

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL PÓS-PUBERAL EM  
MACHOS E FÊMEAS ADVINDO DO HIPOTIREOIDISMO MATERNO:  
POSSÍVEL CORRELAÇÃO PARA O NEURODESENVOLVIMENTO DO  
ESPECTRO AUTISTA?**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Juciara da Costa Silva**

**São Paulo**

**2015**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL PÓS-PUBERAL EM  
MACHOS E FÊMEAS ADVINDO DO HIPOTIREOIDISMO MATERNO:  
POSSÍVEL CORRELAÇÃO PARA O NEURODESENVOLVIMENTO DO  
ESPECTRO AUTISTA?**

Dissertação apresentada  
à Universidade Nove de  
Julho como pré-requisito  
para a obtenção do título  
de mestre em medicina

Programa: Mestrado em

**São Paulo**

**2015**

Silva, Juciara da Costa.

Investigação do comportamento social pós-puberal em machos e fêmeas advindo do hipotireoidismo materno: possível correlação para o neurodesenvolvimento do espectro autista? /  
Juciara da Costa Silva. 2015.

76 f.

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

À COMISSÃO EXAMINADORA, ABAIXO ASSINADA, APROVA A  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL PÓS-PUBERAL EM  
MACHOS E FÊMEAS ADVINDO DO HIPOTIREOIDISMO MATERNO:  
POSSÍVEL CORRELAÇÃO PARA O NEURODESENVOLVIMENTO DO  
ESPECTRO AUTISTA?**

Elaborada por

**Juciara da Costa Silva**

Como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Medicina**

**São Paulo**

**2015**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Professor Dr. Carlos Alberto Avellaneda Penatti**

**Orientador – Universidade Nove de Julho**

---

**Professora Drª Miriam de Oliveira Ribeiro**

**Titular externa – Universidade Presbiteriana Mackenzie**

---

**Professora Dr. Humberto Dellê**

**Titular interno – Universidade Nove de Julho**

**São Paulo, 05 de Março de 2015**

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Professor Dr. Carlos Alberto Avellaneda Penatti**

**Orientador – Universidade Nove de Julho**

---

**Professor Dr. Eduardo Pompeu**

**Suplente externo – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

---

**Professor Dr. Cléber Camacho**

**Suplente interno – Universidade Nove de Julho**

**São Paulo, 05 de Março de 2015**

## **A Deus**

“Volte a brilhar, volte a brilhar  
Um vinho, um pão e uma reza  
Uma lua e um sol, sua vida, portas abertas  
  
Em algum lugar, pra relaxar  
Eu vou pedir pros anjos cantarem por mim  
Pra quem tem fé  
A vida nunca tem fim  
Não tem fim”

## **O Rappa**

---

## **DEDICATÓRIA**

## Dedicatória

---

### *Dedico*

Aos meus queridos **pais** por todo amor e dedicação ao longo da minha vida.

Ao meu querido irmão **Rafael da Costa Silva** por toda amizade e carinho!

E claro aos meus lindos e fofos A **Bela** e o **Fera**.

Que juntos completam a família!

## Dedicatória

---

### *Dedico*

Ao querido orientador Professor Dr. **Carlos Alberto Avellaneda Penatti**  
Agradeço pela dedicação e empenho durante esses anos. Por toda paciência,  
confiança e educação na sua orientação. Por dividir o seu conhecimento  
inesgotável, por toda receptividade a uma nova idéia e por toda compreensão  
nos mais distintos momentos. Muito obrigada infinitamente por tudo e claro por  
apresentar os diversos e fascinantes caminhos da ciência.

---

## **AGRADECIMENTOS**

## **Agradecimentos**

---

### **Agradecimentos**

A Professora Drª **Gisele Giannocco** – Tenho enorme gratidão por todo suporte para a execução da minha pós-graduação. Por todos os ensinamentos e amizade que foram fundamentais!

A Professora Drª **Miriam Oliveira Ribeiro** – Por todas as contribuições para o aperfeiçoamento da minha formação, pela grande oportunidade de aprendizado junto ao seu grupo e pela enorme gentileza em abrir as portas do seu laboratório para a execução de um novo trabalho. Sempre muito simpática e atenciosa! Muito Obrigada!

A **Universidade Nove de Julho** – Pela oportunidade de tornar o meu sonho de cursar a pós-graduação ser possível e a todos os docentes e discentes do **Mestrado em Medicina**. Desejo muito sucesso a todos!

Ao professor **Dr. Cléber Camacho** – Agradeço pela enorme contribuição e sugestões para a melhoria do trabalho durante o processo de qualificação.

## Agradecimentos

---

As **secretárias** do setor de pós-graduação da Universidade Nove de Julho por toda competência! Agradeço a **Denise, Andréia, Camila e a Lígia.**

A professora **Karen** - Responsável pelo biotério central da Universidade Nove de Julho por toda dedicação em viabilizar a adequação da estrutura.

A **Drª Fernanda Marciano Consolim-Colombo**- Por todo suporte possível para a execução desse projeto, pela simplicidade e por toda compreensão com todos do grupo.

Aos meus queridos e eternos amigos da Universidade Paulista de São Paulo, campus Marquês - **Fabiana Luiz, Fabiana Ferreira, Vanessa Gutierrez e Diego Perrote** por todo carinho e amizade durante os passos iniciais da minha formação!

As minhas queridas amigas da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, campus Sorocaba - **Marília Giorgete, Lucinéia Sousa, Ana Lúcia e Sônia**, por toda convivência nas pesquisas com animais tão queridos!

## Agradecimentos

---

Ao Professor Dr. **Roger Chammas** - Pela oportunidade de realização do PAP junto ao Centro de Bioterismo na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, certamente um aprendizado fundamental para minha formação!

Ao Dr. **Eduardo Pompeu** - Por ser o melhor médico veterinário que conheço, pela simplicidade, ensinamentos e amizade que irei levar ao longo da minha vida. Muito obrigada pela oportunidade de acompanhar procedimentos tão incríveis!

A querida bióloga **Maria Luisa Guzzo Valenti** - Por ser uma pessoa mais que especial e por passar todos os seus conhecimentos com experimentação animal, por toda gentileza e amizade!

A querida veterinária **Luci Ebisui** - Por toda competência e ensinamentos com animais SPF.

A todos os amigos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - O que seria da minha formação sem a presença de pessoas tão queridas? Certamente, um dos melhores lugares que

## Agradecimentos

---

passei durante a minha vida - **Carlos Eduardo de Lemos, Alex Hosokawa Griman, Juliana Bortolatto, Anderson Militão, Adilamar Leopoldo Campos Lourenço, Aguinaldo Correira Mendes, Carlito Gonçalves dos Santos, Cyntia Marques dos Santos, Marilda Osti Spinelli, Robison José da Cruz, Claudionor Donizete Vidotti, Clóvis Cícero Vidotti, Vicente de Paula Silveira, Denise Isoldi Seabra, Ademir José da Silva, Ana Lúcia da Silva, Antonia Vera Lúcia da Silva, Claudemir Sidnei Vidotti, Hélio de Freitas Reis, Josinaldo Francisco de Souza, Luis Augusto Leite Mendes, Rodrigo Wojtila da Cruz Francisco, Romildo Trindade Manoel, Valmir Gonsalo Olivieri, Bianca Ventura, Eluzia Lopes da Silva, Valriclei Gonçalves Lima, Wellington Dias Franco, Flávio Martins Ferreira, Gabriel Batista de Faria, Jacqueline Keila Souza do Nascimento e Selmo Vicente Bernardino da Silva e aos eternos: Jarbas Pereira de Melo** (Certamente, o céu ganhou uma linda estrela) **e Sr. Ismael** - Agradeço a cada um por todos os ensinamentos, carinho e amizade!

Ao professor **Dr. Nilson Antonio de Assunção** - da Universidade Federal Paulista de São Paulo, campus Diadema, sempre muito receptivo todas as vezes que visitei ao seu laboratório. Sempre muito divertido no seu universo de proteínas!

## Agradecimentos

---

Aos amigos da Universidade Federal Paulista de São Paulo, campus Diadema – **Letícia Dias Lima Jedlicka, Danielle Furtado, Aleksandro Balbino e Giuseppe Bruno Neto.** Por tornarem os experimentos cada vez mais divertidos!

Aos amigos do grupo de **Neurocognatus– Rodrigo Fernandes de Barros** (meu querido e eterno irmão científico) e aos meninos **Ismael Ribeiro dos Santos e Rafael Del Picchia** (Que hoje são “meninos” e no futuro próximo grandes médicos) – Por todas as risadas e dedicação.

Aos meus amigos de trabalho do **Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** – A pesquisadora Dr<sup>a</sup> **Kátia Cândido Carvalho-** Por todos ensinamentos em biologia molecular. Ao Dr. **Gustavo Arantes Rosa Maciel** - pelos ensinamentos a cada conversa. Ao Professor Dr. **Edmund Chada Baracat** exemplo como titular. A **Natalia Garcia, Giulia Araujo, Thiago Hideki, Rodrigo Rodrigues Marcondes, Marinalva Almeida, Leonardo Tomiatti da Costa, Laura Gonzáles, Luiz Fernando Portugal, Danielle Calvano, Carlos Calvano, Faila Souza e Cecília Ferreira.**

## **Agradecimentos**

---

Aos novos amigos da Universidade Presbiteriana Mackenzie de São Paulo, campus Higienópolis – **Nátilia Barom, Pollyana Braga, Nilson Rodrigues Nascimento Júnior, Lucas Groto Garutti, Cicera Pimenta, Bruna Pascarelli, Sr Domingos, Fernanda Lorena e Felipe Rodrigues Pinto.**

As minhas amigas lindas– **Cinthia Amaral Alecrim, Camila Araújo, Iara Amaral e Renata dos Santos** por todas as palavras de incentivos ao longo da minha vida nos mais diversos momentos!

Ao **Stéfano Pupe Johann** da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela enorme gentileza em disponibilizar os softwares criados durante o seu período de mestrado para as análises dos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Muito obrigada, certamente facilitou muito a abordagem experimental.

Em memória ao querido e eterno Professor **Dr. César Ades** do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo – Certamente, sempre será minha referência na área de comportamento animal.

## Agradecimentos

---

A **CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado na modalidade **PROSUP II** – Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro a pesquisa concedido 13/14466-1.

## Epígrafe

---

***“Ao longo dos anos eu tenho estudado comportamento animal, tenho me interessado por animais e nunca perdi esse interesse, nunca consegui perder esse interesse, nunca consegui me entediar com animais. É de uma riqueza o comportamento animal. Basta olhar um pouco! Se você olha distraidamente não percebe o que está acontecendo, mas se você presta uma atenção começam a surgir perguntas na sua cabeça e é isso mesmo de que se trata estudar o comportamento animal”***

**(César Ades)**

---

## **RESUMO E ABSTRACT**

## **RESUMO**

A disfunção tireoidiana materna com destaque no hipotireoidismo causa representativos danos neurológicos para o feto que em muitos aspectos cognitivos se assemelham às alterações neurobiológicas das doenças do espectro autista, como exemplo: alterações de migração cortical, comprometimento de especialização neuronal e modificações nas funções cognitivas. Há uma escassez de estudos para melhor esclarecer e caracterizar as alterações de comportamento na prole pós-puberal, cujo impacto no neurodesenvolvimento intra-útero ocorreria facilitando os prejuízos tardios de sociabilidade animal. Utilizando um modelo murino de hipotireoidismo materno (tratamento com metimazol), estudamos as alterações em comportamentos sociais da prole após o período puberal, a fim de entendermos os variados aspectos de prováveis alterações cognitivas e motivacionais em machos versus em fêmeas. Realizamos o estudo com foco em comportamentos vislumbrando agressividade ofensiva e defensiva, vocalização social, e autopreservação (i.e.; medo; ansiedade) bem como, adaptações neurovegetativas (i.e.; regulação térmica). Os dados mostraram um acometimento da prole masculina proveniente de mães tratadas com metimazol 30 dias antes da gestação ocorrer. Esse projeto correlacionou aspectos etiológicos com um grande tema da esfera clínica em humanos no que tange doenças do neurodesenvolvimento e desarranjos sociais mais brandos, porém abrangentes e prevalentes e suas repercussões comportamentais na vida pós-puberal e adulta.

