



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE



Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento

Adelisandra Silva Santos Castelhana

***STATUS EPILEPTICUS* NEONATAL LEVA A PREJUÍZOS NA INTERAÇÃO
SOCIAL DE MANEIRA GÊNERO-DEPENDENTE:
NOVO MODELO ANIMAL PARA INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS
NEUROBIOLÓGICOS ENVOLVIDOS COM O TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA?**

São Paulo
2009



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE



Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento

Adelisandra Silva Santos Castelhana

***STATUS EPILEPTICUS* NEONATAL LEVA A PREJUÍZOS NA INTERAÇÃO
SOCIAL DE MANEIRA GÊNERO-DEPENDENTE:
NOVO MODELO ANIMAL PARA INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS
NEUROBIOLÓGICOS ENVOLVIDOS COM O TRANSTORNO DO
ESPECTRO AUTISTA?**

Dissertação Vinculada à Linha de Pesquisa Básica em Neurobiologia e Comportamento no Desenvolvimento e Seus Transtornos, apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento da Universidade Presbiteriana Mackenzie de São Paulo para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Monterazzo Cysneiros

São Paulo
2009

C348s Castelhana, Adelisandra Silva Santos.

Status epilepticus neonatal leva a prejuízos na interação social de maneira gênero-dependente: novo modelo animal para investigação dos mecanismos neurobiológicos envolvidos com o transtorno do espectro autista? / Adelisandra Silva Santos Castelhana – 2010.

47 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Distúrbio do Desenvolvimento) -
Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2010.

Bibliografia: f. 39-44.

Orientador: Profa. Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros

1. TEA. 2. *Status epilepticus*. 3. Modelo animal.
4. Prejuízo na interação social. 5. Gênero. I. Título.

CDD 616.8982



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE



Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento

São Paulo, 26 de janeiro de 2010.

Comissão Examinadora

Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Distúrbios do Desenvolvimento

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Primeira Examinadora: Profa. Dra. Maria Cristina Triguero Veloz Teixeira
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Segundo Examinador: Prof. Dr. Fúlvio Alexandre Scorza
Universidade Federal do Estado de São Paulo

Aos meus queridos pais Adelino e Sandra, por sempre encorajarem a enfrentar os obstáculos, me levantar a cada tombo para dar continuidade à caminhada da vida e jamais desistir. O meu mais profundo agradecimento por cada segundo de dedicação e por me ensinarem a força da vida.

Dedico também a minha querida orientadora, Profa. Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros, que me acolheu com todo seu amor, me deu direção para o caminho do conhecimento e por todos os momentos de aprendizado científico e humano.

O que posso dizer-lhes, é que:

Se hoje eu tenho sido capaz de enxergar mais longe é porque tenho subido nos ombros de gigantes e vocês são esses gigantes, na minha caminhada em busca do saber.

Obrigada por me incentivarem e por me ensinarem que nunca devemos desistir e sempre lutar pelos sonhos e idéias de vida.

A minha querida Tia Deise, (*in memoriam*) amiga, companheira, confidente, que sempre foi muito presente na minha vida, que faz uma falta enorme aqui nessa dimensão, obrigada por toda sua dedicação e amor em cada segundo que passamos juntas.

AGRADECIMENTOS

Deus, por ter me dado sempre oportunidades e muita coragem para enfrentar a caminhada terrena, por estar sempre presente em todos os momentos, me dando discernimento e sabedoria a cada etapa concluída e por colocar pessoas iluminadas em minha caminhada. Sem o Senhor, me guiando jamais teria tanta força...

Aos meus queridos pais por toda dedicação e por serem muito presente na minha vida. Amo vocês eternamente!

A minha mãezinha, que sempre me ajuda com suas palavras, com seu colo amigo, por todo sacrifício que fez em sua vida por mim e por me ajudar no decorrer desse trabalho.

Aos meus irmãos Naira e Naro, por todo amor que me dedicam.

A minha querida Vovozinha, que sempre esteve em oração por mim, durante toda essa jornada e não cansou de orar pedindo por mim e pelos que me ensinavam e por todo seu amor. Você é uma jóia rara, amo você.

A minha querida orientadora Roberta Monterazzo Cysneiros, por ter estendido a sua mão durante toda essa caminhada confiando, incentivando, ensinando e por ter enfrentado comigo todos os desafios, me mostrando que todos podem errar aprender e lutar cada vez mais contra as dificuldades. Eu ganhei o bilhete premiado, por ter caminhado com você nesse processo de aprendizado e crescimento.

Ao professor Dr. Fúlvio Alexandre Scorza, por toda sua contribuição, colaboração e incentivo no decorrer da dissertação e pelo espaço muitas vezes cedido no laboratório de Neurologia Experimental (UNIFESP).

À professora Dra. Maria Cristina Triguero Veloz Teixeira, por toda sua contribuição e pela disponibilidade sempre.

A todos os professores do programa de Pós Graduação em Distúrbio do Desenvolvimento.

À Gisa Baumgarth, que me deu direção em muitos sentidos da minha caminhada terrena, meu sincero agradecimento por me ajudar a enfrentar os obstáculos da vida.

As minhas queridas amigas Ana Elizabeth, Fernanda e Renata, por toda paciência, dedicação, amizade e pela força durante toda a caminhada que fizemos juntas e pelas trocas de aprendizado e crescimento.

À minha amiga Silvana, que sempre aparece nos momentos de maiores dificuldades.

As colegas da iniciação científica Carolina Vono e Gabriela Marinzeck, e a mestranda Gisane Novaes, pela amizade e todo apoio.

Aos funcionários e colegas de laboratório por toda ajuda.

Aos funcionários do Mackenzie que contribuíram para andamento desse trabalho.

A todas as pessoas que aqui não foram citadas, mas contribuíram de forma direta e indireta, meus agradecimentos.

Ao Mack Pesquisa, pelo seu apoio financeiro.

A Capes, pela concessão da bolsa de estudo, que foi de grande importância para mim.

*Sem sonhos, as pedras se tornam insuportáveis,
As pedras do caminho se tornam montanhas,
Os fracassos se tornam em golpes fatais.
Mas, se você tiver grandes sonhos...
Seus erros produzirão crescimento,
Seus desafios produzirão oportunidades,
Seus medos produzirão coragem.
Por isso:
Nunca desista dos seus sonhos.
(Augusto Cury)*

RESUMO

Os Transtornos do Espectro Autista (TEA) são condições que afetam o desenvolvimento cerebral prejudicando a interação social recíproca, a comunicação verbal e não verbal e são acompanhados por comportamentos repetitivos e padrões anormais de interesses e atividades. Apesar da riqueza dos dados obtidos a partir da história dos pacientes, dos exames de neuroimagem, dos estudos genéticos e moleculares, a patogênese do TEA permanece mal compreendida. Modelos animais têm propiciado a ampliação do conhecimento acerca da neurobiologia dos TEA. O *Status epilepticus* (SE), uma condição aguda caracterizada por convulsões repetitivas ou prolongada, é uma emergência clínica que ocorre mais frequentemente em crianças que em adultos, e em 40-50% dos casos em crianças com idade inferior a dois anos. Estudos clínicos e experimentais indicam que embora o SE produza menos danos estruturais no cérebro imaturo que no cérebro adulto, SE em neonatos leva a prejuízos na aprendizagem, memória, sequelas emocionais na idade adulta, alteração da circuitaria GABAérgica hipocampal e intracortical, e redução dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal. Este trabalho teve como objetivo avaliar se o SE em ratos neonatos de ambos os gêneros produz prejuízos na interação social, na cognição e no comportamento exploratório. Ratos wistar de ambos os gêneros com nove dias pós-natal (PN9) receberam injeção intraperitoneal de pilocarpina (380 mg/kg). Animais controles receberam solução salina. Os comportamentos sociais e exploratórios foram avaliados entre PN30-PN35, empregando-se o paradigma de observação por pares. O desempenho cognitivo foi avaliado empregando-se a caixa de Skinner, quantificando-se o número de sessões para aquisição do comportamento de pressão à barra. Os resultados mostraram que o SE no cérebro em desenvolvimento alterou a sociabilidade, a cognição e o comportamento exploratório. Os prejuízos na interação social foram gênero-dependentes, afetando predominantemente os machos. O comportamento exploratório foi reduzido em ambos os gêneros, no entanto, as fêmeas parecem ter sido mais afetadas, desde que paralelamente observou-se aumento do *selfgrooming*. Ambos os comportamentos são afetados pela emocionalidade e pelo contexto ambiental, sugerindo que o SE afetou mais severamente a emocionalidade das fêmeas. Os prejuízos cognitivos foram igualmente observados em ambos os gêneros. Baseando-se nestas evidências, sugerimos que este modelo pode ser utilizado para explorar mecanismos neurobiológicos do TEA.

Palavras-chave: TEA, *status epilepticus*, modelo animal, prejuízo na interação social, gênero.

ABSTRACT

The Autism Spectrum Disorders (ASD), conditions which affect the brain development, are characterized by impairments in reciprocal social interactions, communicative use of verbal and nonverbal language, and restricted/repetitive behaviors. Despite a wealth of descriptive data obtained from patient histories, imaging techniques, and genetic and molecular studies, the pathogenesis of ASD remains poorly understood. Progress toward understanding the etiology of an acquired neurological disorder, such as ASD, is largely dependent on the degree to which experimental animal models reflect the human condition. *Status epilepticus* (SE), the condition of ongoing seizures or repetitive seizure activity, is a clinical emergency more common in children than adults, with almost 40-50% of the case occurring in children younger than 2 years of age. Clinical and experimental studies have been showing that despite of immature brain to be more resistant to structural damage when compared with adult brain, it has been demonstrated that neonatal SE may produce learning deficits, memory impairment, and emotional sequels in adulthood, altered GABAergic intracortical and hippocampal circuitries and reduced dopamine levels in the prefrontal cortex. Taking all information together, the aim of the present study was to evaluate a possible social impairment, learning and exploratory deficits after pilocarpine-induced SE in rats of both genders during development. Wistar rats of both gender at PN9 received intraperitoneal injection of pilocarpine (380 mg/kg). Control animals received saline solution instead pilocarpine. Social and exploratory behaviors were assessed between 30-35 postnatal days using paired-exposure paradigm. Learning performance was assessed, at PN90 using skinner Box apparatus, by quantification of the number of sections to acquire bar pressing conditioning. Our results demonstrated that neonatal SE produced social impairment, learning and exploratory deficits. Furthermore, the social impairment was gender-dependent, affecting predominantly male rats. On the other hand, the exploratory behavior was reduced in both genders, however female rats seems to be more affected, since *selfgrooming* was enhanced in this specific group. Quite interesting, both behaviors are affected by emotionality and environmental context, suggesting that SE was able to affect more severely the emotionality of the female animals. Moreover, it is also important to note that learning deficits were observed in both genders as well. Based on this evidences, we propose that this animal model can be a valuable tool to investigate the neurobiological basis of ASD.

