãe para a prole (STURMAN-HUBLE; STONE, 1929).

Após o nascimento, a fêmea demonstra um rápido interesse no recém-nascido, a limpeza e o consumo dos fluídos amnióticos e da placenta são comportamentos difundidos entre a ordem dos mamíferos, exceto nos aquáticos (*Cetacea*) ou semiaquáticos (*Pinnipedia*) (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006). O início dessa resposta materna é sincronizado com o nascimento da prole; Wiesner e Sheard (1993) sugeriram que “alterações internas” ocorrem no final da gestação e levam ao surgimento do comportamento materno. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que o início da responsividade coincidia com o nascimento dos filhotes, pois foi possível verificar que as fêmeas eram capazes de cuidar de seus filhotes ou de adotar, já as fêmeas nulíparas prenhes (no período de 1 a 9 dias de

gestação) ou fêmeas virgens não apresentavam esse mesmo comportamento quando eram apresentadas a uma ninhada (WIESNER; SHEARD, 1993).

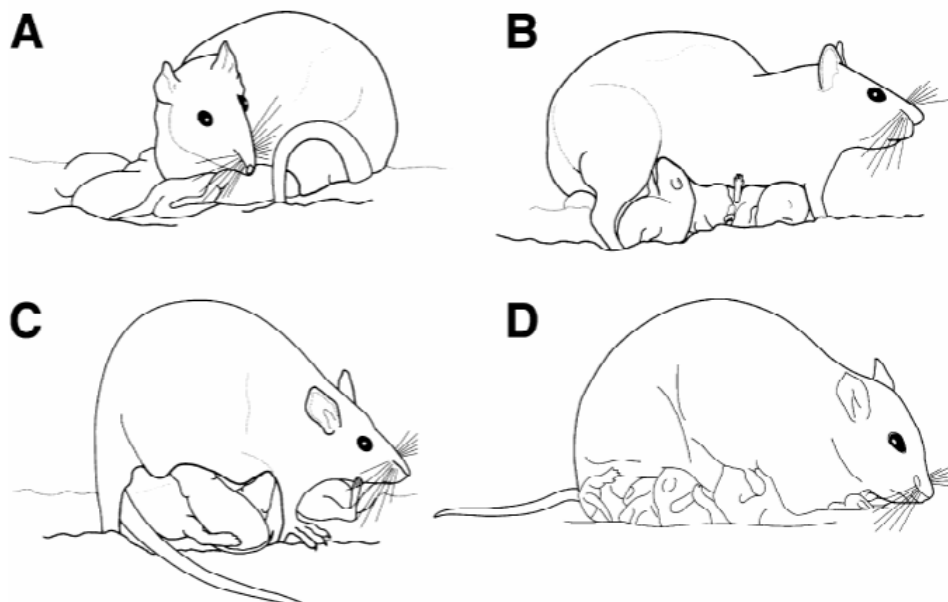
Em espécies altriciais, tais como os roedores, caninos e felinos, a mãe constrói um ninho, onde ela dá à luz a uma ninhada que ainda não está completamente desenvolvida e que apresenta limitações sensoriais e locomotoras. Ninhos geralmente são compostos de materiais naturais que são encontrados no ambiente, tais como folhas, galhos ou palha ou, como no caso dos coelhos (*Lagomorpha*), do pelo da própria mãe que ela começa a puxar antes do parto (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006). Na maioria das espécies altriciais a ninhada permanece amontoadada no ninho durante os primeiros 10 dias, por isso não há necessidade de que a mãe reconheça cada filhote da sua ninhada individualmente, enquanto eles se mantêm no ninho (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006).

Após esses primeiros dias, à medida que os filhotes crescem e se tornam mais independentes em relação à mãe, ela se torna menos responsiva em relação aos filhotes e os cuidados maternos decrescem de forma gradativa (CAMARGO, 2014). A estimulação por parte da mãe, como as lambidas anogenitais e o manuseio, tem a função de estimular a micção e a defecação (MENDES-LIMA, 2020). Esse comportamento é mais direcionado a machos, o que sugere que poderia contribuir para o desenvolvimento presente no comportamento sexual masculino fase adulta (MENDES-LIMA, 2020).

Alguns parâmetros típicos do comportamento materno em roedores incluem: busca, recuperação, agrupamento, *grooming* de filhotes e postura de amamentação (Figura 2.1) (TEODOROV, 2008).



Figura 2.1 – Parâmetros do comportamento maternal em ratas. Agrupamento de filhotes (A), preparo da postura para amamentação (B), “*crouching*” ou cifose fisiológica (C) e comportamento maternal total (D)



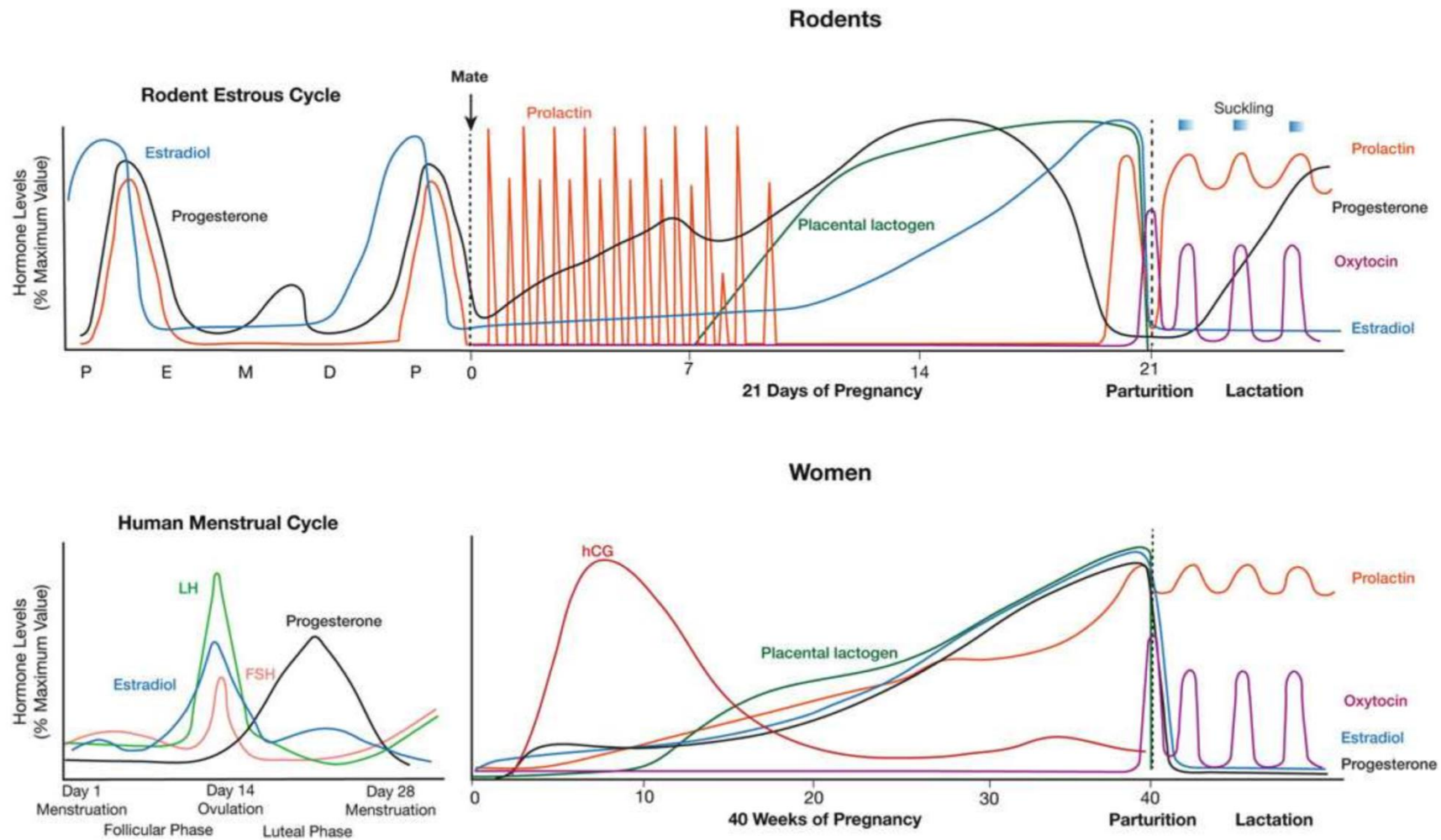
Fonte: Numan (1994).

Conforme os filhotes vão se tornando mais independentes a responsividade da mãe diminui e o desmame ocorre de forma natural. Comumente, em roedores, a avaliação do comportamento materno é realizada na primeira semana após o parto, pois durante esse período a prole é exclusivamente dependente dos cuidados maternos (TEODOROV et al., 2005). Em ratas, os cuidados maternos podem ser divididos em conjuntos: diretos e indiretos (NUMAN, 1994; LENZ; SENGELAUB, 2010). Os cuidados diretos são caracterizados como aqueles voltados aos filhotes, como o agrupamento, ficar sobre os filhotes alimentando-os e aquecendo-os. Já os indiretos envolvem a construção do ninho e a agressividade voltada a intrusos para a proteção da prole (CAMARGO, 2014).

### **2.1.2 Fisiologia do comportamento materno**

A fisiologia do comportamento materno em mamíferos é de caráter multifatorial, englobando fatores endócrinos, neuroquímicos e ambientais, que se iniciam durante a gestação e permanecem durante todo o período de lactação (TEODOROV et al., 2002; CAMARGO, et al. 2017; SMILEY et al., 2019). Dentre esses fatores, se destacam os neuroendócrinos, sendo as mudanças nos níveis de estrógeno, progesterona, prolactina e ocitocina as mais significativas, tanto em mulheres, quanto em roedores (CAMARGO et al., 2017), como mostra a Figura 2.2.

Figura 2.2 – Perfis hormonais de roedores e mulheres durante o ciclo estral/menstrual e os períodos de gestação e lactação



Fonte: SMILEY et al., 2019.

Durante a gestação, ocorrem mudanças cíclicas em relação aos esteroides ovarianos que preparam o trato reprodutivo para a concepção e induzem mudanças cerebrais que levam a expressão do comportamento materno. Essas mudanças desempenham um papel na alteração do foco da reprodução, desde a facilitação da fertilização e implantação do óvulo, para o suporte *in utero* para o crescimento do feto, a preparação para o parto e as demandas subsequentes da amamentação. A placenta também possui papel importante na modificação da liberação desses hormônios e, assim, na adaptação materna em relação a gestação e no estabelecimento do comportamento materno (SMILEY et al., 2019).

Ao final da gestação e no início da lactação ocorre nova mudança nos níveis hormonais, com queda abrupta da progesterona plasmática e aumento dos níveis séricos de prolactina e estrógeno, que são essenciais para que ocorra o início da expressão do comportamento materno concomitantemente ao nascimento dos filhotes (NUMAN, 1994). Nesse mesmo período ocorre a liberação de ocitocina, responsável por estimular as contrações uterinas durante o parto, modular o reflexo de ejeção de leite durante a lactação e viabilizar o comportamento materno (SUMMERLEE et al., 1998; PEDERSEN; PRANGE, 1979) – Figura 2.2.

Em relação aos fatores neuroquímicos, diversas estruturas cerebrais estão relacionadas com o comportamento materno, sendo as principais a área pré-óptica (POA) do hipotálamo, a área tegmental ventral (ATV) e a substância cinzenta periaquedutal (PAG) (NEUMANN et al., 2001). Essas estruturas também são responsáveis pelo controle motor, motivação e modulação da transmissão proprioceptiva (TEODOROV et al., 2002).

Quanto aos sistemas de neurotransmissão envolvidos com a expressão do comportamento materno, os sistemas monoaminérgicos possuem papel fundamental na regulação desse comportamento (CAMARGO et al., 2017). Estudos da literatura destacam o papel do sistema dopaminérgico nigro-estriatal, mostrando que lesões nesse sistema são capazes de reduzir a expressão do comportamento materno, assim como substâncias antagonistas de receptores dopaminérgicos (TEODOROV et al., 2011).