**Descritores:** tireoide, disfunção, comportamento, hipotireoidismo, espectro autista

## **ABSTRACT**

Maternal thyroid dysfunction and its most common condition, gestational hypothyroidism, may facilitate fetal neurodevelopmental disarrangements. Disorders in neurodevelopment arising from subclinical and often not-detectable maternal thyroid dysfunction share similarities with some of the cognitive and behavior alterations manifested in autism spectrum disorders (ASD). In particular, fetal deficits in cortical migration, neuronal fate and maturation impair fine aspects of cognitive function and social behavior in these social and clinical conditions. To date however, there are very few studies, which address in detail the predominant deficits in communication and sociability in late-adolescence and young adult individuals regarding their sex differences related to subclinical maternal hypothyroidism during pregnancy. Using an animal model of mild maternal hypothyroidism, we investigated social behaviors of the offspring after puberty in both male and female mice and looked for changes in their anxiety and aggression levels and vocalization as well as their sex dependence. Our study showed an increase in induced anxiety paralleled by relatively reduced vocalization in male offspring subjected to mild hypothyroidism in pregnant female mice. These experimental findings not only open a neurodevelopmental window to investigate the molecular aspects of these behavioral abnormalities but also and may foster educational, psychological and medical advances in late-stage child neurodevelopment among the ASD individuals

Keywords: thyroid, dysfunction, behavior, hypothyroidism, autism spectrum

---

## **LISTA DE FIGURAS**

## Lista de figuras

---

<b>Figura 1:</b> Anatomia da Glândula tireoide.....	<b>5</b>
<b>Figura 2:</b> Transporte dos hormônios tireoidianos no cérebro.....	<b>8</b>
<b>Figura 3:</b> Transferência durante o período gestacional primeiro e segundo trimestre.....	<b>9</b>
<b>Figura 4:</b> Principais eventos neurológicos regulados pela glândula tireoide.....	<b>13</b>
<b>Figura 5:</b> Delineamento experimental realizado no estudo.....	<b>21</b>
<b>Figura 6:</b> Arena utilizada no teste comportamental de campo aberto 50x 50 cm.....	<b>22</b>
<b>Figura 7:</b> Disposição do teste ‘marble burying’ com 20 esferas de vidro	<b>23</b>
<b>Figura 8:</b> Labirinto em cruz elevado 38,5 cm em relação ao chão.....	<b>25</b>
<b>Figura 9:</b> Padrão de organização do perfil de nidificação.....	<b>26</b>
<b>Figura 10:</b> Padrão comportamental do teste de residente-intruso.....	<b>29</b>
<b>Figura 11:</b> Posicionamento do microfone ultrassônico.....	<b>32</b>
<b>Figura 12:</b> Padrão da abertura ocular.....	<b>34</b>
<b>Figura 13:</b> Centro campo aberto fêmeas.....	<b>36</b>

<b>Figura 14:</b> Centro campo aberto machos.....	36
<b>Figura 15:</b> Periferia campo aberto fêmeas.....	37
<b>Figura 16:</b> Periferia campo aberto machos.....	37
<b>Figura 17:</b> Tempo no braço fechado fêmeas.....	40
<b>Figura 18:</b> Tempo braço fechado machos.....	40
<b>Figura 19:</b> Tempo no braço aberto fêmeas.....	41
<b>Figura 20:</b> Tempo braço aberto machos.....	41
<b>Figura 21:</b> Tempo no centro cruz elevado fêmeas.....	42
<b>Figura 22:</b> Tempo no centro cruz elevado machos.....	42
<b>Figura 23:</b> Freqüênciade levantar no cruz elevado fêmeas.....	43
<b>Figura 24:</b> Freqüênciade levantar no cruz elevado machos.....	43
<b>Figura 25:</b> Perfil de nidificação de fêmeas controle.....	44
<b>Figura 26:</b> Perfil de nidificação de machos controle.....	45
<b>Figura 27:</b> Perfil de nidificação de fêmeas metimazol.....	45
<b>Figura 28:</b> Perfil de nidificação de machos metimazol.....	46
<b>Figura 29:</b> Perfil de nidificação de fêmeas controle negativo.....	46
<b>Figura 30:</b> Perfil de nidificação de machos controle negativo.....	47
<b>Figura 31:</b> Comportamento materno.....	48

<b>Figura 32:</b> Quantidade de vocalização.....	<b>52</b>
<b>Figura 33:</b> Exemplo de vocalização ultrassônica do tipo simples.....	<b>53</b>
<b>Figura 34:</b> Sonograma dos tipos de vocalização no grupo controle.....	<b>54</b>
<b>Figura 35:</b> Sonograma dos tipos de vocalização no grupo controle harmônica e simples.....	<b>55</b>

---

## **LISTA DE TABELAS**

## Lista de tabelas

---

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos déficits em pacientes com o espectro autista.....	<b>3</b>
<b>Tabela 2:</b> Hormônios tireoidianos na gestação.....	<b>10</b>
<b>Tabela 3:</b> Delineamento das matrizes reprodutora.....	<b>20</b>
<b>Tabela 4:</b> Atribuições dos escores no teste ‘nest building’ .....	<b>27</b>
<b>Tabela 5:</b> Padrões reprodutivos.....	<b>33</b>
<b>Tabela 6:</b> Número total de filhotes.....	<b>34</b>
<b>Tabela 7:</b> Abertura ocular da prole.....	<b>34</b>
<b>Tabela 8:</b> Avaliação do peso ao nascer.....	<b>35</b>
<b>Tabela 9:</b> Avaliação do ‘marble burying’ .....	<b>38</b>
<b>Tabela 10:</b> Escores atribuídos a avaliação do ‘nest building’.....	<b>47</b>
<b>Tabela 11:</b> Latência para o ataque em segundos realizado na primeira semana.....	<b>49</b>
<b>Tabela 12:</b> Latência para o ataque em segundos realizado na segunda semana.....	<b>50</b>
<b>Tabela 13:</b> Latência para o ataque em segundos realizado na terceira semana.....	<b>50</b>

<b>Tabela 14:</b> Tempo total de ataques.....	<b>51</b>
<b>Tabela 15:</b> Quantificação total de vocalização ultrassônica simples.....	<b>52</b>
<b>Tabela 16:</b> Quantificação total de vocalização ultrassônica modulada.....	<b>53</b>
<b>Tabela 17:</b> Quantificação total de vocalização ultrassônica harmônica.....	<b>54</b>

---

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

## Lista das principais abreviaturas, siglas e símbolos

---

A– Amígdala

AMS – Área motora suplementar

CCA – Côrtex cíngulo anterior

CEUA– Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais de laboratório

COF –Côrtex órbito-frontal

CPP- Côrtex pariental posterior

D1– desiodase tipo 1

D2– Desiodase tipo 2

D3– Desiodase tipo 3

DIT– diiodinados

GB- Gânglios da base

GF- Giro fusiforme

GFI- Giro frontal inferior

HCG– gonadotrofina coriônica

HTS– hormônios tireoidianos

LAT1– *L-type amino acid transporter* TIPO 1

LAT1– *L-type amino acid transporter* TIPO 2

LATs– *L-type amino acid transporter*

MCT 10 – *Monocarbolilate transporters tipo 10*

MCT 8– *Monocarbolilate transporters tipo 8*

## **Lista das principais abreviaturas, siglas e símbolos**

---

MCT–*Monocarbolilate transporters*

MT – monoiodinados

NC – Núcleos cerebelares da ponte

OATPS – *Organicanion transporting polypeptides*

SN –Substância negra

STS– sulco temporal superior

T- Tálamo

T3– triidotironina

T4– tiroxina

TBG –globulina transportadora da tiroxina

TEA – Transtornos do Espectro do Autismo

TSH- Hormônio estimulante da tireoide

---

## **SUMÁRIO**

**Resumo**

**Abstract**

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Lista de Abreviaturas, Sigla e símbolos**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Comportamento Social.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Comportamento social e espectro autista.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Substrato neuroanatômico do espectro autista.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Glândula tireoide.....</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Desiodadases e transportadores tireoidianos.....</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Função de glândula tireoide materna.....</b>	<b>9</b>
<b>1.7 Hipotireoidismo subclínico materno.....</b>	<b>11</b>
<b>1.8 Hormônios tireoidianos e neurodesenvolvimento.....</b>	<b>12</b>
<b>1.9 Disfunções tireoidianas em modelos animais e o paralelo com a clínica em humanos.....</b>	<b>14</b>
<b>2. HIPÓTESE DO TRABALHO.....</b>	<b>16</b>

<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Modelo animal.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Grupo controle.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3 Grupo metimazol- Hipotireoidismo materno farmacológico.....</b>	<b>19</b>
<b>4.4 Grupo controle negativo.....</b>	<b>19</b>
<b>4.5 Paradigmas comportamentais.....</b>	<b>20</b>
<b>4.6 Campo aberto ou ‘open field’.....</b>	<b>21</b>
<b>4.7 ‘Marble burying’.....</b>	<b>23</b>
<b>4.8 Labirinto em cruz elevado ou ‘plus maze’.....</b>	<b>24</b>
<b>4.9 ‘Nest building’.....</b>	<b>25</b>
<b>4.10 Agressividade em machos.....</b>	<b>27</b>
<b>4.11 Comportamento materno.....</b>	<b>30</b>
<b>4.12 Vocalização ultrassônica.....</b>	<b>31</b>
<b>4.13 Análise estatística.....</b>	<b>32</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>

<b>5.1</b> Padrões reprodutivos e ninhadas.....	<b>33</b>
<b>5.2</b> Paradigma comportamental - campo aberto.....	<b>35</b>
<b>5.3</b> Paradigma comportamental – ‘marble burying’.....	<b>38</b>
<b>5.4</b> Paradigma comportamental - labirinto em cruz elevado.....	<b>39</b>
<b>5.5</b> Paradigma comportamental – ‘nest building’.....	<b>44</b>
<b>5.6</b> Paradigma comportamental - comportamento materno.....	<b>48</b>
<b>5.7</b> Paradigma comportamental - residente-intruso.....	<b>49</b>
<b>5.8</b> Paradigma comportamental- vocalização ultrassônica.....	<b>51</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>6.1</b> Do modelo experimental.....	<b>56</b>
<b>6.2</b> Dos testes comportamentais não específicos.....	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>78</b>

## **1. Introdução**

### **1.1 Comportamento social**

*"A relação dos organismos entre si é a mais importante de todas - Podemos*

Os seres humanos são inherentemente uma espécie social e o ajuste ou adaptação do comportamento torna-se fundamental para o chamado processo de sociabilidade. No entanto, a sociabilidade não é um comportamento de exclusividade. Algo similar pode ocorrer até mesmo em organismos que não apresentam o sistema nervoso estabelecido. Ao estudarem motibilidade bacteriana na espécie *Proteus mirabilis*, os autores concluíram que a capacidade de movimentação é semelhante a um enxame em superfícies sólidas o que confere uma vantagem biológica o fato da interação social entre os indivíduos (Gibbs, Urbanowski e Greenberg, 2008).

A sociabilidade também é perceptível em outras espécies que possuem o sistema nervoso rudimentar, como exemplo em formigas que compartilham assim como em humanos o comportamento de hierarquia e territorialidade. Embora, possamos compartilhar alguns dos aspectos mais amplos do nosso comportamento com outras espécies, o comportamento social humano é obviamente mais complexo dada a importância das interações sociais. Não é surpreendente que a maioria das desordens psiquiátricas apresenta alguma perturbação do comportamento social, e que, em vários distúrbios, o funcionamento social anormal é um dos sintomas centrais, como exemplo no espectro autista, transtorno de ansiedade social e nos transtornos de personalidade *borderline* ou esquizóide (Young, 2008).

De acordo com uma pesquisa recente da Organização Mundial da Saúde, estima-se que os transtornos mentais ocupam o primeiro lugar em termos de anos de acometimento de vida, podendo superar até mesmo as doenças cardiovasculares, doença do sistema respiratório e tumores malignos. O transtorno mental é portanto muito prejudicial para a saúde humana devido o acometimento social ao longo da vida (Wu e Duan, 2015).

## **1.2 Comportamento social e espectro autista**

Um dos primeiros relatos consistente na literatura médica de acometimento na vida social foi descrito por, Leo Kanner no artigo intitulado “*Autistic Disturbances of Affective contact*” (Kanner, 1968). Neste trabalho, o comportamento particularizado de onze crianças foi analisado e demonstrada a preferência por isolamento extremo e o desejo por repetição. Anos mais tarde, alguns pesquisadores chegaram a utilizar o termo “surto epidêmico” ao se referirem à doença. Atualmente estima-se que a prevalência de autismo em 1/68 indivíduos (Ngounou Wetie *et al.*, 2015), e a esse aumento é atribuída a maior facilidade e acurácia de diagnóstico, e pelo fato de mais desarranjos dentro da classificação do espectro autista serem caracterizados (Megremi, 2013). No entanto, os perfis são variados. Essas dificuldades alcançam gravidade com embotamento importante na interação social devido à ausência de reciprocidade afetiva e nas formas de comunicação não-verbal como linguagem gestual, contato visual e expressão facial (Tell e Davidson, 2014). Através da sua ampliação de manifestações clínicas diante da nomenclatura Transtornos do Espectro do Autismo (TEA), estas representam desordens neurológicas com perfis amplamente heterogêneos e de origem multifatorial (Tabela 1).

## Introdução

---

A manifestação deve ser evidenciada clinicamente até os três anos de idade fundamentada em muito pelo período do estabelecimento da linguagem (Schumann *et al.*, 2004; Nordahl *et al.*, 2011; Broadbent, Galic e Stokes, 2013). O grau de heterogeneidade etiológica no TEA faz com que se tenha dificuldade para identificar seus efeitos causais dentro do desenvolvimento cerebral (Jeremy Willsey e State, 2015).