Key-words: ASD, *status epilepticus*, animal model, social impairment, gender.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática do processo de maturação neural mediado pelo GABA	14
FIGURA 2: Caixa de Condicionamento Operante (Caixa de Skinner)	23

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Efeito do (<i>SE</i>) no comportamento de ratos.....	18
TABELA 2: Repertório comportamental dos ratos machos modificado pelo <i>SE</i> e ou pelo isolamento social.....	28
TABELA 3: Repertório comportamental dos ratos machos não modificado pelo <i>SE</i> e ou pelo isolamento.....	28
TABELA 4: Repertório comportamental de ratos fêmeas modificado pelo <i>SE</i> e ou pelo isolamento social.....	29
TABELA 5: Repertório comportamental de ratos fêmeas não modificado pelo <i>SE</i> e ou pelo isolamento social.....	30
TABELA 6: Repertório comportamental alterado pelo <i>SE</i> : comparação entre os gêneros.....	31
TABELA 7: Número de sessões para aquisição do comportamento de pressão à barra.....	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Autismo	12
2. OBJETIVO	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Animais utilizados	21
3.2. Grupos experimentais	21
3.3. Indução do <i>Status epilepticus (SE)</i>	22
3.4. Testes comportamentais	22
3.4.1. Comportamentos de brincar, sociais e exploratório	22
3.4.2. Caixa de Condicionamento Operante	23
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Comportamentos de brincar, sociais e exploratório	26
5.2. Comparações entre os gêneros do efeito <i>SE</i> sobre alterações comportamentais	30
5.3. Caixa de Condicionamento Operante (Caixa de Skinner)	31
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Presbiteriana Mackenzie	45
ANEXO 2: Protocolo dos comportamentos de brincar, social e exploratório	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Autismo

O termo “autismo” foi criado por Bleuler, para caracterizar os sintomas negativos e as alienações sociais de indivíduos que sofriam de esquizofrenia, sendo posteriormente utilizado por Kanner em 1943, para descrever crianças com incapacidades do desenvolvimento e com uma singularidade caracterizada por profundo déficit de relacionamento interpessoal (TUCHMAN *et al.*, 2009).

Segundo o Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM- IV-TR, 2002), o autismo é um Transtorno Global do Desenvolvimento, que consiste em uma tríade de dificuldades: sociabilidade, comunicação e comportamentos que são restritos, repetitivos e estereotipados.

Por sua vez, o Transtorno do Espectro Autista (TEA) representa uma classe de transtornos que compartilham características semelhantes e inclui diferentes diagnósticos: Autismo, Síndrome de Asperger, Transtorno invasivo do desenvolvimento sem outra especificação e transtorno desintegrativo da infância.

A prevalência dos TEAs aumentou ao longo dos últimos anos. Estima-se que a prevalência do autismo seja de 20/10.000, do transtorno do espectro autista sem outra especificação de 30/10.000 e do transtorno desintegrativo da infância de 2/100.000. No que tange ao Autismo, FOMBONNE (2009) revisou os resultados de 43 artigos publicados desde 1966 e observou que a prevalência foi negativamente correlacionada com o tamanho da amostra, que a correlação entre prevalência e ano da publicação foi estatisticamente significativa e que estudos com prevalência maior que 7/10.000 foram publicados a partir de 1987. Nos estudos publicados a partir do ano 2000, a estimativa de prevalência oscilou entre 7,2/10.000 e 40,5/10.000, com uma prevalência média 20,6/10.000. A revisão cuidadosa da literatura permitiu inferir que o aumento da prevalência é reflexo de um conjunto de fatores que abarca a maior eficiência dos métodos utilizados para identificação dos casos, melhoria da prática para o diagnóstico bem como da maior disponibilidade ao serviço.

Pesquisas clínicas e epidemiológicas apontam maior incidência de autismo em meninos numa relação 4:1 podendo variar, no entanto, em função do grau de funcionamento intelectual (KLIN, 2006)

Após décadas de estudo, a patogênese do autismo permanece desconhecida. Vários estudos têm mostrado evidências que indicam a importância de fatores genéticos (FOLSTEIN & PIVEN, 1991; FOLSTEIN & ROSEN-SHEIDLEY, 2001), e de fatores ambientais, como a exposição às substâncias teratogênicas como a talidomida (STROMLAND *et al.*, 1994), ácido valpróico (CHRISTIANSON, CHESLER & KROMBERG, 1994; WILLIAMS & HERSH, 1997; WILLIAMS & HERSH, 2001) e etanol (NANSON, 1992). Vários estudos têm sugerido que o autismo é resultante destes dois fatores. A alta taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos (MZ) (36–96%) comparada à dos gêmeos dizigóticos (DZ) (0-30%) apontam para uma hereditariedade elevada. Contudo, deve-se considerar que alguns aspectos do ambiente pré-natal, assim como do pós-natal, tendem a ser mais similares nos gêmeos MZ do que nos DZ; por exemplo, aproximadamente 75% dos gêmeos MZ, mas menos de 10% dos DZ, parecem compartilhar da vascularização intrauterina (HALL, 2007). Assim, a interação gene-ambiente pode produzir uma concordância muito mais elevada nos gêmeos MZ do que nos gêmeos DZ. Contudo, o mecanismo preciso desta interação permanece desconhecido (VOLKMAR & PAULS, 2003; BARON-COHEN & BELMONTE, 2005; McDOUGLE *et al.*, 2005).

Neonatos e crianças apresentam alto risco para convulsões quando comparado aos adultos. No período peri-natal, os neonatos apresentam risco elevado para exposição a insultos que podem resultar em crises convulsivas. Estes insultos incluem traumatismo do nascimento, insulto hipóxico-isquêmico, infecções peri-natais, hemorragia intracraniana e distúrbios metabólicos. Além do maior risco de exposição aos insultos cerebrais, o cérebro imaturo é mais susceptível para convulsões que o cérebro maduro (BEN-ARI *et al.*, 2006). Os mecanismos responsáveis pelo aumento da excitabilidade no cérebro imaturo não são completamente compreendidos, mas são dependentes da idade. O aumento da susceptibilidade tem sido atribuído, em parte, à ação excitatória do ácido gama aminobutírico (GABA) em todas as estruturas cerebrais, e em todas as espécies, incluindo primatas, sugerindo que este mecanismo é preservado ao longo da evolução (BEN-ARI *et al.*, 2006). Em ratos, o GABA exerce efeito despolarizante até

cerca do décimo quarto dia pós-natal (KHAZIPOV *et al.*, 2004) e até o terceiro trimestre em primatas (KHAZIPOV *et al.*, 2001). Os efeitos despolarizantes do GABA devem-se ao acúmulo de íons cloreto dentro dos neurônios imaturos, e ao seu efluxo quando o receptor $GABA_A$ é estimulado (BEN-ARI *et al.*, 1989; 1994; 2002; 2007; CHERUBINI *et al.*, 1990) deflagrando o aumento da concentração de cálcio intracelular. Com a progressão do desenvolvimento a $[Cl^-]_i$ (íons cloreto) diminui e os receptores $GABA_A$ adquirem sua sinalização clássica hiperpolarizante, que resulta no influxo de íons cloreto quando o receptor é estimulado. Este processo é dependente da substituição balanceada de transportadores iônicos na membrana neuronal: NKCC1 (co-transportador de sódio, potássio e cloro) e KCC2 (co-transportador de potássio e cloro). O NKCC1 se expressa mais prematuramente que o KCC2, e acumula íons Cl^- intracelularmente, e o KCC2, que se expressa posteriormente, bombeia os íons Cl^- para fora da célula. A substituição gradual destes transportadores favorece a manutenção de baixa concentração intracelular de Cl^- em neurônios maduros e o aparecimento da resposta GABAérgica hiperpolarizante (Fig. 1) (BEN-ARI *et al.*, 2006; FIUMELLI & WOODIN, 2007; AKERMAN & CLINE, 2007; GALANOPOULOU, 2008).

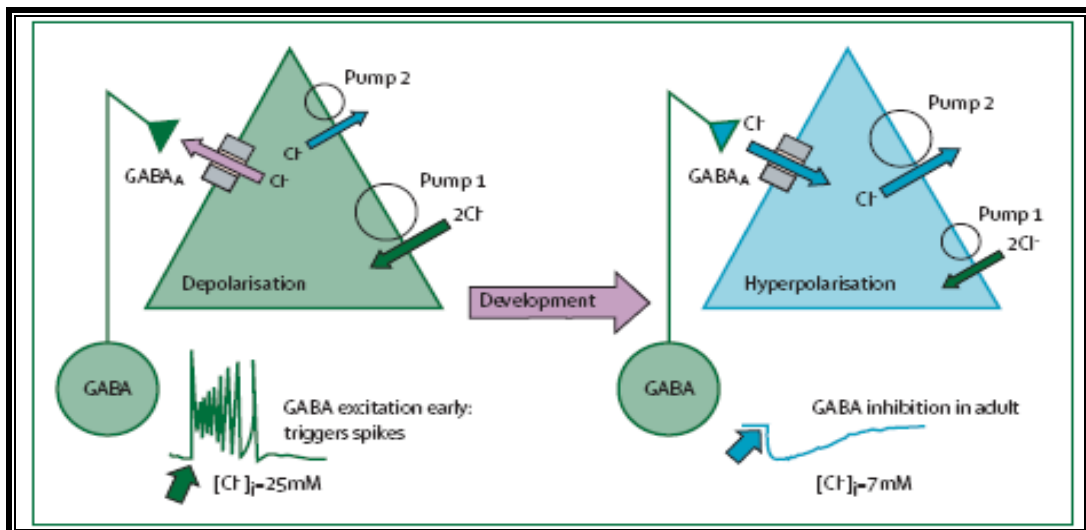


Fig. 1: Representação esquemática do processo de maturação neural mediado pelo GABA. (Fonte: BEN-ARI, *et al.*, 2006)

Vários estudos têm mostrado evidências convincentes que a resposta despolarizante mediada pelo GABA exerce um fator chave no desenvolvimento do circuito neural. A resposta despolarizante mediada pelo receptor $GABA_A$ ativa canais

de cálcio e sódio dependentes de voltagem e reduz o bloqueio, mediado pelo magnésio, no receptor glutamatérgico do tipo NMDA (N-metil -D-ácido aspártico). Estes efeitos influenciam a atividade neuronal e também deflagram processos de sinalização que controlam a proliferação, migração e diferenciação neuronal (BEN-ARI *et al.*, 2007; GALANOPOULOU, 2008). Estudos *in vivo* e *in vitro* enfatizam que a alteração no decurso temporal que governa a transformação da sinalização despolarizante para hiperpolarizante pode resultar em anormalidades do desenvolvimento.