### 2.1.3 Comportamento materno e TEA

Para muitas mulheres, uma etapa importante da vida adulta envolve tornar-se mãe. Estudos com pessoas de diferentes culturas mostram que ter um filho é uma mistura de diversas emoções, podendo ser positivas, como alegria e conexão com o outro, e também negativas, como aumento de estresse (LOUIE; CROMER; BERRY, 2017). Autistas adultos têm diferentes experiências em vários aspectos da vida quando comparados aos não autistas, portanto, é possível que a maternidade seja percebida de uma forma um pouco diferente para mulheres autistas (DUGDALE et al., 2021).

Atualmente não há uma estimativa do número de adultos autistas que são pais. Estudo de Pruit, Rhoden e Ekas (2018) apontou que de 17 a 23% dos pais de crianças autistas também apresentam “um fenótipo mais amplo”, uma vez que o autismo é um transtorno parcialmente genético. Dessa forma, é possível que um número ainda maior de mulheres, mães de crianças autistas, se enquadrem no espectro, uma vez que o diagnóstico do transtorno em mulheres muitas vezes é feito tardiamente, como discutido no Capítulo 1 (POHL et al., 2020).

Sabe-se que 96% dos indivíduos autistas experimentam dificuldades de processamento sensorial, e a maternidade apresenta demandas sensoriais que podem ser especialmente desafiadoras para mães autistas (TALCER; DUFFY; PEDLOW, 2021). Os desafios se apresentam desde o início, enquanto estão se ajustando a sua nova rotina e identidade, como amamentação e a comunicação com os médicos podem ser componentes únicos durante esse período para mulheres autistas (MAYES; LLEWELLYN; MCCONNELL, 2011).

Hampton et al. (2022) mostra relatos de mães autistas que sentem que a falta de conhecimento sobre o transtorno as impede de receber ajuda, e principalmente a sua capacidade de “esconder” suas características autistas, leva os profissionais de saúde a subestimar suas necessidades. Essas mulheres também podem enfrentar barreiras de comunicação para os cuidados de saúde, incluindo desafios relacionados ao processamento de informações verbais e não verbais durante as consultas (HAMPTON et al., 2022).

O conhecimento de como a maternidade é vivenciada por mulheres autistas é escasso, e pode acarretar em uma série de consequências negativas, incluindo

suporte inadequado (DUGDALE et al., 2021). Embora seja possível encontrar na literatura trabalhos que discutem como a presença de uma criança autista impacta a dinâmica familiar, a experiência das mães autistas é pouco explorada.

#### **2.1.4 Justificativa**

A maternidade é uma etapa importante na vida adulta de diversas mulheres, e consiste em diversas mudanças emocionais, comportamentais e fisiológicas. Mulheres com TEA, devido às características do transtorno, percebem a maternidade de forma diferente e podem apresentar maiores dificuldades. Apesar disso, o número de pesquisas sobre o tema ainda é muito limitado.

Modelos animais são ferramentas extremamente úteis para o estudo de diversas patologias, incluindo o TEA. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os cuidados maternos de ratas fêmeas tipo-autistas induzidas pelo VPA, bem como a neuroquímica cerebral relacionada.

## 2. 2. OBJETIVOS

### 2.2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da exposição ao VPA nos cuidados maternos e na neuroquímica cerebral de ratas.

### 2.2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5, os efeitos:

- Nos cuidados maternos, através das avaliações de comportamento materno e materno agressivo;
- Nos níveis de monoaminas cerebrais e seus metabólitos.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), de aproximadamente 90 dias de vida, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Foram utilizados os mesmos animais do capítulo 1. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (43 x 23 x 16 cm), mantidos em uma sala com a temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade entre 55-65% e com o ciclo de doze horas de claro e escuro (luz acesa às 07h00). Os animais tiveram água e comida *ad libitum* durante todo o procedimento experimental. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da FMVZ/USP, sob protocolo de número 7561140119.

### 2.3.2. Procedimentos

#### 2.3.2.1. Comportamento materno

Para a avaliação deste comportamento, os filhotes foram separados da mãe durante um período de uma hora e os ninhos foram desmanchados. Ao término desse período, os filhotes foram colocados de volta na gaiola moradia, distribuídos nos vértices e nos pontos centrais das laterais da gaiola. Em seguida, a mãe foi introduzida no centro e o comportamento materno foi avaliado por 1 h (UDO et al., 2014). Os parâmetros avaliados estão descritos no Quadro 2.1.



Quadro 2.1 - Parâmetros utilizados na avaliação do comportamento materno de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5

Parâmetro	Definição	Unidade de medida
Recolhimento dos filhotes	Mãe carrega o filhote pela boca enquanto se locomove	Tempo (segundos)
Latência agrupamento	Mãe agrupa todos os filhotes no ninho	Tempo (segundos)
<i>Grooming</i> nos filhotes	Mãe realiza higienização dos filhotes	Tempo (segundos)
<i>Self-grooming</i>	Mãe realiza a auto higienização	Tempo (segundos)
Latência para amamentação	Tempo que a mãe demora para iniciar a amamentação pela primeira vez	Tempo (segundos)
Amamentação	Mãe permanece na postura de cifose, por no mínimo 3 minutos consecutivos, sobre no mínimo 5 filhotes	Tempo (segundos)

Fonte: Magalhães (2021).

### 2.3.2.2 Comportamento materno agressivo

Para a realização desse teste a mãe foi separada dos filhotes por 15 min; após esse período, ela foi recolocada na gaiola com os filhotes e então um macho intruso, de peso semelhante ou menor ao da mãe (é aceitável uma diferença de peso de até 10g entre eles), foi introduzido (MAGALHÃES et al., 2015). Este comportamento foi observado por 10 minutos. Os parâmetros avaliados estão descritos no Quadro 2.2.

Quadro 2.2 - Parâmetros utilizados na avaliação do comportamento materno agressivo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5

Parâmetro	Definição	Unidade de medida
Interação mãe-intruso	Interação entre a mãe e o macho intruso; inclui os comportamentos de farejar, lambar, perseguir, passar sob/sobre, lutar e morder	Tempo (segundos)
Interação intruso-filhotes	Interação entre o macho intruso e os filhotes; inclui os comportamentos de farejar, lambar e pegar com a boca	Tempo (segundos)
Latência 1ª luta	Tempo gasto até a mãe iniciar a primeira luta com o macho intruso	Tempo (segundos)
Luta	Mãe exibe comportamento de luta, caracterizado por ataques rápidos e consecutivos contra o macho intruso; os ataques incluem <i>boxing</i> , mordidas e rolamento pela caixa, seguidos por um período de imobilidade	Frequência
<i>Boxing</i>	Mãe ataca o macho intruso com as patas dianteiras e/ou traseiras	Frequência
Interação mãe-filhotes	Interação entre a mãe e os filhotes, inclui os comportamentos de farejar, lambar, pegar com a boca e amamentar	Tempo (segundos)
<i>Grooming</i> da mãe	Mãe realiza auto higienização	Tempo (segundos)
<i>Grooming</i> do intruso	Macho intruso realiza a auto higienização	Tempo (segundos)
<i>Freezing</i>	Macho intruso apresenta comportamento de imobilidade	Tempo (segundos)

Fonte: Magalhães (2021).

### 2.3.2.3 Avaliação neuroquímica

Os animais destinados para esse experimento foram decapitados no 21º dia de lactação em guilhotina e as estruturas pré-selecionadas foram coletadas sobre placa de gelo, formando um microambiente o mais frio possível. Para tal, cinco estruturas do sistema nervoso central foram colhidas – o córtex frontal, o hipocampo, o hipotálamo, o corpo estriado, e a substância cinzenta periaquedutal (PAG), e preparadas para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O método foi previamente descrito em nossos laboratórios (FELICIO et al.,

1996). Cada uma das estruturas retirada foi então pesada em balança analítica, acondicionada em *ependorfs* e estocada em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estes procedimentos de coleta duraram no máximo 3 minutos por animal.

As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de uma caneta sonicadora de alta frequência com solução diluente gelada de ácido perclórico ( $\text{ClHO}_4$ ) 0,1 M contendo 0,02 % de metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), EDTA dissódico (ácido dissódico etilenodiaminotetracético) e uma concentração conhecida de DHBA (ácido 3,4- dihidroxibenzilamina). O DHBA foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas. Essas amostras foram mantidas *overnight* em um refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$  com a finalidade de se obter uma boa precipitação das proteínas e ácidos nucleicos, e melhor purificação das amostras. Após essa etapa, o material foi centrifugado a 10.000 RPMs, por um período de 30 minutos (centrífuga Eppendorf®- 5804 R - refrigerada a  $4^{\circ}\text{C}$ ). Logo em seguida o sobrenadante foi retirado e acondicionado em *ependorfs*, estocados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para ser utilizado na quantificação por HPLC.

Foram quantificados: noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido vanilmandélico (VMA); serotonina (5HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HIAA); e dopamina (DA) e seus metabólitos, ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA).

Foi calculado também o *turnover* (taxa de renovação), por meio da relação metabólito/neurotransmissor, de NOR, 5HT e DA da seguinte forma: VMA/NOR, 5HIAA/5-HT, DOPAC/DA e HVA/DA. Os dados foram analisados como descrito anteriormente por Kirsten (KIRSTEN, 2012).

### **2.3.3 Delineamento experimental**

Vinte e duas ratas primíparas, utilizadas no Capítulo 1, foram divididas em dois grupos, o grupo controle (SAL) e o grupo experimental (VPA). Foi realizado o acasalamento das ratas fêmeas adultas e acompanhamento de peso para diagnóstico de prenhez. Após o nascimento da prole foram realizados experimentos para avaliação do comportamento materno (DPN 5) e comportamento materno agressivo (DPN 6). No DPN 21, os animais foram submetidos à eutanásia por

decapitação para coleta de diferentes estruturas cerebrais para avaliação da neuroquímica cerebral.

#### **2.3.4 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism 6® (GraphPad software, Inc., San Diego, California, USA). O teste utilizado foi o teste t e o teste de Mann-Whitney não pareado. O nível de significância para as análises foi considerado  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão ou mediana (mínimo e máximo).

## 2. 4 RESULTADOS

São apresentados, a seguir, os resultados obtidos.

### 2.4.1 Comportamento materno

As Tabelas 2.1 e 2.2 e a Figura 2.3 mostram os resultados dos parâmetros avaliados no teste de comportamento materno de ratas expostas VPA no período pré-natal. O teste t não mostrou diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados: latência para buscar o 1º filhote ( $p=0,2059$ ), latência para buscar o 2º filhote ( $p=0,5422$ ), latência para buscar o 3º filhote ( $p=0,9035$ ), latência para buscar o 4º filhote ( $p=0,9260$ ), latência para agrupamento dos filhotes ( $p=0,2138$ ), tempo de *grooming* nos filhotes ( $p=0,3055$ ), tempo total de *self-grooming* da mãe ( $p=0,4022$ ), latência para postura de amamentação ( $p=0,2793$ ) e tempo total de amamentação ( $p= 0,3732$ ).

