

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA SENSORIAL EM RATOS EXPOSTOS À CONVULSÃO NEONATAL

Pedro Bastos dos Santos (IC), Roberta Monterazzo Cysneiros (Orientadora)

Apoio: PIBIC CNPq

RESUMO

O *status epilepticus* (SE) neonatal em ratos produz prejuízos na sociabilidade, na emocionalidade, porém sem alterações cognitivas. Evidências indicam que indivíduos com Transtorno do Espectro Autista (TEA) apresentam alteração sensorial, incluindo para o limiar nociceptivo, como visto na última edição do DSM-5. O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta ao estímulo nociceptivo em ratos submetidos ao SE neonatal em duas situações: sem estresse social (SES) e pós estresse social (PES). O grupo experimental recebeu injeção de pilocarpina 3,8% (380 mg/kg, i.p) no nono dia pós-natal e os controles receberam soro fisiológico 0,9% (0,1 ml/10g). A partir dos sessenta dias pós-natal, os animais foram submetidos ao teste de placa quente (HP). Em HP-SES não houve diferença significativa entre os grupos, tanto na latência para a resposta ao estímulo nociceptivo ($t=0.55, p=0.59$), quanto para a frequência do tipo de resposta (teste exato de Fisher, $p=1,0$). Em HP-PES também não houve diferença na latência para a resposta ao estímulo nociceptivo ($t=0,4904, p=0,638$) e na frequência do tipo de resposta (teste de exato de Fisher, $p=0,6199$). Entretanto, na comparação entre os testes, observamos que o estresse social agudo aumentou a latência para o estímulo nociceptivo ($F(1,15) = 51,46, p<0,0001$), porém não houve diferença entre os grupos ($F(1,15) = 0,03713, P=0,849$). Portanto, um único episódio SE neonatal induzido por pilocarpina não alterou a resposta nociceptiva independentemente da exposição ao estresse social agudo.

Palavras-chave: Autismo. Nocicepção. Opióide

ABSTRACT

Neonatal status epilepticus (SE) in rats produces impairment in sociability, in emotionality, but without cognitive alterations. Evidences shows that individuals with Autistic Spectrum Disorder (ASD) present sensory impairment, including for the nociceptive threshold, as seen in the last edition of DSM-5. The objective of this study was to evaluate the response to nociceptive stimulus in rats submitted to neonatal SE in two situations: no social stress (SES) and post social stress (PES). The experimental group received pilocarpine 3,8% injection (380 mg / kg, i.p) on the ninth postnatal day and the controls received 0.9% saline (0.1 ml / 10 g). After sixty days postnatal, the animals were submitted to the hot plate (HP) test. In HP-SES there was no

significant difference between the groups in both latency for nociceptive stimulus response ($t = 0.55$, $p = 0.59$) and frequency of the type of response (Fisher's exact test, $p = 1, 0$). In HP-PES, there was also no difference in latency for response to nociceptive stimuli ($t = 0.4904$, $p = 0.638$) and frequency of the type of response (Fisher's exact test, $p = 0.6199$). However, in the comparison between the tests, we observed that the acute social stress increased the latency for the nociceptive stimulus ($F(1,15) = 51.46$, $p < 0.0001$), but there was no difference between the groups ($F(1,15) = 0.03713$, $P = 0.849$). Therefore, a single episode of neonatal SE induced by pilocarpine did not change the nociceptive response regardless of exposure to acute social stress.

Keywords: Autism, Nociception, Opioid.

1. INTRODUÇÃO

Estudos clínicos demonstraram que pacientes com Transtorno do Espectro Autista (TEA) apresentam hipossensibilidade à dor. Tal alteração na resposta ao estímulo nociceptivo pode estar relacionada a uma alteração na expressão de opióides endógenos.

Modelos animais que investigam fatores genéticos e ambientais relacionados ao TEA têm possibilitado uma melhor compreensão de sua neuropatologia. Neste contexto, o *status epilepticus* (SE) neonatal em roedores produz alterações comportamentais de longo prazo, compatíveis com o comportamento autista, sugerindo que o modelo seja útil para investigar a associação entre as crises neonatais com o desenvolvimento do TEA. A avaliação da resposta sensorial é um dos critérios requeridos para a validação aparente de um modelo animal para estudo desse transtorno.

Falta na literatura pesquisas de caráter sistemático nessa área, fornecendo uma melhor compreensão do limiar da dor envolvido nas respostas anormais aos estímulos nociceptivos. O atual estudo também visa contribuir ampliando os critérios de validação do modelo animal submetidos ao SE para estudo dos transtornos do neurodesenvolvimento.

A alteração do processamento sensorial tem sido observada em um considerável contingente de indivíduos com TEA, incluindo alteração no limiar de resposta para estímulos algícos. Está bem estabelecido que a convulsão neonatal possa produzir sequelas permanentes por alterar o curso normal do desenvolvimento cerebral, sem que se observe perda neuronal considerável. Em modelos animais, a convulsão neonatal produz comportamento do tipo ansioso e comportamento autista caracterizado por redução da preferência social e déficit de discriminação social, sugerindo que o modelo pode ser apropriado para estudo desse transtorno.

Assim, a avaliação da resposta sensorial é uma etapa fundamental para validação do modelo do *status epilepticus* neonatal para o estudo dos transtornos do neurodesenvolvimento.

Este projeto tem como objetivo principal avaliar a resposta sensorial de ratos submetidos ao *status epilepticus* neonatal para estímulos nociceptivos em duas situações distintas: a primeira sem situação estressora prévia e uma segunda com exposição à novidade social minutos antes da realização do teste nociceptivo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A neurociência é uma área de estudo com enfoque no sistema nervoso, nas suas funcionalidades, estruturas envolvidas, desenvolvimento, mecanismos e aspectos comportamentais. Logo, esse ramo da ciência possui um caráter interdisciplinar visto que os

conhecimentos gerados possuem implicações em outras áreas do conhecimento, como educação, qualidade de vida, patologias, etc. (DIAMOND; AMSO, 2008).

As patologias neurológicas são aquelas que acometem o Sistema nervoso central e periférico, causando desordens no encéfalo e em outras estruturas desse sistema (ELIAS, 2004). O autismo é um exemplo dessas patologias, e por ter um grande espectro de sintomas envolvidos, há uma devida necessidade de pesquisas nessa área (POSAR; VISCONTI, 2016).