Embora muitas convulsões em crianças sejam benignas e não resultem em conseqüências em longo prazo, estudos em animais têm mostrado evidências sugerindo que crises convulsivas prolongadas durante o desenvolvimento cerebral resultam em seqüelas permanentes. Estas crises podem interferir com o desenvolvimento cerebral por alterar o desenvolvimento das redes corticais através de modificações epigenéticas (BEN-ARI & HOLMES, 2006; GALANOPOULOU & MOSHÉ, 2009). Por outro lado, no que tange ao TEA, estudos de neuroimagem demonstram que múltiplas áreas corticais e subcorticais estão alteradas, primariamente o cerebelo (COURCHESNE *et al.*, 1988; 1994), córtex frontal (CARPER & COURCHESNE, 2000), córtex temporal (ZILBOVICIUS *et al.*, 2000), hipocampo (NICOLSON *et al.*, 2006), amígdala (AYLWARD *et al.*, 1999), corpo caloso (PIVEN *et al.*, 1997) e algumas vezes o estriado, tálamo e gânglios da base (CODY, PELPHREY & PIVEN, 2002; SANTANGELO & TSATSANIS, 2005). Além das alterações estruturais, numerosas moléculas importantes para o desenvolvimento das sinapses, plasticidade sináptica, organização cortical, migração neuronal, neurotransmissão e neuromodulação estão também alteradas no TEA. Estas alterações podem ser resultantes de mutações genéticas, e de fato, mais de 30 genes candidatos já foram relacionados aos TEAs, bem como de fatores ambientais através de modificações epigenéticas. A epigenética estuda as alterações na expressão dos genes sem que ocorra alteração na sequência do DNA. Recentemente demonstrou-se que o ácido valpróico utilizado no tratamento da epilepsia e do transtorno bipolar e cuja exposição pré-natal aumenta o risco para o desenvolvimento do autismo infantil (CHRISTIANSON, CHESLER & KROMBERG, 1994; WILLIAMS & HERSH, 1997), inibe a histona desacetilase a qual está associada com a regulação epigenética da expressão gênica (FUKUCHI *et al.*, 2009). Utilizando a técnica de microarranjos demonstrou-se que a expressão do

RNA_m do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e da subunidade $\alpha 4$ do receptor GABA_A, conhecido por estar envolvido na epileptogênese, foram suprarregulados, contudo os genes para GABAAR $\gamma 2$ (subunidade gama2 do receptor GABA_A), GAD65 e 67 (enzima responsável pela síntese do GABA) e para o co-transportador KCC2, envolvidos no desenvolvimento e maturação do sistema GABAérgicos, foram infraregulados. Consistente com estes resultados, alteração no BDNF, envolvido na regulação da proliferação celular, migração, sinaptogênese e crescimento da arborização axonal e dendrítica, foram relatados nos sujeitos com autismo. Nível elevado de BDNF foi encontrado no sangue de crianças com TEA (NELSON *et al.*, 2001), bem como auto-anticorpos contra BDNF foram também encontrados no soro de crianças com TEA (CONNOLLY *et al.*, 2006). Alteração no sistema inibitório GABAérgico também foram relatados no TEA, especialmente nos genes relacionados as subunidades do receptor GABA_A (MENOLD *et al.*, 2001).

Esta evidência sugere que outros fatores ambientais podem utilizar-se de mecanismos similares para modular a expressão de moléculas importantes para o desenvolvimento, maturação e plasticidade sináptica e estas alterações podem contribuir para alterações das funções cerebrais.

Status epilepticus (SE), uma condição aguda caracterizadas por convulsões repetitivas ou prolongadas, é uma emergência clínica que afeta entre 120.000 a 200.000 pessoas por ano nos Estados Unidos (NEILL *et al.*, 2005; LOWENSTEIN, 2006). Ocorre mais frequentemente em crianças que em adultos, e em 40-50% dos casos crianças com idade inferior a dois anos (SHINNAR *et al.*, 1997).

Embora os exames histológicos indiquem que o *SE* produz menos danos no cérebro imaturo que no cérebro adulto (ALBALA, MOSHE & OKADA, 1984; STAFSTROM *et al.*, 1993; SPERBER, 1996; DUBE, MARESCAUX & NEHLIG, 2000) o *SE* em neonatos causa prejuízos na aprendizagem, memória e sequelas emocionais na idade adulta (HOLMES *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2002; STAFSTROM *et al.*, 2002; KUBOVA *et al.*, 2004).

No entanto, nos pacientes, o conjunto de variáveis pode confundir uma interpretação fiel, se as crises isoladamente ou a etiologia de base ou outro fator relacionado são responsáveis pelos déficits. Desta maneira, a utilização de modelos experimentais permite a observação e análise de variáveis sob condições controladas e têm sido utilizados para explorar estas questões.

Estudos em animais demonstram que apesar do cérebro imaturo ser mais susceptível às crises convulsivas, é mais resistente aos danos estruturais, especialmente no que se refere à perda celular hipocampal. Apesar da ausência de perda neuronal, estudos em modelos animais têm provado evidências que as crises convulsivas produzem alterações funcionais, estruturais e plásticas (reorganização sináptica, redução da neurogênese) e comportamentais que são largamente dependentes do estágio de desenvolvimento do cérebro (SCANTLEBURY *et al.*, 2007) aumentando o potencial epileptogênico que persiste na vida adulta (SAYIN, SUTULA & STAFSTROM, 2004; TUCHMAN, MOSHÉ & RAPIN, 2009).

A maioria dos modelos utiliza drogas convulsivantes para induzir crises agudas que mimetizam o *Status epilepticus*. Posteriormente, avalia-se a função cognitiva, o comportamento e o dano neuronal empregando métodos histológicos. As comparações entre os estudos são difíceis devido aos diferentes agentes convulsivantes empregados, idade do animal no momento da indução do SE, diferentes idades no momento da avaliação e diferentes testes para avaliação do comportamento.

Em ratos com idade pós-natal entre PN 7-9, que corresponde a um neonato a termo (SCANTLEBURY *et al.*, 2007), DOS SANTOS *et al.*, (2000) demonstraram que o *Status epilepticus* induzido pela administração de pilocarpina por três dias consecutivos produziu atividade epileptiforme hipocampal/neocortical, hiperexcitabilidade persistente *in vitro*, apoptose hipocampal e talâmica, e prejuízo cognitivo na idade adulta. Neste mesmo modelo, DA SILVA *et al.* (2005) demonstraram a ocorrência de alterações na microarquitetura hipocampal e cortical evidenciadas pela redução das células positivas para parvalbumina e aumento da imunoreatividade para a enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD 65), respectivamente. A tabela abaixo sumariza o efeito do SE sobre o repertório comportamental.

Até o presente, não há estudos que explorem prejuízos no comportamento social de roedores expostos ao SE em idade equivalente a um neonato a termo.

Tabela 1: Efeito do SE no comportamento de ratos. AC= ácido caínico. CRH= fator liberador de corticotrofina. PILO= pilocarpina. LAM= labirinto aquático de Moris. LR= Labirinto radial. CA= campo aberto. LCE= labirinto em cruz elevado.

REFERÊNCIA	INDUTOR	IDADE SE	IDADE DO TESTE	COMPORTAMENTO
<i>Status epilepticus</i> (único)				
(STAFSTROM <i>et al.</i> , 1993)	AC	P5-60	P80	Déficit dependente da idade (só P30) no LAM
(LYNCH <i>et al.</i> , 2000)	AC	P1-24	P95	Déficit cognitivo em LR
(SAYIN <i>et al.</i> , 2004)	AC	P1-24	P90-100	Déficit cognitivo no LR e LAM. Maior grau de ansiedade no LCE
(BRUNSON <i>et al.</i> , 2001)	CRH	P10	3, 6, e 10 meses	Prejuízo progressivo na aprendizagem espacial avaliado LAM
<i>Status epilepticus</i> (múltiplos)				
(DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2000)	PILO	P7-9(3 episódios)	P60	Menor atividade no CA, menor ansiedade em LCE

Não existe um modelo animal ideal para o estudo da neurobiologia do autismo devido à heterogeneidade do distúrbio autístico, à diversidade dos fatores predisponentes e à ausência de um marcador biológico. As abordagens experimentais para estudo do autismo residem em três estratégias: a) focar em características isoladas, produzindo-se lesões nas estruturas cerebrais identificadas como relevantes para o desenvolvimento do autismo por meio dos exames de imagem e/ou nos poucos estudos neuropatológicas post-mortem; b) investigar possíveis fatores ambientais pela exposição pré-natal e ou pós-natal; e c) modelos genéticos. As intercorrências pós-natais têm sido pouco exploradas em modelos animais como fatores de risco no desencadeamento de prejuízos da sociabilidade. Assim, houve o interesse em se investigar se um insulto cerebral grave pós-natal, como o *Status epilepticus* pode produzir prejuízos no comportamento social, que é uma das características do Transtorno do Espectro Autista (TEA). Neste caso, a validação do modelo dependerá das alterações no repertório comportamental dos animais. Todavia, o autismo é um transtorno estritamente comportamental com

características clínicas difíceis ou impossíveis de serem reproduzidas no modelo animal, particularmente em roedores. CRAWLEY (2007), MOY *et al.* (2004), MOY *et al.* (2007), MOY *et al.* (2008a) e MOY *et al.* (2008b) propuseram uma bateria de testes comportamentais capazes de rastrear em roedores os sintomas centrais do autismo: interação social anormal, déficit na comunicação e alto nível de comportamentos repetitivos e estereotipados, e os sintomas associados. Para o modelo ser considerado válido, o roedor deve apresentar pelos menos um dos três sintomas diagnósticos (CRAWLEY, 2007). Para este trabalho, serão analisadas a interação social e a cognição.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar se o *Status epilepticus* em ratos neonatos de ambos os gêneros produz prejuízos na interação social, na cognição e no comportamento exploratório.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais utilizados

Para este projeto foram utilizados ratos da raça Wistar, (200-250g). Os animais foram procedentes do Biotério Central da UNIFESP e posteriormente alojados no Biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie, com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Presbiteriana Mackenzie (Anexo1).