Tabela 2.1 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 9 salinas/ N= 13 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Recolhimento do 1º filhote (s)	158,1 ± 64,30	274,5 ± 106,1
Recolhimento do 2º filhote (s)	242,2 ± 103,3	337,5 ± 105,6
Recolhimento do 3º filhote (s)	423,2 ± 140,3	401 ± 115
Recolhimento do 4º filhote (s)	471,4 ± 137,6	490,8 ± 142,4
Latência agrupamento (s)	826,1 ± 180	1368 ± 326,2
<i>Grooming</i> nos filhotes (s)	357,2 ± 42,37	440,5 ± 58,67
<i>Self-grooming</i> (s)	166,4 ± 28,58	138 ± 19,40
Latência para amamentação (s)	1657 ± 86,91	1991 ± 240,8
Amamentação (s)	1842 ± 122,5	1709 ± 86,63

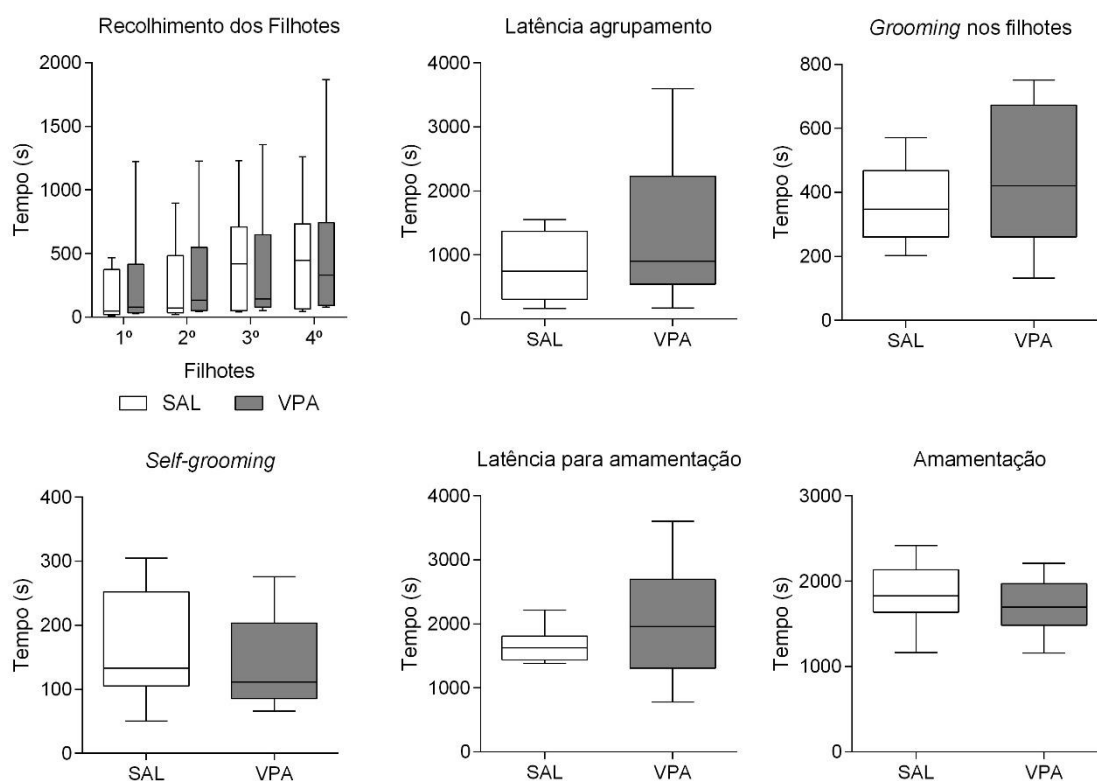
Fonte: (MANES, 2023).  
 $p > 0,05$ , teste t.

Tabela 2.2 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites N= 9 salinas/ N= 13 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Recolhimento do 1º filhote (s)	49 (12 - 467)	79 (28 – 1244)
Recolhimento do 2º filhote (s)	73 (22 – 898)	132 (45 – 1226)
Recolhimento do 3º filhote (s)	420 (41-1230)	144 (50-1357)
Recolhimento do 4º filhote (s)	447 (46 – 1263)	332 (80 – 1866)
Latência agrupamento (s)	746 (162 – 1556)	904 (167 – 3600)
<i>Grooming</i> nos filhotes (s)	347 (202 – 571)	421 (132 – 751)
<i>Self-grooming</i> (s)	133 (50 – 305)	111 (66 – 276)
Latência para amamentação (s)	1628 (1382 – 2216)	1958 (780 – 3600)
Amamentação (s)	1830 (1163 – 2421)	1696 (1161 – 2210)

Fonte: (MANES, 2023).  
 $p > 0,05$ , teste t.

Figura 2.3 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 9 salinas/ N= 13 VPA



Fonte: (MANES, 2023).  
 $p > 0,05$ , teste t.

#### 2.4.2 Comportamento materno agressivo

As Tabelas 2.3 e 2.4 e a Figura 2.4 mostram os resultados dos parâmetros avaliados no teste de comportamento materno agressivo. O teste t mostrou que as ratas do grupo VPA apresentaram diminuição nos parâmetros interação social ( $p=0,004$ ), tempo de *self-grooming* do macho ( $p=0,297$ ) e aumento em relação à frequência de *boxing* ( $p=0,0088$ ). O teste t não mostrou diferenças nos demais parâmetros: tempo que o macho passou farejando os filhotes ( $p=0,1292$ ), latência para a primeira luta ( $p=0,1398$ ), frequência de lutas ( $p=0,2860$ ), tempo que a mãe passou com os filhotes ( $p=0,1440$ ), tempo de *self-grooming* da mãe ( $p=0,8372$ ) e tempo de *freezing* do macho ( $p=0,0622$ ).



Tabela 2.3 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno agressivo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas/ N= 13 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Interação mãe-intruso (s)	213 ± 18,38	121,4 ± 12,24 ***
Interação intruso-filhotes (s)	72,50 ± 10,53	49,77 ± 9,17
Latência 1ª luta (s)	219,5 ± 61,27	126,2 ± 28,22
<i>Boxing</i>	4,25 ± 0,86	12,38 ± 2,10 **
Luta	2,50 ± 1,05	4,84 ± 1,53
Interação mãe-filhotes (s)	107 ± 5,27	85,85 ± 10,31
<i>Grooming</i> da mãe (s)	43,5 ± 4,95	46,25 ± 10,17
<i>Grooming</i> do intruso (s)	24,25 ± 7,33	7,16 ± 3,38 *
<i>Freezing</i> (s)	45,13 ± 19,63	105,6 ± 20,58

Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, teste t.

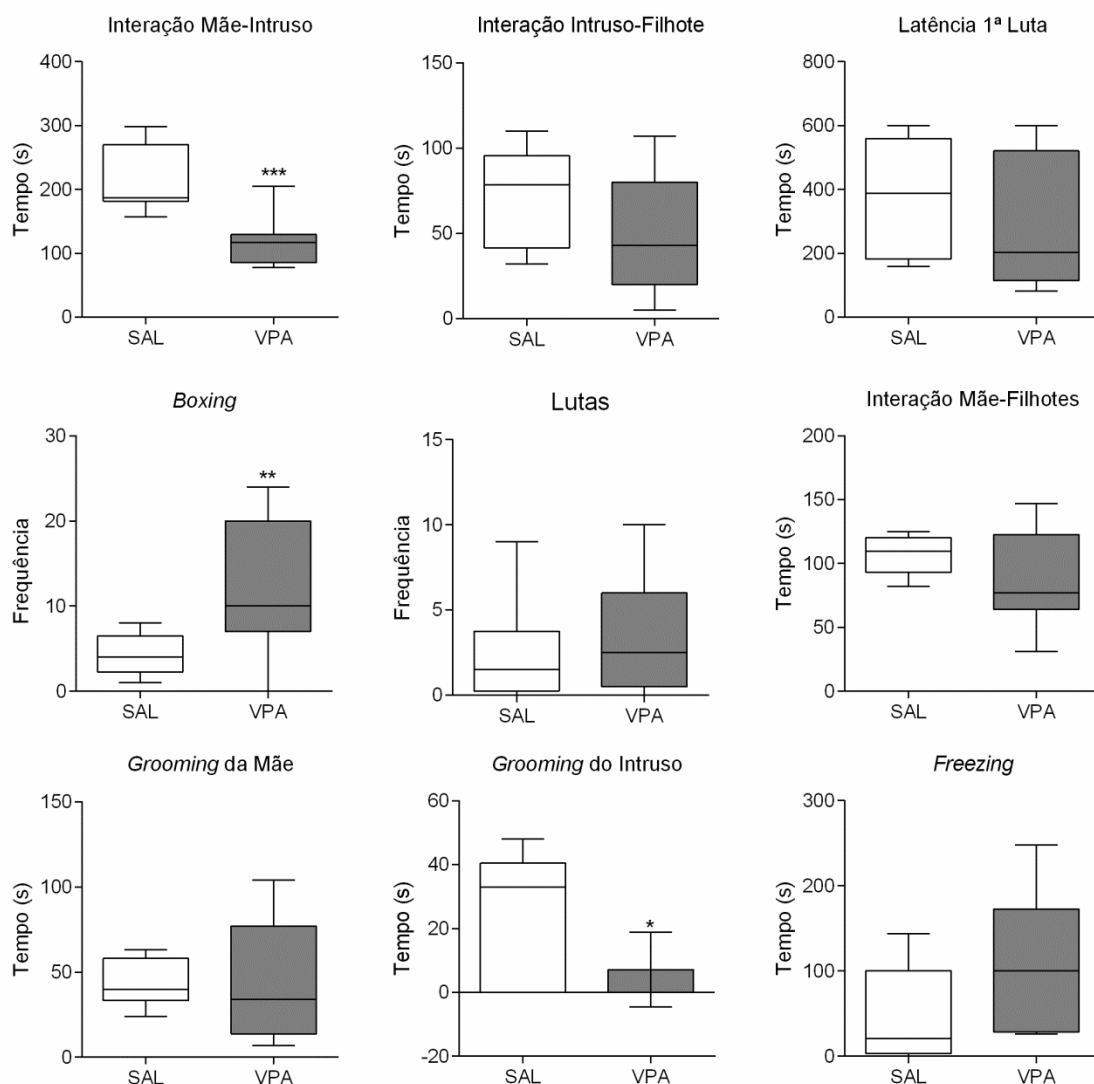
Tabela 2.4 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno agressivo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites N= 8 salinas/ N= 13 VPA

Parâmetros	SAL	VPA
Interação mãe-intruso (s)	187 (157 – 298)	117 (78 – 205) ***
Interação intruso-filhotes (s)	78,50 (32 – 110)	43 (5 – 107)
Latência 1ª luta (s)	191,5 (0 – 437)	117 (0 – 285)
<i>Boxing</i>	4 (1 – 8)	10 (0 – 24) **
Luta	1,50 (0 – 9)	3 (0 – 20)
Interação mãe-filhotes (s)	109,5 (82 – 125)	77 (31 – 147)
<i>Grooming</i> da mãe (s)	40 (24 – 63)	34 (7 – 104)
<i>Grooming</i> do intruso (s)	33 (0 – 48)	0 (0 – 36) *
<i>Freezing</i> (s)	21 (0 – 144)	100 (26 – 248)

Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, teste t.

Figura 2.4 – Parâmetros avaliados no teste do comportamento materno agressivo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas/ N= 13 VPA



Fonte: (MANES, 2023).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , teste t.

### 2.4.3 Avaliação neuroquímica

As Tabelas 2.5 a 2.15 e as Figuras 2.5 a 2.9 mostram o resultado da avaliação dos níveis de neurotransmissores e seus metabólitos nas diferentes estruturas cerebrais. Em relação ao córtex, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes analitos testados: VMA ( $p=0,6308$ ), *turnover* VMA/NOR ( $p=0,5799$ ), 5HT ( $p=0,4342$ ), 5HIAA ( $p=0,2216$ ), *turnover*

5HIAA/5HT ( $p=0,5124$ ), DA ( $p=0,7437$ ), DOPAC ( $p=0,5880$ ), *turnover* DOPAC/DA ( $p=0,3131$ ), HVA ( $p=0,9702$ ) e HVA/DA ( $p=0,0603$ ). O teste t apontou apenas diferenças entre os grupos em relação aos níveis de NOR ( $p=0,0127$ ) – Tabelas 2.5 e 2.6 e Figura 2.5.