**Tabela 1:** Classificação dos déficits em pacientes com o espectro autista (Schumann *et al.*, 2004; Nordahl *et al.*, 2011; Broadbent, Galic e Stokes, 2013).

<b>Classificação dos Déficits em pacientes com o Espectro Autista</b>	
❖ <b>Interação social</b>	
❖ Exclusão Social	
❖ Euforia Social	
❖ <b>Comunicabilidade</b>	
❖ Prejuízo na linguagem verbal	
❖ Não verbais em algumas situações	
❖ <b>Comportamento restrito e repertório</b>	
❖ Mesma atividade com freqüência	

## Introdução

---

### 1.3 Substrato neuroanatômico do espectro autista

Do ponto de vista neuroanatômico as principais regiões cerebrais documentadamente afetadas em pacientes dentro da classificação do espectro autista são:

(i) **Déficits sociais**

Em COF –Côrtex órbito-frontal, CCA – Côrtex cíngulo anterior; GF- Giro fusiforme, STS- Sulco temporal superior; A- Amígdala, GFI- Giro frontal inferior e CPP- Côrtex pariental posterior;

(ii) **Déficits de comunicação**

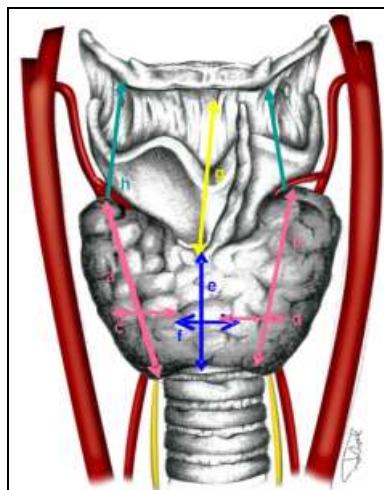
Em GFI- Giro frontal inferior, STS- Sulco temporal superior, AMS – Área motora suplementar, GB- Gânglios da base, SN- Substância negra, T- Tálamo e NC- Núcleos cerebelares da ponte;

(iii) **Comportamento repetitivo**

Em COF- Côrtex orbito-frontal, CCA- Côrtex cíngulo anterior, GB- Gânglios da base e T- Tálamo (Amaral, Schumann e Nordahl, 2008).

## 1.4 Glândula tireoide

A glândula tireoide está localizada na parte anterior do pescoço abaixo da proeminência laríngea, formada por dois tipos de células, sendo: células foliculares responsáveis pela produção de tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) e por células C responsáveis pela produção de calcitonina. É a primeira glândula a se desenvolver no embrião humano (Antonica *et al.*, 2012) (figura 1).



**Figura 1:** Anatomia da Glândula tireoide em: A- lobo direito, B- lobo esquerdo, C- largura lobo direito, D-largura lobo esquerdo, E- comprimento do istmo, F-largura do istmo, G-comprimento piramidal, H-pólo superior e osso hióide (Ozguner e Sulak, 2014).

A síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (HTS) ocorrem através do transporte ativo de iodo para a célula folicular. O processo de iodinação de tirosinas é dado através da ação do MIT (monoiodinados), DIT (diiodinados), e T4 e de T3, são os produtos hormonais armazenados nas células foliculares da tireoide (Brown *et al.*, 2000; De Escobar, Obregon e Del Rey, 2004; Neale, Coatauco e Burrow, 2007).

## Introdução

---

Dados mostram que a deficiência de iodo é um problema significativo de saúde pública em diversos países, cerca de 241 milhões de crianças em idade escolar apresentam algum tipo de carência, acarretando possíveis déficits de desenvolvimento (Delange *et al.*, 2001). Graves carências de iodo durante a gravidez podem estar associadas a diversas alterações como exemplo a presença de bocio, aborto, mortalidade infantil, anomalias congênitas como o cretinismo, que é um estado irreversível de retardo mental em combinação com nanismo, deficiência auditiva e espasticidade (Trumpff *et al.*, 2013).

### 1.5 Desiodases e transportadores tireoidianos

Em relação à transferência de hormônios tireoidianos, sabe-se que a disponibilidade local é amplamente determinada pela presença de transportadores que permitem a passagem de HTS através da membrana celular com a atuação das desiodases cuja função primordial é participar do metabolismo (Wittmann *et al.*, 2015).

As desiodases iodotironinas incluem duas enzimas de ativação: desiodase tipo 1 (D1) e desiodase tipo 2 (D2) e uma enzima de inativação a desiodase do tipo 3 (D3) que é expressa diferencialmente em tecidos adultos. D3 é geralmente expressa em primeiro lugar, seguida da D2 e D1, sendo que D1 é expressa no fígado, rim e tireoide, D2 no cérebro, hipófise, tireoide e BAT e D3 na pele, tecido vascular e placenta. Portanto, a D1 tem importante função na adaptação à deficiência de iodo e D3 para proteção fetal (Mullur, Liu e Brent, 2014).

Diante dos avanços científicos a partir da década de 90 fica clara a atuação dos transportadores de iodotironina à medida que os mesmos foram identificados (Schweizer e Kohrle, 2013).

## Introdução

---

Atualmente os chamados OATPS (*Organicanion transporting polypeptides*) fazem parte da família de proteína transportadora de hormônios tireoidianos que possuem alta especificidade e afinidade pelas iodotironinas. A primeira descoberta da família OATP foi descrita em modelo experimental e até o momento existem 12 membros estabelecidos. OATPS são expressos em várias barreiras epiteliais incluindo as células epiteliais intestinais, hepatócitos, túbulo renal e com atuação na barreira sangue-cérebro (Hong, 2014).

No sistema nervoso central OATPS tem papel essencial, uma vez em que alguns medicamentos e resíduos tóxicos são transportados e têm de ser eliminadas a partir do cérebro através da barreira cefalorraquidiana. É relatada a capacidade de medir a absorção de drogas através desse transportador e determinadas famílias tem a capacidade de desempenhar papel importante na distribuição local de iodotironina (Hagenbuch e Meier, 2003).

Os transportadores da família MCT (*Monocarboxilate transporters*) apresentam como função o transporte de aminoácidos que possuem carga positiva. Dentre a família os mais representativos são MCT8 e MCT10, que apresentam a função de facilitar a entrada e saída dos hormônios tireoidianos (Friesema *et al.*, 2008).

MCT8 foi descrito associado com mutações inativadoras no quadro clínico da síndrome de Allan Herndon-Dudley, nos qual os pacientes afetados manifestam uma forma grave de retardamento psicomotor composto por hipotonía central, tetraplegia espástica e déficits intelectuais graves. Em adição aos sintomas neurológicos pronunciados, os pacientes exibem alterações características no perfil dos hormônios tireoidianos com T3 altamente reduzido e elevada concentração de T4 (Mayerl *et al.*, 2014).

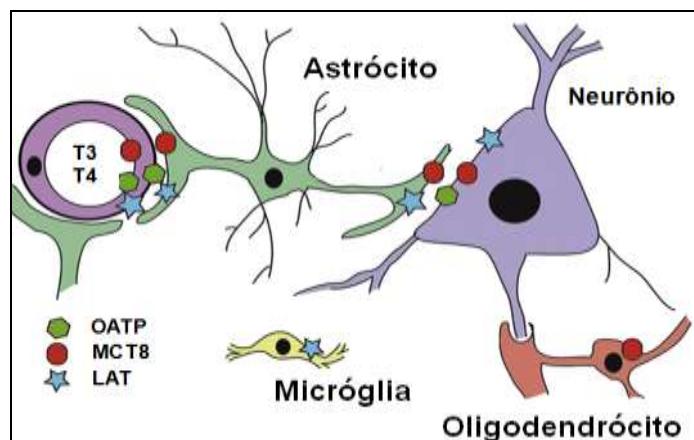
## Introdução

---

Estudos demonstraram que o MCT8 desempenha papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, por ser responsável pela entrada de T3 nos neurônios, e possivelmente, pela saída de T3 dos astrócitos (Heuer *et al.*, 2005).

Embora existam dados sobre a modulação da expressão de MCT por diferentes substratos em tecidos selecionados, há uma lacuna de conhecimento sobre a regulação metabólica de MCTs. No entanto, os MCTs desempenham papel crucial na distribuição de substratos energéticos e reguladores. Pela função adicional como transportadores de drogas, quaisquer mudanças na expressão de MCT poderiam causar alterações de farmacodinâmica (Schutkowski *et al.*, 2014).

Como transportador de iidotironina também se destacam os LATs (*L-type amino acid transporter*), cuja expressão ocorre de maneira diferenciada no órgão alvo, sendo: LAT 1 expresso no cérebro, baço, timo, testículo, pele, fígado, placenta, músculo esquelético e estômago e LAT2 no epitélio intestinal (Prasad *et al.*, 1999). Em relação à ação nos transportadores dos hormônios tireoidianos no sistema nervoso central podemos sintetizar em (figura 2).

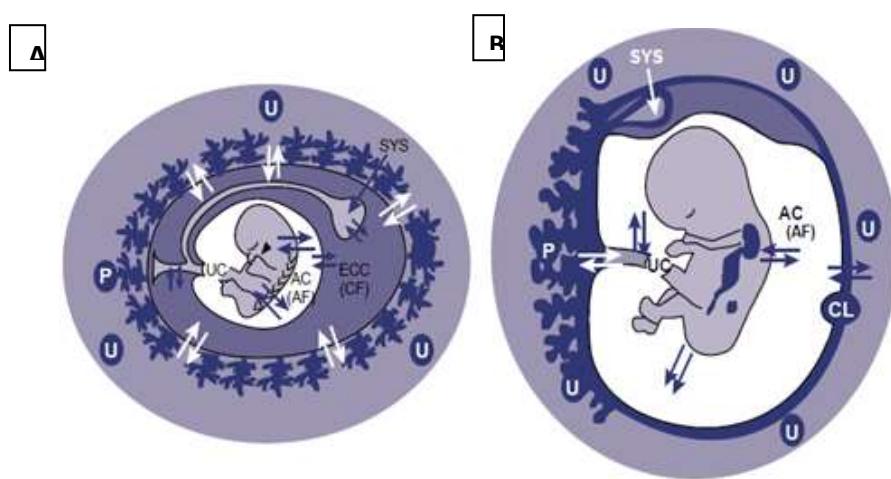


**Figura 2:** Transporte dos hormônios tireoidianos no cérebro. Adaptação: (Schweizer e Kohrle, 2013).

## 1.6 Função da Glândula tireoide materna

Diante da relevância da função tireoidiana e a relação materno-fetal, estudos realizados ao final da década de 80 demonstraram de maneira inédita a passagem de hormônios tireoidianos via placenta (Vulsmá, Gons e De Vijlder, 1989).

Atualmente novos estudos quanto à compreensão do funcionamento da tireoide materna estão estabelecidos, com a evidência do mecanismo de transferência hormonal durante a gestação. Os achados evidenciam que a barreira-placentária tem como função primordial evitar as concentrações potencialmente tóxicas ao feto dos hormônios tireoidianos, oferecendo a proteção necessária quanto as possíveis níveis de toxicidades antes do período necessário para a devida maturação (De Escobar, Obregon e Del Rey, 2004) (figura 3). Podemos sintetizar atuação da glândula tireoide materna em três etapas primordiais sendo (Tabela 2).



**Figura 3:** Transferência durante o período gestacional primeiro e segundo trimestre em (A) O feto humano está envolvida por AC= amniótico, ECC= Separa a cavidade amniótica da placenta, SYS= Saco vitelínico secundário, CF= Troca de fluído da mãe com o feto. (B) Diversas alterações anatômicas ocorrem e os nutrientes maternos incluindo o hormônio tireoidiano são transferidos diretamente para a circulação fetal (De Escobar, Obregon e Del Rey, 2004).

## Introdução

---

**Tabela 2:** Hormônios tireoidianos na gestação. Adaptação: (Costa et al., 2004)

<b>Etapa</b>	<b>Definição</b>
I	<p>Os HTS são transportados no sangue através de três proteínas: globulina transportadora da tiroxina (TBG), transtirretina e albumina. Durante a gestação, a afinidade das três proteínas por T4 e T3 não são significativamente alteradas, mas a concentração de TBG aumenta aproximadamente de duas a três vezes, enquanto que a concentração de albumina e transtirretina permanecem inalteradas.</p>
II	<p>No primeiro trimestre de gestação ocorre a estimulação direta da tireóide materna por níveis elevados de gonadotrofina coriônica (hCG), que é acompanhada por uma inibição parcial do eixo hipófise-tireoidiano. Entre as 8-14 semanas de gestação, há uma diminuição transitória no TSH (hormônio estimulante da tireoide) sérico.</p>
III	<p>Na segunda metade da gestação, está alterado o metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos maternos, ocorrendo a desiodação nos tecidos humanos alvo.</p>

## **1.7 Hipotireoidismo subclínico materno**

O hipotireoidismo subclínico é definido através da concentração de T4 e de T3 dentro dos valores de normalidade e atualmente não há evidência quanto ao limite superior estabelecido para as dosagens de TSH. No entanto dados bioquímicos são primordiais, uma vez em que os sinais clínicos relatados são frequentes durante uma gestação normal (Chaker *et al.*, 2014; Negro e Stagnaro-Green, 2014).