O termo “Autismo” foi inicialmente usado pelo psiquiatra suíço Paul Eugen Bleuler para caracterizar um dos sintomas de pacientes com esquizofrenia. Posteriormente, em 1943, o termo foi utilizado pelo psiquiatra Leo Kanner para descrever crianças com problemas no desenvolvimento e um profundo déficit de relacionamento interpessoal. Na época, Kanner acompanhou um total de onze crianças, e os aspectos que neles ficaram mais evidentes foram a incapacidade de se relacionar com outras pessoas, os distúrbios severos de linguagem e a insistência obsessiva na invariância (TUCHMAN; RAPIN, 2009).

Logo, o autismo é descrito como uma síndrome neurológica (HOLMES *et al.*, 2015), e, atualmente, está inserido dentro dos Transtornos do Espectro do Autista, um grupo de transtornos caracterizado por déficit de comunicação social e comportamentos/ interesses restritos e repetitivos (Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – 5a edição - DSM-5, American Psychiatry Association, 2013).

Considerando o acúmulo de evidências que demonstram que indivíduos com TEA frequentemente apresentam disfunção do processamento sensorial, a última edição do DSM-5 inseriu problemas com o processamento sensorial (hiper ou hiporreatividade a estímulos sensoriais ou interesse incomum por aspectos sensoriais do ambiente), nos critérios diagnósticos. Tais sintomas poderiam estar diretamente associados ao Sistema Opióide, na modulação endógena da dor.

O Sistema Opióide abriga uma série de receptores, espalhados por todo o Sistema Nervoso Central que estão diretamente envolvidos na manutenção de diversas respostas comportamentais e fisiológicas, porém, estão principalmente associados à regulação da dor. De acordo com o tipo desses receptores, bem como sua localização dentro do sistema nervoso central e periférico, algumas de suas ações já são conhecidas (DHAWAN, *et al.*, 1996). O quadro a seguir mostra as principais funções e localizações dos receptores opióides (quadro 1).

Quadro 1 – Classificação dos receptores opióides quanto sua função e localização

Tipo de receptor	Função	Localização
Receptor δ (delta)	Podem modular as repostas analgésicas, como também podem regular as funções cognitivas e de dependência física	núcleos pontinos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral profundo e nos neurônios sensitivos periféricos
Receptor κ (kappa)	funções de nocicepção, termorregulação, controle de diurese e secreção neuroendócrina	Hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa na medula espinhal, além de neurônios sensitivos periféricos
Receptor μ (mu)	regulam funções como a nocicepção, o ciclo respiratório e o trânsito intestinal	nas lâminas III e V do córtex cerebral, no tálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa e trato gastrintestinal

Fonte: DHAWAN, et al., 1996

Embora os receptores κ e μ participem diretamente da analgesia, ambos atuam de maneira distintas nesse processo. Os receptores κ atuam principalmente à nível medular, ou seja, suas ações se concentram principalmente na substância gelatinosa da medula espinhal. É neste local que ocorrem a liberações de neuromoduladores e neurotransmissores inibitórios que ativarão receptores pré e/ou pós-sinápticos na terminação central do aferente primário nociceptivo, modulando o impulso nervoso que ascende ao córtex sensorial (PATHAN; WILLIAMS, 2012). Já os receptores μ atuam principalmente a nível supraespinhal. O estímulo nociceptivo que ascende ao tálamo e região cortical ativa o Núcleo periaquedutal cinzento (PAG). Esse estímulo se propaga até o Núcleo magno da rafe (NRM), no tronco encefálico, ativando a formação reticular, mais precisamente no núcleo reticular paragigantocelular (NRPG). Essa estrutura liberará endorfinas na fibra nociceptiva aferente, causando a abertura de canais de Cl^- , e, conseqüentemente, a inibição do potencial de ação. Destaca-se também a importância de outras estruturas que podem ajudar a modular esse processo, como o hipotálamo, capaz de ativar ou inibir o Núcleo periaquedutal cinzento (HOLDEN; YOUNG; YOUNG, 2012).

FORREST, 2005). A figura abaixo demonstra a participação das estruturas cerebrais e medulares envolvidas no processo analgésico (figura 1)

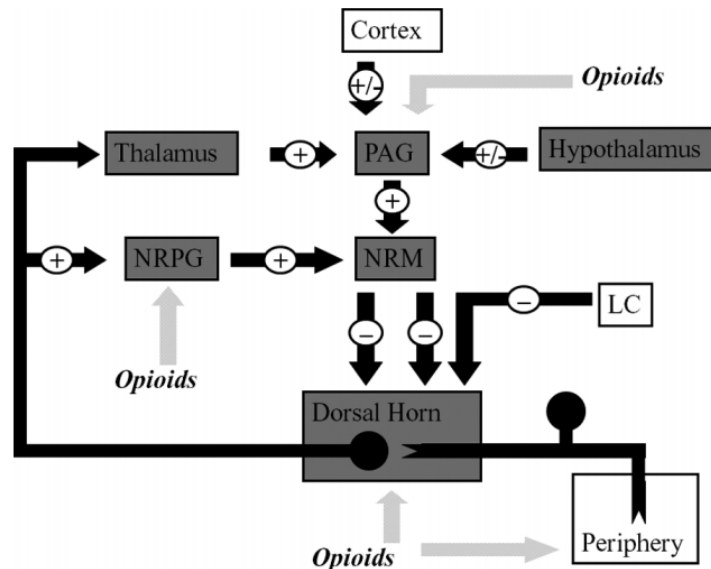


Figura 1 - Esquema das estruturas envolvidas na analgesia. O esquema demonstra a participação da modulação nociceptiva no corno dorsal da medula, pela liberação de opióides endógenos nessa estrutura, bem como a participação de estruturas principais nas vias descendentes de inibição, representadas pela cor cinza. (Fonte: PATHAN; WILLIAMS, 2012).

Por ativarem respostas de caráter inibitório, esses receptores opióides são transmembranares, acoplados a uma proteína G, e modulam a analgesia bloqueando canais de Cálcio voltagem-dependentes, na medida em que os opióides endógenos se encaixam em seus sítios de ligação, desencadeados por um estímulo nociceptivo. (HOLDEN; YOUNHEE; FORREST, 2005). O fechamento dos canais de cálcio voltagem dependentes, reduz a liberação de neurotransmissores envolvidos no impulso nociceptivo, causando uma hiperpolarização dos neurônios aferentes, inibindo parcialmente a transmissão do estímulo doloroso (DHAWAN, et al., 1996). A figura abaixo demonstra como ocorre esse processo (figura 2).