Tabela 2.5 - Análise de níveis de neurotransmissores do córtex de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas e 10 VPA

Analito	Controle	VPA
NOR	123,9 ± 6,45	100,4 ± 5,47 *
VMA	37,43 ± 7,30	34,04 ± 2,67
VMA/NOR	0,30 ± 0,07	0,34 ± 0,02
5HT	507,2 ± 24,81	477,8 ± 25,53
5HIAA	173,8 ± 6,83	157,6 ± 9,61
5HIAA/5HT	0,34 ± 0,01	0,33 ± 0,01
DA	1034 ± 151,8	950,7 ± 182,4
DOPAC	84,01 ± 10,55	74,50 ± 12,48
DOPAC/DA	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,003
HVA	105,1 ± 18,95	106,1 ± 19,38
HVA/DA	0,20 ± 0,03	0,12 ± 0,01

Fonte: (MANES, 2023).

\* $p<0,05$ , teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroxindolacético.

Tabela 2.6 - Análise de níveis de neurotransmissores do córtex de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites N= 8 salinas/ N= 13 VPA

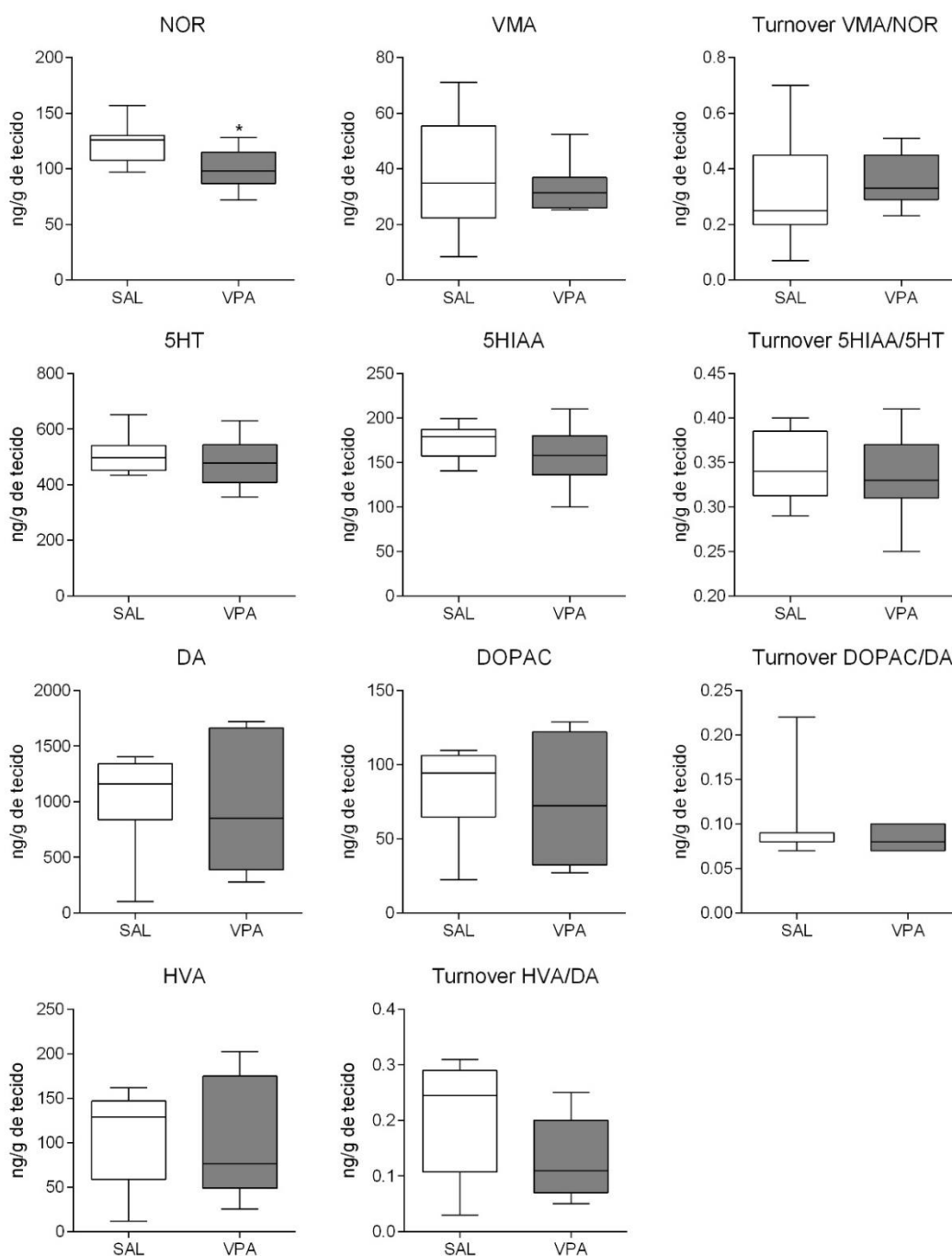
Analito	Controle	VPA
NOR	126,1 (97,10- 156,9)	98,30 (71,90-128,3) *
VMA	34,90 (8,40-71,20)	31,40 (25,20-52,50)
VMA/NOR	0,25 (0,07-0,70)	0,33 (0,23-0,51)
5HT	498 (434,3-652,6)	478,9 (356,6-631,1)
5HIAA	179,1 (140,6-199,6)	157,7 (100,1-210,6)
5HIAA/5HT	0,34 (0,29-0,40)	0,33 (0,25-0,41)
DA	1162 (103-1405)	850,8 (277,2-1720)
DOPAC	94,45 (22,40-109,7)	72,40 (26,90-128,8)
DOPAC/DA	0,08 (0,07-0,22)	0,08 (0,07-0,10)
HVA	129 (12-161,7)	76,50 (25,30-202,7)
HVA/DA	0,24 (0,03-0,31)	0,11 (0,05-0,25)

Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroindolacético.

Figura 2.5 - Análise de níveis de neurotransmissores do córtex de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas e 10 VPA



Fonte: (MANES, 2023).

\* $p < 0,05$ , teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-dihidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroxindolacético.

Em relação ao hipocampo, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes analitos testados: VMA ( $p=0,8365$ ), *turnover* VMA/NOR ( $p=0,4698$ ), 5HT ( $p=0,0649$ ), 5HIAA ( $p=0,5548$ ), DA ( $p=0,4864$ ), DOPAC ( $p=0,4244$ ), HVA ( $p=0,8771$ ), *turnover* HVA/DA ( $p=0,4959$ ). O teste t apontou diferenças entre os grupos em relação aos níveis de NOR ( $p=0,0014$ ), *turnover* DOPAC/DA ( $p=0,0225$ ), *turnover* 5HIAA/5HT ( $p=0,0203$ ) - Tabelas 2.7 e 2.8 e Figura 2.6.

Tabela 2.7 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipocampo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas e 12 VPA

Analito	Controle	VPA
NOR	68,90 ± 5,10	50,33 ± 1,71 **
VMA	18,35 ± 2,71	17,59 ± 2,33
VMA/NOR	0,24 ± 0,04	0,29 ± 0,04
5HT	218 ± 10,79	263,5 ± 17,36
5HIAA	91,64 ± 3,63	87,49 ± 5,04
5HIAA/5HT	0,42 ± 0,02	0,34 ± 0,02 *
DA	246,5 ± 57,29	201,1 ± 35,68
DOPAC	15,01 ± 3,13	12,09 ± 2,04
DOPAC/DA	0,05 ± 0,004	0,06 ± 0,003 *
HVA	20,98 ± 2,33	21,53 ± 2,44
HVA/DA	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,02

Fonte: (MANES, 2023).

\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-dihidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroindolacético.

Tabela 2.8 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipocampo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 8 salinas e 12 VPA

Analito	Controle	VPA
NOR	69,40 (53,60-89,90)	52,10 (41,20-56,80)**
VMA	15,90 (9-33,20)	18,30 (4-30,20)
VMA/NOR	0,25 (0,11-0,48)	0,25 (0,09-0,52)
5HT	222,8 (173,9-251,8)	255,4 (175-385,4)
5HIAA	91,65 (18,80-108)	84,35 (68,30-133,9)
5HIAA/5HT	0,44 (0,31-0,54)	0,33 (0,22-0,46) *
DA	221,2 (16-493)	203,8 (15,30-393,3)
DOPAC	12,20 (4,60-31,40)	11,80 (2-24,80)
DOPAC/DA	0,05 (0,03-0,06)	0,06 (0,05-0,09) *
HVA	20,65 (13,50-34,70)	21,05 (11,70-43,50)
HVA/DA	0,80 (0,04-1,15)	0,08 (0,04-0,29)

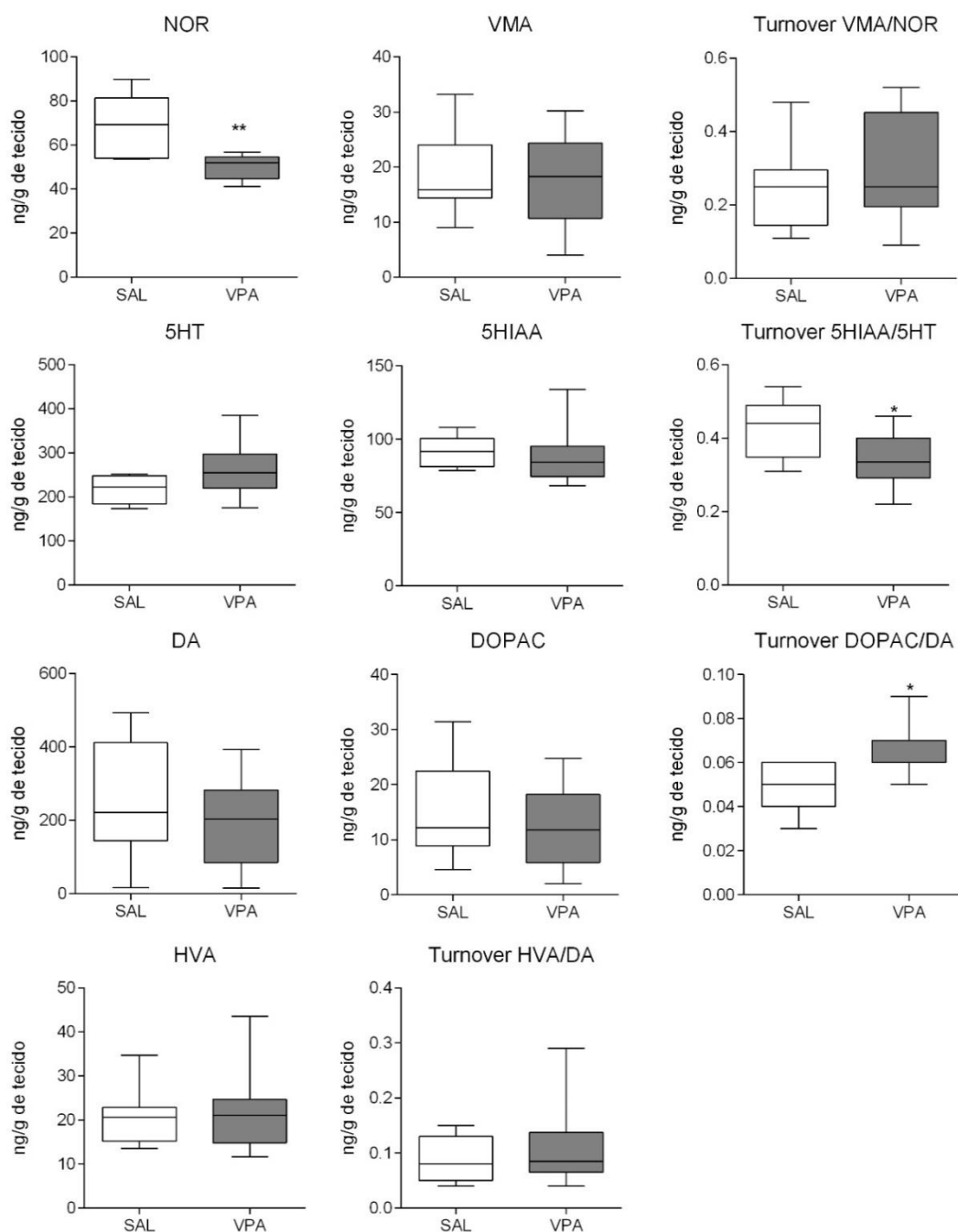
Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, \*\*p<0,01, teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroindolacético.