Deficiências de hormônio tireoidiano são encontradas em cerca de 3 a 7% das mulheres em idade fértil, nos quais de 2 a 3% apresentam hipotireoidismo durante a gravidez. Em áreas com deficiência de iodo, a causa mais comum de hipotireoidismo na gravidez é a tireoidite de Hashimoto (comprometimento auto-imune alterando a função da tireoide e sistema imunológico). Outras causas incluem: o iodo radioativo prévio e/ou ablação cirúrgicas em tratamento da doença de Graves, remoção cirúrgica da tireoide devido a câncer, interações medicamentosas ou tóxicas na tireoide, como exemplo para tratamento de hipertireoidismo e defeitos centrais no eixo-hipotálamo-hipófise-tireoidiano (Nathan e Sullivan, 2014).

O efeito dos hormônios tireoidianos sobre a maturação do sistema nervoso central é bem estabelecido. Quadros de hipotireoidismo que ocorrem no período crítico do desenvolvimento levam ao comprometimento desfavorável das funções cognitivas, sendo que atualmente poucos são os relatos que investigam a associação cognitiva e os níveis subclínicos de hormônios tireoidianos (Catli *et al.*, 2014).

## **1.8 Hormônios tireoidianos e neurodesenvolvimento**

Hormônios tireoidianos são essenciais para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso central, com a participação em eventos primordiais: regulação, diferenciação neuronal, sinaptogênese e mielinização (Faustino e Ortiga-Carvalho, 2014).

Os resultados de estudos epidemiológicos recentes sugerem que a deficiência da tireoide materna durante a gravidez, especialmente no início da gestação, pode perturbar o desenvolvimento neurológico em crianças. Durante as primeiras semanas de gravidez, o embrião é totalmente dependente do fornecimento hormonal materno, uma vez que a produção endógena de hormônios da tireoide não começa até o início do segundo trimestre de gestação (geralmente com 14 semanas) (Abdelouahab *et al.*, 2013). Em relação ao neurodesenvolvimento e a interação com o hormônio tireoidiano podem ser consideradas as seguintes fases:

Primeira etapa: Fornecimento adequado de T4 materno iniciando-se na segunda metade do primeiro trimestre. Esta fase inclui proliferação neuronal e o inicio da migração neuronal no córtex cerebral, hipocampo e eminênia ganglionar medial (Skeaff, 2011).

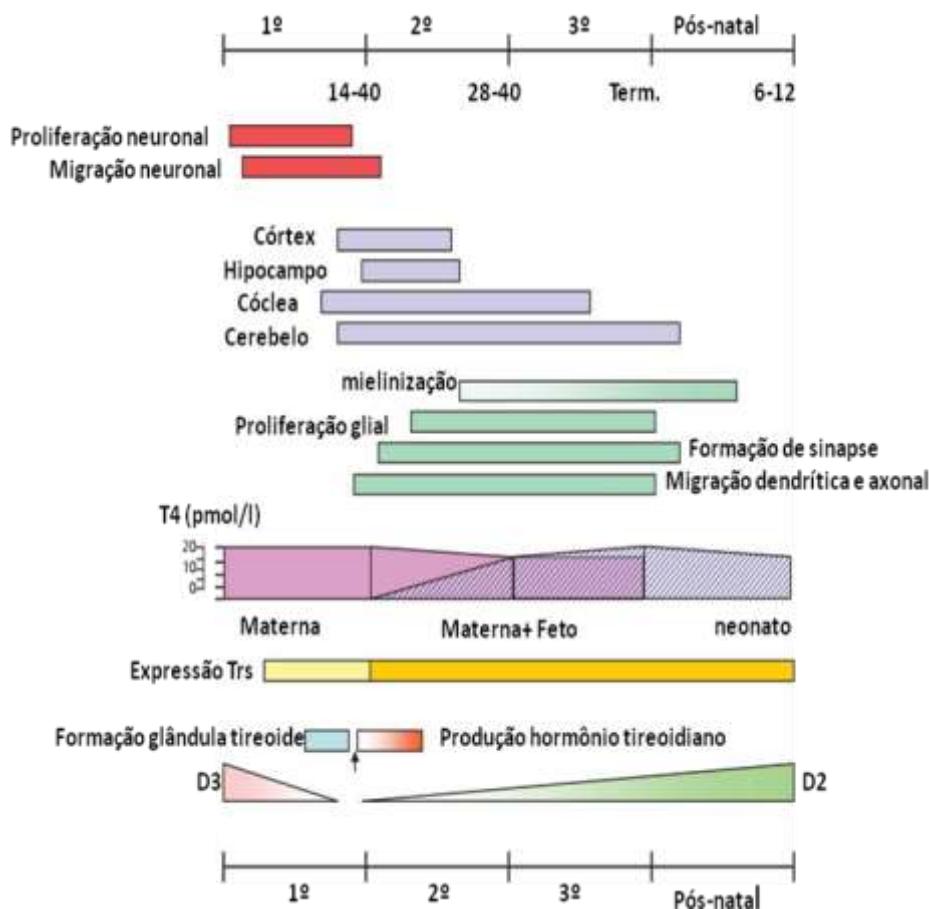
Segunda etapa: Neurogênese, migração neuronal, crescimento axonal, arborização dendrítica, sinaptogênese, diferenciação de células da gliais e início da mielinização (Skeaff, 2011).

Terceira etapa: Embora a concentração de T4 no feto aumenta à medida que a gestação avança, as reservas da glândula fetal são baixas, uma vez em que não ocorreu totalmente o amadurecimento (Skeaff, 2011).

## Introdução

---

No homem, a deficiência de tiroxina pode causar danos irreversíveis e alterações neurológicas mais graves, T4 e T3 circulantes são fundamentais para o desenvolvimento ao longo da vida e no crescimento pós-parto para o desenvolvimento adequado do cérebro (figura 4).



**Figura 4:** Principais eventos neurológicos regulados pela glândula tireoide. Adaptação: (Williams, 2008).

## Introdução

---

Trabalhos realizados por (Hong e Paneth, 2008), demonstram que a deficiência de T4 e T3 durante períodos críticos do neurodesenvolvimento pode danificar gravemente o sistema nervoso. Evidências acumuladas sugerem que a deficiência hormonal da tireoide materna pode ser uma das causas de paralisia cerebral em crianças dado que: 1) crianças prematuras com graves hipotiroxinemia têm alto risco de paralisia cerebral; 2) crianças que nascem com cretinismo em diferentes regiões do mundo têm achados motores compatíveis com o diagnóstico da paralisia cerebral e 3) estudos anteriores associam a deficiência da tireoide materna com os riscos de paralisia cerebral.

Portanto, estudos demonstraram que disfunções tireoidianas de origem materna, como exemplo o hipotireoidismo causam representativos danos neurológicos para o feto, como alterações no córtex, comprometimento da maturação celular, visão afetada e transtornos nas funções cognitivas (Zoeller e Rovet, 2004).

### **1.9 Disfunções tireoidianas em modelos animais e o paralelo com a clínica em humanos**

Perturbações em fases sensíveis do neurodesenvolvimento podem resultar em eventos estruturais e funcionais, os quais promovem ou facilitam alterações comportamentais e disfunções cognitivas. Experimentos realizados em ratos jovens com hipotireoidismo mostraram o déficit de memória e aprendizado em teste de labirinto (Hasegawa e Wada, 2013). A partir do modelo experimental esses dados foram comprovados em estudos em humanos, ao estudarem memória em crianças com deficiência de HTS Demonstrou-se a perda da retenção da memória dos eventos episódicos e de longo prazo (Willoughby, McAndrews e Rovet, 2013).

## Introdução

---

A pesquisa da sociabilidade em modelo murino provenientes do hipotireoidismo materno com as fêmeas matrizes submetidas à tireoidectomia total, evidenciou na prole uma redução do peso corporal e com um atraso no processo de neurodesenvolvimento (Pineda-Reynoso *et al.*, 2010).

Em resumo, as disfunções tireoidianas leves de origem materna podem causar desarranjos e repercuções *a posteriori*, quando já completadas as etapas do amadurecimento tecidual, com especial efeito para tecidos que ainda tem alto potencial de desenvolvimento como o sistema nervoso central. Muitos modelos animais de tireoidopatias podem permitir a abordagem e acompanhamento experimentais das etapas do neurodesenvolvimento após insultos ou condições de exceção durante a vida fetal e neonatal e com isto ajuda traçar paralelos de entendimento para análogos da condição em humanos.

## Hipótese do trabalho

---

### 2. Hipótese do trabalho

Conforme exposto, os hormônios tireoidianos são imprescindíveis para a adequada formação, constituição e composição citoarquitetural do cérebro fetal e pós-natal. A disfunção tireoidiana de origem materna poderá, portanto afetar o perfil de expressão comportamental na vida adulta com a dependência pelo sexo do indivíduo ou espécime, ou seja, o impacto potencialmente em machos versus em fêmeas pode apresentar possíveis correlações aos transtornos do espectro autista.

**Objetivos**

---

**3. Objetivos****3.1 Objetivo Geral**

Pretendemos analisar o perfil comportamental de desempenho social e de caráter de comunicabilidade em modelo experimental murino, cuja prole advém do hipotireoidismo materno, a fim de entender as particularidades na dependência do sexo no período pós-puberal e fase adulta.

**3.2 Objetivos específicos**

- ❖ Avaliar ação do hipotireoidismo materno em relação aos aspectos cognitivos e de neurodesenvolvimento na prole de modelo experimentação murino com paradigmas de comportamento animal em contexto social;
- ❖ Identificar aspectos de alteração social e comunicação vocal da linhagem estudada entre as proles dos grupos controle e advindos das mães com hipotireoidismo durante a gestação;
- ❖ Correlacionar as possíveis alterações cognitivas apresentadas aos transtornos do espectro autista.

## **4. Casuística e métodos**

### **4.1 Modelo animal**

O presente protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da Universidade Nove de Julho, sob o parecer 031/2012. Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6J com 60 dias de vida, sendo destinada a formação das matrizes reprodutoras. O delineamento ocorreu através da formação de 3 casais para cada grupo (Tabela 3).

Durante a realização do estudo os animais foram mantidos em gabinete ventilado alocados no biotério central da Universidade Presbiteriana Mackenzie no campus Higienópolis, nos quais eles foram alojados em caixa de polipropileno, com assoalho recoberto de maravalha, recebendo água e ração à vontade, com período de 12 hr no ciclo claro e 12 hr no escuro e com temperatura média de 25ºC.

### **4.2 Grupo controle**

A atribuição do grupo controle ocorreu através da formação de três casais, sem nenhum tipo de tratamento ou manipulação cirúrgica, sendo os animais mantidos juntos até o nascimento da primeira geração descendente.

### **4.3 Grupo metimazol – hipotireoidismo materno farmacológico**

A indução experimental do hipotireoidismo farmacológico é amplamente divulgada na literatura através de dois modelos clássicos, sendo realizadas por metimazol ou propiltiuracil.

## Casuística e métodos

---

Ambas são drogas antitireoidianas com mecanismos de inibição da síntese hormonal (Manna, Roy e Mugesh, 2013).

A determinação do bloqueio da glândula tireoide nas fêmeas foi estabelecida com a administração de metimazol. Diferentes investigadores mencionam a toxicidade do metimazol durante o período gestacional em roedores (Alves *et al.*, 2013; Mallela *et al.*, 2014).

Utilizamos o protocolo clássico validado em literatura na dose de 0,05% de metimazol (Sigma- Aldrich) (Bianco *et al.*, 2014) disponível na água de beber. As fêmeas foram acasaladas com machos não manipulados.

Os casais foram mantidos juntos até a segunda geração de filhotes. As fêmeas foram tratadas com o fármaco durante 30 dias antes da gestação. O tratamento foi interrompido na primeira gestação a partir da presença do 'plug' vaginal. Ressaltamos que o metimazol tem potencial de atravessar a barreira placentária, bloqueando a função tireoidiana do feto (Mandel e Cooper, 2001).

### 4.4 Grupo controle negativo

Neste grupo temos a segunda geração de prole vindas do grupo metimazol suspenso nas fêmeas antes mesmo do acasalamento inicial. Tendo como objetivo parâmetros comportamentais similares aos do grupo controle.

Nos três grupos os neonatos permaneceram com as fêmeas durante três semanas e após esse período foram desmamados e alocados em pequenos grupos de acordo com a sexagem e a determinação da sua origem materna.