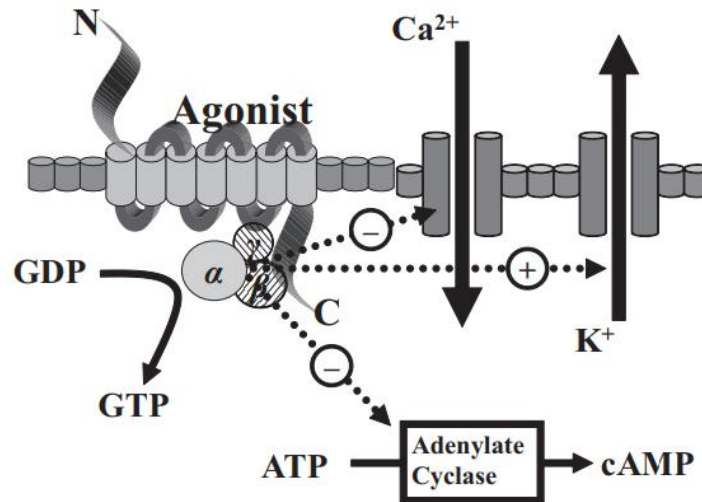


Figura 2 - Representação do receptor opióide. Quando o agonista se liga a porção terminal do receptor opióide faz com que a subunidade α , que estava ligada a Guanina difosfato (GDP), se ligue a guanina trifosfato (GTP), tornando-se ativa. De tal modo, o complexo α GTP se dissocia do complexo $\beta\gamma$. Ambos irão atuar em proteínas alvos, causando uma diminuição dos níveis intracelulares de AMPc, e, conseqüentemente, reduzindo a entrada de Cálcio e permitindo o efluxo de potássio. Esses eventos resultam na hiperpolarização e contribuindo na inibição do estímulo. (Fonte: PATHAN; WILLIAMS, 2012).

Além dessa neuromodulação da dor, o Sistema Opióide pode ser ativado também em decorrências de estímulos estressores, não necessariamente associados à dor física. (ROSENBLUM, 2008).

Esses estímulos estressores podem alterar o nível de ansiedade do indivíduo, impactando diretamente na percepção nociceptiva. Essa alteração dependerá da intensidade, contexto e período de duração da situação estressora (AL' ABSI; NAKAJIMA; GRABOWSKI, 2013). Alguns estudos de caráter sistemático e clínico demonstraram que o estresse crônico pode aumentar consideravelmente a experiência dolorosa, bem como o estresse agudo pode causar um efeito atenuante na percepção da dor (AL' ABSI; ROKKE, 1991; QUINTERO *et al.*, 2000; AHMAD; ZAKARIA, 2015).

A exposição à novidade social pode ser um estímulo estressante desencadeador para aumentar o nível de ansiedade, principalmente quando se trata de um animal com comportamento típico autista. Tal estímulo pode ser a causa de um estresse agudo, desencadeando uma série de comportamentos do tipo ansioso (CASTELHANO *et al.*, 2013).

De tal modo, esses estímulos estressores que aumentam a ansiedade e afetam a percepção dolorosa está diretamente relacionado a produção e ação de opióides endógenos. Mediante uma situação estressora há uma ativação de neurônios endófinérgicos, resultando numa liberação de β -endorfinas que irão atuar não somente em áreas como o hipocampo,

amígdala e mesencéfalo, moduladores da sensação de estresse, como também outras áreas encefálicas (BALI, RANDHAWA, JAGGI, 2015).

Considerando um indivíduo autista, essas situações estressoras e a manutenção da liberação de endorfinas podem ter um funcionamento diferente mediante o transtorno, podendo acarretar mudanças fisiológicas e comportamentais significativas (PELLISSIER *et al.*, 2017).

Um estudo feito por Cazzulo (1999) demonstrou que há uma alteração significativa na expressão de opióides endógenos de indivíduos que apresentam TEA, e a anormalidade desse sistema estaria diretamente ligada aos sintomas apresentados no comportamento autista. Curiosamente, quando se trata da resposta à estímulos não dolorosos, sejam estímulos visuais, olfatórios, táteis, gustatórios, etc., há uma hipersensibilidade desses indivíduos (BARANEK *et al.*, 2005; DUNN; MYLES; ORR, 2002), aliada a uma dificuldade no processo de integração sensório-motora (HANNANT; TAVASSOLI; CASSIDY, 2016).

Apesar dos diversos estudos investigando as alterações sensoriais no TEA, ainda permanece obscura como ocorre a regulação e percepção da dor (NADER *et al.*, 2004). Militeri (2000) apontou que crianças que apresentavam comportamento autista, tinham uma propensão significativa em ter baixa sensibilidade à dor. Porém, em um artigo de revisão neste tema, Moore (2015) observou que tanto o auto relato, quanto a dos cuidadores de indivíduos com TEA, apontam para a hipossensibilidade à dor, no entanto, os procedimentos médicos e da manipulação experimental sugerem respostas normais ou de hipersensibilidade. O estudo aponta a necessidade de mais pesquisas sistemáticas nesta área para se entender as respostas e os limiares à dor em indivíduos com TEA.

Vários modelos animais foram desenvolvidos para estudar esse Transtorno, cuja etiologia é complexa e multifatorial, pois geralmente pode estar associado ao insulto hipóxico-isquêmico, mas também pode ser ocasionado por infecções perinatais, distúrbios metabólicos e hemorragia intracraniana (CASTELHANO *et al.*, 2013). Outras possíveis causas de convulsões são infecções do sistema nervoso central, distúrbios de desenvolvimento do sistema nervoso central, distúrbios metabólicos e convulsões hereditárias (LAWRENCE *et al.*, 2010).

Os modelos foram desenvolvidos com base nos fatores etiológicos (genéticos e ambientais) associados ao transtorno, com o intuito de compreender o papel destes na fisiopatologia do TEA.

Os estudos epidemiológicos indicam que o TEA está fortemente ligado à epilepsia, um distúrbio paroxístico, ou seja, que se manifesta na forma de crises, caracterizado por uma atividade elétrica cerebral grande com uma gama de variedade de manifestações

comportamentais. Há uma prevalência de 5-46% dos indivíduos com autismo apresentarem epilepsia. Esta extensa variabilidade pode ser atribuída à heterogeneidade da população estudada, quanto à coexistência de deficiência intelectual, idade, história familiar, atraso grave na linguagem, síndromes genéticas e a gravidade dos sintomas autísticos (WOOLFENDEM et al. 2012).

A incidência de epilepsia em crianças com TEA é bimodal, portanto, tem sido observado um pico antes do cinco anos de idade e um segundo pico em crianças com mais de 10 anos (VOLKMAR; NELSON, 1990). A relação entre Autismo e Epilepsia, que vem sendo discutida há décadas, ressurge com a discussão se as crises no início do desenvolvimento contribuem para os sintomas autísticos.

