

## EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* AO ÁCIDO VALPROICO NA MORFOLOGIA E NA DENSIDADE NEURONAL NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL ADULTO

Gabriela Rodrigues Damasceno<sup>1\*</sup>, Cristiane Queixa Tilelli<sup>2</sup>

1. Estudante de IC do curso de Farmácia da UFSJ

2. Pesquisadora da UFSJ

### Resumo:

O ácido valproico (AVP), quando administrado intraperitonealmente em ratas prenhas durante o fechamento do tubo neural dos fetos, induz a ocorrência de prole com transtorno de espectro autista (TEA). Este trabalho visou o estudo de áreas cerebrais com alterações já conhecidas nesta disfunção cerebral, como Amígdala e áreas ainda não estudadas: Núcleo Rubro, Substância Negra Compacta e Substância Negra Reticulada.

Ratas prenhas foram injetadas com AVP (500 mg/Kg) no 12,5º dia gestacional. As proles, com 7 semanas de vida, foram anestesiadas e perfundidas. Os cérebros foram cortados em fatias de 40 micrômetros de espessura para o preparo de lâminas histológicas e foi realizada coloração de Nissl. Fotos foram adquiridas digitalmente em microscópio óptico e realizou-se análise cega no programa *ImageJ*®.

A exposição *in utero* ao AVP causou aumento do número de células grandes no Núcleo Rubro. Essa alteração pode ter ocorrido para uma compensação devido à diminuição do cerebelo no TEA.

**Autorização legal:** Aprovação pela CEUA da UFSJ, protocolo 44/2014.

**Palavras-chave:** Transtorno do espectro autista; Modelo animal; Morfologia neuronal.

**Apoio financeiro:** UFSJ

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UFSJ

### Introdução:

O AVP é um anticonvulsivante usado para tratar vários tipos de epilepsia e transtorno bipolar (Martim *et al*, 2014). Quando administrado *in utero* pode causar defeitos no tubo neural, sendo esses congênitos e cognitivos (Adans *et al.*, 1990).

A injeção de AVP durante o desenvolvimento intrauterino foi proposta como um mo-

delo para se estudar o TEA, visto que sua etiologia ainda não está clara e que existem diversas possibilidades para seu desenvolvimento (Bernardi *et al*, 2012; Perreira *et al*, 2012; Gadad *et al*, 2013).

Atualmente o TEA engloba os seguintes sintomas: deficiências intrínsecas para estabelecer contato afetivo e interpessoal, desenvolvimento prejudicado da linguagem, comportamentos estereotipados e limitada gama de atividades e interesses, bem como a Síndrome de Asperger e autismos atípicos (Parellada *et al*, 2013). Em cérebros *post-mortem* foram percebidas alterações morfológicas e estruturais (Gadad *et al.*, 2013).

A Amígdala (AM) é essencial no processamento afetivo, comportamento social, reconhecimento facial e emocional. Pode ser parte da etiologia do autismo, com um possível papel no caso de estereotípias (Wang *et al.*, 2015).

O Núcleo Rubro (NR) é um centro de integração motor esferóide, que compreende a regulação dos movimentos dos membros superiores. O NR conecta principalmente áreas motoras do córtex ao cerebelo e medula. Estudos sugerem que ele esteja envolvido na postura, porque é capaz de modular neurônios motores  $\gamma$  e movimentos de preensão juntamente com agarramento (Lent *et al*, 2010; Milardi *et al.*, 2016).

Já a Substância Negra Compacta (SNc) e a Substância Negra Reticulada (SNr) são estruturas dos núcleos da base e localizam-se no mesencéfalo. As funções dos núcleos da base consistem, principalmente, em controlar as funções motoras e cognitivas, através de aferentes corticais e eferentes inibitórios para tálamo e mesencéfalo (Lent *et al*, 2010).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar células de áreas do Sistema Nervoso Central com funções relacionadas ao TEA, por meio da análise de áreas cerebrais com alterações já conhecidas, como AM e áreas ainda não estudadas: NR, SNc e SNr.

## Metodologia:

Ratos Wistar machos adultos foram colocados juntos a ratos Wistar fêmeas durante 12 horas no período noturno a fim de que houvesse copulação. O coito era confirmado pelo achado de *plug* copulatório ou presença de espermatozoides no lavado vaginal, determinando-se o dia 0 de gestação.

Ratas prenhas foram injetadas com AVP (500 mg/Kg) no 12,5º dia gestacional (controles = NAIVE). A gestação ocorreu normalmente, o parto foi natural e sem qualquer manipulação na prole ou na progenitora, evitando canibalismo ou desprezo da mãe pelos filhotes. Os filhotes foram desmamados aos 21 dias após o nascimento, sendo a partir de então alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

As proles, com 7 semanas de vida, foram anestesiadas com cetamina e xilazina (120 e 12 mg/Kg, respectivamente) e perfundidas através do ventrículo direito com tampão fosfato-salina (PBS 0,1 M, pH 7,4), seguido por paraformaldeído (PFA 4% p/v em PBS). Após a perfusão, os cérebros foram colocados por 2 horas no fixador. Os cérebros foram transferidos para soluções tampão com sacarose 15% e 30% e congelados. Cortes de 40 micrômetros de espessura foram obtidos em criostato. As fatias foram transferidas para lâminas histológicas gelatinizadas, secas *overnight*, e tratadas para coloração de Nissl. Adquiriram-se fotos digitalmente em microscópio óptico e realizou-se análise cega por 3 pesquisadores independentes, no programa *ImageJ*®.