As fêmeas permaneceram na presença dos machos e o ciclo estral foi acompanhado diariamente. A prenhez foi confirmada pela presença de espermatozóides no esfregaço vaginal. Este dia foi designado com o 1^o dia da gestação. Após o nascimento, os filhotes foram pesados e sexados, permanecendo 4 fêmeas e 4 machos por caixa até o desmame. No nono dia pós-natal (PN9) os animais foram identificados e aleatoriamente divididos nos grupos experimentais e controle. Neste dia os animais do grupo experimental foram submetidos ao *Status epilepticus* pela administração de pilocarpina (360 mg/kg, i.p.) e o grupo controle recebeu salina.

3.2. Grupos experimentais

Os animais machos e fêmeas foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- Grupo A = grupo controle com veículo (C): animais administrados com salina (10 animais);
- Grupo B = grupo experimental (E): animais submetidos ao *Status epilepticus* pela administração sistêmica de pilocarpina (10 animais).

3.3. Indução do *Status epilepticus* (SE)

Ratos machos e fêmeas PN9 foram submetidos ao *Status epilepticus* (SE) pela administração de pilocarpina (380 mg/kg, ip). Os animais controles receberam salina. Após quatro horas do início do *Status epilepticus* (SE), os animais retornaram para as gaiolas e permaneceram com as mães até o desmame.

3.4. Testes comportamentais

3.4.1. Comportamentos de brincar, sociais e exploratórios

Na maioria dos mamíferos, o comportamento de brincar é bastante comum na infância, estando relacionado com o treinamento e desenvolvimento do animal, pois permite que este apresente comportamentos sociais na idade adulta (VANDERSCHUREN, NEISINK & VAN REE, 1997; VIEIRA & SARTORIO, 2002).

A análise desse comportamento foi padronizada de acordo com PLETNIKOV *et al.* (1999). Considerando que o isolamento social aumenta a interação social (IKEMOTO & PANKSEPP, 1992; NEISINK & VAN REE, 1992), logo após o desmame os animais foram divididos em grupos. Um animal de cada gaiola foi isolado dos demais por uma semana. Este foi chamado de isolado. Os demais continuaram agrupados. No dia do teste, um intruso (proveniente da gaiola dos agrupados) foi colocado na gaiola de um isolado. Cada par foi filmado por 10 minutos/dia. Os pares foram formados da seguinte maneira: controle/controlado, experimental/experimental (MURCIA, GULDEN & HERRUP, 2005).

Dentre os comportamentos classificados como sociais foram analisados: monta, investigação anogenital, *grooming*, passar sobre ou sob. Perseguição, defesa, ataque e manipulação de cauda são classificados como comportamentos de solicitação de brincadeira (VANDERSCHUREN, NEISINK & VAN REE, 1997; VIEIRA & SARTORIO, 2002; SCHNEIDER & KOCH, 2005). Os comportamentos sociais não relacionados à brincadeira diferem em seus processos ontogênicos. O comportamento de brincar tem início por volta do décimo oitavo dia pós-natal (PN18) e alcança seu ápice entre PN30-40, reduzindo na puberdade, embora não desapareça completamente. Contudo, os comportamentos sociais não relacionados

à brincadeira permanecem constantes por toda a vida do animal (SCHNEIDER & KOCH, 2005)

O comportamento de exploração ambiental (levantar e tempo de locomoção) também foi analisado porque tais comportamentos podem apresentar alterações compatíveis com aquelas observadas no autismo, já que esses indivíduos freqüentemente apresentam menos interesse em explorar o ambiente (CAMPOS, 2006).

Outro comportamento também analisado foi o *self-grooming*. O protocolo utilizado encontra-se no Anexo 2.

3.4.2 Caixa de Condicionamento Operante

Este experimento foi utilizado para averiguação da cognição, especialmente aprendizagem. Para este fim, foi utilizado a caixa de condicionamento operante (Caixa de Skinner) equipada com uma barra e bebedouro (Fig. 2). Para estes experimentos os animais foram privados de água por 48 horas.

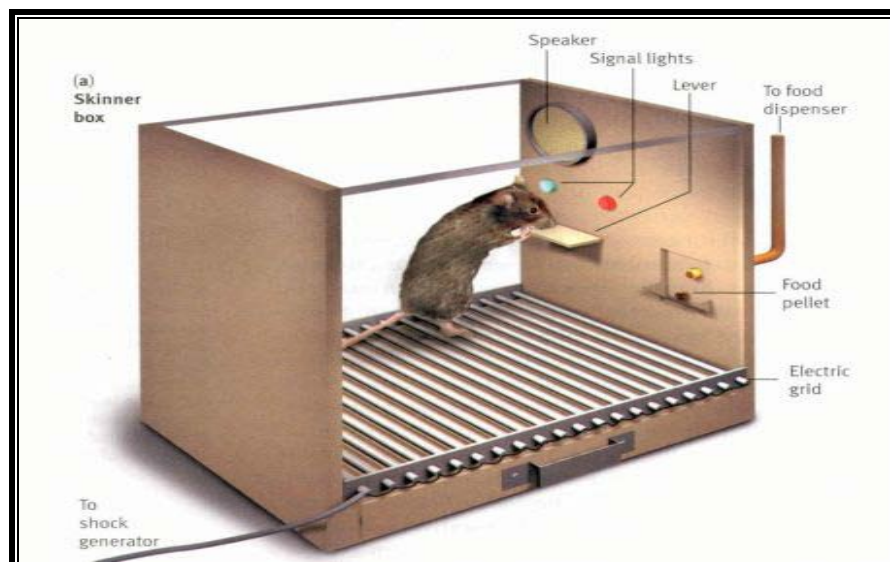


Figura 2: Caixa de Condicionamento Operante (Caixa de Skinner)
(Fonte: www.theculturebeat.com)

O protocolo experimental utilizado foi adaptado daquele descrito por MOREIRA & MEDEIROS (2007).

Após período de habituação de 15 minutos, deu-se início o treinamento ao bebedouro (modelagem) com o intuito de fazer com que o animal associe o ruído do bebedouro à apresentação da água. A modelagem pretende levar o animal à aquisição do comportamento de pressão à barra por meio do reforço (apresentação de água). O comportamento reforçado depende do comportamento inicial que o rato apresentar no início da sessão: olhar em direção à barra, caminhar em direção à barra, cheirar a barra, lamber a barra, e outros. A modelagem foi encerrada após o rato pressionar a barra sete vezes sem interrupção, seguido pelo acionamento automático do bebedouro. Após a modelagem foi dado início ao reforço contínuo da resposta de pressão à barra (CRF). O objetivo do CRF é fortalecer a resposta de pressão à barra, e mantê-la em alta frequência no repertório do comportamento animal, sem a intervenção do experimentador. Assim, cada vez que o rato pressionar a barra, o comportamento será reforçado pela liberação automática da água (MOREIRA & MEDEIROS, 2007).

Ao término da análise comportamental todos os animais foram mortos sob anestesia profunda.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos comportamentos sociais e exploratórios foram expressos como média \pm desvio padrão, e a diferença entre os grupos analisada utilizando-se o GLM (General Linear Model) seguido do pós-teste de LSD (Método da Diferença Mínima Significativa), e consideradas significantes para um valor de $p \leq 0,05$.

O número de sessões para aquisição do condicionamento foi expresso como média \pm desvio padrão, e a diferença entre os grupos foi analisada pelo teste t de student não-pareado e considerada significativa para um valor de $p \leq 0,05$.

Para comparação dos dados entre gêneros utilizou-se o teste t de student não-pareado e a diferença considerada significativa para um valor de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Comportamentos de brincar, sociais e exploratórios

Os resultados foram analisados considerando-se dois parâmetros: o grupo ao qual o animal pertencia (controle ou experimental) e condição de ser isolado ou agrupado e se havia interação entre os dois parâmetros.

Machos

Os resultados mostram que nos ratos machos, o *SE* produziu prejuízos na interação social de forma mais contundente no comportamento de brincar, em detrimento da maioria dos comportamentos sociais. Adicionalmente, também se observou redução do comportamento exploratório (Tabelas 2 e 3).

Comportamentos que foram alterados

Ataque

Animais do grupo experimental (ET) apresentaram menor número de eventos quando comparados aos animais do grupo controle (CT), no entanto em ambos os grupos não se observou diferença em relação à condição de ser isolado ou agrupado (Tabela 2).

Defesa

Animais do grupo experimental (ET) apresentaram menor número de eventos quando comparados aos animais do grupo controle (CT), no entanto em ambos os grupos não se observou diferença em relação à condição de ser isolado ou agrupado (Tabela 2).

Perseguição

Animais controles isolados (CI) apresentaram maior número de eventos quando comparados aos animais controles agrupados (CA). No entanto, não se

observou diferença no número de eventos entre os grupos, experimental (ET) e controle (CT) (Tabela 2).

Passar sob ou sobre:

Animais do grupo experimental (ET) apresentaram menor número de eventos comparativamente aos animais do grupo controle (CT). Paralelamente, observou-se que o número de eventos foi maior nos animais isolados (I) comparativamente aos animais agrupados (A) em ambos os grupos, no entanto não se observou interação entre os dois parâmetros analisados. Em ambos os grupos (controle e experimental) o isolamento aumentou a solicitação para a interação social (Tabela 2).

Grooming

Animais experimentais isolados (EI) apresentaram maior número de eventos comparativamente aos animais experimentais agrupados (EA), revelando que o isolamento acentuou o interesse pelo co-específico. Por outro lado, não se observou diferença no número de eventos entre os grupos controle (CT) e experimental (ET) (Tabela 2).

Locomoção

Animais do grupo experimental (ET) apresentaram menor tempo de locomoção em comparação aos animais do grupo controle (CT). Animais isolados, de ambos os grupos, CI e EI, despenderam menor tempo de locomoção comparativamente aos animais agrupados, CA e EA, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Repertório comportamental dos ratos machos modificado pelo *SE* e ou pelo isolamento social. Os dados foram apresentados com média (desvio padrão) do número de eventos registrados em 10 minutos de observação, exceto para o LC, no qual se registrou o tempo de locomoção em segundos. CI= controle isolado, CA= controle agrupado, EI= experimental isolado, EA= experimental agrupado, CT (média dos comportamentos do grupo controle), ET (média dos comportamentos do grupo experimental), AT= Ataque, DF= Defesa, PER= perseguição, PSS= passar sob ou sobre, GR= *Grooming*, LC= tempo de locomoção em segundos, **, ### $p \leq 0,01$; § $p \leq 0,05$.