É compreensível que essas convulsões acometam mais os recém-nascidos. Isso se deve ao fato do cérebro em desenvolvimento ser mais excitável, e, portanto tal característica tem forte relação com a idade (BEN-ARI; HOLMES, 2006). Essa excitabilidade do cérebro imaturo é atribuída em parte a ação excitatória do Ácido Gama Aminobutírico (GABA). Em estudos com modelo animal, demonstrou-se que esse neurotransmissor tem efeito despolarizante nas estruturas cerebrais de ratos ainda jovens. Conforme o cérebro do roedor vai se desenvolvendo, o GABA assume papel hiperpolarizante no potencial de ação desses neurônios (KHAZIPOV *et al.*, 2004).

Essas convulsões podem atrapalhar, portanto, o desenvolvimento cerebral, como já evidenciado em estudos animais. Em termos gerais, cerca de metade dos casos de convulsões apresentam sequelas mínimas, enquanto a outra parcela apresenta sequelas profundas. Em casos mais extremos podem levar a morte do indivíduo (COSTA *et al.*, 2001).

Tais convulsões geralmente se apresentam de modo repetitivo no neonato, sem apresentar consciência entre elas. A essa condição dá-se o nome de Status Epilético (SE), que se caracteriza como condição resultante da falha de mecanismos cerebrais que levam a convulsões prolongadas e podem resultar em consequências a longo prazo, incluindo lesão ou morte neuronal e alteração das redes neuronais, dependendo do tipo e duração das crises convulsivas (TRINKA *et al.*, 2015). A fim de estudos, em modelo animal, geralmente utilizam-se substâncias convulsionantes para simular o Status Epilético, de modo a analisar os impactos ocasionados pelas crises convulsivas durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso.

Outros estudos também se empenharam em investigar as alterações de longo prazo da convulsão neonatal para o desenvolvimento de comportamento autista, demonstrando que as crises convulsivas neonatais em ratos produzem prejuízos na sociabilidade (BARBOSA *et al.*, 2017; CASTELHANO *et al.*, 2010; CASTELHANO *et al.*, 2013; CASTELHANO *et al.* 2015,

LEITE et al., 2016), o que foi posteriormente demonstrado por grupos independentes (BERNARD; BENKE, 2015; LUGO et al. 2014).

3. METODOLOGIA

Os procedimentos foram devidamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da Universidade Presbiteriana Mackenzie segundo o processo de Nº 150/12/2016.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos recém-nascidos (PN9), sob condições controladas de ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura (25-26° C) e com livre acesso a água e comida. A ninhada foi aleatoriamente separada em dois grupos: controle e experimental, com oito e nove animais, respectivamente.

Indução ao *Status Epilepticus*

O grupo experimental recebeu injeção de pilocarpina 3,8% (380 mg/kg, i.p) no nono dia pós-natal e os controles receberam soro fisiológico 0,9% (0,1 ml/10g) (CASTELHANO et al., 2013).

Testes

Todos os testes foram iniciados a partir do 60º dia após o nascimento e foram devidamente filmados com uma câmera acoplada próximo ao aparato do teste comportamental. Após o término de cada sessão os aparelhos foram higienizados com uma solução de álcool 5%. Todos os testes foram realizados na mesma sala, com uma temperatura e intensidade de luz controlada (CASTELHANO et al., 2013).

Teste da Placa Quente (*Hot Plate test*)

O teste descrito inicialmente por Woolfe e Macdonald (1944), utiliza a temperatura como estímulo nociceptivo. Logo, o teste foi utilizado para avaliar a sensibilidade do animal ao estímulo térmico, medindo sua resposta ao ser exposto ao contato com uma superfície aquecida, como demonstra a figura 3.



Figura 3 - Representação gráfica do teste de Placa quente. Fonte: elaborado pelo autor.

Para tal, foi utilizado uma superfície de alumínio elevada a temperatura de 55°C, e margeada por uma redoma de acrílico transparente, a qual não limitou a capacidade de movimento do animal, mas garantiu que o rato permanecesse somente na região aquecida (ALLEN et al., 2004). O aparelho utilizado para realizar o teste foi “Ugo Basile 35100 - Hot Cold Plate” (figura 4).



Figura 4 - Aparelho Ugo Basile 35100. Fonte: fotografado pelo autor

Inicialmente foi feita a habituação do animal no aparelho, a fim de evitar que o animal se estressasse e comprometesse a fase seguinte do experimento. Foram colocados sob a placa não aquecida durante dois minutos. Depois foram retirados e logo depois colocados novamente na placa, para a execução da fase seguinte

Na próxima fase do teste foi feita a avaliação da dor. Com a superfície da placa previamente aquecida em 52° C. A avaliação do comportamento do animal se deu logo após a sua introdução sobre a superfície da placa. Foram registrados alguns movimentos de reação, como elavação da pata, lambida da pata e salto, juntamente com o tempo que realizariam tais ações.

A latência para a resposta foi registrada manualmente com a ajuda de um cronômetro acoplado ao sistema do aparato. A medição do tempo se deu desde a introdução do rato no local correspondente a placa até a realização de um desses movimentos. Estabeleceremos um tempo limite de 25 segundos de permanência do rato nesse teste, a fim de evitar danos à saúde do animal (EMIK *et al.*, 2016).

O teste de placa quente foi feito sob duas condições: a primeira com utilização do teste sem condição estressora prévia, e uma segunda utilização com uma exposição estressora prévia ao teste de placa quente por meio da exposição à uma novidade social.

Exposição à novidade social

A exposição à novidade social foi feita antes do teste de placa quente. O contato do animal testado na placa quente se deu da seguinte maneira: A novidade social foi colocada em uma caixa de acrílico com alguns orifícios em suas paredes, de modo que permitiu o contato entre os animais. A caixa possui dimensões de 31x21x24 cm e foi colocada no centro do aparato de campo aberto (figura 5).