Figura 2.6 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipocampo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas e 12 VPA



Fonte: (MANES, 2023).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-dihidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroindolacético.

Em relação ao hipotálamo, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes analitos testados: NOR ( $p=0,4542$ ), VMA ( $p=0,8866$ ), *turnover* VMA/NOR ( $p=0,6294$ ), 5HT ( $p=0,0892$ ), 5HIAA ( $p=0,1657$ ), *turnover* 5HIAA/5HT ( $p=0,7798$ ), DA ( $p=0,2069$ ), DOPAC ( $p=0,4597$ ), *turnover* DOPAC/DA ( $p=0,6759$ ) – Tabelas 2.9 e 2.10 e 4 e Figura 2.7. O HVA estava abaixo da linha de identificação do aparelho utilizado.

Tabela 2.9 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipotálamo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas e 10 VPA

Analito	Controle	VPA
NOR	152,3 ± 8,60	161,5 ± 8,06
VMA	21,18 ± 2,54	20,64 ± 2,57
VMA/NOR	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01
5HT	275,3 ± 20,25	233,3 ± 13,57
5HIAA	56,30 ± 3,94	48,85 ± 3,31
5HIAA/5HT	0,20 ± 0,005	0,20 ± 0,007
DA	35,90 ± 4,05	42,64 ± 3,23
DOPAC	3,08 ± 0,23	3,37 ± 0,26
DOPAC/DA	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01

Fonte: (MANES, 2023).

Teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-dihidroifenilacético.

HVA indetectável/ abaixo da linha de identificação.

Tabela 2.10 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipotálamo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 8 salinas e 10 VPA

Analito	Controle	VPA
NOR	151,9 (117,7-185,1)	156,1 (127,8-228,6)
VMA	24,45 (8,20-28,70)	18,10 (9,40-39)
VMA/NOR	0,14 (0,07-0,18)	0,13 (0,06-0,19)
5HT	290 (177,6-337,6)	242,3 (171-299,2)
5HIAA	62 (38,10-67,10)	51 (33,40-63,90)
5HIAA/5HT	0,20 (0,18-0,23)	0,20 (0,18-0,25)
DA	34,60 (23,50-58,80)	40,30 (28,80-59,20)
DOPAC	3,05 (2,20-4)	3,50 (2,10-4,90)
DOPAC/DA	0,08 (0,06-0,16)	0,08 (0,04-0,16)

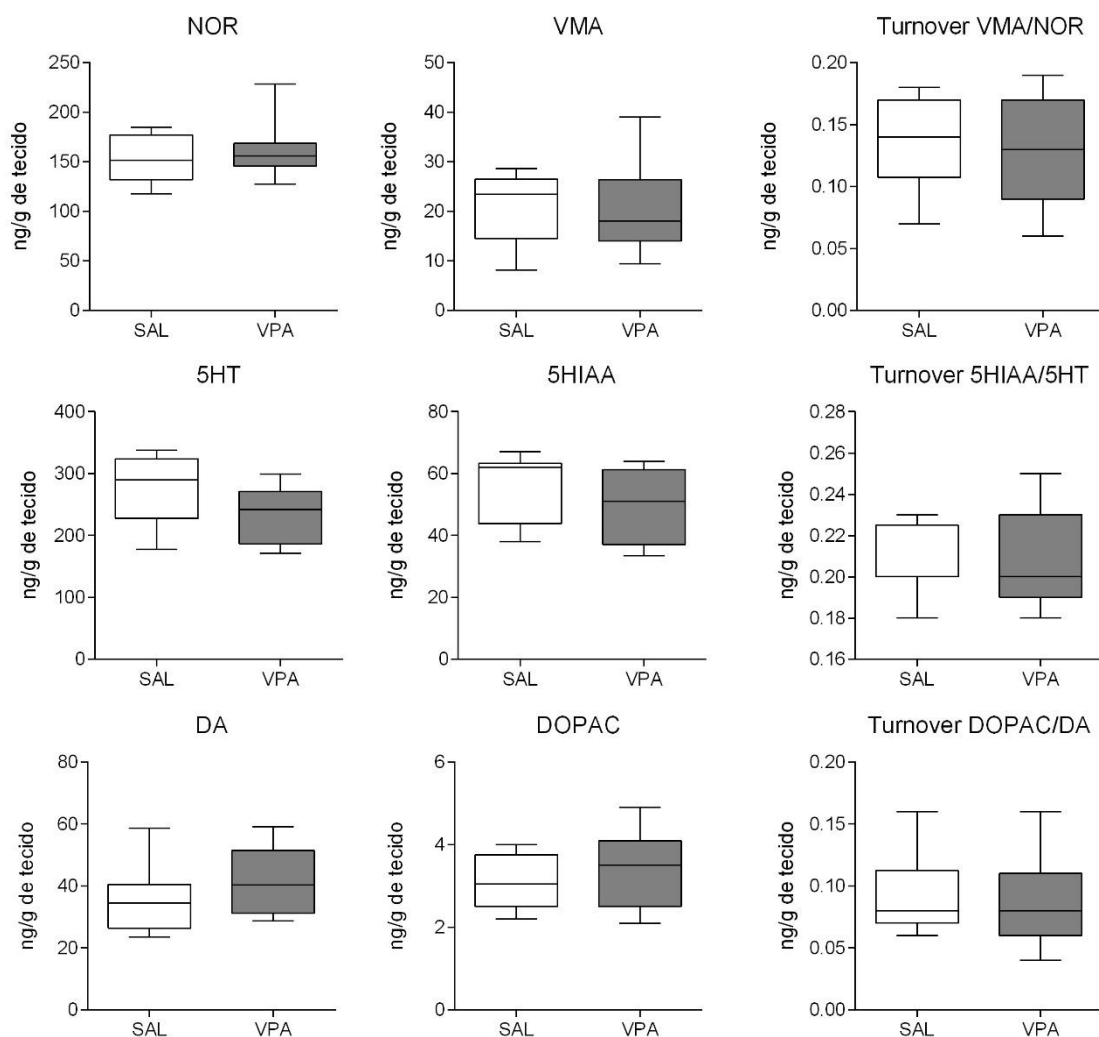
Fonte: (MANES, 2023).

Teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-dihidroxifenilacético.

HVA indetectável/ abaixo da linha de identificação.

Figura 2.7 - Análise de níveis de neurotransmissores do hipotálamo de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas e 10 VPA



Fonte: (MANES, 2023).

Teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético.

HVA indetectável/ abaixo da linha de identificação.

Em relação ao corpo estriado, o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes analitos testados: NOR ( $p=0,9466$ ), VMA ( $p=0,1139$ ), *turnover* VMA/NOR ( $p=0,0731$ ), 5HT ( $p=0,0524$ ), 5HIAA ( $p=0,1355$ ), DA ( $p=0,8645$ ) DOPAC ( $p=0,7072$ ), *turnover* DOPAC/DA ( $p=0,1382$ ), HVA ( $p=0,4513$ ). O teste t apontou diferenças entre os grupos em relação aos níveis de *turnover* HVA/DA ( $p=0,0037$ ) e *turnover* 5HIAA/5HT ( $p=0,0020$ ) – Tabelas 2.11 e 2.12 e Figura 2.7.

Tabela 2.11 - Análise de níveis de neurotransmissores do corpo estriado de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 9 salinas e 13 VPA

Analito	Controle	VPA
NOR	135,3 ± 12,29	134,5 ± 5,60
VMA	46,07 ± 4,30	38,15 ± 2,66
VMA/NOR	0,37 ± 0,04	0,28 ± 0,02
5HT	471,5 ± 31,85	406,4 ± 15,22
5HIAA	190,7 ± 9,03	207,9 ± 6,63
5HIAA/5HT	0,41 ± 0,02	0,51 ± 0,01 **
DA	142,8 ± 27,07	150,3 ± 29,24
DOPAC	13,24 ± 2,21	14,45 ± 2,09
DOPAC/DA	0,09 ± 0,002	0,10 ± 0,005
HVA	18,94 ± 2,19	16,75 ± 1,77
HVA/DA	0,04 ± 0,008	0,14 ± 0,25 **

Fonte: (MANES, 2023).

\*\* $p<0,01$ , teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-dihidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroindolacético.

Tabela 2.12 - Análise de níveis de neurotransmissores do corpo estriado de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 9 salinas e 13 VPA

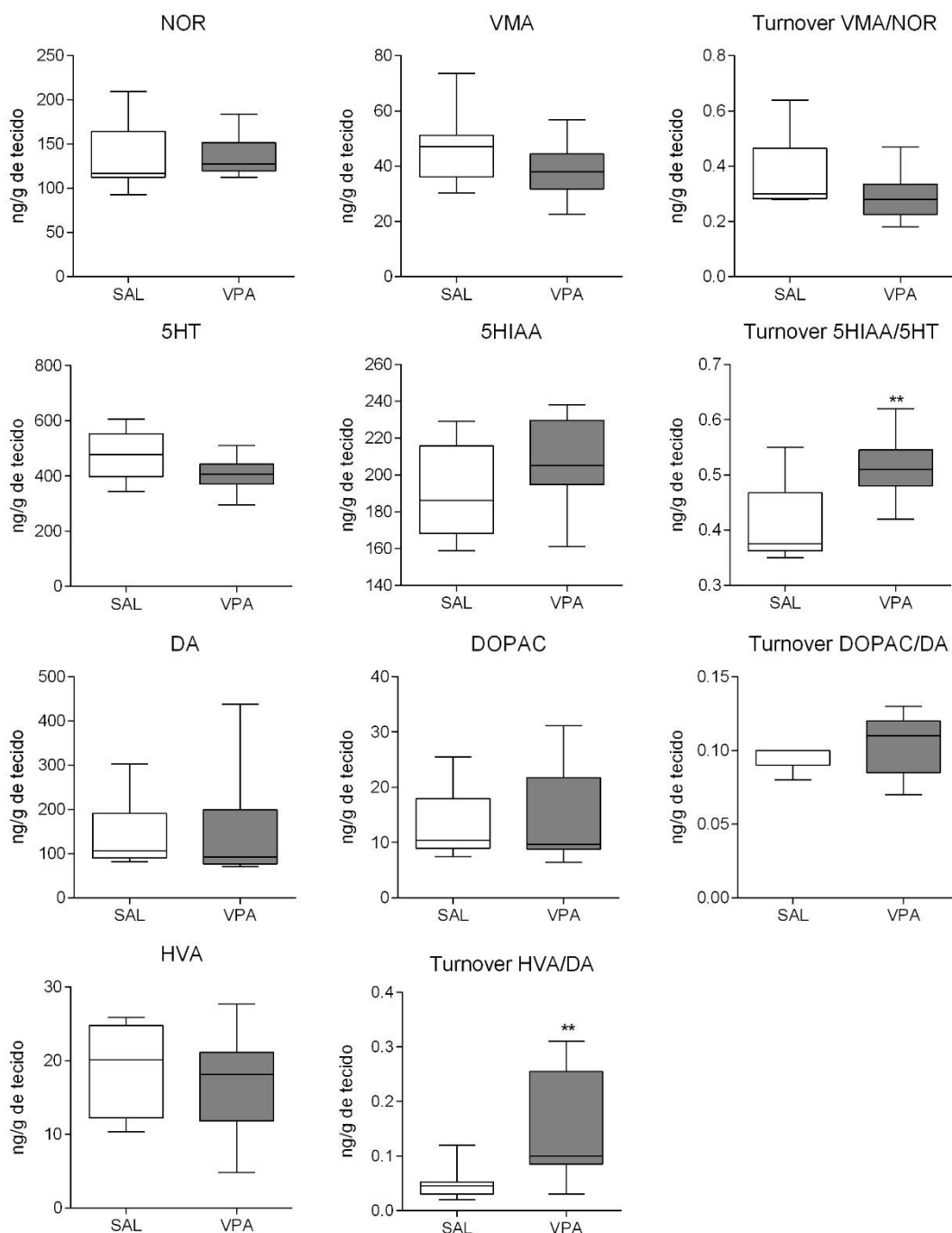
Analito	Controle	VPA
NOR	116,8 (92,90-209,7)	127,5 (112,4-184)
VMA	47,10 (30,40-73,70)	38 (22,60-56,90)
VMA/NOR	0,30 (0,28-0,64)	0,28 (0,18-0,47)
5HT	477,8 (344,2-607,3)	407,5 (296,4-510,1)
5HIAA	186,2 (158,8-229,1)	205 (161,2- 238,1)
5HIAA/5HT	0,37 (0,35-0,55)	0,51 (0,42-0,62)**
DA	105,8 (81,30-302,6)	91,90 (70,40-438,3)
DOPAC	10,45 (7,40-25,50)	9,70 (6,40-31,10)
DOPAC/DA	0,09 (0,08-0,10)	0,11 (0,07-0,13)
HVA	20,15 (10,40-25,90)	18,10 (4,80-27,70)
HVA/DA	0,04 (0,02-0,12)	0,10 (0,03-0,31) **

Fonte: (MANES, 2023).

