

Guilherme Bauer-Negrini*^{1,2,3}, Mellanie Dutra^{1,2,3}, Victorio Bambini-Junior^{1,2,3}, Gabriela Mello^{1,2,3}, Carla Moreira Furtado⁴, Cecília Hedin-Pereira⁴, Carmem Gottfried^{1,2,3}
¹ Grupo de Pesquisa em Plasticidade Neuroglial; ² Departamento de Bioquímica – UFRGS; ³ Grupo de Estudos Translacionais em Transtornos do Espectro do Autismo (GETTEA); ⁴ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ.

*guilherme.negrini@ufrgs.br

Introdução

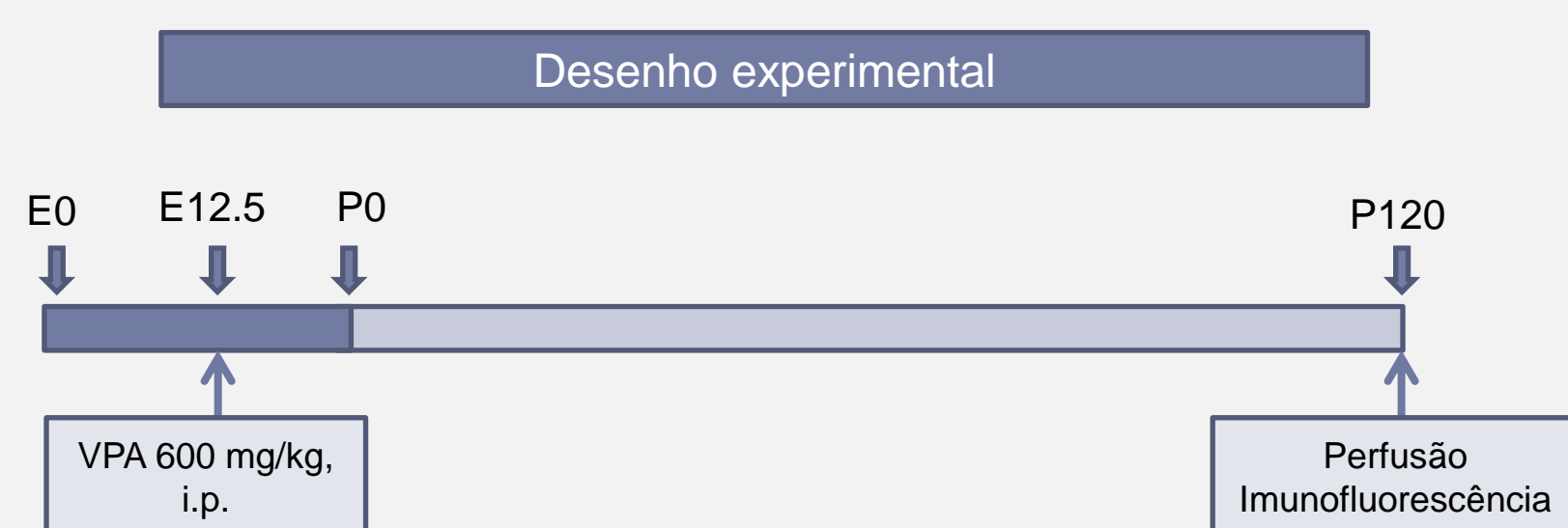
O Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) é um grupo heterogêneo de desordens caracterizadas por déficits sociais e de comunicação e repertório fixo de interesses com comportamentos repetitivos [1]. Dados epidemiológicos indicam que fatores ambientais, como a exposição materna ao ácido valpróico (VPA), aumentam o risco do nascimento de indivíduos com autismo [2]. A exposição pré-natal ao VPA em ratos leva a comportamentos similares ao autismo na prole, tais como déficits na interação social e comportamentos repetitivos/estereotipados [3]. O desbalanço excitatório/inibitório causado por disfunções na neurotransmissão GABAérgica, especialmente em regiões sensoriais, tem sido relacionado a muitas desordens, podendo afetar habilidades cognitivas e comportamentos emocionais, como observado no TEA [4]. Evidências sugerem que alterações no processamento sensorial podem estar fortemente associadas com anormalidades cognitivo-comportamentais e com alterações na forma e na organização dos neurônios em padrões colunares em regiões corticais.