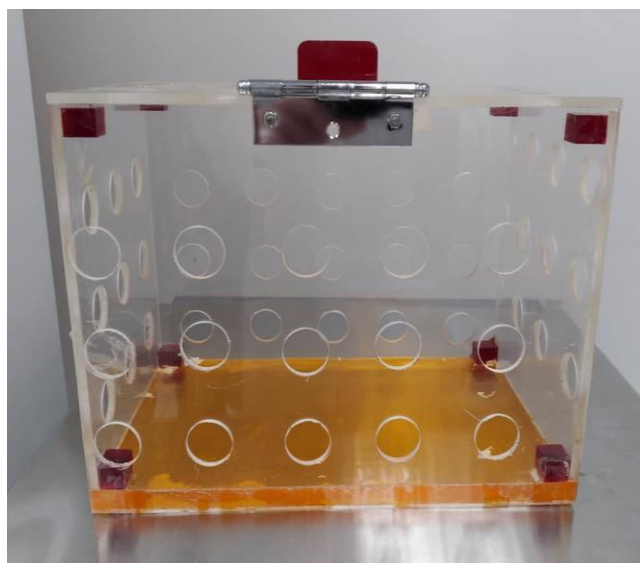


Figura 5 - Caixa de acrílico. Fonte: fotografado pelo autor

Cada animal foi nomeado com dois números, o primeiro referente a ninhada a qual pertence e o segundo para identificar o indivíduo dentro da ninhada.

A escolha da novidade social foi feita aleatoriamente, apenas tomando cuidado para que animais que já se conheciam não fossem sorteados juntos, como mostra o seguinte quadro (Quadro 2).

Quadro 2. Combinação aleatória dos animais usados como novidade social e animal testado

Novidade social	Animal testado
C4.1	C0.2
C1.2	C4.1
C3.1	C4.3
C0.1	C1.3
C0.3	C2.1
C2.3	C0.3
C3.2	C1.1
C0.2	C3.2
C5.1	C2.3
C4.3	C5.1
C2.2	C3.1
C1.1	C2.2
C4.2	C1.2
C2.1	C4.2
C5.2	C0.1
C3.1	C5.2
C1.3	C4.4

Fonte: elaborado pelo autor.

Logo após, o animal testado fora introduzido no aparato durante três minutos, de modo que podia explorar o ambiente e a novidade social livremente, como pode ser visto na representação abaixo (figura 6).

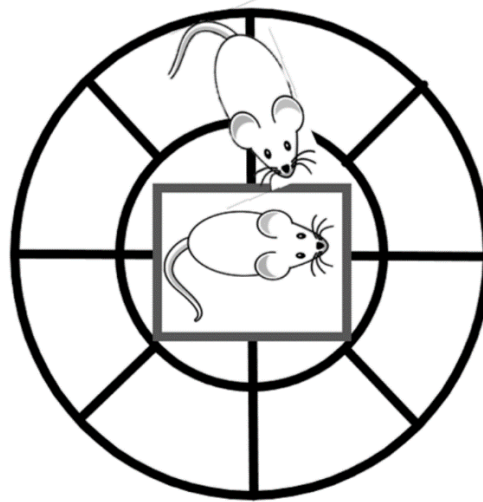


Figura 6 - Representação gráfica da exposição à novidade social

Ao acabar o tempo de exposição, o animal testado era retirado do campo aberto e imediatamente colocado no teste de placa quente, com a placa previamente aquecida. Então, era feita toda a análise e mensurado o tempo de resposta ao estímulo nociceptivo.

Análise dos tecidos pós-testes comportamentais

Ao fim dos testes comportamentais, os animais foram decapitados sob anestesia profunda (uretana 1,2 g/kg, ip), o cérebro foi removido e os tecidos (córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo e estriado) foram dissecados e armazenados em freezer -80°C até o momento da análise.

Análise estatística

As variáveis analisadas foram a latência de resposta nociceptiva, com ou sem exposição à novidade social e a frequência de sobressalto. Para avaliar a distribuição Normal ou Gaussiana, as variáveis foram submetidas aos testes de D'Agostino & Pearson e Shapiro-Wilk. A latência de resposta nociceptiva foi expressa como média $\pm$ desvio padrão e foram analisados com teste t de Student ou ANOVA Mista seguido pelo pós-teste de Bonferroni. As

variáveis com distribuição não paramétrica foram analisadas com o teste exato de Fisher. Diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0.05$.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

No que se refere ao teste de placa quente sem exposição à novidade social não houve diferença significativa entre os grupos, tanto na latência para a resposta ao estímulo nociceptivo ($t=0.55, p=0.59$) quanto para a frequência do tipo de resposta (teste exato de Fisher, $p=1.0$), gráficos 1 e 2, respectivamente.

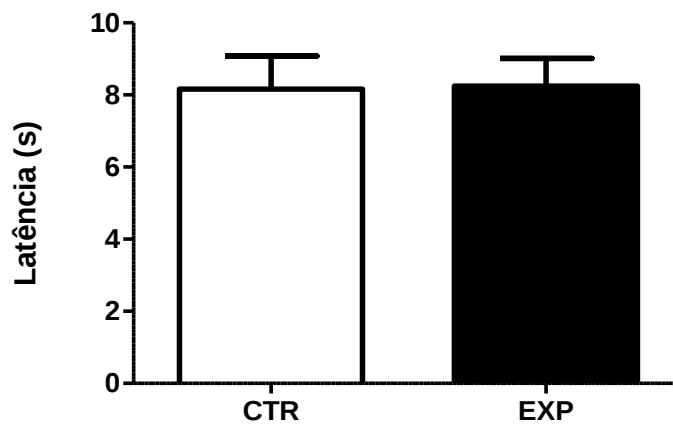
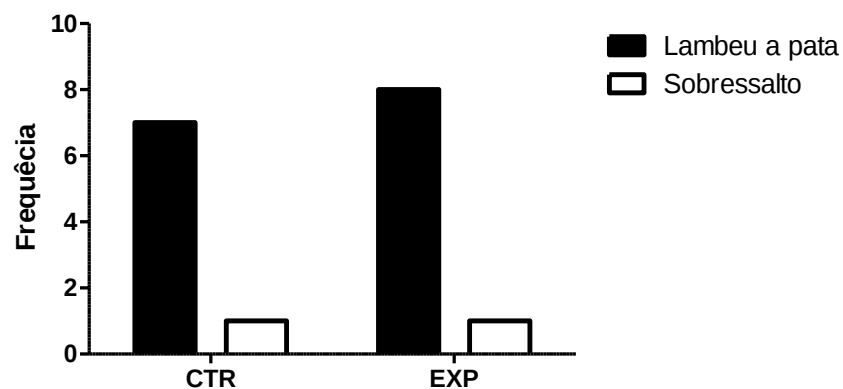


Gráfico 1 - Latência para a resposta ao estímulo nociceptivo no teste de placa quente sem estímulo estressor prévio expressos como média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos.



Gráficos 2 – Frequência dos tipos de respostas no teste de placa quente sem estímulo estressor prévio. Não houve diferença significativa entre os grupos.