**Tabela 3:** Delineamento das matrizes reprodutora utilizadas no estudo

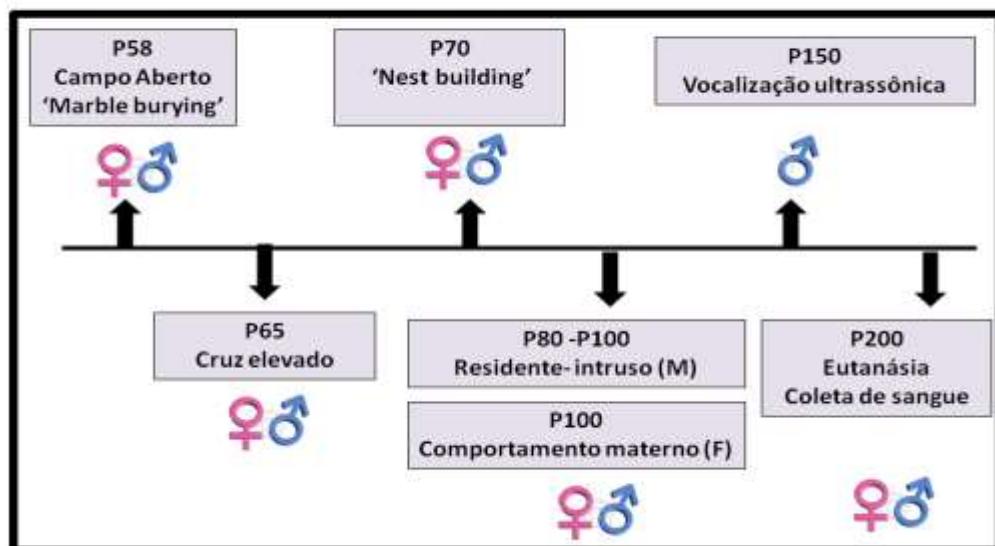
<b>Matrizes Reprodutoras</b>	<b>Número</b>
Grupo controle	3 casais
Grupo Metimazol (Fêmeas tratadas por 30 dias)	3 casais
Grupo Controle negativo (segunda geração metimazol)	3 casais

Após as realizações experimentais os animais foram sacrificados com a combinação de superdose de anestésicos ketamina 120 mg/kg e de 50 mg/kg xilazina administrados através da via intra-peritoneal. A coleta de sangue das mães foi realizada através da punção cardíaca para proceder às determinações bioquímicas futuras. Amostras de soro foram processadas à 5.000 rpm, 4ºC por 15 min, em seguida foram acondicionadas em -80ºC.

#### **4.5 Paradigmas comportamentais**

Ao completar 58 dias de vida (P58), a prole descendente foi submetida aos paradigmas comportamentais. O período de realização dos testes foi compreendido entre as 8:00 - 10:00 hr. Todas as técnicas foram analisadas através de único examinador.

Na primeira fase do estudo entre P58 à P70 os paradigmas consistiram na identificação de perfis de ansiedade, neofobia, bem-estar e padrões de temperatura corporal. Na segunda fase compreendendo o período entre P80 e P150 (Figura 5) buscou-se avaliar os níveis de agressividade, sobretudo na prole de machos e posterior enfoque na comunicabilidade ultrassônica.



**Figura 5:** Delineamento experimental realizado no estudo em: P58 aplicação de campo aberto e 'Marble burying', P65 labirinto em cruz elevado, P70 'Nest building', entre P80 à P100 teste de agressividade residente- intruso com a abordagem nos machos, P100 comportamento materno em fêmeas, P150 vocalização ultrassônica em machos e em P200 atribuição do protocolo de eutanásia e coleta de sangue para determinações bioquímicas futuras.

#### 4.6 Campo aberto ou 'open field'

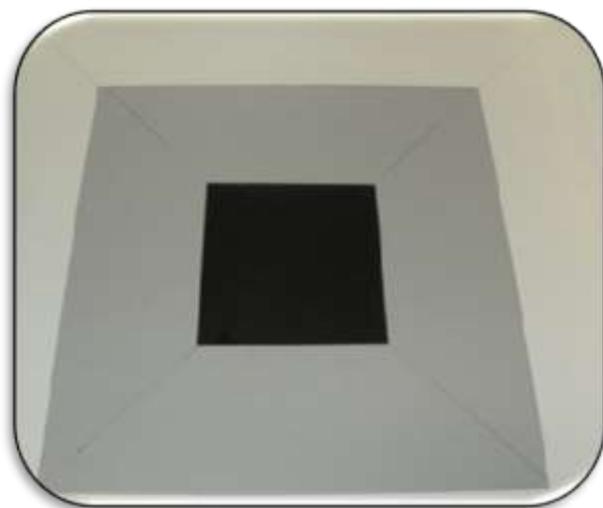
O paradigma de campo aberto ou 'open field' é amplamente utilizado por diversos investigadores com o objetivo de determinar o perfil de ansiedade do animal dentro de uma arena (MESFIN *et al.*, 2014; RATNAYAKE *et al.*, 2014). Realizamos o teste em idade pós-natal de P58.

**Casuística e métodos**

---

A realização ocorreu através da colocação de um animal em um ambiente desconhecido com paredes circundantes delimitadas em 50 cm X 50 cm (Figura 6). Foi observado o padrão de comportamento do animal, incluindo aspectos como a tendência de ficar na periferia da arena, sem entrar no centro, sendo esse interpretado como comportamento ansioso.

Para determinar a atividade exploratória e a movimentação espontânea o animal permaneceu na arena por 5 minutos, cujo protocolo foi adaptação de (Mesfin, Asres e Shibeshi, 2014). O comportamento foi tabulado e gravado com uma câmera da Sony 12.1, sendo quantificado com auxílio de software OPEN FLD (gentilmente cedido por Stefano Pupe). Foram mensurados: deslocamento do animal dentro da arena, quantificados os tempos de movimentação na parte central (demarcação em preto) e periférica (demarcação em cinza).



**Figura 6:** Arena utilizada no teste comportamental de campo aberto 50 x 50 cm.

#### **4.7 'Marble burying'**

O paradigma 'Marble burying' é amplamente utilizado para investigar a ansiedade em modelos murinos, nos quais os achados sugerem implicações para a avaliação do comportamento compulsivo, neofobia e ansiedade, conforme a variação de esferas cobertas pelo animal dentro da arena (Nardo *et al.*, 2013; Kedia e Chattarji, 2014).

Para a realização do paradigma, utilizamos caixa de material transparente com 5 cm de maravalha. Posteriormente na superfície disponibilizamos 20 bolinhas de vidro ("gude"), sendo formadas 5 fileiras com 4 bolinhas cada e com intervalos de aproximadamente 1,5 cm (Figura 7). Para a determinação do perfil de ansiedade, o animal a ser estudado foi posicionado no centro da caixa e permaneceu durante 30 min. Em seguida foi tabulada a quantidade de esferas cobertas durante a permanência no circuito, interpretado como ansiedade/neofobia.



**Figura 7:** Disposição do teste marble burying com 20 esferas de vidro.

#### **4.8 Labirinto em cruz elevado ou ‘plus maze’**

O paradigma 'plus-maze' ou labirinto de cruz elevado (figura 8) consiste em uma estrutura com dois braços, sendo a avaliação do comportamento de ansiedade em roedores. A atribuição ocorre através de um cálculo de proporção do tempo gasto nos braços abertos para o tempo gasto nos braços fechados, o número total de entradas nos braços abertos e fechados denominado como medidas da atividade global (Walf e Frye, 2007).

Ao contrário de outros testes comportamentais utilizados para a avaliação de respostas de ansiedade que dependem de apresentação de estímulos nocivos (ou seja, i.e; choques elétricos, privação de alimentos/água, ruídos altos, a exposição ao odor de predador) que normalmente produzem uma resposta condicionada, o labirinto elevado mais depende da propensão dos roedores para espaços escuros e de um medo incondicionado de alturas/espaços abertos (Walf e Frye, 2007). Para a realização do teste o animal foi posicionado na parte central da arena e o comportamento foi gravado com uma câmera Sony 12.1 por 5 min. Os parâmetros foram analisados com o software Plus FLD (gentilmente cedido por Stefano Pupe). Através das análises dos vídeos mensuramos:

- ❖ Tempo no braço fechado (minutos / segundos);
- ❖ Tempo no braço aberto (minutos / segundos);
- ❖ Tempo no centro (minutos / segundos);
- ❖ Quantidade de vezes da atividade levantar.



**Figura 8:** Labirinto em cruz elevado 38,5 cm em relação ao chão.

#### **4.9 'Nest building'**

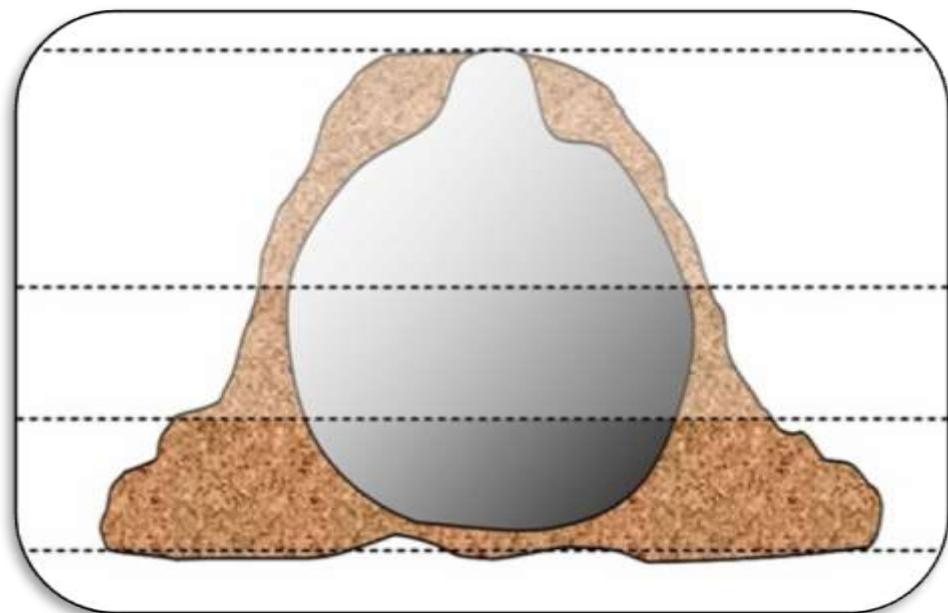
Os ninhos são usados por camundongos selvagens para abrigo contra os predadores, para recuar de condições ambientais adversas, e assim favorecer a proteção. Comportamentos associados à construção de ninhos são, portanto, altamente ligada à sobrevivência dos camundongos selvagem. Em laboratório, embora removido de condições selvagens por muitas gerações, os animais são altamente motivados a construir ninho quando aplicado o recurso na caixa.

**Casuística e métodos**

---

Qualquer alteração a estes comportamentos altamente motivados, ou o desarranjo do próprio ninho, deve indicar uma alteração substancial no meio ambiente ou diretamente relacionada aos próprios animais (Gaskill *et al.*, 2013).

Para a realização do teste oferecemos a prole dos grupos controle, metimazol e controle negativo 10 g de lenço de papel de máxima suavidade cortado ao meio. A avaliação ocorreu 24hr após a aplicação do recurso na caixa. Através da padronização da técnica foram atribuímos escores conforme as demarcações das linhas pontilhadas (figura 9 e tabela 4).



**Figura 9:** Padrão de organização do perfil de nidificação. Adaptado: (Gaskill *et al.*, 2013).

**Tabela 4:** Atribuições dos escores no teste 'nest building' - Adaptado: (Gaskill *et al.*, 2013).

Descrição do escore	Escore
O ninho é plano, sem paredes rasas	2
Forma levemente côncava	3
Parede que é $\frac{1}{2}$ a altura de uma cúpula;	4
Paredes são mais altas do que uma cúpula	5

#### **4.10 Agressividade em machos**

Para estudar a agressividade ofensiva em modelos animais, o paradigma residente-intruso é amplamente utilizada em roedores, onde é possível observar a conduta de agressividade do animal residente, no qual inicialmente, adota comportamentos investigatórios farejando o 'intruso', seguindo de piloereção e ranger dos dentes (Ogawa *et al.*, 1997; De Boer *et al.*, 1999; Defensor *et al.*, 2012; Kasten-Jolly *et al.*, 2012; Robinson, Penatti e Clark, 2012; Weathington, Arnold e Cooke, 2012) (Figura 10). Esse estudo comportamental consiste em uma sessão onde é realizado o pareamento de um animal macho 'residente' em relação a um macho 'intruso' (i.e.; o 'intruso' é escolhido randomicamente em uma gaiola coletiva e colocado na gaiola do 'residente').

