



## ANÁLISE DE INTERNEURÔNIOS GABAÉRGICOS PARVALBUMINA-POSITIVOS E CALBINDINA-POSITIVOS NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL MEDIAL EM MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR ÁCIDO VALPROICO

**Giovanna Carello-Collar<sup>1,2,3</sup>, Júlio Santos-Terra<sup>1,2,3</sup>, Mellanie Fontes-Dutra<sup>1,2,3</sup>, Iohanna Deckmann<sup>1,2,3</sup>, Gustavo Brum Schwingel<sup>1,2,3</sup> e Carmem Gottfried<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. <sup>3</sup> Grupo de Estudos Translacionais em Transtorno do Espectro Autista (GETTEA), ICBS, Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

### INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento que apresenta alta prevalência (1:59)<sup>[1]</sup> e, apesar do progresso alcançado, sua etiologia permanece desconhecida. Uma das hipóteses para explicar a complexidade da fisiopatologia do TEA centra-se no desequilíbrio excitatório/inibitório (E/I)<sup>[2]</sup>, o qual está relacionado com os prejuízos sociais, cognitivos e sensoriais encontrados no transtorno<sup>[3]</sup>. Entretanto, seus mecanismos ainda são pouco compreendidos. Devido ao papel-chave dos interneurônios GABAérgicos na manutenção do equilíbrio E/I no córtex pré-frontal medial (CPFm)<sup>[4]</sup> e, uma vez que o CPFm é fundamental para comportamentos sociais, questionou-se como a organização neuronal estava estruturada e se os interneurônios GABAérgicos tinham padrão de distribuição alterado em três sub-regiões do CPFm no modelo animal de autismo induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA).

### OBJETIVOS

Analisar a **quantidade** e a **proporção** dos interneurônios GABAérgicos calbindina-positivos (CB<sup>+</sup>) e parvalbumina-positivos (PV<sup>+</sup>) em relação aos neurônios totais (NeuN<sup>+</sup>) nas camadas superficiais (II/III) e profundas (IV/V) do CPFm no modelo VPA.