No teste de placa quente pós exposição à novidade social, a latência para a resposta ao estímulo nociceptivo ($t=0,4904$, $p=0,638$) e a frequência do tipo de resposta não diferiram entre os grupos (teste de exato de Fisher, $p=0,6199$), gráficos 3 e 4.

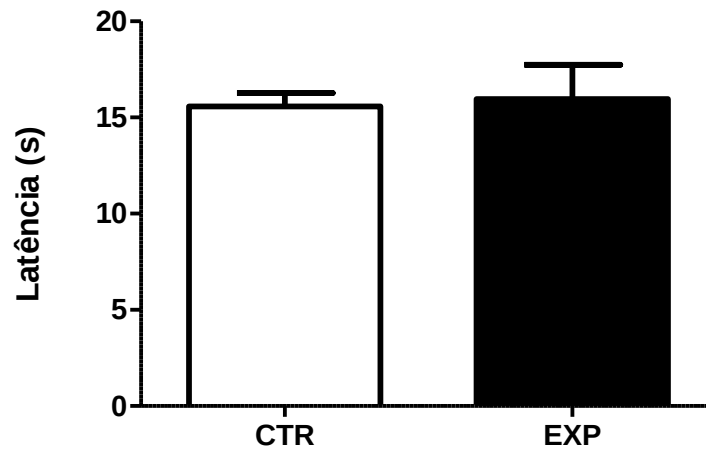


Gráfico 3 - Latência para a resposta ao estímulo nociceptivo no teste de placa quente pós exposição à novidade social expressos como média $\pm$ desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos.

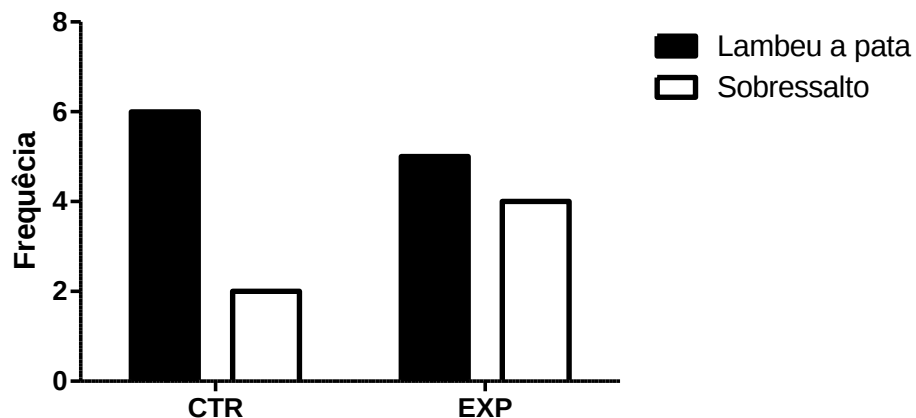


Gráfico 4 - Frequência dos tipos de respostas no teste de placa quente pós exposição à novidade social. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Por fim foi necessário realizar uma comparação entre os resultados obtidos nos testes anteriores, de modo a verificar se houve diferença na latência para resposta ao estímulo nociceptivo entre as condições. Observamos que o estresse social agudo aumentou a latência ($F(1,15) = 51,46$, $p<0,0001$), mas sem diferença entre os grupos ($F(1,15) = 0,03713$, $P=0,849$), gráfico 5.

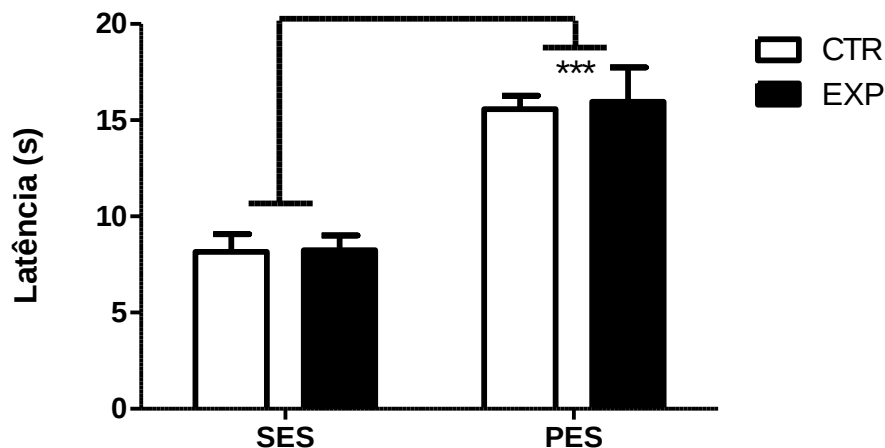


Gráfico 5 - Comparação das latências para a resposta ao estímulo nociceptivo sem estresse social (SES) e pós estresse social (PES) expressos como média $\pm$ desvio padrão dos grupos controles e experimental. A latência aumentou pós exposição à novidade social, ***p<0,0001).

Os resultados demonstram que os animais expostos ao SE neonatal não apresentam alterações na resposta nociceptiva. Entretanto, mesmo que os resultados contrariem a hipótese inicial de que um animal com comportamento típico autista deva apresentar hipossensibilidade ao estímulo nociceptivo, estudos anteriores do grupo demonstram que os animais exibem um conjunto de alterações comportamentais compatíveis com autismo de alto funcionamento ou síndrome Asperger, como prejuízo no comportamento de brincar, baixa preferência pela novidade social, déficit de discriminação social, aumento do *grooming* em ambiente ansiogênico, comportamento relacionado à ansiedade (CASTELHANO *et al.*, 2010, 2013, LEITE *et al.*, 2016), prejuízo na motivação social (PACÍFICO, 2016), prejuízo no comportamento materno (SILVA, 2018), provavelmente relacionados a redução da sinalização ocitocinérgica hipocampal (CYSNEIROS *et al.*, 2017) com preservação das funções executivas (BARBOSA *et al.*, 2017).

Os achados desse trabalho podem ser comparados com outros modelos igualmente utilizados para o estudo do TEA no que tange as alterações do comportamento social. No entanto, no modelo para estudo do TEA pela exposição pré-natal ao ácido valpróico (VPA), os ratos também apresentam, no teste de placa quente, um limiar mais alto para o estímulo nociceptivo em comparação com ratos controle (MORAKOTSRIWAN *et al.*, 2016). Apesar desta aparentemente discrepância, o modelo do SE neonatal parece bastante promissor para estudo do TEA pela seletividade das alterações produzidas, que abrange primariamente o circuito mesocorticolímbico envolvido com tomada de decisão social. A despeito da aparente ausência de alteração no limiar de resposta ao estímulo nociceptivo, se faz necessário a testagem com outros paradigmas que também avaliem a resposta para o estímulo alérgico que

mediante a um processo inflamatório. Por exemplo, o paradigma Randall & Selitto mensura o limiar nociceptivo de retirada da pata mediante a uma pressão crescente exercida sobre a pata do animal, na ausência e presença de reação inflamatória induzida pela administração intraplantar de um agente flogístico (SILVA *et al.*, 2013).