## Casuística e métodos

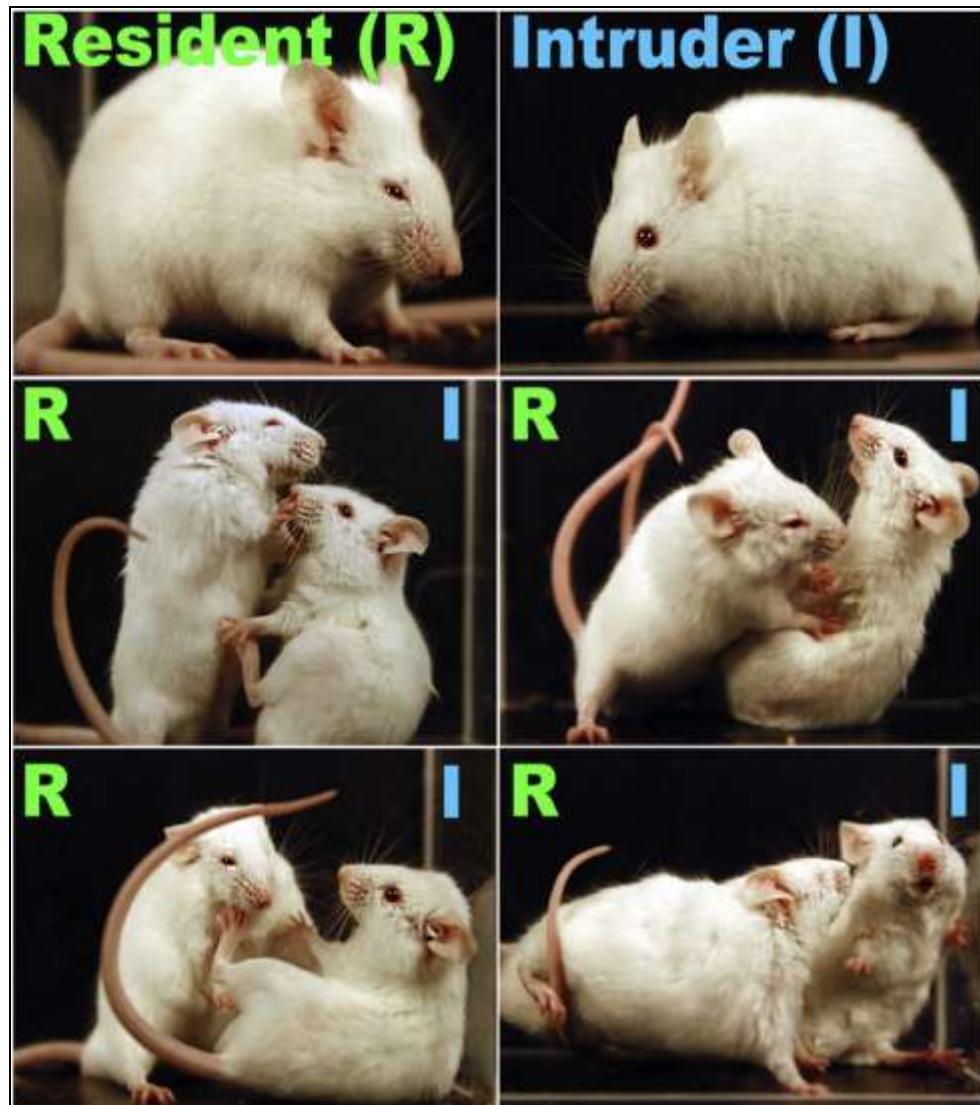
---

Utilizamos como residentes os machos descendentes da prole de fêmeas do grupo controle, metimazol e controle negativo, e os machos intrusos não apresentaram nenhum tipo de manipulação.

Para o desenvolvimento da técnica e para a garantia da estabilidade comportamental dos animais, os residentes ficaram em presença de fêmeas. Na semana que procedeu ao teste, as gaiolas dos animais chamados residentes não foram trocadas. Para a realização do teste a fêmea foi retirada e após esse período o animal intruso foi colocado na gaiola do animal residente.

Foram anotados os dados comportamentais com o tempo de observação estabelecido de 10 min. por caixa durante três semanas, nos quais foram filmados com auxílio de uma câmera digital Sony 12.1 mp. para posterior verificação. Determinamos no teste:

- ❖ Latência para o primeiro ataque (minutos / segundos);
- ❖ Tempo total de ataques (minutos / segundos);
- ❖ Duração de cada ataque (minutos / segundos);
- ❖ Número de ataques / intervalos (minutos / segundos).



**Figura 10:** Padrão comportamental do teste de residente-intruso (Defensor et al., 2012)

#### **4.11 Comportamento materno**

Comportamento materno é na realidade um conjunto de comportamentos amplamente estudados a fim de explorar as nuances abrangendo a profunda interação mãe-filho. (Grissom *et al.*, 2014; Carola, Mirabeau e Gross, 2011; Bayerl, Klampfl e Bosch, 2014). Em mamíferos, o cuidado materno contribui para a sobrevivência das espécies e em modelos murinos os cuidados nos primeiros dias de vida é primordial. A prole nasce sem pêlo, cega e sem a capacidade de regulação da temperatura corporal (Brooks *et al.*, 2012). Em um dos seus aspectos centrado na mãe podemos considerar o comportamento materno um contraponto à agressividade ofensiva do macho na defesa /cuidado com a prole na interação social.

Camundongas selvagens sem contato sexual e que não foram expostas anteriormente à prole apresentam espontaneamente o comportamento materno e na investigação de possíveis déficits nesta interação social, procuramos esclarecer o perfil das fêmeas descendentes do grupo controle, metimazol e controle negativo. Em camundongas é típico do comportamento materno de recuperação dos filhotes, lambadura, construção de ninho e agachamento sobre os filhotes. Adaptamos o protocolo desenvolvido com fêmeas virgens (Wang e Storm, 2011).

O protocolo ocorreu através da disposição de três filhotes provenientes de mães não manipuladas com 7 dias de vida. Ao centro da caixa foi colocada uma fêmea descendente dos grupos estudados (controle, metimazol e controle negativo) com P100. Os dados foram tabulados e quantificados, sendo considerado o tempo do comportamento de interação com o filhote durante o período de 10 min.

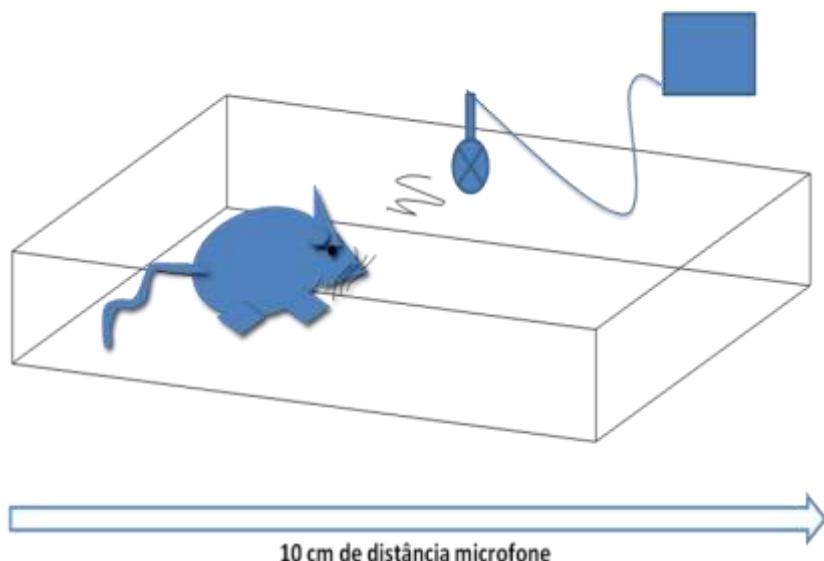
#### **4.12 Vocalização ultrassônica**

Sabemos que a emissão de vocalização é fundamental para o comportamento e sociabilidade em roedores. Inúmeros são os trabalhos que enfocam no estudo de ultrassons, no qual a variação acústica ocorre de 30 à 110 kHz, conforme o contexto social e expresso pelas condições emocionais dos animais envolvidos. Esta característica natural e comportamental pode ser uma forte ferramenta para modelos de disfunções cognitivas (Branchi, Santucci e Alleva, 2001; Moles *et al.*, 2007; Arriaga e Jarvis, 2013).

A vocalização ocorre basicamente em contexto social de duas etapas (Lahvis, Alleva e Scattoni, 2011): 1) No contexto sexual, caracterizado por machos emitirem o som para atrair as fêmeas e 2) na interação filhote com as fêmeas. Por ser um contexto social quando os animais são isolados por 24 horas à percepção acústica da interação com o outro indivíduo (Chabout *et al.*, 2012).

O nosso interesse foi realizar as coletas dos dados durante o contexto sexual, nos quais a prole de machos descendente do grupo controle, metimazol e controle negativo foram isolados por 24 horas e apresentados a uma fêmea não manipulada.

As gravações foram como base na coleta do áudio digital através de um gravador de sons ultrassônicos Avisoft UltraSoundGate 116m Mobile- 41165-Delta-Sigma, posicionado próximo à caixa teste. As análises sonográficas foram realizadas com o auxílio do software Avisoft-SAS LAB. O microfone foi distanciado 10 cm dos animais (Figura 11). As gravações ocorreram durante a interação macho-fêmea durante 3 min. As fêmeas não emitem vocalização diante desse contexto. Procuramos identificar a presença de sílabas simples, harmônicas e moduladas para a determinação dos parâmetros acústicos específicos observando a complexidade global nos tipos de vocalização produzida (Johnson, Ciucci e Connor, 2013).

**Casuística e métodos**

**Figura 11:** Posicionamento do microfone ultrassônico.

#### 4.13 Análise estatística

A análise dos resultados obtidos e sua associação com os dados foram realizadas através do software OriginPro versão 9.1. A normalidade foi verificada pelo teste Kolmogorov e Smirnov. Para a análise de variância utilizamos ANOVA de uma via seguida do teste pos-hoc de comparações múltiplas de Turkey. O nível de significância de 5% ( $p<0.05$ ) foi considerado e os dados expressos em números absolutos como média  $\pm$  erro padrão (SEM) ou relativos em porcentagens. Para os dados não paramétricos foi aplicado qui-quadrado sendo representado por  $\chi^2$  com nível de significância também de 5% ( $p<0.05$ ).

## Resultados

---

## 5. Resultados

### 5.1 Padrões reprodutivos e ninhadas

Não observamos diferença significativa quanto a obtenção da prole. Dos três casais acasalados por grupo, o número de prole está descrito na tabela 5 e quanto ao número total de filhotes os dados na tabela 6. Em relação à abertura ocular, observamos qualitativamente um atraso na prole em três dias proveniente do grupo metimazol quando comparada aos demais grupos tabela 7 e figura 12. Embora não quantificado, este achado é biologicamente relevante dada a estreita janela temporal para esta maturação.

**Tabela 5:** Padrões reprodutivos

Descrição do grupo	Número de prole
Controle	1
Metimazol	2
Controle negativo	2

O peso corporal da prole também não variou tanto em machos quanto em fêmeas dos grupos estudados com a aferição no primeiro dia de vida (P01). Os dados de média e desvio estão expressos na tabela 8.

## Resultados

---

**Tabela 6:** Número total de filhotes

<b>Descrição do grupo</b>	<b>Total de filhote</b>
Controle	7 = 3♀ - 4♂
Metimazol	9 = 5♀ - 4♂
Controle negativo	8 = 4♀ - 4♂

**Tabela 7:** Abertura ocular da prole

<b>Descrição do grupo</b>	<b>Total de dias</b>
Controle (fêmeas e machos)	13
Metimazol (fêmeas e machos)	16
Controle negativo (fêmeas e machos)	14



**Figura 12:** Padrão da abertura ocular em A grupo controle, B grupo metimazol e em C grupo controle negativo.

## Resultados

---

**Tabela 8:** Avaliação do peso ao nascer (gramas)

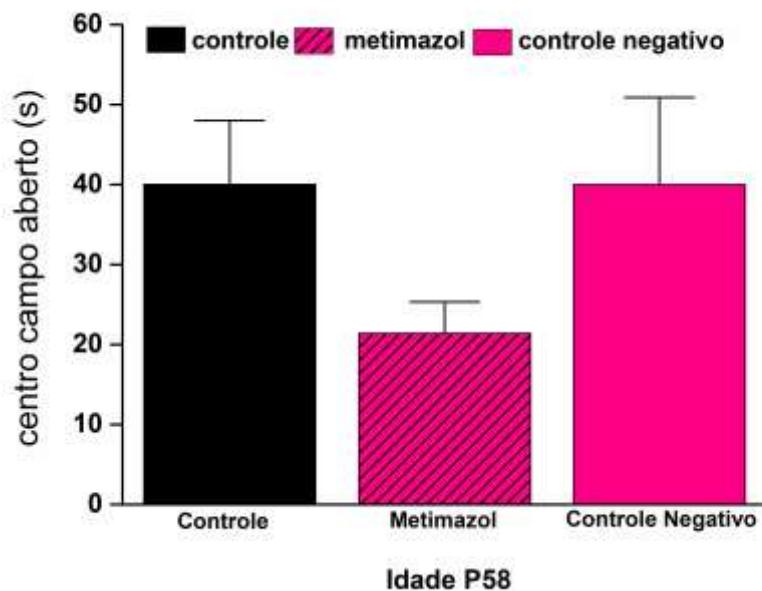
Descrição do grupo	Média - S.E (g)
Controle fêmeas	1,13 ± 0,08
Controle machos	1,20 ± 0,04
Metimazol fêmeas	1,26 ± 0,09
Metimazol machos	1,35 ± 0,06
Controle negativo fêmeas	1,15 ± 0,06
Controle negativo machos	1,22± 0,06