Objetivos

O presente estudo teve como objetivo quantificar o número de células neuronais GABAérgicas, não-GABAérgicas e células não-neuronais, bem como analisar o padrão de organização colunar na camada cortical V da área somatossensorial primária - região de campos em barras - em ratos Wistar expostos pré-natalmente ao ácido valpróico (VPA), um modelo animal de autismo.

Materiais e métodos

Ratos Wistar prenhes receberam uma única injeção intraperitoneal de VPA (600 mg/kg, grupo VPA) ou salina (grupo controle) no dia 12,5 de gestação. Ratos machos de 120 dias oriundos de ninhadas diferentes foram anestesiados e submetidos a perfusão transcardíaca.



Os cérebros foram removidos e fatiados em criostato para obtenção de cortes coronais, utilizados nos experimentos de imunofluorescência para as marcações com anti-GABA, anti-NeuN e a visualização de núcleos celulares pela coloração com DAPI na região da área somatossensorial primária. As imagens obtidas através de microscopia confocal foram analisadas com o software FluoView e ImageJ, e os resultados foram considerados significativos com um $P < 0,05$ pelo teste t de Student. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Apoio

Resultados e Discussão

Área Somatossensorial Primária – Camada V

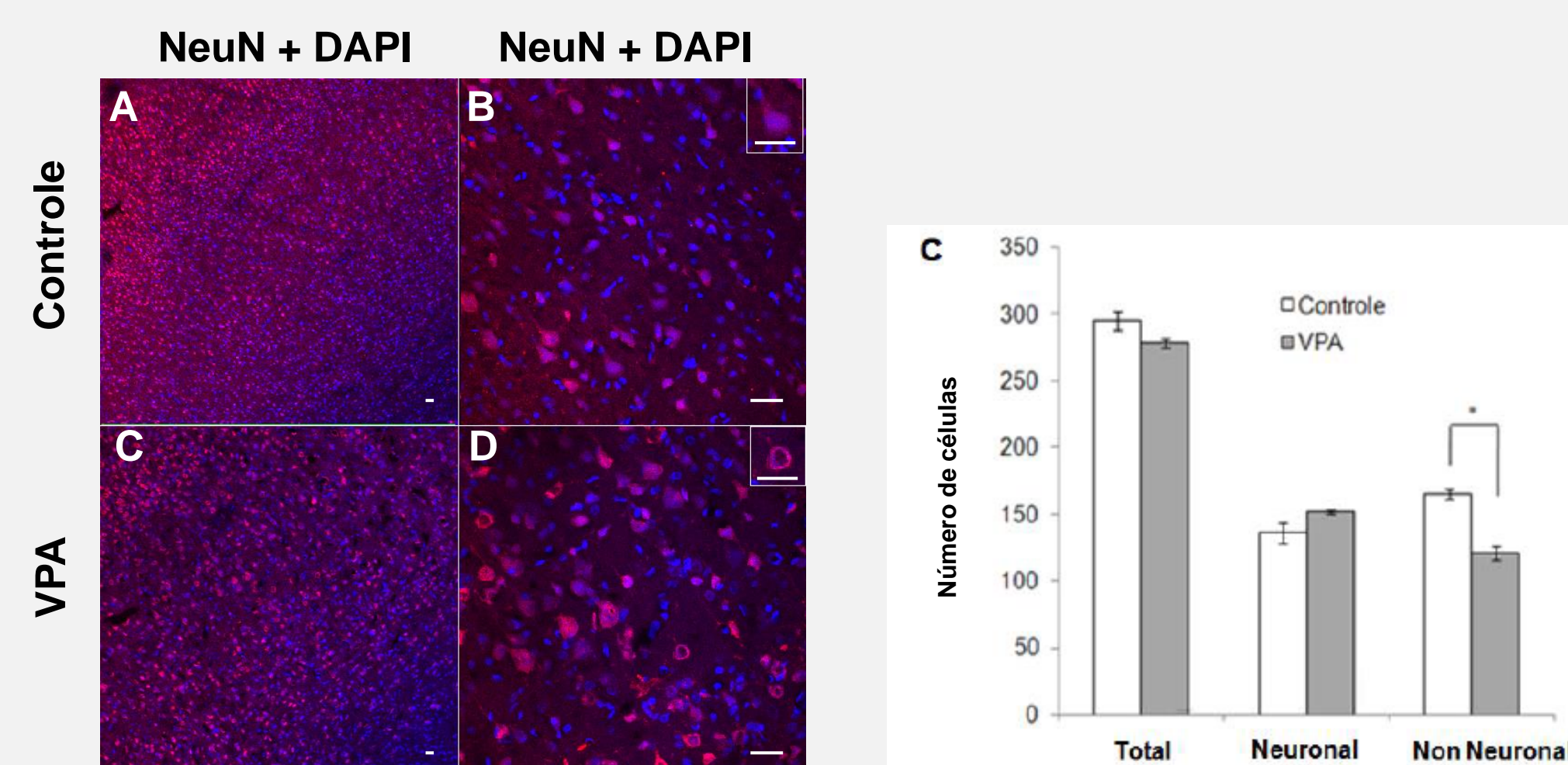


Figura 1: Efeito da exposição pré-natal ao ácido valpróico no padrão de organização colunar, forma neuronal e distribuição de NeuN, na camada V da área somatossensorial primária - região de campos em barras. Micrografias de fluorescência ilustrativas dos grupos controle (A-B) e VPA (C-D). O destaque em B e D ilustra as diferenças na distribuição de NeuN (vermelho, Alexa 546) entre os grupos. Marcação nuclear com DAPI (azul). Barra de escala = 200 μ m.

Gráfico 1: Efeito da exposição pré-natal ao ácido valpróico no número de células totais, neuronais e não-neuronais na camada V da área somatossensorial primária - região de campos em barras. Células não-neuronais na camada V (VPA): 121.5 ± 5.315 N=4; grupo controle: $165,0 \pm 4,223$ N=4, $p=0,0007$. Análise estatística por teste t de Student.