Diferentemente do teste de placa quente que avalia predominantemente a resposta supraespinal (LANGERMAN *et al.*, 1995), este paradigma avalia também a transmissão do impulso até o corno dorsal da medula. Outro teste que poderá ser utilizado é o *Tail-flick test*, que predominantemente avalia o reflexo espinal, mensura a latência para a retirada da cauda exposta à um estímulo térmico (SILVA *et al.*, 2013). Além disso, há um grande escopo de estímulos não dolorosos, sejam eles visuais, olfatórios, gustativos, táteis ou auditivos que também são importantes para a validação de um modelo animal útil para estudo do TEA.

Em relação ao teste de placa quente pós novidade social, o aumento no tempo de resposta dos animais de ambos os grupos pode ser fruto de uma possível analgesia decorrente do estresse agudo da interação social. O estresse agudo ativa uma resposta alostática para manter a homeostase, que inclui neste caso, ativação do sistema descendente de analgesia que tem como componentes centrais *Locus Coeruleus* (LC) e substância cinzenta periaquedutal mesencefálica que modulam a liberação de opióides endógenos, como as β -endorfinas resultando em analgesia. (BALI, RANDHAWA, JAGGI, 2015). Neste sentido, especulamos que apesar dos animais experimentais exibirem comportamento do tipo ansioso (CASTELHANO *et al.*, 2013, LEITE *et al.*, 2016) e esperássemos maior hipoalgesia comparativamente aos controles, é possível que a intensidade do estresse social agudo tenha atingindo o teto máximo, desencadeando respostas iguais em ambos os grupos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que um único episódio SE neonatal induzido por pilocarpina não impactou as funções de resposta ao estresse agudo e o processo neuromodulatório da experiência nociceptiva.

Reitero a importância da utilização de outros testes que avaliem a resposta ao estímulo nociceptivo periférico, podendo ser feita juntamente com a indução de inflamação local. Além disso, é interessante quantificar os receptores opióides envolvidos nos processos analgésicos nos animais submetidos ao *Status Epilépticus* por pilocarpina. Por fim, para melhor avaliar o nível de receptores nas estruturas encefálicas é necessário fazer o Ensaio de imunoabsorção enzimática.

6. REFERÊNCIAS

American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5). Arlington: American Psychiatric Publishing; 2013.

AHMAD, A. H.; ZAKARIA, R.; Pain in times of stress. **Malaysian journal of medical sciences**, v. 22, n. 1, p. 52-61, 2015.

AL'ABSI, Mustafa; ROKKE, P. D.; Can anxiety help us tolerate pain?. **Pain**, v. 46, n. 1, p. 43-51, 1991.

AL' ABSI, M.; NAKAJIMA, M.; GRABOWSKY, J.; Stress response dysregulation and stress-induced analgesia in nicotine dependent men and women. *Biological psychology*, v. 93, n. 1, p. 1-8, 2013.

ALLEN, J. W.; YAKSH, T. L.; Assessment of Acute Thermal Nociception in Laboratory Animals. **Methods in Molecular Medicine**, Totowa, NJ. v. 99, n. 1, p. 11-23, 2004.

BALI, A; RANDHAWA, P. K.; JAGGI, A. S.; Stress and opioids: role of opioids in modulating stress-related behavior and effect of stress on morphine conditioned place preference. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 51, n. 1, p. 138-150, 2015.

BARANEK, G. T.; DAVID, F. J.; POE, M. D.; STONE, W. L.; WATSON, L. R.; Sensory Experiences Questionnaire: discriminating sensory features in young children with autism, developmental delays, and typical development. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**. v. 47, n. 6, p. 591-601, 2005.

BARBOSA, G. H. L.; BATISTA, S. P.; DOS SANTOS, P. B.; THOMAZ, C. R. C.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M.; et al. Single neonatal status epilepticus does not impair cognitive function in rats. **Epilepsy & Behavior**, v. 72, p.200-202, jul. 2017.

BEN-ARI, Y.; HOLMES, G. L.; Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. **Lancet Neural**. v. 5, p. 1055-1063, 2006.

BERNARD, P. B.; BENKE, T. A.; Early life seizures: evidence for chronic deficits linked to autism and intellectual disability across species and models. **Experimental neurology**. v. 263, n. 1, p. 72-78, 2015.

CASTELHANO, A. S. S.; SOCRZA, F. A.; TEIXEIRA, M. C.; ARIDA, R. M.; CAVALHEIRO, E. A.; CYSNEIROS, R. M.; Social play impairment following *status epilepticus* during early development. **Journal of Neurotransmission**. v. 117, n. 10, p. 1155-1160, 2010.

CASTELHANO, A. S. S.; CASSANE, G. S.; SOCRZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M.; Altered anxiety-related and abnormal social behaviors in rats exposed to early life seizures. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 7, n.36, 2013.

CASTELHANO, A. S. S.; RAMOS, F. O.; SCORZA, F. A.; CYSNEIROS, R. M.; Early life seizures in female rats lead to anxiety-related behavior and abnormal social behavior characterized by reduced motivation to novelty and deficit in social discrimination. **Journal of Neurotransmission**. v. 122, n. 3, p. 349-355, 2015.

CAZZULLO, A. G.; MUSETTI, M. C.; MUSETTI, L.; BAJO, S.; SACERDOTE, P.; PERENAI, A.; b-Endorphin levels in peripheral blood mononuclear cells and long-term naltrexone treatment in autistic children. **European Neuropsychopharmacology**. v. 9, n. 4, p. 361-366, 1999.

COSTA, J. C.; NUNES, M. L.; FIORI, R. M.; Convulsões no período neonatal. **Jornal de Pediatria**. v. 77, n. 1, p. 115-122, 2001.

CYSNEIROS R. M.; PACÍFICO, A.; BATISTA, S. P.; BASTOS, P.; BARBOSA, G. L.; Single episode of neonatal status epilepticus impairs sociability but not cognitive function in rats. Program No. 706.06/SS40. 2017 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2017. Online.

DHAWAN, B. N.; CESSSELIN, F.; RAUGHUBIR, R.; REISENE, T.; BRADLEY, P. B.; PORTOGHESE, P.S.; HAMON. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev.* v. 48, n. 4, p. 567-592, 1996

DIAMOND, A.; AMSO, D.; Contributions of Neuroscience to Our Understanding of Cognitive Development. *Current directions in psychological science*. v. 17, n. 2, p. 136-141, 2008.