Grupos	AT	DF	PER	PSS	GR	LC
CI	5,2 (2,2)	2,90(2,23)	6,80(1,22)###	4,80(1,81)###	6,80(2,94)	173,00(42,2)###
CA	4,6 (2,0)	2,30(1,15)	3,60(1,95)###	3,10 (0,73)###	6,50(1,90)	242,00(48,0)###
EI	3,0 (1,9)	0,88(1,13)	5,20(2,61)	3,40(1,84) §	7,30(2,06)§	150,50(22,9)§
EA	3,0 (1,4)	1,00 (1,05)	4,60 (1,77)	1,80(1,23) §	5,20(2,44)§	200,00(22,1)§
CT	4,9 (2,1)**	2,65(1,69)**	5,20(2,28)	3,95(1,6)**	6,65(2,41)	207,50(56,4)**
ET	3,0 (1,6)**	0,95(1,18)**	4,90(2,19)	2,60(1,73)**	6,25(2,44)	175,25(33,5)**

Tabela 3: Repertório comportamental dos ratos machos não modificados pelo *SE* e ou pelo isolamento social. Os dados foram apresentados com média (desvio padrão) do número de eventos registrados em 10 minutos de observação. CI= controle isolado, CA= controle agrupado, EI= experimental isolado, EA= experimental agrupado. MC= manipulação da cauda, CT (média dos comportamentos do grupo controle), ET (média dos comportamentos do grupo experimental). IA= investigação anogenital, MT= monta, LV= levantar, SG= *selfgrooming*.

Grupos	MC	IA	MT	LV	SG
CI	1,80(2,2)	6,40(2,27)	1,70(1,42)	11,30(9,35)	3,60(2,42)
CA	1,20(1,13)	7,50(2,36)	1,10(1,19)	15,30(7,04)	4,80(3,91)
EI	0,90(0,74)	7,70(3,05)	0,90(1,52)	16,10(6,54)	4,20 (2,04)
EA	1,20(0,92)	7,10(2,65)	1,10(1,79)	14,90(6,70)	4,50(2,07)
CT	1,50(1,73)	6,95(2,33)	1,40(1,31)	13,30(8,31)	4,20(3,22)
ET	1,05(0,82)	7,40(2,79)	1,00(1,62)	15,50(6,46)	4,34(2,00)

Fêmeas

Comportamentos Que Foram Alterados

Os resultados mostraram que o *SE* reduziu o comportamento exploratório das fêmeas e paralelamente aumentou o *self grooming*, sem interferir na interação social (Tabelas 4 e 5)

Self-grooming

Animais do grupo experimental (ET) apresentaram maior número de eventos em comparação aos animais do grupo controle (CT) (Tabela 4).

Locomoção

Animais do grupo experimental (ET) despenderam menor tempo de locomoção em comparação aos animais do grupo controle (CT). Animais isolados, de ambos os grupos, CI e EI, despenderam menor tempo de locomoção comparativamente aos animais agrupados, CA e EA, respectivamente (Tabela 4). Como esperado, animais agrupados de ambos os grupos (CA e EA) apresentaram aumento do tempo de locomoção, desde que foram expostos a um novo ambiente.

Tabela 4: Repertório comportamental dos ratos fêmeas modificado pelo *SE* e ou pelo isolamento social. Os dados foram apresentados com média (desvio padrão) do número de eventos registrados em 10 minutos de observação, exceto para o LC, no qual se registrou o tempo de locomoção em segundos. CI= controle isolado, CA= controle agrupado, EI= experimental isolado, EA= experimental agrupado, CT (média dos comportamentos do grupo controle), ET (média dos comportamentos do grupo experimental), PSS= passar sob ou sobre, SG= *self-grooming*, LC= tempo de locomoção em segundos, **, ### $p \leq 0,01$; #, *, § $p \leq 0,05$.

Grupos	PSS	SG	LC
CI	5,00(2,82) [#]	2,40(1,35)	184,00(48,57) ^{###}
CA	2,00(1,05) [#]	2,20(1,03)	260,00(55,57) ^{###}
EI	4,00(2,82)	4,80(1,93)	161,50(35,28)§
EA	3,10(1,19)	3,70(1,11)	218,00(47,33)§
CT	3,50(2,58)	2,30(1,17) ^{**}	222,00(64,04) [*]
ET	3,55(2,14)	4,25(2,05) ^{**}	189,75(49,90) [*]

Tabela 5: Repertório comportamental dos ratos fêmeas não modificado pelo *SE* e ou pelo isolamento social. Os dados foram apresentados com média (desvio padrão) do número de eventos registrados em 10 minutos de observação, CI= controle isolado, CA=controle agrupado, EI= experimental isolado, EA= experimental agrupado, CT (média dos comportamentos do grupo controle), ET (média dos comportamentos do grupo experimental), AT= Ataque, DF= Defesa, PER= perseguição, MC= manipulação da cauda, MT= monta, IA= investigação anogenital, GR= *Grooming*, LV= levantar.

Grupos	AT	DF	PER	MC	MT	IA	GR	LV
CI	6,20(1,40)	3,40(0,70)	7,00 (1,70)	2,50(3,69)	1,80(1,62)	6,90(1,66)	7,50 (2,59)	17,00(12,53)
CA	5,30(2,21)	3,10 (1,52)	4,20(3,05)	2,10(1,52)	1,10(0,74)	6,00(3,39)	6,10(2,99)	16,00(5,29)
EI	4,80(2,35)	2,20 (1,87)	6,10(3,47)	2,20(2,48)	1,50(1,35)	7,40(2,75)	7,60(2,71)	12,70(5,53)
EA	5,00(3,23)	2,70 (2,83)	6,00(4,47)	1,60(1,57)	1,60(1,35)	6,70(4,42)	6,90(2,46)	21,10(7,24)
CT	5,75(1,86)	3,25(1,16)	5,60(2,79)	2,75(2,39)	1,45(1,27)	6,45(2,64)	6,80(2,82)	16,50(9,31)
ET	4,90(2,75)	2,45(2,35)	6,05(3,89)	1,90(2,05)	1,55(1,32)	7,05(3,60)	7,25(2,29)	16,90(7,61)

5.2. Comparações entre os gêneros do efeito do *SE* sobre as alterações comportamentais

Os resultados mostram que o *SE* alterou o comportamento social dos machos (ataque e defesa e passar sob ou sobre) em detrimento das fêmeas. Tais comportamentos não diferiam entre os animais machos e fêmeas controles (MCT e FMCT), tampouco entre os animais machos e fêmeas experimentais (MET e FET). Os resultados mostram que as fêmeas controles (FCT) exibiram maior atividade locomotora que os machos controles (MCT) e paralelamente o *self-grooming* aumentou nas fêmeas experimentais (FET) equiparando-se ao dos machos controles (MCT) (Tabela 6).

Tabela 6: Repertório comportamental alterado pelo SE: comparação entre os gêneros. Os dados foram apresentados com média (desvio padrão) do número de eventos registrados em 10 minutos de observação, MCT (média dos comportamentos dos ratos machos do grupo controle), MET (média dos comportamentos animais ratos machos do grupo experimental), FCT (média dos comportamentos das fêmeas do grupo controle), FET (média dos comportamentos das fêmeas do grupo experimental), AT= Ataque, DF= Defesa, LC= locomoção, SG= *self-grooming*. * $p < 0,05$.

Grupos	AT	DF	PSS	LC	SG
MCT	4,9 (2,1)	2,65(1,69)	3,95(1,6)	207,50(56,4)*	4,20(3,22)
MET	3,0 (1,6)	0,95(1,18)	2,60(1,73)	175,25(33,5)	4,34(2,00)
FCT	5,75(1,86)	3,25(1,16)	3,50(2,58)	222,00(64,04)*	2,30(1,17)
FET	4,90(2,75)	2,45(2,35)	3,55(2,14)	189,75(49,90)	4,25(2,05)

5.3. Caixa de Condicionamento Operante (Caixa de Skinner)

O teste foi utilizado com objetivo de avaliar o desempenho cognitivo, especificamente a aprendizagem.

Animais experimentais de ambos os gêneros (ME e FE) necessitaram de maior número de sessões, comparativamente aos seus respectivos controles, para aquisição do comportamento de pressão à barra. Os resultados mostram que o SE produziu prejuízo cognitivo em ambos os gêneros (Tabela 7).

Tabela 7: Número de sessões para aquisição do comportamento de pressão à barra. Os dados foram apresentados com média (desvio padrão) do número sessões para aprendizagem da tarefa. MC= machos controles, ME= machos experimentais, FC= fêmeas controles, FE= fêmeas experimentais. ** $p \leq 0,01$, # $p \leq 0,05$.

Grupos	Número de Sessões
MC	1,70 (0,67) [#]
ME	2,80 (1,23) [#]
FC	1,8 (0,63) **
FE	2,60 (0,69)**

6. DISCUSSÃO

Os Transtornos do Espectro Autista (TEA) são condições que afetam o desenvolvimento cerebral prejudicando o estabelecimento da interação social recíproca, da comunicação verbal e não verbal e são acompanhados por comportamentos repetitivos e padrões anormais de interesses e atividades. A ampla heterogeneidade na clínica dos indivíduos afetados dificulta as pesquisas que visam identificar a etiologia dos TEAs (FOLSTEIN & PIVEN, 1991; YOUNG & DONALDSON, 2008). A patogênese do autismo permanece desconhecida, apesar de se reconhecer a importância dos fatores genéticos e ambientais. A utilização de modelos animais tem proporcionado a ampliação do conhecimento acerca dos fatores neurobiológicos. Recentemente, demonstrou-se que o ácido valpróico, reconhecido como um fator ambiental envolvido com a etiologia do autismo, modula a expressão de genes relacionados ao transtorno por mecanismos epigenéticos. Esta evidência sugere que outros fatores ambientais podem empregar mecanismos similares para interferir na expressão de moléculas importantes para o desenvolvimento, maturação e plasticidade sináptica e assim contribuindo para alterações das funções cerebrais.

O *Status epilepticus (SE)*, uma condição aguda caracterizada por convulsões repetitivas ou prolongada, é uma emergência clínica que ocorre mais frequentemente em crianças que em adultos, e em 40-50% dos casos em crianças com idade inferior a dois anos (SHINNAR *et al.*, 1997; NEILL *et al.*, 2005; LOWENSTEIN, 2006).

Estudos clínicos e experimentais indicam que embora o *SE* produza menos danos estruturais no cérebro imaturo que no cérebro adulto, em neonatos o *SE* causa prejuízos na aprendizagem, memória, sequelas emocionais na idade adulta, alteração da microcircuitaria GABAérgica hipocampal e cortical, e redução dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal.