\*\*p<0,01, teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroindolacético.

Figura 2.8 - Análise de níveis de neurotransmissores do corpo estriado de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 9 salinas e 13 VPA



Fonte: (MANES, 2023).

\*\*p<0,01, teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-dihidroxifenilacético, HVA = ácido 5-hidroxindolacético.

Em relação à substância cinzenta periaquedutal (PAG), o teste t não mostrou diferenças significantes entre os grupos nos seguintes analitos testados: NOR ( $p=0,1273$ ), 5HT ( $p=0,3011$ ), 5HIAA ( $p=0,8096$ ), *turnover* 5HIAA/5HT ( $p=0,0718$ ), DA ( $p=0,6857$ ), DOPAC ( $p=0,3416$ ), *turnover* DOPAC/DA ( $p=0,4375$ ). O teste t apontou diferenças entre os grupos em relação aos níveis de VMA ( $p=0,0069$ ), *turnover* VMA/NOR ( $p=0,0380$ ) – Tabelas 2.13 e 2.14 e Figura 2.9. O HVA estava abaixo da linha de identificação do aparelho utilizado.

Tabela 2.13 - Análise de níveis de neurotransmissores da substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão. N= 8 salinas e 10 VPA

Analito	Controle	VPA
NOR	33,06 ± 5,28	24 ± 2,92
VMA	14,47 ± 2,84	5,57 ± 1,33 **
VMA/NOR	0,47 ± 0,10	0,22 ± 0,05 *
5HT	96,71 ± 19,20	74,19 ± 11,47
5HIAA	30,04 ± 5,57	28,57 ± 3,20
5HIAA/5HT	0,32 ± 0,02	0,41 ± 0,03
DA	9,42 ± 1,30	8,63 ± 1,33
DOPAC	1,84 ± 0,25	1,45 ± 0,28
DOPAC/DA	0,23 ± 0,06	0,17 ± 0,03

Fonte: (MANES, 2023).

\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético. HVA indetectável/ abaixo da linha de identificação.



Tabela 2.14 - Análise de níveis de neurotransmissores da substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. São apresentados as medianas e os respectivos limites. N= 8 salinas e 10 VPA

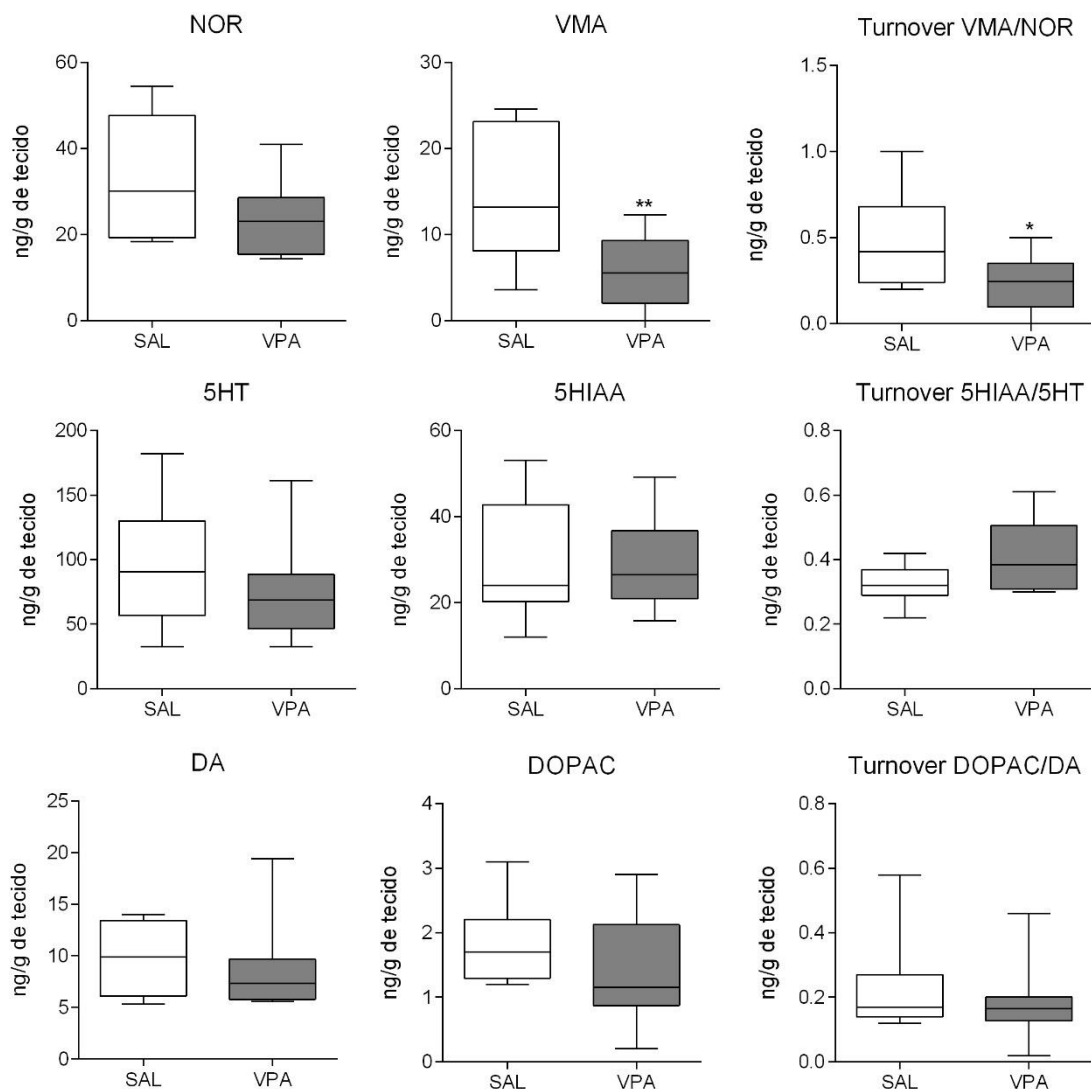
Analito	Controle	VPA
NOR	30,10 (18,40-54,50)	23,10 (14,30-40,90)
VMA	13,20 (3,60- 24,60)	5,50 (0-12,30) **
VMA/NOR	0,42 (0,20-1)	0,24 (0-0,5) *
5HT	90,70 (32,40-181,9)	68,60 (32,80-161,4)
5HIAA	26 (12-53,10)	26,55 (15,80-49,20)
5HIAA/5HT	0,32 (0,22-0,42)	0,38 (0,30-0,61)
DA	9,90 (5,30-14)	7,35 (5,60-19,40)
DOPAC	1,70 (1,20-3,10)	1,15 (0,20-2,90)
DOPAC/DA	0,17 (0,12-0,58)	0,16 (0,02-0,46)

Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, \*\*p<0,01, teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-dihidroxifenilacético. HVA indetectável/ abaixo da linha de identificação.

Figura 2.9 - Análise de níveis de neurotransmissores da substância cinzenta periaquedutal (PAG) de ratas expostas ao VPA por via intraperitoneal no dia de gestação 12,5. Dados apresentados em média e seus respectivos erros ou desvios padrão. N= 8 salinas e 10 VPA



Fonte: (MANES, 2023).

\*p<0,05, \*\*p<0,01, teste t.

Legenda: NOR= noradrenalina, VMA= ácido vanilmandélico, 5HT = serotonina, 5HIAA = ácido 5-hidroindol, 3-acético, DA = dopamina, DOPAC = ácido 4,4-dihidroifenilacético.

HVA indetectável/ abaixo da linha de identificação.

## 2.5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que o modelo experimental de autismo, por meio da exposição pré-natal ao VPA (400 mg/kg no DG 12,5) não foi capaz de alterar os comportamentos envolvidos no cuidado materno, entretanto causou algumas alterações na neuroquímica cerebral.

O uso do VPA para indução de fenótipo tipo-autista em ratos é um modelo validado, uma vez que é capaz de reproduzir os sintomas similares àqueles encontrados na condição humana, sendo amplamente utilizado na compreensão desse transtorno (SCHNEIDER; PRZEWŁOCKI, 2005; CEZAR et al., 2018). Apesar de haver grande número de trabalhos na literatura sobre o TEA, ainda são escassas as informações sobre o transtorno em mulheres e pouco se sabe sobre a maternidade nessas mulheres.

A maternidade constitui uma fase da vida da mulher com diversas mudanças, entre elas fisiológicas e comportamentais. Todas essas alterações são extremamente desafiadoras para uma pessoa neurotípica; já uma pessoa com TEA possui essas mesmas questões desafiadoras, além de outros potenciais estressores (POHL et al., 2020).

Os cuidados maternos são o conjunto de comportamentos exibidos pelas mães com a finalidade de garantir a saúde e sobrevivência da prole até a sua independência (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006; OKINO et al., 2020). Esses são comportamentos sociais evolutivamente conservados entre os mamíferos e modulados por fatores ambientais internos e externos, como hormônios e estímulos sensoriais da prole (OKINO et al., 2020).

No período após o parto, a mãe precisa manter um equilíbrio entre a sobrevivência de sua prole e a sua própria, sendo necessário haver um balanço entre os mecanismos fisiológicos dirigidos para a subsistência e a reprodução (KLEIN, 2012). Dessa forma, tanto a sobrevivência da prole, quanto a perpetuação da espécie, dependem da formulação de novas estratégias para a seleção do comportamento mais adaptativo (FELÍCIO; CANTERAS, 2008; KLEIN, 2012).

Em roedores, os cuidados maternos podem ser divididos em duas categorias: 1) os diretos, que são aqueles direcionados à prole, como recolher os filhotes, agrupá-los no ninho e amamentá-los; e 2) os indiretos, que são aqueles dirigidos à

estímulos externos, como a construção do ninho e a expressão de agressividade frente a um intruso (ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2023). Dessa forma, neste trabalho, foi utilizado o teste de comportamento materno para avaliar os cuidados maternos diretos e o teste de comportamento materno agressivo para avaliar os cuidados maternos indiretos.

Existem quatro elementos primários no comportamento materno de ratos: 1) o recolhimento dos filhotes; 2) a construção do ninho e o agrupamento da ninhada no mesmo; 3) a higienização dos filhotes; e 4) o comportamento de amamentação (NUMAN; STOLZENBERG, 2009).