DUNN, W.; MYLES, B. S.; ORR, S.; Sensory Processing Issues Associated With Aperger Syndrome: A Preliminary Investigation. **American Journal of Occupational Therapy**. v. 56, p. 97-102, 2002.

EMIK, U.; UNAL, Y.; ARSLAN, M.; DEMIREL, C. B.; The effects of memantine on recovery, cognitive functions, and pain after propofol anesthesia. **Brazilian Journal of Anesthesiology**. v. 66, n. 5, p. 485-491, 2016.

ELIAS, R, M.; Distúrbios do sistema nervoso central e periférico. *J Bras Nefrol*. v. 26, n. 3, p. 40-41, 2004.

HANNANT, P.; TAVASSOLI, T. CASSIDY, S.; The Role of Sensorimotor Difficulties in Autism Spectrum Conditions. **Frontiers in Neurology**. v. 7, p. 124-134, 2016

HOLDEN, J. E.; YOUNHEE, J.; FORREST, J. M.; The Endogenous Opioid System and Clinical Pain Management. **AACN Clinical Issues**. v. 16, n. 3, p. 291-301, 2005.

HOLMES, G. L.; TIAN, C.; HERNAN, A. E.; FLYNN, S.; CAMP, D.; BARRY, J.; Alterations in sociability and functional brain connectivity caused by early-life seizures are prevented by bumetanide. **Neurobiology of Disease**. v. 77, p. 204-219, 2015.

KHAZIPOV, R.; KHALILOV, I.; TYZIO, R.; MOROZOVA, E.; BEN-ARI, Y.; HOLMES, G. L.; Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. **European Journal Neuroscience**. v. 19, p. 590–600, 2004.

LANGERMAN, L. ZAKOWSKI, M. I.; PISKOUN, B.; GRANT, G. J.; Hot plate versus tail flick: Evaluation of acute tolerance to continuous morphine infusion in the rat model. **Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods**, v. 34, n. 1, p.23-27, set. 1995.

LAWRENCE, R.; INDER, T.; Neonatal Status Epilepticus. **Seminars in Pediatric Neurology**. v. 17, n. 3, p. 163 - 168, 2010.

LEITE, I. S.; CASTELHANO, A. S. S.; CYSNEIROS, R. M.; Effect of diazepam on sociability of rats submitted to neonatal seizures. **Data in Brief**. n. 7, p. 686-691 2016.

LUGO, J. N.; SWANN, J. W.; ANDERSON, A .E.; Early life seizures result in deficits in social behavior and learning. **Experimental Neurology**. v. 256, n. 1, p. 74-80, 2014.

MILITERNI, R.; BRAVACCIO, C.; FALCO, C.; PULGLISI-ALLEGRA, S.; PASCUCCI, T.; FICO, C.; Pain reactivity in children with autistic disorder. **Journal of Hedache Pain**. v. 1. p. 53-56, 2000.

MOORE, D. J.; Acute pain experience in individuals with autism spectrum disorders: a review. **Autism**. v. 19, n. 4, p. 387-399, 2015.

MORAKOTRIWAN, N.; WATTANATHORN, J.; KIRISATTAYAKUL, W.; CHAISIWANMONGKOL, K.; Autistic-Like Behaviors, Oxidative Stress Status, and Histopathological Changes in Cerebellum of Valproic Acid Rat Model of Autism Are Improved by the Combined Extract of Purple Rice and Silkworm Pupae. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2016, n. 1, 2015.

NADER, R.; Expression of Pain in Children With Autism. **The clinical Journal of Pain**. v. 20, n. 2, p. 88-97, 2004.

PACIFICO, A. M.; Avaliação da expressão gênica do sistema ocitocinérgico em ratos expostos ao status epilepticus neonatal. 2016. 50 f. Dissertação(Distúrbios do Desenvolvimento) - Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.

PATHAN, H.; WILLIAMS, J.; Basic opioid pharmacology: an update. **British Journal Of Pain**, Reino Unido, v. 1, n. 6, p.11-16, 2012.

PELLISSIER, L. P.; GANDÍA, J.; LABOUTE, T.; BECKER, J. A. J.; LE MERRER, J.; Mu opioid receptor, social behaviour and autism spectrum disorder: reward matters. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 14, p. 2750-2769, jul. 2017.

POSAR, A.; VISCONTI, P.; Autismo em 2016: necessidade de respostas. *Jornal de Pediatria*. v. 93, n. 2, p. 111-119, 2016.

QUINTERO, L.; MORENO, M.; AVILA, C.; ARCAYA, J.; MAIXNER, W.; SUAREZ-ROCA, H.; Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 67, n. 3, p. 449-458, 2000.

ROSENBLUM, A.; MARSCH, L. A.; JOSEPH, H.; PORTENOY, R. K.; Opioids and the Treatment of Chronic Pain: Controversies, Current Status, and Future Directions. **Exp Clin Psychopharmacol**. v. 16, n. 5, p. 405–416, 2008.

SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R. G. L.; JÚNIOR, R. G. O.; ALMEIDA, J. R. S.; Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Revista Brasileira de Farmacia*, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SILVA, L. O.; **AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO EM RATAS EXPOSTAS AO Status Epilepticus NEONATAL**. 2018, 31f. Monografia (Ciências Biológicas) – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2018.

TRINKA, E.; COCK, H.; HESDORFFER, D.; ROSSETTI, A. O.; SCHEFFER, I. E.; SHINNAR, S.; SHORVON, S.; LOWENSTEIN, D. H.; A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus - Definição e classificação do status epilepticus - Relatório da ILAE Task Force sobre Classificação do Status Epilepticus. **Epilepsia**. v. 56, n. 10, p. 1515–1523, 2015.

TUCHMAN, R.; RAPIN, I.; Autismo: abordagem neurobiological. Porto Alegre: Artmed, 2009.

VOLKMAR, F. R.; NELSON, D. S.; Seizures disorders in autism. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**. v. 29, n. 1, p. 127-129, 1990.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D.; The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **J Pharmacol Exp Ther**. v. 80, n. 3, p. 300-307, 1944.

WOOLFENDEN, S.; SARKOZY, V.; RIDLEY, G.; COORY, M; WILLIAMS, K.; A systematic review of two outcomes in autism spectrum disorder – epilepsy and mortality. **Developmental Medicine & Child Neurology**. v. 54, n. 7, p. 306-312, 2012.

Contatos: pedroksbastos@gmail.com e rcysneiros@yahoo.com