### MATERIAIS E MÉTODOS

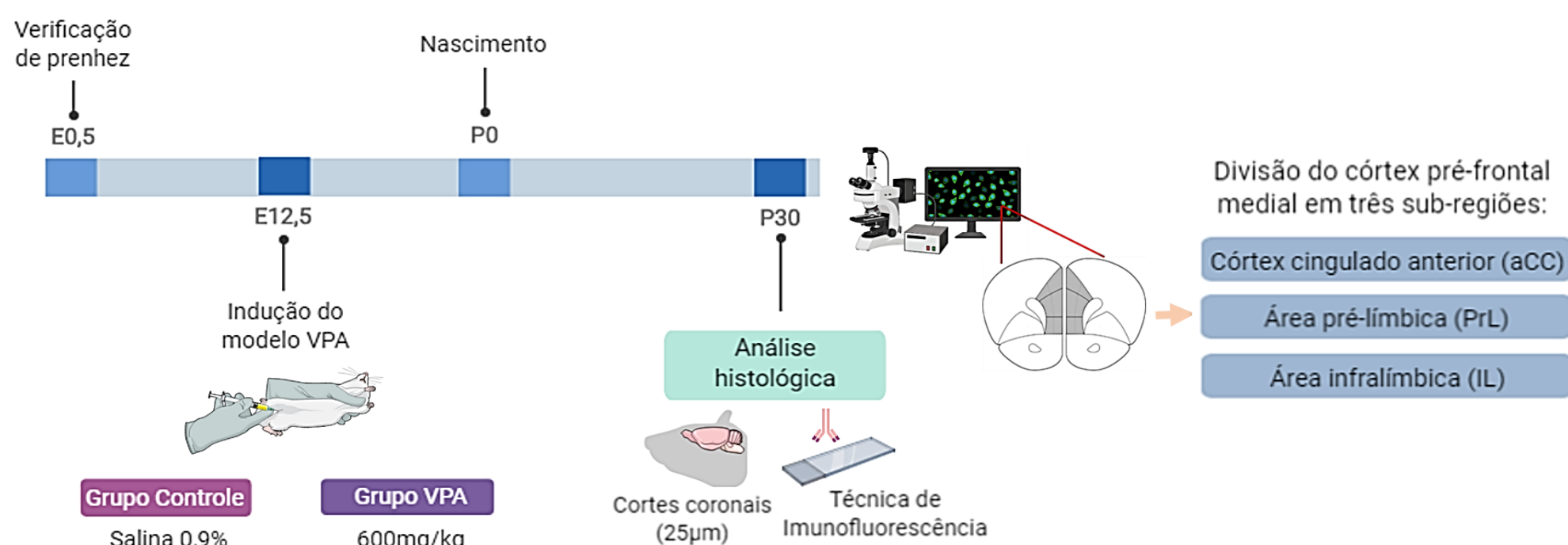


Figura 1 | **Desenho experimental.** Somente ratos machos da prole foram utilizados para os procedimentos experimentais. Anticorpos primários: Anti-Parvalbumina, Anti-Calbindina e Anti-NeuN. Incubação com DAPI. E: dia embrionário. P: dia pós-natal. Modelo VPA: dose única (600 mg/kg, i.p) [5]. CEUA-UFRGS #140367.

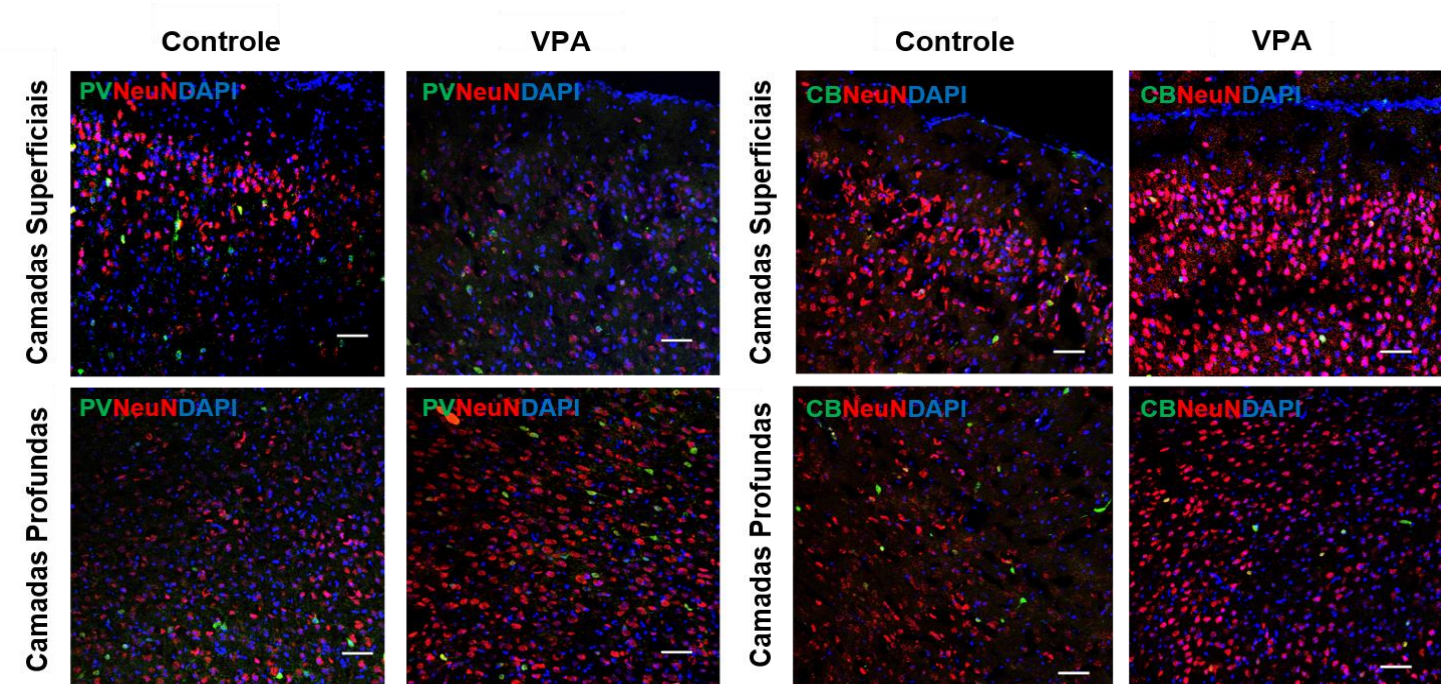


Figura 2 | **Imagem ilustrativa do ensaio de imunofluorescência.** (A) Merge de PV<sup>+</sup> (verde), NeuN<sup>+</sup> (vermelho) e DAPI (azul) no grupo controle (esquerda) e VPA (direita). (B) Merge de CB<sup>+</sup> (verde), NeuN<sup>+</sup> (vermelho) e DAPI (azul) no grupo controle (esquerda) e VPA (direita). Barra de escala: 50µm.