### 5.2 Paradigma Comportamental - campo aberto

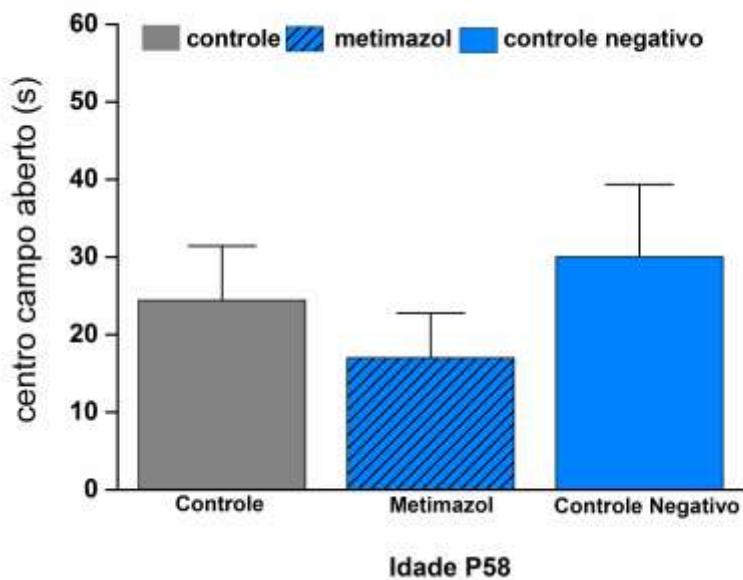
O início da análise foi estudar a movimentação exploratória de todos os grupos de prole. A análise mostrou apenas uma inclinação de redução de atividade central em ambos os sexos do grupo metimazol quando comparada aos demais grupos. No entanto, não houve diferença real na permanência no centro para ambos os sexos: fêmeas ( $p=0,2$ ) (figura 13) e machos ( $p=0,5$ ) (figura 14). Na avaliação compensatória quanto à preferência do animal em relação à periferia da arena (área demarcada em cinza do campo aberto), o resultado foi confirmado no mesmo padrão para fêmeas ( $p=0,2$ ) (figura 15) em machos ( $p=0,5$ ) (figura 16).

## Resultados

---



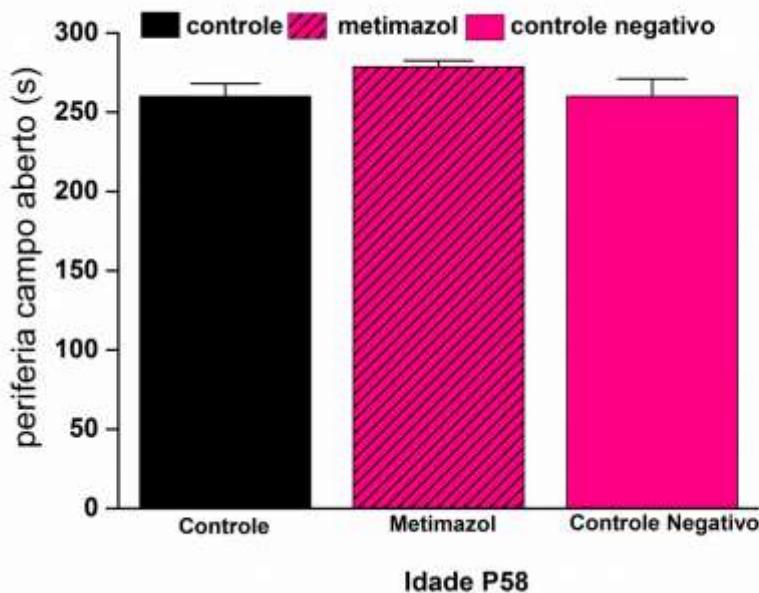
**Figura 13:** Centro campo aberto. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M. controle =  $40,0 \pm 7,1$ , metimazol =  $21,4 \pm 3,9$ , controle negativo =  $40,0 \pm 11,0$ .



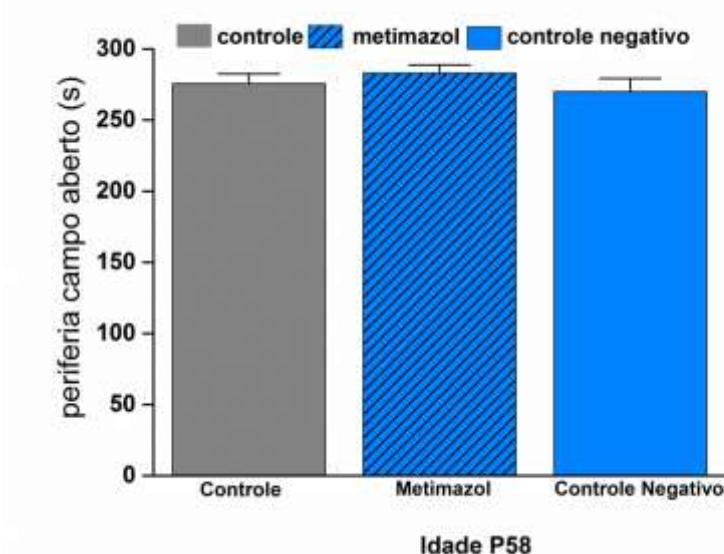
**Figura 14:** Centro campo aberto. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M. controle =  $24,4 \pm 7,0$ , metimazol =  $17,0 \pm 5,8$  e controle negativo =  $30,0 \pm 9,3$ .

## Resultados

---



**Figura 15:** Periferia campo aberto. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM. controle =  $260,0 \pm 7,1$ , metimazol =  $278,5 \pm 3,1$ , controle negativo =  $260,0 \pm 11,0$ .



**Figura 16:** Periferia campo aberto. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M. controle =  $275,5 \pm 7,0$ , metimazol =  $282,1 \pm 5,8$  e controle negativo =  $269,1 \pm 9,3$ .

## Resultados

---

### 5.3 Paradigma Comportamental – ‘marble burying’

Não ocorreu diferença ( $p=0,8$ ) entre os grupos estudados. Os dados estão expressos na tabela 9. Portanto, na aplicação da técnica em P58 não evidenciamos os perfis de neofobia e compulsividade neste modelo estudado.

**Tabela 9:** Avaliação do ‘marble burying’ – Quantidade de esferas de vidro cobertas

Descrição do grupo	Média - S.E (esferas)
Controle fêmeas	11,7 ± 2,9
Controle machos	12,3 ± 0,9
Metimazol fêmeas	11,8 ± 2,7
Metimazol machos	12,0 ± 2,1
Controle negativo fêmeas	9,0± 2,9
Controle negativo machos	14,5 ± 2,6

## Resultados

---

### 5.4 Paradigma Comportamental - Labirinto em cruz elevado

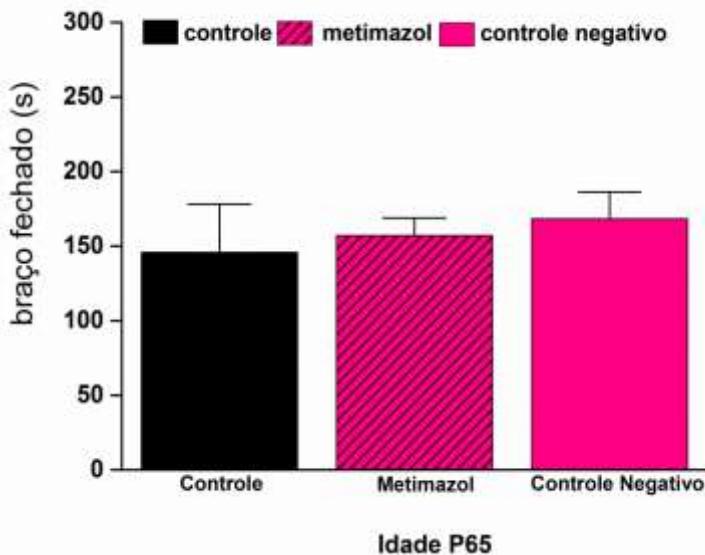
Talvez pela sensibilidade da técnica ao identificar e mensurar o perfil de ansiedade do animal testado em uma situação inata *provocadora* de medo, a técnica de labirinto em cruz elevado ou ‘plus maze’ demonstrou um dos achados mais relevantes.

A avaliação de permanência nos braços fechados, cuja inferência é de um aumento do estado ansioso relacionado ao tempo mais prolongado de estada, não houve variação entre todos os grupos da prole fêmea ( $p=0,70$ ) (figura 17). Em contrapartida, machos do grupo metimazol mostraram um importante aumento de permanência nos braços fechados quando comparados tanto ao grupo macho controle ( $p=0,001$ ) quanto ao grupo macho controle negativo ( $p=0,002$ ) (figura 18).

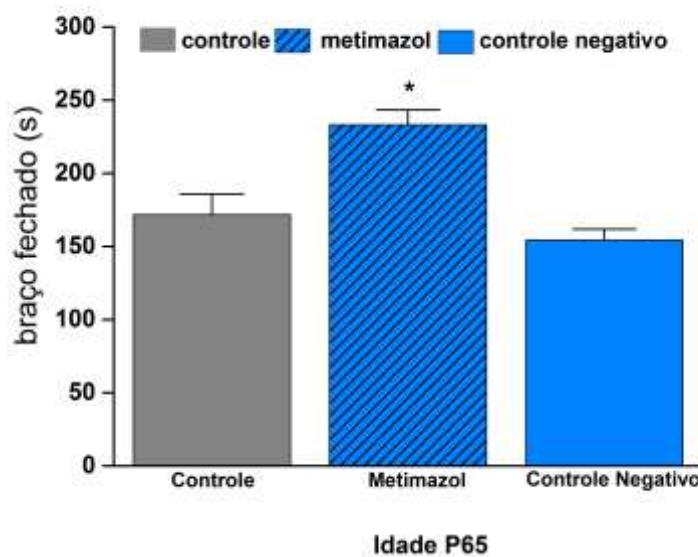
Quanto à permanência nos braços abertos, não houve diferenciação de tempo entre os grupos de fêmeas ( $p=0,60$ ) (figura 19) nem para os machos ( $p=0,20$ ) (figura 20). Quando avaliado o perfil central de escolha que o animal testado tem em relação à opção de realizar o deslocamento ao braço aberto ou braço fechado não observamos diferença como permanência em fêmeas ( $p=0,70$ ) (figura 21), mas coerentemente com o aumento de ansiedade, os machos do grupo metimazol mostraram redução de estada neste ambiente ( $p=0,04$ ) (figura 22). A tendência da atividade de levantar-se que o animal realiza, sobretudo no braço fechado, foi ausente tanto em fêmeas ( $p=0,20$ ) (figura 23) como em machos do grupo metimazol ( $p=0,08$ ) (figura 24).

## Resultados

---



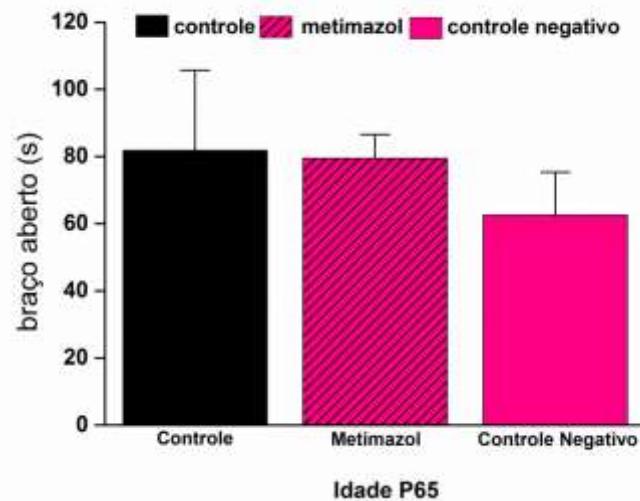
**Figura 17:** Tempo no braço fechado. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM. controle =  $145,8 \pm 32,3$ , metimazol =  $157,1 \pm 11,6$ , controle negativo =  $168,2 \pm 18,0$ .