O recolhimento dos filhotes ocorre quando um filhote sai do ninho e a mãe rapidamente tende a carregá-lo na boca de volta com os demais filhotes da ninhada (MENDES-LIMA, 2020). A construção e o agrupamento da ninhada no ninho tem a função de isolar os filhotes em um ambiente controlado para que se mantenham aquecidos na ausência da mãe (NUMAN; STOLZENBERG, 2009). Esses comportamentos são respostas sensório-motoras causadas por estímulos oriundos dos filhotes e vem sendo bastante utilizados em pesquisas sobre distúrbios que afetam a interação mãe-filhote, como depressão pós-parto, esquizofrenia, síndrome fetal alcoólica e TEA (WINTERS et al., 2022).

A higienização dos filhotes ocorre através de lambidas (*grooming*), sendo especialmente importante na região genital, pois auxilia na promoção da micção e defecação da prole (NUMAN, 1974). Ela também é uma importante fonte de estimulação tátil para os filhotes jovens (NUMAN; STOLZENBERG, 2009).

Uma vez que todos os filhotes se encontram agrupados no ninho, as ratas tendem a passar a maior parte do tempo em posição de amamentação, também conhecida como cifose, em que arqueiam a coluna vertebral para expor a região mamária e facilitar o acesso dos filhotes ao leite (NUMAN; STOLZENBERG, 2009; CAMARGO et al., 2017).

Vale ressaltar a diferença entre os comportamentos de recolher e amamentar os filhotes. O recolhimento dos filhotes é iniciado pelas mães e pode ser classificado como uma resposta materna ativa, sendo controlado pela atividade do sistema nervoso central. Já a amamentação, é classificada como uma resposta passiva, uma vez que é iniciada pela estimulação do filhote na região ventral da mãe, sendo um

reflexo da proximidade com a prole (NUMAN; STOLZENBERG, 2009; CAMARGO et al., 2017).

O teste de comportamento materno realizado neste trabalho avaliou os quatro elementos primários deste comportamento. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos, indicando que o modelo de autismo induzido pelo VPA não alterou o comportamento materno direto das ratas.

A agressão maternal consiste em comportamentos executados pela mãe em relação à um intruso, com ou sem a intenção de lesá-lo (HUNTINGFORD, 1989). Ratas lactantes apresentam altos níveis de agressividade, principalmente durante as duas primeiras semanas após o parto, com um declínio gradativo até o final da lactação (GIONEVARO et al., 2005). Esse comportamento é natural e necessário para a sobrevivência da prole (HUNTINGFORD, 1989).

O comportamento agressivo materno ocorre durante um período específico da vida das fêmeas, ao contrário do de machos, que podem manifestar respostas agressivas continuamente durante a vida (NUMAN, 1994). A agressão materna em relação a um intruso, tanto macho quanto fêmea, que tente se aproximar do ninho, está relacionada com a defesa e proteção da prole (BOSCH et al., 2005). Apesar disso, a agressão voltada a fêmeas intrusas é menos feroz do que a exibida frente a um macho intruso (PARMIGIANI et al., 1988).

A forma de ataque das fêmeas é caracterizada por ataques laterais, pequenas mordidas e investigação com o focinho (farejar), e é diferente da apresentada por machos dominantes em seus territórios (LEYHAUSEN, 1973; BLANCHARD et al., 1984). Diversos fatores influenciam essa agressão materna, como as alterações hormonais e neuroquímicas que ocorrem no período de lactação, bem como fatores ambientais, em especial sinais olfatórios (GAMMIE; LONSTEIN, 2006).

Os resultados deste trabalho mostraram que houve diminuição no tempo de interação mãe-intruso e no tempo de *grooming* do intruso, e aumento da frequência de *boxing* das ratas do grupo VPA em relação com as do grupo controle. Não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliaram o comportamento materno de modelos animais tipo-autista.

Uma hipótese para explicar os resultados encontrados baseia-se no fenótipo tipo-autista validado no Capítulo 1, em que o VPA induz os sintomas típicos do TEA nas ratas, com prejuízo na comunicação e déficits de sociabilização. Apesar disso,

relatos da literatura de mães autistas apontam que essas mulheres, apesar de todas as dificuldades impostas pela maternidade em si e pelo transtorno, apresentam maior resiliência e dedicação aos seus filhos, com maior atenção aos detalhes (DUGDALE et al., 2021). Dessa forma, esses resultados sugerem que as ratas VPA apresentaram agressividade frente a um macho intruso, de forma até um pouco mais acentuada que as ratas do grupo controle.

A avaliação da neuroquímica cerebral foi realizada com a finalidade de determinar as concentrações das monoaminas e de seus metabólitos em regiões específicas do sistema nervoso central relacionadas com o TEA e com os cuidados maternos. Para isso, foram escolhidas cinco estruturas cerebrais: córtex frontal, hipocampo, hipotálamo, corpo estriado e PAG.

O córtex frontal é a região do encéfalo responsável por grande parte dos processos cognitivos, como tomadas de decisão, planejamento, memória, aprendizado, comunicação e comportamento social (DONOVAN; BASSON, 2017). Devido ao seu papel na comunicação e no comportamento social, essa estrutura está relacionada tanto com o comportamento materno, quanto com o TEA (DONOVAN; BASSON, 2017; MAGALHÃES, 2021). Estudos mostraram que indivíduos com TEA apresentam crescimento anormal da região cortical, além de desorganização dos neurônios e das conexões com outras regiões cerebrais (DONOVAN; BASSON, 2017).

O hipocampo é uma estrutura subcortical que faz parte do sistema límbico; esse sistema tem como principal função controlar o comportamento emocional e as forças motivacionais (GUYTON; HALL, 2017). Estudos da literatura apontam que o hipocampo possui papel importante no comportamento social, e, em especial, na expressão do comportamento materno, através de alterações na sua plasticidade que levam a modificações na cognição e na emocionalidade (PAWLUSKI; LAMBERT; KINSLEY, 2016). Além disso, trabalhos recentes de neuroimagem vêm sendo conduzidos sobre o papel do hipocampo no TEA, devido a sua relevância na expressão do comportamento social (BANQER et al., 2021).

O hipotálamo também é uma região cerebral que faz parte do sistema límbico e possui tanto funções endócrinas, quanto comportamentais, possuindo papel importante na manifestação do comportamento social (GUYTON; HALL, 2017).

Estudos apontam o papel de dois peptídeos hipotalâmicos na regulação de respostas socioemocionais, que são impactadas no TEA (CARIA et al., 2020).

O corpo estriado é uma estrutura cerebral que faz parte dos núcleos da base e tem como principal função o controle motor do organismo (GUYTON; HALL, 2017). Apesar disso, ele também está relacionado com o sistema de recompensa do cérebro e com as tomadas de decisões, sendo, portanto, importante na expressão do comportamento materno e de principais sintomas do TEA (HENSCHEN; PALMITER; DARVAS, 2013; KOHLS; YERYS; SCHULTZ, 2014; ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2019).

A PAG é uma região do encéfalo responsável por diversos comportamentos, como vocalização, receptividade sexual e a resposta ao medo (TEODOROV, 2008). Essa estrutura também está diretamente relacionada com a expressão de comportamentos reprodutivos, sendo a realização da postura de cifose e o comportamento de amamentação as mais importantes, e também por comportamentos de defesa, como a agressividade materna em ratas lactantes (STERN, 1996; LONSTEIN; STERN, 1997; NEUMANN et al., 2001).

Neste trabalho foram avaliados os sistemas de neurotransmissão monoaminérgicos, sendo eles o noradrenérgico, o serotoninérgico e o dopaminérgico.

Existem poucos estudos na literatura que correlacionaram o sistema noradrenérgico com o comportamento materno. Thomas e Palmiter (1997) mostraram que a noradrenalina é importante na regulação do comportamento de recolhimento dos filhotes e de amamentação, uma vez que filhotes de camundongo mutantes que não produzem noradrenalina, não apresentam marcas de leite visível na barriga nos primeiros dias de vida.

Já o sistema serotoninérgico está associado aos componentes passivos do comportamento materno, sendo necessário estímulos oriundos dos filhotes, como *grooming* e amamentação (JOHNS et al., 2005; COX et al., 2011). Além disso, baixos níveis de serotonina estão associados com aumento de agressão materna (MICZEK et al., 2007).

Os circuitos dopaminérgicos também apresentam papel significativo no comportamento materno, principalmente a via mesolímbica (ZACCARELLI-MAGALHÃES et al., 2023). Os neurônios dopaminérgicos saem da área tegmental

ventral e se projetam para o núcleo *accumbens*, para estruturas do sistema límbico, em especial o hipocampo, e para o córtex. Dessa forma, essa via está relacionada com o sistema de recompensa, e, assim, com os comportamentos motivacionais, bem como com funções cognitivas e emocionais (POST; LEUNER, 2019).

Os resultados da avaliação neuroquímica deste trabalho mostraram que houve: 1) diminuição de NOR no hipocampo e de seu metabólito VMA e no *turnover* na PAG; 2) diminuição no *turnover* 5HIAA/5HT no hipocampo e aumento desse mesmo *turnover* no corpo estriado; e 3) aumento no *turnover* DOPAC/DA no hipocampo e HVA/DA no corpo estriado. Esses resultados apesar de estatisticamente significantes não apresentam significado biológico, uma vez que foram em poucos neurotransmissores e em estruturas distintas, além de que a maior das diferenças ocorreu nos *turnovers*, sem alterações dos níveis de neurotransmissão e/ou metabólitos.

Os dados em conjunto indicam que o modelo de indução de fenótipo tipo-autista pela administração de VPA em ratas, não modifica os cuidados maternos desses animais, nem os circuitos de neurotransmissão relacionados com esses cuidados, indicando que ratas tipo-autistas apresentam o mesmo tipo de comportamento que ratas saudáveis.



## 2.6 CONCLUSÃO

Os presentes resultados mostraram que a exposição pré-natal ao VPA (400mg/k no DG 12,5) em ratas:

- Não alterou o comportamento materno;
- Causou pequenas alterações no comportamento materno agressivo;
- Causou pequenas alterações na neuroquímica cerebral.

## REFERÊNCIAS

- BANKER, S. M.; GU, X.; SCHILLER, D.; & FOSS-FEIG, J. H. Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder. **Trends in neurosciences**, v. 44, n. 10, p. 793-807, 2021.
- BLANCHARD, D. C.; FUKUNAGA-STINSON, C.; TAKAHASHI, L. K.; FLANNELLY, K. J.; BLANCHARD, R. J. Dominant aggression in social groups of male and female rats. **Behavioral Processes**, v. 9, p. 31-48, 1984.
- BOSCH, O. J.; MEDDLE, S. L.; BEIDERBECK, D. I.; BRANTEN, A. J. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 6807-6815, 2005.
- CAMARGO, E.L.R.A. **Exposição perinatal de ratos ao glifosato (Roundup®): efeitos sobre o comportamento materno e sobre o desenvolvimento físico e neurocomportamental da prole desde o nascimento até a idade adulta**. 2014. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- CAMARGO, E. L. R. A.; ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; FUKUSHIMA, A. R.; SPINOSA, H. D. S. Comportamento materno: uma revisão da inter-relação com a toxicologia do desenvolvimento em roedores. **Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento**, v. 17, n. 1, p. 08-25, 2017.
- CARIA, A.; CIRINGIONE, L.; DE FALCO, S. Morphofunctional alterations of the hypothalamus and social behavior in autism spectrum disorders. **Brain Sciences**, v. 10, n. 7, p. 435, 2020.
- CEZAR, L. C., KIRSTEN, T. B., DA FONSECA, C. C. N., DE LIMA, A. P. N., BERNARDI, M. M., FELICIO, L. F. Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. **Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry**, v. 84, p. 173-180, 2018.
- COX, E. T.; JARRETT, T. M.; MCMURRAY, M. S.; GREENHILL, K.; HOFER, V. E.; WILLIAMS, S. K.; JOYNER, P. W.; MIDDLETON, C. L.; JOHNS, J. M. Combined norepinephrine/serotonergic reuptake inhibition: effects on maternal behavior, aggression, and oxytocin in the rat. **Frontiers in psychiatry**, v. 2, p. 34, 2011.
- DONOVAN, A. P. A.; BASSON, M. Al. The neuroanatomy of autism—a developmental perspective. **Journal of anatomy**, v. 230, n. 1, p. 4-15, 2017.
- DUGDALE, A. S.; THOMPSON, A. R.; LEEDHAM, A.; BEAIL, N.; FREETH, M. Intense connection and love: The experiences of autistic mothers. **Autism**, v. 25, n. 7, p. 1973-1984, 2021.
- FELÍCIO L.F.; FLORIO J.C.; SIDER L.H.; CRUZ-CASALLAS P.E.; BRIDGES R.S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Research Bulletin**, 40(4): 253–6; 1996.
- FELÍCIO, L. F.; CANTERAS, N. S. Maternal choices: neural mediation-caring for young or hunting?. **Neurobiology of the parenteral brain**, 2008.