## Resultados e Discussão:

Resultados foram avaliados por teste *t-Student* (distribuição normal; média  $\pm$  desvio padrão) ou *Mann Whitney* (distribuição não-normal; mediana, percentis 25-75), com  $p < 0,05$  indicando significância estatística (\*). Foram avaliados número (N) e tamanho (T) de células grandes (CG), médias (CM) e pequenas (CP). AM: NCG (NAIVE  $148,75 \pm 9,85$ , AVP  $131,70 \pm 17,99$ ), NCP (NAIVE  $59,12 \pm 14,64$ , AVP  $61,60 \pm 14,51$ ), TCG (NAIVE  $12,69$ ,  $12,40-13,21$ ; AVP  $12,91$ ,  $12,40-15,38$ ), TCP (NAIVE  $4,35 \pm 0,21$ , AVP  $4,30 \pm 0,219$ ); NR: NCG (NAIVE  $13,44 \pm 1,50$ , AVP  $17,75 \pm 1,66$ , \*), NCM (NAIVE  $7,00 \pm 1,50$ , AVP  $10,63 \pm 3,79$ ), NCP (NAIVE  $129,44 \pm 7,26$ , AVP  $115,17 \pm 19,33$ ), TCG (NAIVE  $20,81 \pm 1,078$ , AVP  $21,66 \pm 3,79$ ), TCM (NAIVE  $11,03 \pm 1,78$ , AVP  $11,33 \pm 1,83$ ), TCP (NAIVE  $3,36 \pm 0,14$ , AVP  $3,36 \pm 0,14$ ); SNc: NCG (NAIVE  $20,25 \pm 7,41$ , AVP  $23,62 \pm 15,22$ ), TCG (NAIVE  $20,03$

$\pm 1,78$ , AVP  $19,38 \pm 1,18$ ), SNr: NCG (NAIVE  $23,83 \pm 9,44$ , AVP  $26,50 \pm 10,75$ ), NCP tipo 1 (NAIVE  $27,25 \pm 5,60$ , AVP  $70,87 \pm 4,48$ ), NCP tipo 2 (NAIVE  $78,62 \pm 12,55$ , AVP  $70,87 \pm 4,48$ ), TCG (NAIVE  $20,65 \pm 2,10$ , AVP  $19,19 \pm 1,32$ ), TCP tipo 1 (NAIVE  $4,90 \pm 0,24$ , AVP  $4,60 \pm 0,52$ ), TCP tipo 2 (NAIVE  $6,12 \pm 0,29$ , AVP  $5,89 \pm 0,30$ ).

A exposição *in utero* ao AVP causou aumento do número de células grandes no NR, que tem função motora apendicular, junto ao córtex motor e ao cerebelo. Essa alteração pode ter ocorrido como meio de compensação devido à diminuição do cerebelo no TEA. Há possibilidade de aumento da densidade de células no NR sem aumento do seu número absoluto, pois não foi realizado estudo do volume total desta estrutura. Não se observou alterações nas demais estruturas avaliadas. Alterações no NR aqui encontradas, se confirmadas, podem ter relação causal ou compensatória ao TEA.

## Conclusões:

A administração *in utero* de AVP induziu ao aumento do número das células grandes do NR. Novos estudos, mais complexos, são necessários para a confirmação dos resultados aqui obtidos e sua relação com o TEA.

## Referências bibliográficas

- ADAMS, J.; VORHEES C. V.; MIDDAUGH, L. D. Developmental neurotoxicity of anticonvulsants: human and animal evidence on phenytoin. **Neurotoxicol Teratol**, v. 12, n. 3, p. 203-214. 1990.
- BERNADI, M. M.; KIRSTEN, T. B.; TRINDADE M. O. Sobre o autismo, neuroinflamação e modelos animais para o estudo de autismo: uma revisão. **Revista de Neurociências**, v. 20, n. 1, p. 117-127. 2012.
- GADAD, B. S.; HEWITSON, L.; YOUNG, K. A.; GERMAN, D. C. Neuropathology and animal models of autism: Genetic and environmental factors. **Austim Research and Treatment**, p. 12. 2013.
- LENT, R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. 2.ed. São Paulo: **Atheneu**, 2010.
- MARTIN, H. G. S.; MANZONI, O. J. Late onset deficits in synaptic plasticity in the valproic acid rat modelo of autism. **Frontier in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. 23, p. 1-8. 2014.

MILARDI, D. CACCIOLA, A.; CUTRUNEO, G.; MARINO, S. IRRERA, M.; CACCIOLA, G.; CIOLLI, P.; ANASTASI, G.; CALABRÒ, R. S. Red nucleus connectivity as revealed by constrained spherical deconvolution tractography. **Neuroscience Letters**, v. 626, p. 68-73. 2016.

PARELLADA, M.; PENZOL, M.J.; PINA, L.; MORENO, C.; GONZÁLEZ, V. E.; ZALSMAN, G.; ARANGO, C. The neurobiology of autism spectrum disorders. **Eur Psychiatry**, v. 29, n. 1, p. 11-19. 2014.

PEREIRA, A.; PEGORARO, L. F. L.; CENDES F. Autism and Epilepsy: models and mechanisms. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 18, p. 92-96. 2012.

WANG, S. S. H.; KLOTH, A. D.; BADURA, A. The cerebellum, sensitive periods, and autism. **Neuron**, v. 83, n. 3, p. 518-532. 2015.