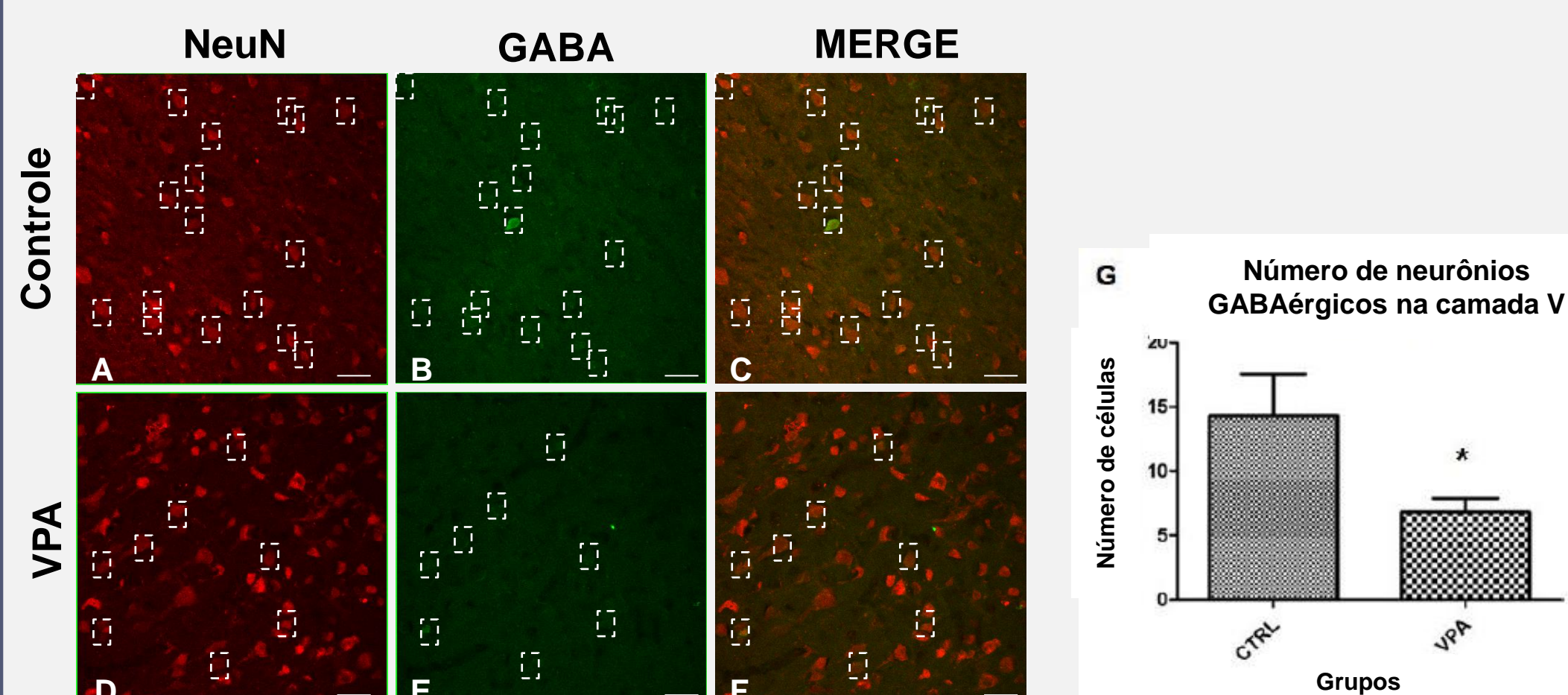


Figura 2: Exposição pré-natal ao ácido valpróico: Análise de células NeuN+ e GABA+ na camada V da área somatossensorial primária - região de campos em barras. Micrografias de fluorescência ilustrativas dos grupos controle (A-C) e VPA (D-F) marcadas com NeuN (A,D - vermelho, Alexa 546) e GABA (B, E - verde, alexa 488). Barra de escala = 200 μ m. G. Quantificação do número de células NeuN+ e GABA+ nos grupos controle ($14,33 \pm 1,856$ N=3) e VPA ($6,83 \pm 0,601$ N=3). Análise estatística por teste t de Student, $*p=0,0184$.

Gráfico 2: Quantificação do número de células NeuN+ e GABA+. Grupos controle ($14,33 \pm 1,856$ N=3) e VPA ($6,83 \pm 0,601$ N=3). Análise estatística por teste t de Student, $*p=0,0184$.

Os resultados deste trabalho demonstram uma evidente desorganização no padrão colunar e na forma de neurônios na camada V da área somatossensorial primária do grupo VPA, bem como uma localização alterada de NeuN, que afasta-se do núcleo, permanecendo na periferia celular. Ainda, observou-se redução não somente no número de neurônios GABAérgicos (VPA: $6,83 \pm 0,601$ N=3; grupo controle: $14,33 \pm 1,856$ N=3, $p=0,0184$), mas também no número de células não-neuronais nessa camada (VPA: $121,5 \pm 5,315$ N=4; grupo controle: $165,0 \pm 4,223$ N=4, $p=0,0007$).

As vias inibitórias nessa região desempenham papéis fundamentais para a organização colunar e processamento neuronal, tendo relações importantes com as células da glia, as quais regulam e são reguladas pela liberação de neurotransmissores, como o GABA. Uma redução no número de neurônios GABAérgicos pode ter consequências importantes, especialmente como um dos mecanismos desencadeadores da excitotoxicidade neuronal encontrada no TEA, especialmente em regiões corticais. Além disso, pode estar relacionada com a desorganização minicolunar observada neste trabalho.

Conclusões

Como conclusão, as alterações encontradas na área somatossensorial primária no grupo VPA destacam uma via biológica significativa e possivelmente envolvida nos distúrbios de processamento sensorial encontrados em indivíduos com TEA.

Referências

- [1] Am Psych Assoc (2013) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (5th Ed.)
- [2] Fombonne E, 2009, *Pediatr. Res.* 65, 591-598;
- [3] Rouillet et al, 2013, *Neurotoxicol Teratol*, Mar-Apr;36:47-56.
- [4] Rubenstein JL & Merzenich MM, 2003, *Genes Brain Behav.* 2, 255-67.