GAMMIE, S. C.; LOSTEIN, J. S. Maternal aggression. In: RANDY N, (ed.). **Biology of aggression**. Oxford: University Oxford, p. 74-250, 2006.

GIOVENARDI, M.; DE AZEVEDO, M. S.; DA SILVA, S. P.; DO E.S. HERMEL, E.; GOMES, C. M.; LUCION, A. B. Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. **Physiology and Behavior**, v. 86, p. 209-217, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Endocrinologia e reprodução. In: **Fundamentos de Guyton**: Tratado de fisiologia médica. 13<sup>a</sup>. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

HAMPTON, S.; MAN, J.; ALLISON, C.; AYDIN, E.; BARON-COHEN; S.; HOLT, R. A qualitative exploration of autistic mothers' experiences I: Pregnancy experiences. **Autism**, p. 13623613221132435, 2022.

HENSCHEN, C. W.; PALMITER, R. D.; DARVAS, M. Restoration of dopamine signaling to the dorsal striatum is sufficient for aspects of active maternal behavior in female mice. **Endocrinology**, v. 154, n. 11, p. 4316-4327, 2013.

HUNTINGFORD, F. A. Animals fight but do not make war. In: Groebel, J., Hinde, R. A. Aggression and war – their biological and social bases. **Cambridge University Press**, 1989.

JOHNS, J. M.; JOYNER, P. W.; MCMURRAY, M. S.; ELLIOTT, D. L.; HOFER, V. E.; MIDDLETON, C. L.; KNUPP, K. W.; LOMAS, L. M.; WALKER, C. H. The effects of dopaminergic/serotonergic reuptake inhibition on maternal behavior, maternal aggression, and oxytocin in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 4, p. 769-785, 2005.

KIRSTEN, T. B. **Lipopolissacarídeo no início do período pré-natal como modelo experimental de autismo e prejuízos dopaminérgicos estriatais**. 2012. 195 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KLEIN, M. O. **Papel dos receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$  da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na seleção comportamental durante a lactação**. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KOHL, J.; AUTRY, A. E.; DULAC, C. The neurobiology of parenting: A neural circuit perspective. **Bioessays**, v. 39, n. 1, p. 1-11, 2017.

KOHL, G.; YERYS, B.; SCHULTZ, R. T. Striatal development in autism: repetitive behaviors and the reward circuitry. **Biological psychiatry**, v. 76, n. 5, p. 358, 2014.

LENZ, K. M.; SENNELAUB, D. R. Maternal care effects on the development of a sexually dimorphic motor system: the role of spinal oxytocin. **Hormones and Behavior**, v. 58, n. 4, p. 558-575, 2010.

LEYHAUSEN, P. On the functions of the relative hierarchy of moods. **Motivation of Human and Animal Behavior**, v. 2, p. 144-247, 1973.

LONSTEIN, J. S.; LÉVY, F.; FLEMING, A. S. Common and divergent psychobiological mechanisms underlying maternal behaviors in non-human and human mammals. **Hormones and behavior**, v. 73, p. 156-185, 2015.

LONSTEIN, J. S.; STERN, J. M. Somatosensory Contributions to c-fos Activation within the Caudal Periaqueductal Gray of Lactating Rats: Effects of Perioral, Rooting, and Suckling Stimuli from Pups. **Hormones and behavior**, v. 32, n. 3, p. 155-166, 1997.

LOUIE, A. D.; CROMER, L. D.; BERRY, J. O. Assessing parenting stress: Review of the use and interpretation of the parental stress scale. **The Family Journal**, v. 25, n. 4, p. 359-367, 2017.

MAGALHÃES, J.Z. **Estudos comportamentais e neurofisiológicos da exposição prolongada à cetamina como antidepressivo e o modelo de separação materna para indução de depressão pós-parto em ratos**. 2021. 247f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

MAGALHÃES, J.Z.; UDO, M.S.B.; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A.M.; CARVALHO, M.P.N.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Prenatal exposure to fipronil disturns maternal aggressive behavior in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v.52, p.11-16, 2015.

MAYES, R.; LLEWELLYN, G.; MCCONNELL, D. "That's who I choose to be": the mother identity for women with intellectual disabilities. In: **Women's Studies International Forum**. Pergamon, p. 112-120, 2011.

MENDES-LIMA, T. **O estresse materno induz na prole de ratos jovens comportamentos tipo-depressivo-ansioso e resiliência ao estresse: implicações da limitação das condições do ninho**. 86 f. Dissertação (Mestrado) – (Patologia Ambiental e Experimental) Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

KLEIN, M. O. **Papel dos receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$  da substância cinzenta periaquedutal (PAG) na seleção comportamental durante a lactação**. 2012. 80f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MICZEK, K. A.; DE ALMEIDA, R. M.; KRAVITZ, E. A.; RISSMAN, E. F.; DE BOER, S. F.; RAINE, A. Neurobiology of escalated aggression and violence. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 44, p. 11803-11806, 2007.

NEUMANN, I. D.; TOSCHI, N.; OHL, F.; LANDGRAF, R. Maternal defence as an emotional stressor in female rats: correlation of neuroendocrine and behavioural parameters and involvement of brain oxytocin. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, p. 1016-1024, 2001.

NUMAN, M. Maternal behavior, In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds.) **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994.

NUMAN, M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 87, n. 4, p. 746, 1974.

NUMAN M.; FLEMING A.S.; LEVY F. **Maternal behavior**. In: Neil, JD, editor. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 3rd ed. San Diego: Elsevier; p1921-1993, 2006.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 46-64, 2009.

OKINO, E.; MORITA, S.; HOSHIKAWA, Y.; TSUKAHARA, S. The glutamatergic system in the preoptic area is involved in the retention of maternal behavior in maternally experienced female rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 120, p. 104792, 2020.

PARMIGIANI, S.; BRAIN, P. F.; MAINARDI, D.; BRUNONI, V. Different patterns of biting attack employed by lactating female mice in encounters with male and female conspecific intruders. **Journal Comparative Psychology**, v. 102, n. 3, p. 93-287, 1988.

PAWLUSKI, J. L.; LAMBERT, K. G.; KINSLEY, Craig H. Neuroplasticity in the maternal hippocampus: Relation to cognition and effects of repeated stress. **Hormones and behavior**, v. 77, p. 86-97, 2016.

PEDERSEN, C.A.; PRANGE, A.J.Jr. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p.6661-6665., 1979.

POHL, A. L.; CROCKFORD, S. K.; BLAKEMORE, M.; ALLISON, C.; BARON-COHEN, S. A comparative study of autistic and non-autistic women's experience of motherhood. **Molecular Autism**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

POST, C.; LEUNER, B.. The maternal reward system in postpartum depression. **Archives of women's mental health**, v. 22, n. 3, p. 417-429, 2019.

PRUITT, M. M.; RHODEN, M.; EKAS, N. V. Relationship between the broad autism phenotype, social relationships and mental health for mothers of children with autism spectrum disorder. **Autism**, v. 22, n. 2, p. 171-180, 2018.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 1, p.80–89, 2005.

SMILEY, K. O.; LADYMAN, S. R.; GUSTAFSON, P.; GRATTAN, D. R.; BROWN, R. S. Neuroendocrinology and adaptive physiology of maternal care. **Neuroendocrine Regulation of Behavior**, p. 161-210, 2019.

STERN, J. M. Somatosensation and maternal care in Norway rats. In: **Advances in the study of behavior**. Academic Press, p. 243-294. 1996.

STURMAN-HULBE, M.; STONE, C. P. Maternal behavior in the albino rat. **Journal of Comparative Psychology**, v. 9, n. 3, p. 203, 1929.

SUMMERLEE, A.J.; O'BYRNE, K.T.; POTERSKI, R.S. Relaxin inhibits the pulsatile release of oxytocin but increases basal concentrations of hormone in lactating rats. **Biol. Reprod.**, v. 58, p.977-981, 1998.

TALCER, M. C.; DUFFY, O.; PEDLOW, K. A qualitative exploration into the sensory experiences of autistic mothers. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, p. 1-16, 2021.

TEODOROV, E. **Comportamento maternal e o papel dos receptores opióides na substância cinzenta periaquedutal de ratas lactantes**. 2008. 190 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TEODOROV, E.; BERNARDI, M. M.; FERRARI, M. F.; FIOR-CHADI, D. R.; FELICIO, L. F. Plasticity of opioid receptors in the female periaqueductal gray: multiparity-induced increase in the activity of genes encoding for mu and kappa receptors and a post-translational decrease in delta receptor expression. **Journal of Molecular Neurosciences**, v. 43, n. 2, p. 175-181, 2011.

TEODOROV, E., MORAES, A. P., FELICIO, L. F., VAROLLI, F. M., BERNARDI, M. M. 2005. Perinatal maternal exposure to picrotoxin: Effects on sexual behavior in female rat offspring. **Pharmacol Biochem Behavior**, v. 81, p. 935 -942, 2005.

TEODOROV, E.; SALZGEBER, S. A.; FELICIO, L. F.; VAROLLI, F. M. F.; BERNARDI, M. M. Effects of perinatal picrotoxin and sexual experience on heterosexual and homosexual behavior in male rats. **Neurotoxicology Teratology**, v. 24, p. 235-245, 2002.

THOMAS, S. A.; PALMITER, R. D. Impaired maternal behavior in mice lacking norepinephrine and epinephrine. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 583-592, 1997.

UDO, M.S.B.; SANDINI, T.M.; REIS, T.M.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Prenatal exposure to a low fipronil dose disturbs maternal behavior and reflex development in rats. **Neurotoxicology and Teratology**, v.45, p.27–33, 2014.

ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; SANDINI, T.M.; ABREU, G.R.; PETROCELLI, B.M.; MOREIRA, N.; REIS-SILVA, T.M.; LEBRUM, I.; FLÓRIO, J.C.; RICCI, E.L.; FUKUSHIMA, A.R.; WAZIRY, P.A.F.; SPINOSA, H.S. Prolonged exposure of rats to varenicline increases anxiety and alters serotonergic system, but has no effect on memory. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.181, p.1-8, 2019.

ZACCARELLI-MAGALHÃES, J.; ABREU, G. R.; FUKUSHIMA, A. R.; PANTALEON, L. P.; RIBEIRO, B. B.; MUNHOZ, C.; MANES, M.; LIMA, M. A.; MIGLIOLI, J.; FLORIO, J. C.; LEBRUN, I.; WARIRY, P. A. F.; FONSECA, T. L.; BOCCO, B. M. L. C.; BIANCO, A. C.; RICCI, E. L.; SPINOSA, H. S. Postpartum depression in rats causes poor maternal care and neurochemical alterations on dams and long-lasting impairment in sociability on the offspring. **Behavioural Brain Research**, v. 436, p. 114082, 2023.

WINTERS, C.; GORSSSEN, W.; OSSORIO-SALAZAR; V. A., NILSSON, S.; GOLDEN, S.; D’HOOGE, R. Automated procedure to assess pup retrieval in laboratory mice. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2022.