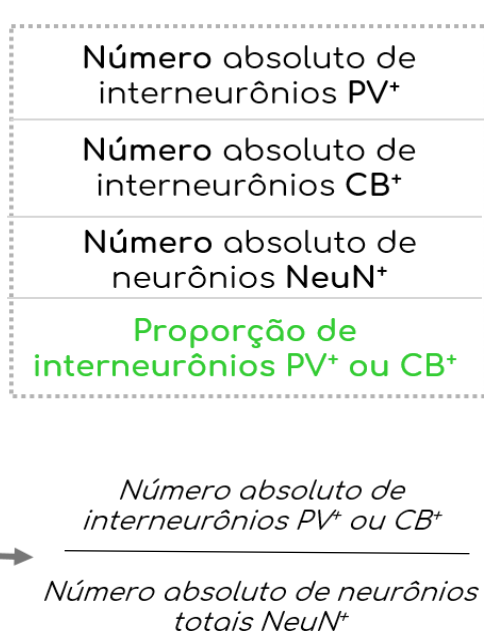


Figura 3 | **Análise cega por dois pesquisadores treinados através do software ImageJ.**

### RESULTADOS

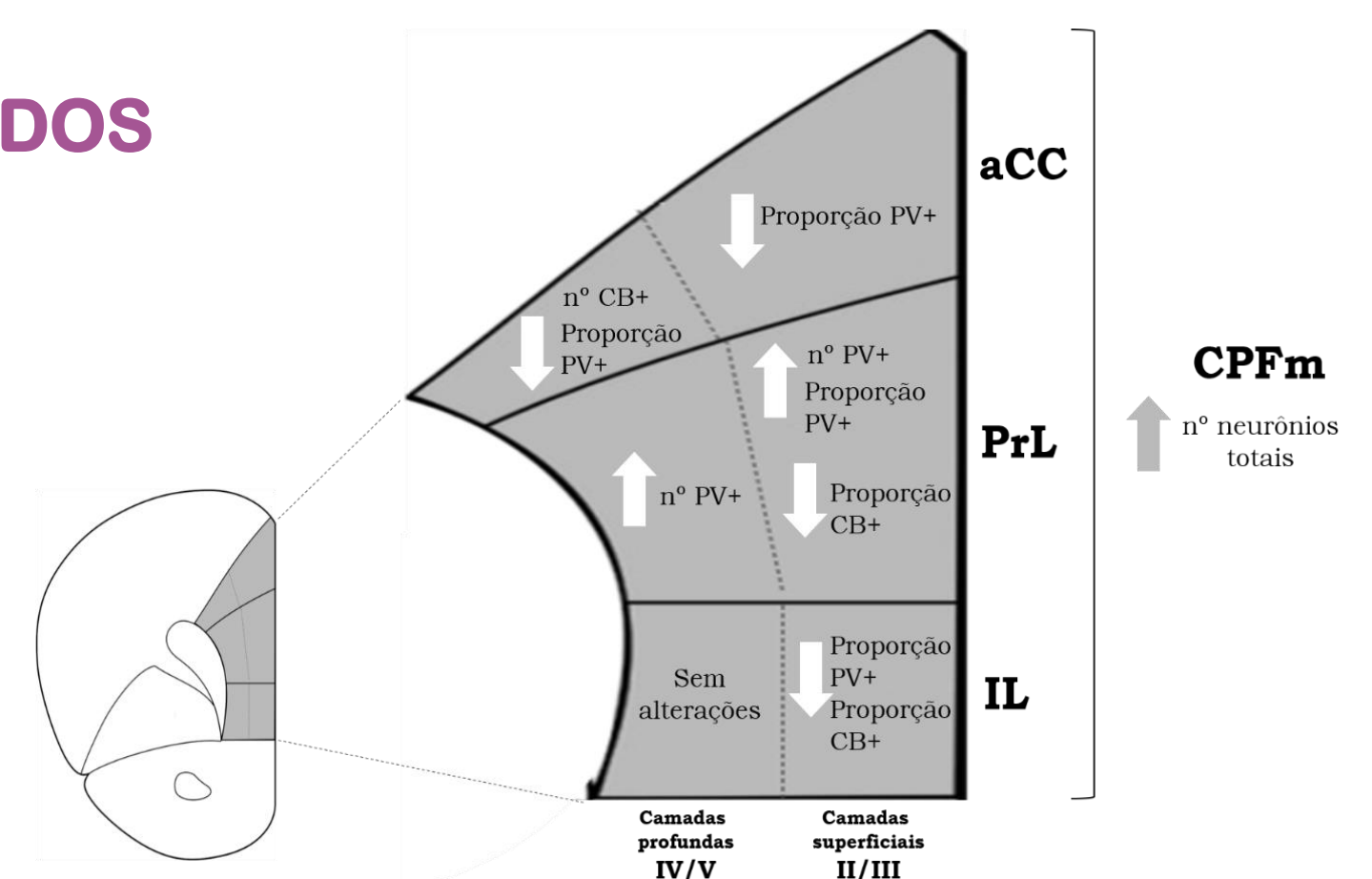


Figura 4 | **Representação esquemática dos resultados.** Imagem ilustrativa de um hemisfério encefálico, com destaque para o CPFm (área cinza) e com ampliação de suas sub-regiões (aCC, PrL e IL). No CPFm como um todo, o grupo VPA apresentou um aumento no número de neurônios totais NeuN<sup>+</sup> (p=0,0086). Já na análise das sub-regiões, observou-se diminuição do número de CB<sup>+</sup> (p=0,0278) nas camadas profundas do aCC e na proporção destes interneurônios (p=0,0255) nas camadas superficiais de PrL e de IL (p=0,0173). Já em relação aos PV<sup>+</sup>, houve aumento do número (p=0,0369) e na proporção (p=0,0044) destas células nas camadas superficiais de PrL e aumento do número nas camadas profundas (p=0,0245) de PrL. Interessantemente, houve diminuição da proporção de PV<sup>+</sup> nas camadas superficiais (p=0,0003) e profundas (p=0,0460) do aCC e nas camadas superficiais de IL (p=0,0169). n=3-5 (em ninhadas). Teste t de Student seguido por correção de Welch. Fonte: imagem elaborada pela autora.

### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A exposição pré-natal ao VPA conduziu a um aumento do número de neurônios totais NeuN<sup>+</sup> no CPFm como um todo – o que pode indicar alteração a nível excitatório. Ainda, foram observados diferentes padrões de alteração tanto em número como em proporção dos interneurônios CB<sup>+</sup> e PV<sup>+</sup> nas sub-regiões e camadas do CPFm no grupo VPA, os quais podem ser resultado de possíveis alterações no processo de migração dessas células em direção a áreas corticais e intracorticais. A exposição pré-natal ao VPA pode resultar em modificações do ambiente extracelular em diferentes momentos embrionários e influenciar nos fatores necessários para uma migração adequada. Não obstante, os resultados encontrados podem ter consequências para o equilíbrio E/I no CPFm no grupo VPA e possível relação com os prejuízos sociais já observados no modelo. Devido à complexidade dos resultados, as análises serão expandidas com foco na ontogenia dos interneurônios na tentativa de elucidar possíveis mecanismos e momentos-chave na fisiopatologia do TEA acerca do desequilíbrio E/I.

### REFERÊNCIAS

- [1] CHRISTENSEN, D. L. et al. Surveillance Summaries, 2018. [2] RUBENSTEIN, J.L.R.; MERZENICH, M. M. Genes, Brain and Behavior, 2003; NELSON, S. B.; VALAKH, V. Neuron, 2015. [3] MARKRAM, K.; MARKRAM, H. Frontiers in Human Neuroscience, 2010. [4] MARKRAM, H. et al. Nature Reviews Neuroscience, 2004. [5] SCHNEIDER, T.; PRZEŹŁOCKI, R. Neuropsychopharmacology, 2005.

### APOIO E AGRADECIMENTOS

AWARD Institute, CNPq, CAPES, FIPE-HCPA, INCT-NIM, PROPESQ-UFRGS.