Apesar da existência de embasamento teórico sugerindo que o *SE* possa também produzir prejuízos na interação social, até o presente não há estudos que tenham se debruçado para investigar diretamente esta questão. Este trabalho teve

como principal objetivo investigar se o *SE* em ratos neonatos de ambos os gêneros produz prejuízos na interação social e secundariamente prejuízos cognitivos e no comportamento exploratório.

O principal resultado deste estudo demonstrou que ratos machos apresentaram déficit no comportamento de brincar, em detrimento das fêmeas. O comportamento de brincar é uma das formas mais precoces de interação social em roedores que não é dirigido à mãe; é sexualmente dimórfico, sendo mais frequente e exuberante em machos do que em fêmeas (AUGER & OLESEN, 2009). Contudo, no nosso estudo não observamos diferença na frequência da maioria dos comportamentos sociais entre os gêneros, exceto *selfgrooming*. O paradigma utilizado para registrar os comportamentos parece interferir no padrão de resposta. Diferenças entre os gêneros são frequentemente encontradas quando animais agrupados são observados em suas gaiolas sem serem perturbados. Em contraste, diferenças entre os gêneros são menos frequentemente encontradas quando se utiliza a observação por pares, principalmente após longo período de isolamento e curto período de observação (AUGER & OLESEN, 2009), tal como utilizado neste estudo. Interessante observar que, apesar de não terem sido observadas diferenças na frequência dos comportamentos sociais entre os gêneros, o *SE* produziu déficit na interação social somente nos ratos machos. Este resultado sugere que os machos apresentam maior vulnerabilidade aos danos induzidos pelo *SE*, pelo menos no que se refere à sociabilidade. Está bem estabelecido que o neurotransmissor GABA exerce ação excitatória no cérebro em desenvolvimento por meio da ativação dos receptores GABA_A e que este papel é extremamente relevante para o desenvolvimento cerebral (BEN-ARI *et al.*, 2002), no entanto, ativação excessiva está envolvida na patogênese decorrente de crises convulsivas (DZHALA *et al.*, 2005; KHALILOV *et al.*, 2005). NUÑEZ, ALT & MCCARTHY (2003) demonstraram que os danos produzidos pela ativação excessiva do receptor GABA_A no hipocampo em desenvolvimento é diferente entre os gêneros, sendo maior nos machos que nas fêmeas. Mas recentemente, NUÑEZ & MCCARTHY (2009) utilizando estudos eletrofisiológicos em células piramidais cultivadas exploraram os mecanismos que respondem por este efeito. O pré-tratamento das células com dihidrotestosterona (DHT) aumentou a morte celular induzida pela aplicação do muscimol, um agonista GABAérgico, em ambos os sexos. A investigação da quantidade de cálcio

intracelular, diretamente relacionada com a excitotoxicidade, revelou que a aplicação do muscimol produziu níveis mais elevados de cálcio intracelular ($[Ca]_i$) nas células das fêmeas que na dos machos, porém por um tempo mais curto. Contudo, uma segunda exposição ao muscimol causou uma significativa atenuação nos níveis de $[Ca]_i$ nas células das fêmeas em contraste com as células dos machos que permaneceram com níveis mais elevados $[Ca]_i$ e por um tempo maior. Este último efeito foi reproduzido nas células das fêmeas após pré-tratamento com DHT e foi inversamente correlacionado com a quantidade da subunidade gama2 do receptor GABAérgico. Embora este estudo tenha sido conduzido em células piramidais hipocampais cultivadas, é lícito pensarmos que mecanismos similares possam ocorrer em outras estruturas cerebrais, inclusive no córtex pré-frontal, igualmente dependente do sistema GABAérgico para sua maturação, e também implicado na cognição social.

O comportamento de brincar exerce um papel relevante na organização social dentro do grupo, ou entre parceiros. Dentro do grupo, os ratos têm preferência por aqueles que apreciam brincar, e em várias espécies de mamíferos, os animais que brincam menos exibem laços sociais mais fracos na vida adulta. Assim, o comportamento de brincar contribui para o desenvolvimento da cognição social, da habilidade do animal em se expressar e entender os sinais da comunicação intra-espécie inibindo o comportamento agressivo e aumentando a estabilidade dentro do grupo (VANDERSCHUREN, NIESINK & VAN REE, 1997).

As sequelas emocionais que ocorrem fase adulta e que têm sido relacionadas ao *SE* nos estágios precoces do desenvolvimento, podem estar vinculadas aos prejuízos da interação social precoce, prejuízos do comportamento de brincar, desde que é frequente na vida de animais jovens, principalmente de mamíferos, e indispensável para o desenvolvimento adequado do enfrentamento relacionado com o ambiente social (VAN DEN BERG *et al.*, 1999; VIEIRA & SARTORIO, 2002).

O córtex pré-frontal tem sido implicado no autismo para explicar os déficits nas funções executivas relacionadas à cognição, linguagem, sociabilidade e emoção (RINALDI, PERRODIN & MARKRAM, 2008), no comportamento de brincar em roedores (VANDERSCHUREN, NIESINK & VAN REE, 1997), e com prejuízos no comportamento recíproco e cooperativo em humanos que sofreram lesão nesta região (ESLINGER, FLAHERTY-CRAIG & BENTON, 2004; ANDERSON & RAYMOND, 1999).

Interessante observar que em roedores o período crítico para o amadurecimento cortical corresponde às duas primeiras semanas de vida pós-natal e que também corresponde ao período de marcada excitabilidade para crises convulsivas (SWANN, 2004). Neste estudo, o SE foi induzido no nono dia pós-natal, período relevante para o amadurecimento das redes corticais. A formação e a maturação das redes corticais sofrem extrema influência do sistema de sinalização mediado pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), e podem ser modificadas por insultos precoces. O prejuízo no comportamento de brincar observado nos ratos machos pode ser secundário às alterações da neuroquímica, bem como da microarquitetura cortical. Está bem estabelecido que a redução na neurotransmissão dopaminérgica compromete o comportamento de brincar (VANDERSCHUREN, NIESINK & VAN REE, 1997). Ratos neonatos submetidos ao SE pela administração da pilocarpina apresentam alterações na microarquitetura gabaérgica cortical e hipocampal (DA SILVA *et al.*, 2005) e marcante redução nos níveis de dopamina e de seus metabólitos no córtex pré-frontal (LIN *et al.*, 2009).

Dentre os comportamentos sociais analisados, o *self-grooming* foi significativamente maior nas fêmeas experimentais comparativamente às controles, e paralelamente exibiram menor comportamento exploratório. Adicionalmente, observou-se que fêmeas controles exibiram maior comportamento exploratório que os machos controles. Ratos machos comportam-se de maneira mais cuidadosa e exploram menos um novo ambiente que as fêmeas, especialmente na presença de um co-específico, acarretando no aumento do *grooming* seguido pelo *self-grooming* (MOORE, 1986; Thor *et al.*, 1988). Nossos resultados sugerem que o SE modificou a emocionalidade das fêmeas, aumentando a reatividade destas aos estímulos ambientais, e aproximando alguns comportamentos daqueles exibidos pelos machos.

Este estudo também demonstrou que animais de ambos os gêneros submetidos ao SE apresentaram redução do comportamento exploratório. Nossos resultados estão de acordo com aqueles observados por DOS SANTOS *et al.*, (2000). FINK & SMITH (1980) demonstraram que a destruição dos terminais dopaminérgicos na via mesolímbica e mesocortical reduziu o comportamento exploratório em ratos e que baixas doses de apomorfina (agonista dopaminérgico) foi capaz de restaurar o comportamento. Interessantemente, LIN *et al.*, (2009) observaram marcante redução

nos níveis de dopamina e de seus metabólitos no córtex pré-frontal de ratos neonatos submetidos ao *SE* pela administração da pilocarpina.

Neste trabalho, a investigação dos comportamentos empregou o paradigma de observação por pares (isolado-intruso). Animais isolados por uma semana foram observados por 10 minutos com os animais intrusos que previamente encontravam-se agrupados. Como esperado, os animais intrusos (agrupados) despenderam maior tempo explorando o novo ambiente que os animais isolados, em ambos os grupos, embora o tempo despendido na atividade exploratória tenha sido menor nos animais do grupo experimental.

Outro importante resultado deste estudo revelou que animais de ambos os gêneros submetidos ao *SE*, apresentaram déficits cognitivos. Inúmeros trabalhos têm mostrado evidências que o *SE* no cérebro em desenvolvimento produz déficits cognitivos (LYNCH *et al.*, 2000; BRUNSON *et al.*, 2001; SWANN, 2004; SAYIN, SUTULA & STAFSTROM, 2004). Apesar de o cérebro imaturo ser mais excitável que o cérebro adulto, o cérebro imaturo é mais resistente à morte celular induzida pelo *SE*. Assim, é improvável que a morte neuronal das células hipocâmpais seja a explicação para os déficits cognitivos observados no cérebro imaturo. Como alternativa, estudos eletrofisiológicos e morfológicos sugerem que o aumento da excitabilidade neuronal produz uma redução compensatória na transmissão sináptica glutamatérgica; poucas sinapses são formadas em decorrência de menor número de espinhos dendríticos e ou de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (SWANN, 2004).

Interação social inadequada é uma característica notável nos Transtornos do Espectro Autista. Se um insulto precoce grave como *SE* durante um período crítico do desenvolvimento neural é capaz de desencadear autismo em indivíduos vulneráveis, é um tema que demanda cuidadosa investigação. No entanto, em roedores, os resultados deste estudo claramente demonstraram que o *SE* produziu prejuízo no comportamento de brincar, de maneira gênero-dependente. É importante chamar a atenção que o autismo é mais frequente em meninos que em meninas, numa proporção de 4:1 (KLIN, 2006). Dada a importância deste comportamento para a maturação da cognição social, mais estudos devem ser conduzidos para dimensionar as conseqüências sobre o comportamento social em longo prazo. Segundo CRAWLEY (2007), um modelo animal para estudo do autismo será

considerado válido, quando o roedor apresentar pelo menos um dos três sintomas diagnósticos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que o *SE* no cérebro em desenvolvimento alterou a sociabilidade, a cognição e o comportamento exploratório. O prejuízo na interação social foi gênero-dependente, afetando predominantemente os machos. O comportamento exploratório foi reduzido em ambos os gêneros, no entanto, as fêmeas parecem ter sido mais afetadas, desde que paralelamente aumentou o *self-grooming*. Ambos os comportamentos são afetados pela emocionalidade e pelo contexto ambiental, sugerindo que o *SE* afetou mais severamente a emocionalidade das fêmeas. Os prejuízos cognitivos foram igualmente observados em ambos os gêneros. Baseando-se nestas evidências, sugerimos que este modelo pode ser utilizado para explorar mecanismos neurobiológicos envolvidos com os transtornos do espectro autista.

REFERÊNCIAS

- AKERMAN, C. J. & CLINE, H. T. Refining the roles of GABAergic signaling during neural circuit formation. **Trends Neurosci.**, v. 30, n. 8, p. 382-389, 2007.
- ALBALA, B. J.; MOSHE, S. L. & OKADA, R. Kainic-acid-induced seizures: a developmental study. **Brain Res.**, v. 315, p. 139-148, 1984.
- ANDERSON, S. R. & RAYMOND, G. R. Early intervention for young children with autism: continuum-based behavioral models. **Journal of the Association for Persons with Severe Handicaps**, v. 24, n.3, p. 162-173, 1999.
- AUGER, A. P. & OLESEN, K. M. Brain sex differences and the organization of juvenile social play behaviour. **J. Neuroendocrinol.**, v. 21, n. 6, p. 519-525. 2009.
- AYLWARD E. H.; MINSHEW, N. J.; GOLDSTEIN, G.; HONEYCUTT, N. A.; AUGUSTINE, A. M.; YATES, K. O.; BARTA, P. E. & PEARLSON, G. D. MRI volumes of amygdale and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. **Neurology**, v. 53, n. 9, p. 2145-2150, 1999.
- BARON-COHEN S. & BELMONTE M. K. Autism: a window onto the development of the social and the analytic brain. **Annual Review Neuroscience**, v. 28, p. 109-126. 2005.
- BEN-ARI, Y. & HOLMES, G. L. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. **The lancet Neurology**, v. 5, n. 12, p. 1055-1063, 2006.
- BEN-ARI, Y.; CHERUBINI, E.; ANIKSZTEJN, L.; ROISIN, M. P. & CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Mechanism of induction of long term potentiation by the mast celldegranulating peptide. **Pharmacopsychiatry**, v. 2, p.107-110, 1989.
- BEN-ARI, Y.; CHERUBINI, E.; ANIKSZTEJN, L.; ROISIN, M. P. & CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Gamma-Aminobutyric acid (GABA): a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurons in early postnatal life. **Prog. Brain Res.**, v. 102, p. 261-273, 1994.
- BEN-ARI, Y.; CHERUBINI, E.; ANIKSZTEJN, L.; ROISIN, M. P. & CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 3, n. 9, p. 728-739, 2002.
- BEN-ARI, Y.; CHERUBINI, E.; ANIKSZTEJN, L.; ROISIN, M. P. & CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, p. 1055-1063, 2006.
- BEN-ARI, Y.; CHERUBINI, E.; ANIKSZTEJN, L.; ROISIN, M. P. & CHARRIAUT-MARLANGUE, C. GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 4, p. 1215-1284, 2007.
- BRUNSON, K. L.; AVISHAI-ELINER, S.; HATALSKI, C. G. & BARAM, T. Z. Neurobiology of the stress response early in life: evolution of a concept and the role of corticotropin releasing hormone. **Molecular Psychiatry**, v. 6, n. 6, p. 647-656, 2001.
- CAMPOS, M. L. R. **Efeito da administração de ácido valpróico no comportamento de brincar na prole de ratos**: um modelo animal para autismo. 2006. 56 f.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-graduação em Distúrbios do Desenvolvimento) - Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2006.

CARPER, R. A. & COURCHESNE, E. Inverse correlation between frontal lobe and cerebellum sizes in children with autism. **Brain**, v. 123, n. 4, p. 836-844. 2000.

CHERUBINI, E.; ROVIRA, C.; GAIARSA, J. L.; CORRADETTI, R. & BEN-ARI, Y. GABA mediated excitation in immature rat CA3 hippocampal neurons. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 8, n. 4, p. 481-490, 1990.

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

CODY H.; PELPHREY, K. & PIVEN, J. Structural and functional magnetic resonance imaging of autism. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 20, n. 3-5, p. 421-438, 2002.

CONNOLLY, A. M.; CHEZ, M.; STREIF, E. M.; KEELING, R. M.; GOLUMBEK, P. T.; KWON, J. M.; RIVIELLO, J. J.; ROBINSON, R. G.; NEUMAN, R. J. & DEUEL, R. M. Brain-derived neurotrophic factor and autoantibodies to neural antigens in sera of children with autistic spectrum disorders, Landau-Kleffner syndrome, and epilepsy. **Biol. Psychiatry**, v. 59, n. 4, p. 354-363. 2006.

COURCHESNE, E.; YEUNG-COURCHESNE, R.; PRESS, G. A.; HESSELINK, J. R. & JERNIGAN, T. L. Hypoplasia of cerebellar vermal lobules VI and VII in autism. **The new England Journal of Medicine**, v. 318, n. 21, p. 1349-1354. 1988.

COURCHESNE, E.; TOWNSEND, J.; AKSHOOMOFF, N. A.; SAITOH, O.; YEUNG-COURCHESNE, R.; LINCOLN, A. J.; JAMES, H. E.; HAAS, R. H.; SCHREIBMAN, L. & LAU, L. Impairment in shifting attention in autistic and cerebellar patients. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, n. 5, p. 848-865. 1994.

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

DSM-IV-TR. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais** (4ª ed.). Porto Alegre: Artmed, 2002. 146 p.

DUBE, C.; MARESCAUX, C. & NEHLIG, A. A metabolic and neuropathological approach to the understanding of plastic changes that occur in the immature and adult rat brain during lithium-pilocarpine-induced epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 41, n. 6, p. 36-43. 2000.

DZHALA, V. I.; TALOS, D. M.; SDRULLA, D. A.; BRUMBACK, A. C.; MATHEWS, G. C.; BENKE, T. A.; DELPIRE, E.; JENSEN, F. E. & STALEY, K. J. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. **Nat. Med.**, v. 11, n. 11, p. 1205-1213. 2005.

ESLINGER, P. J.; FLAHERTY-CRAIG, C. V. & BENTON, A. L. Developmental outcomes after early prefrontal cortex damage. **Brain Cogn.**, v. 55, n. 1, p. 84-103, 2004.

FINK, J. S. & SMITH, G. P. Mesolimbocortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats. **Brain Research**, v. 199, n. 2, p. 359-384, 1980.

FIUMELLI, H.; WOODIN, M. A. Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 17, n. 1, p. 81-86, 2007.

FOLSTEIN, S. E. & PIVEN, J. Etiology of autism: genetic influences. **Pediatrics**, v. 87, n. 5, p. 767-773, 1991.

- FOLSTEIN, S. & ROSEN-SHEIDLEY, B. J. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, n. 12, p. 943-955, 2001.
- FOMBONNE, E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. **Pediatric Research**, v. 65, n. 6, 2009.
- FUKUCHI, M.; NII, T.; ISHIMARU, N.; MINAMINO, A.; HARA, D.; TAKASAKI, D.; TABUCHI, A. & MASAOKI TSUDA. Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. **Neuroscience Research**, v. 65, n. 1, p. 35-43, 2009.
- GALANOPOULOU, A. S. Sexually dimorphic expression of KCC2 and GABA function. **Epilepsy Res.**, v. 80, n. 2-3, p. 99-113, 2008.
- GALANOPOULOU, A. S. & MOSHÉ, S. L. The epileptic hypothesis: developmentally related arguments based on animal models. **Epilepsia**, v. 50, n. 7, p. 37-42, 2009.
- HALL, S. S. Small and thin: the controversy over the fetal origins of adult health. **New Yorker**, v. 19, p. 52-57, 2007.
- HOLMES, G. L.; GAIRSA, J. L.; CHEVASSUS-AU-LOUIS, N. & BEN-ARI, Y. Consequences of neonatal seizures in the rat: morphological and behavioral effects. **Ann. Neurol.**, v. 44, p. 845-857, 1998.
- HUANG, L. T.; YANG, S. N.; LIOU, C. W.; HUNG, P. L.; LAI, M. C.; WANG, C. L. & WANG, T. J. Pentylentetrazol-induced recurrent seizures in rat pups: time course on spatial learning and long-term effects. **Epilepsia**, v. 43, p. 567-573, 2002.
- IKEMOTO, S. & PANKSEPP, J. The effects of early social isolation on the motivation for social play in juvenile rats. **Dev. Psychobiol.**, v. 25, n. 4, p. 261-274, 1992.
- KHALILOV, I.; LE VAN QUYEN, M.; GOZLAN, H. & BEN-ARI, Y. Epileptogenic actions of GABA and fast oscillations in the developing hippocampus. **Neuron.**, v. 48, n. 5, p. 787-796. 2005.
- KHAZIPOV, R.; ESCLAPEZ, M.; CAILLARD, O.; BERNARD, C.; KHALILOV, I.; TYZIO, R.; HIRSCH, J.; DZHALA, V.; BERGER, B. & BEN-ARI, Y. Early development of neuronal activity in the primate hippocampus in utero. **The journal of neuroscience**, v. 21, n. 24, p. 9770-9781, 2001.
- KHAZIPOV, R.; ESCLAPEZ, M.; CAILLARD, O.; BERNARD, C.; KHALILOV, I.; TYZIO, R.; HIRSCH, J.; DZHALA, V.; BERGER, B. & BEN-ARI, Y. Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. **The European Journal of neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 590-600, 2004.
- KLIN, A. Autism and Asperger syndrome: an overview. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 28, p. 3-11, 2006.
- KUBOVA, H.; MARES, P.; SUCHOMELOVA, L.; BROZEK, G.; DRUGA, R. & PITKANEN, A. *Status epilepticus* in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. **Eur. J. Neurosci.**, v. 19, p. 3255-3265. 2004.
- LIN, T. C.; HUANG, L. T.; HUANG, Y. N.; CHEN, G. S. & WANG, J. Y. Neonatal *Status epilepticus* alters prefrontal-striatal circuitry and enhances methamphetamine-induced behavioral sensitization in adolescence. **Epilepsy Behav.**, v. 14, n. 2, p. 316-323, 2009.
- LOWENSTEIN, D. H. The management of refractory *Status epilepticus*: an update. **Epilepsia**, v. 47, n. 1, p. 35-40, 2006.

- LYNCH, M.; SAYIN, U.; GOLARAI, G. & SUTULA, T. NMDA receptor- dependent plasticity of granule cell spiking in the denate gyrus of normal and epileptic rats. **Journal of neurophysiology**, v. 84, n. 6, p. 2868-2879, 2000.
- LYNCH, M.; SAYIN, U.; GOLARAI, G. & SUTULA, T. Long-term consequences of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 2252-2264, 2000.
- MCDOUGLE, C. J.; ERICKSON, C. A.; STIGLER, K. A. & POSEY, D. J. Neurochemistry in the pathophysiology of autism. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 66, n. 10, p. 9-18, 2005.
- MENOLD, M. M.; SHAO, Y.; WOLPERT, C. M.; DONNELLY, S. L.; RAIFORD, K. L.; MARTIN, E. R.; RAVAN, S. A.; ABRAMSON, R. K.; WRIGHT, H. H.; DELONG, G. R.; CUCCARO, M. L.; PERICAK-VANCE, M. A. & GILBERT, J. R. Association analysis of chromosome 15 gaba receptor subunit genes in autistic disorder. **J. Neurogenet.**, v. 15, n. 3-4, p. 245-259, 2001.
- MOORE, C. L. Sex-differences in self-grooming of rats: effects of gonadal-hormones and context. **Physiology & Behavior**, v. 36, n. 3, p. 451-455, 1986.
- MOREIRA, B. M. & MEDEIROS, C. A. **Princípios básicos de análise do comportamento**. Porto Alegre: Artmed, 2007. 240 p.
- MOY, S. S.; NADLER, J. J.; PEREZ, A.; BARBARO, R. P.; JOHNS, J. M.; MAGNUSON, T. R.; PIVEN, J. & CRAWLEY, J. N. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. **Genes Brain and Behavior**, v. 3, n. 5, p. 287-302, 2004.
- MOY, S. S.; NADLER, J. J.; PEREZ, A.; BARBARO, R. P.; JOHNS, J. M.; MAGNUSON, T. R.; PIVEN, J. & CRAWLEY, J. N. Mouse behavioral tasks relevant to autism: Phenotypes of ten inbred strains. **Behav. Brain Res.**, v. 176, n. 1, p. 4-20, 2007.
- MOY, S. S.; NADLER, J. J.; PEREZ, A.; BARBARO, R. P.; JOHNS, J. M.; MAGNUSON, T. R.; PIVEN, J. & CRAWLEY, J. N. Development of a mouse test for repetitive, restricted behaviors: Relevance to autism. **Behav. Brain Res.**, v. 188, n. 1, p. 178-194, 2008a.
- MOY, S. S.; NADLER, J. J.; PEREZ, A.; BARBARO, R. P.; JOHNS, J. M.; MAGNUSON, T. R.; PIVEN, J. & CRAWLEY, J. N. Social approach and repetitive behavior in eleven inbred mouse strains. **Behav. Brain Res.**, v. 191, n. 1, p. 118-129, 2008b.
- MURCIA, C. L.; GULDEN, F. & HERRUP, K. A. question of balance: A proposal for new mouse models of autism. **Int. J. Devl. neuroscience**, v. 23, p. 265-275, 2005.
- NANSON, J. L. Autism in fetal alcohol syndrome: a report of six cases. **Alcohol clin. Exp. Reviews**, v. 16, n. 3, p. 558-565, 1992.
- NEILL, J. C.; LIU, Z.; MIKATI, M. & HOLMES, G. L. Pilocarpine seizures cause age-dependent impairment in auditory location discrimination. **Journal of the experimental analyses of behavior**, v. 84, n. 3, p. 357-370, 2005.
- NEISINK, R. J. M. & VAN REE, J. M. Short-term isolation increases social interactions of male rats: a parametric analysis. **Physiol. Behavior**, v. 29, p. 819-825, 1992.
- NELSON, K. B.; GREYER, J. K.; CROEN, L. A.; DAMBROSIA, J. M.; DICKENS, B. F.; JELLIFFE, L. L.; HANSEN, R. L. & PHILLIPS, T. M. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. **Ann. Neurol.**, v. 49, n. 5, p. 597-606, 2001.

NICOLSON R.; DEVITO, T. J.; VIDAL, C. N.; SUI, Y.; HAYASHI, K. M.; DROST, D. J.; WILLIAMSON, P. C.; RAJAKUMAR, N.; TOGA, A. W. & THOMPSON, P. M. Detection and mapping of hippocampal abnormalities in autism. **Psychiatry Res.**, v. 148, n. 1, p. 11-21, 2006.

NUÑEZ, J. L.; ALT, J. J. & MCCARTHY, M. M. A new model for prenatal brain damage - I. GABA_A receptor activation induces cell death in developing rat hippocampus. **Experimental Neurology**, v. 181, n. 2, p. 258-269, 2003.

NUÑEZ, J. L. & MCCARTHY, M. M. Resting intracellular calcium concentration, depolarizing Gamma-Aminobutyric Acid and possible role of local estradiol synthesis in the developing male and female hippocampus. **Neuroscience**, v. 158, n. 2, p. 623-634, 2009.

PIVEN, J.; PALMER, P.; JACOBI, D.; CHILDRESS, D. & ARNDT, S. Broader autism phenotype: evidence from a family history study of multiple-incidence autism families. **The American Journal Psychiatry**, v. 154, n. 2, p. 185-190, 1997.

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.

RINALDI, T.; PERRODIN, C. & MARKRAM, H. Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic acid animal model of autism. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 2, n. 4, p. 377-390, 2008.

SANTANGELO, S. L. & TSATSANIS, K. What is known about autism: genes, brain, and behavior. **Am. J. Pharmacogenomics**, v. 5, n. 2, p. 71-92, 2005.

DOS SANTOS, F. N.; ARIDA, R. M.; FILHO, E. M.; PRIEL, M. R. & CAVALHEIRO, E. A. Epileptogeneses in immature rats following recurrent *Status epilepticus*. **Brain research reviews**, v. 32, p. 269-276, 2000.

SAYIN, U.; SUTULA, T. P. & STAFSTROM, C. E. Seizures in the developing brain causes adverse long-term effects on spatial learning and anxiety. **Epilepsia**, v. 45, n. 12, p.1539-1548, 2004.

SCANTLEBURY, M. H.; HEIDA, J. G.; HASSON, H. J.; VELÍSKOVÁ, J.; VELÍSEK, L.; GALANOPOULOU, A. S. & MOSHÉ, S. L. Age-dependent consequences of *Status epilepticus*: animal models. **Epilepsia**, v. 48, n. 2, p. 75-82, 2007.

SCHNEIDER, M. & KOCH, M. Behavioral and morphological alterations following neonatal excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex in rats. **Experimental Neurology**, v. 195, n. 1, p. 185-198, 2005.

SHINNAR, S.; PELLOCK, J. M.; MOSHÉ, S. L.; MAYTAL, J.; O'DELL, C.; DRISCOLL, S. M.; ALEMANY, M.; NEWSTEIN, D. & DELORENZO, R. J. In whom does *Status epilepticus* occur: age-related differences in children. **Epilepsia**, v. 38, n. 8, p. 907-914, 1997.

DA SILVA, V. A.; REGONDI, M. C.; CAVALHEIRO, E. A. & SPREAFICO, R. Disruption of cortical development as a consequence of repetitive pilocarpine-induced *Status epilepticus* in rats. **Epilepsia**, v. 46, n. 5, p. 22-30, 2005.

SPERBER, E. F. The relationship between seizures and damage in the maturing brain, **Epilepsy Res.**, v. 12, p. 365-376, 1996.

- STAFSTROM, C. E.; CHRONOPOULOS, A.; THURBER, S.; THOMPSON, J. L. & HOLMES, G. L. Age-dependent cognitive and behavior deficits after kainic acid seizures. **Epilepsia**, v. 34, n. 3, p. 420-432, 1993.
- STAFSTROM, C. E.; CHRONOPOULOS, A.; THURBER, S.; THOMPSON, J. L. & HOLMES, G. L. Assessing the behavioral and cognitive effects of seizures on the developing brain. **Progress in brain research**, v. 135, cap. 2, 2002.
- STROMLAND, K.; NORDIN, V.; MILLER, M.; ÅKERSTRÖM, B. & GILLBERG, C. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. **Dev. Med. Child Neurol.**, v. 36, n. 4, p. 351-356, 1994.
- SWANN, J. W. The effects of seizures on the connectivity and circuitry of the developing brain. **Mental Retardation Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 10, n. 2, p. 96-100, 2004.
- THOR, D. H.; HARRISON, R. J.; SCHNEIDER, S. R.; CARR, W. J. Sex differences in investigatory and grooming behaviors of laboratory rats (*Rattus norvegicus*) following exposure to novelty. **Journal of Comparative Psychology**, v. 102, n. 2, p. 188-192, 1988.
- TUCHMAN, R.; MOSHÉ, S. L. & RAPIN, I. Convulsing toward the pathophysiology of autism. **Brain Development**, v. 31, n. 2, p. 95-103, 2009.
- VAN DEN BERG, C. L.; HOL, T.; VAN REE, J. M. & SPRUIJT, B. M. Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. **Development Psychobiology**, v. 34, p. 129-138, 1999.
- VANDERSCHUREN, L. J.; NIESINK, R. J. & VAN REE, J. M. The neurobiology of social play in rats. **Neuroscience and behavior Reviews**, v. 21, n. 3, p. 309-326, 1997.
- VIEIRA, M. L. & SARTORIO, R. Análise motivacional, causal e funcional da brincadeira em duas espécies de roedores. **Estudos de Psicologia**, v. 7, n. 1, p. 189-196, 2002.
- VOLKMAR, F. R. & PAULS, D. Autism. **Lancet**, v. 362, n. 9390, p. 1133-1141, 2003.
- WILLIAMS, P. G. & HERSH, J. H. A male with fetal valproate syndrome and autism. **Dev. Med. Child Neurol.**, v. 39, n. 9, p. 632-634, 1997.
- WILLIAMS, P. G. & HERSH, J. H. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. **Dev. Med. Child Neurol.**, v. 43, n. 3, p. 202-206, 2001.
- YOUNG, L. J. & DONALDSON, Z. R. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. **Science**, v. 322, n. 5903, p. 900-904, 2008.
- ZILBOVICIUS, M.; BODDAERT, N.; BELIN, P.; POLINE, J. B.; REMY, P.; MANGIN, J. F.; THIVARD, L.; BARTHÉLÉMY, C. & SAMSON, Y. Temporal lobe dysfunction in childhood autism: a PET study. Positron emission tomography. **The American Journal Psychiatry**, v. 157, n. 12, p. 1988-1993, 2000.

ANEXO 1

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

ANEXO 2

Protocolo do comportamento de brincar, social e exploratório.

CATEGORIAS DE COMPORTAMENTOS	COMPORTAMENTO	FREQUÊNCIA	TOTAL
Brincar	Ataques		
	Defesa		
	Perseguição		
	Manipulação de cauda		
Sociais	Investigação anogenital		
	<i>Grooming</i>		
	Monta		
	Passar sob ou sobre		
Exploração	Levantar		
	Locomoção		
Outros	<i>Self-grooming</i>		