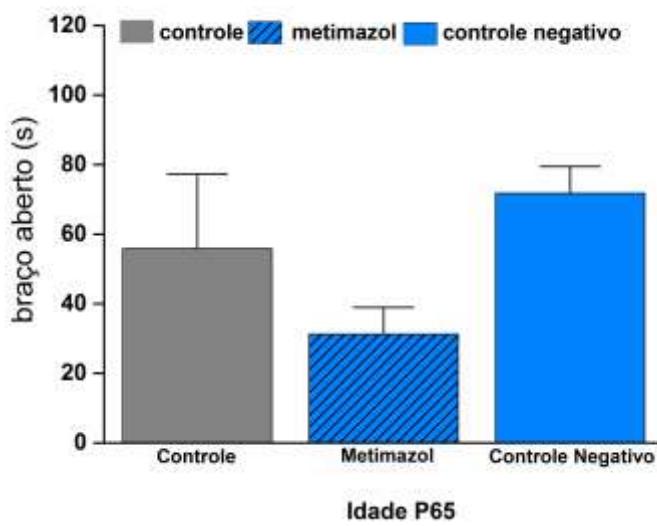
**Figura 18:** Tempo braço fechado. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M. controle =  $171,6 \pm 14,0$  metimazol =  $233,1 \pm 10,1$  e controle negativo =  $154,3 \pm 7,5$  (\*  $p=0,002$ ).

## Resultados

---



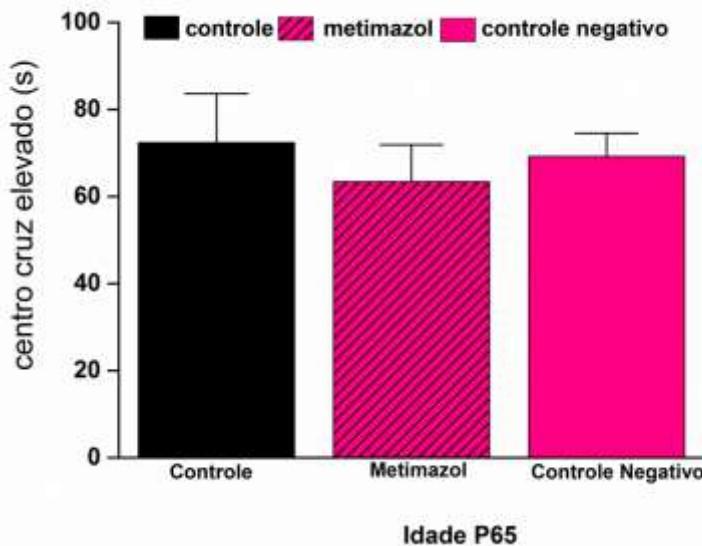
**Figura 19:** Tempo no braço aberto. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM. controle =  $81,8 \pm 23,8$ , metimazol =  $79,4 \pm 7,0$ , controle negativo =  $62,5 \pm 12,7$ .



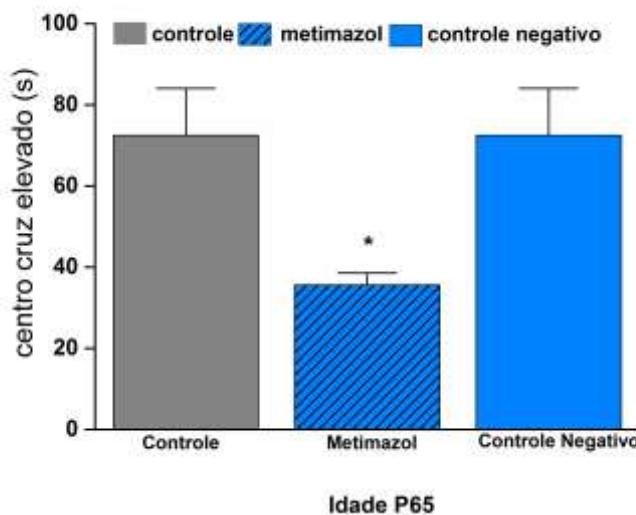
**Figura 20:** Tempo braço aberto. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M. Controle =  $55,8 \pm 21,3$ , Metimazol =  $31,2 \pm 7,6$  e Controle negativo =  $71,7 \pm 7,6$ .

## Resultados

---



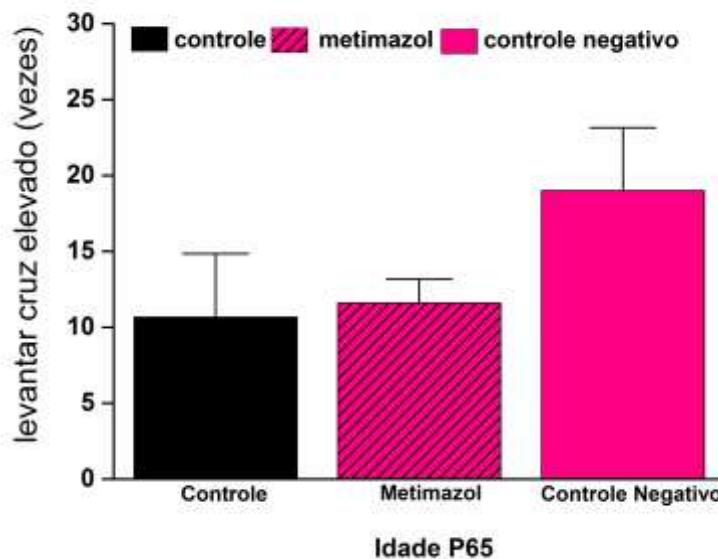
**Figura 21:** Tempo no centro cruz elevado. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM. controle = 72,3  $\pm$  11,1, metimazol = 63,3  $\pm$  8,4, controle negativo = 69,2  $\pm$  5,3.



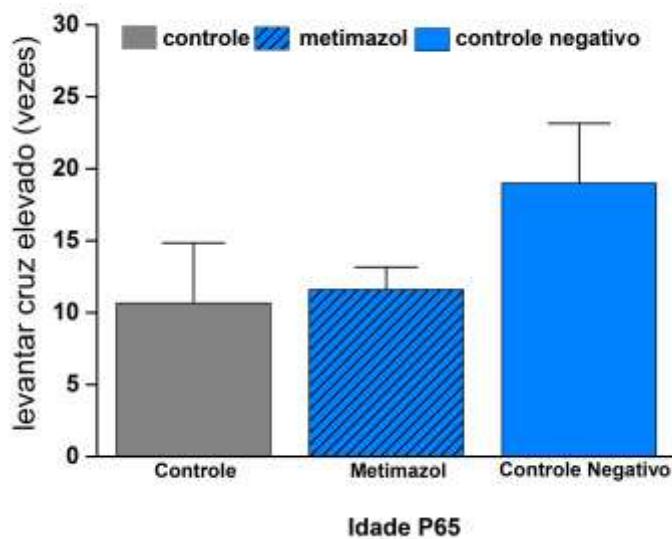
**Figura 22:** Tempo no centro cruz elevado. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M. Controle = 72,5  $\pm$  11,5, Metimazol = 35,6  $\pm$  2,9 e Controle negativo = 72,5  $\pm$  11,5 (\* $p=0,04$ ).

## Resultados

---



**Figura 23:** Freqüência de levantar no cruz elevado. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM. controle  $10,6 \pm 4,1$ , metimazol  $= 11,6 \pm 1,5$ , controle negativo  $= 19 \pm 4,1$ .



**Figura 24:** Freqüência de levantar no cruz elevado. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M. controle  $= 12,5 \pm 2,9$  , metimazol  $= 6,5 \pm 1,3$  e controle negativo  $= 14,2 \pm 2,0$ .

## Resultados

### 5.5 Paradigma Comportamental - 'Nest building'

'Nest building' foi aplicado nos diferentes grupos estudados que expressaram escores discretamente diferentes tanto em machos como em fêmeas, admitindo os grupos controle a referência. Porém, esta avaliação qualitativa não revelou inferências diretas com relação ao controle de temperatura corporal. Ressaltamos que a temperatura média da sala permaneceu 23ºC nos dois dias de estudo. O primeiro dia foi disponibilizado 10 g de papel cortado e o segundo dia feita a avaliação do padrão de nidificação animais (figura 25 à figura 30) cuja determinação dos escores descrita na tabela 10. Déficits organizacionais no controle de temperatura corporal atribuídos aos machos proveniente do metimazol, controle negativo fêmeas e machos são meramente impressões, necessitando abordagens experimentais complementares e quantitativas.



**Figura 25:** Perfil de nidificação de fêmeas controle em A representa o inicio do teste e em B 24 hr após o perfil de nidificação.

**Resultados**

**Figura 26:** Perfil de nidificação de machos controle em A representa o inicio do teste e em B 24 hr após o perfil de nidificação.



**Figura 27:** Perfil de nidificação de fêmeas metimazol em A representa o inicio do teste e em B 24 hr após o perfil de nidificação

**Resultados**

**Figura 28:** Perfil de nidificação de machos metimazol em A representa o inicio do teste e em B 24 hr após o perfil de nidificação.



**Figura 29:** Perfil de nidificação de fêmeas controle negativo em A representa o inicio do teste e em B 24 hr após o perfil de nidificação.

## Resultados

---



**Figura 30:** Perfil de nidificação de machos controle negativo em A representa o inicio do teste e em B 24 hr após o perfil de nidificação.

**Tabela 10:** Escores atribuídos a avaliação do 'nest building'

Descrição do grupo	Escore (nidificação)
Controle fêmeas	4
Controle machos	5
Metimazol fêmeas	3
Metimazol machos	4
Controle negativo fêmeas	2
Controle negativo machos	3

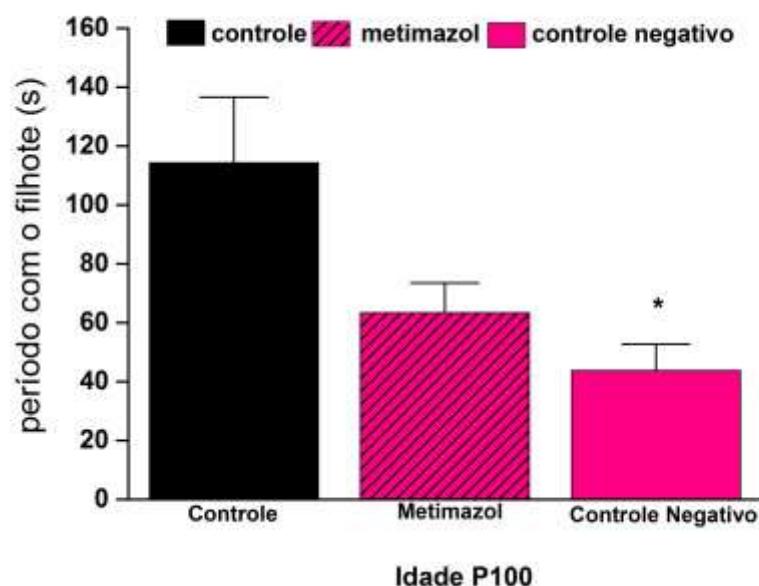
## Resultados

---

### 5.6 Paradigma Comportamental - comportamento materno

O comportamento materno é um perfil típico de roedores. Embora as fêmeas analisadas não tivessem contato prévio com os machos e mesmo não sendo as mães biológicas, foi perceptível a interação mãe-adotiva e filhote em todos os grupos analisados.

Desta forma, determinamos em P100 maior recuperação dos filhotes, ou seja, maior interação, nas fêmeas do grupo controle ocorrendo uma redução de interação nos grupos metimazol e controle negativo em relação ao controle ( $p=0,02$ ) (figura 31).



**Figura 31:** Comportamento materno. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  SEM. controle = 114, 3  $\pm$  22,2, metimazol = 63,4  $\pm$  10,0, controle negativo = 43,7  $\pm$  8,9 (\* p =0,02).

## Resultados

---

### **5.7 Paradigma Comportamental - residente-intruso**

Na avaliação do perfil de agressividade não observamos diferença significativas em relação à latência para os ataques durante a realização do teste em nenhuma semana: primeira semana ( $p=0,5$ ) (tabela 11), segunda semana ( $p=0,2$ ) (tabela 12) e terceira semana (0,08) (tabela 13).

Ao analisarmos os parâmetros da quantidade de ataques diante das três semanas não observamos diferenças significativa atribuída a grande variabilidade e inconstância no comportamento dos animais em vários grupos (tabela 14).

Na avaliação de prevalência para o ataque (i.e.; individuo que lutou e que não entrou em conflito), também não ocorreu diferença em qualquer dos grupos ( $\chi^2 p=0.23$ ).

**Tabela 11:** Latência para o ataque em segundos realizado na primeira semana

Descrição do grupo	Média (latência em segundos)
Controle	150
Metimazol	71
Controle Negativo	199

## Resultados

---

**Tabela 12:** Latência para o ataque em segundos realizado na segunda semana.

Descrição do grupo	Média (latência em segundos)
Controle	151
Metimazol	204
Controle Negativo	364

**Tabela 13:** Latência para o ataque em segundos realizado na terceira semana.

Descrição do grupo	Média (latência em segundos)
Controle	64
Metimazol	276
Controle Negativo	282

## Resultados

---

**Tabela 14:** Tempo total de ataque em segundos nas três semanas

Descrição do grupo	Média - S.E (s)
Controle	20 ± 1,0
Metimazol	84 ± 47
Controle negativo	30 ± 17

## 5.8 Paradigma Comportamental - Vocalização ultrassônica

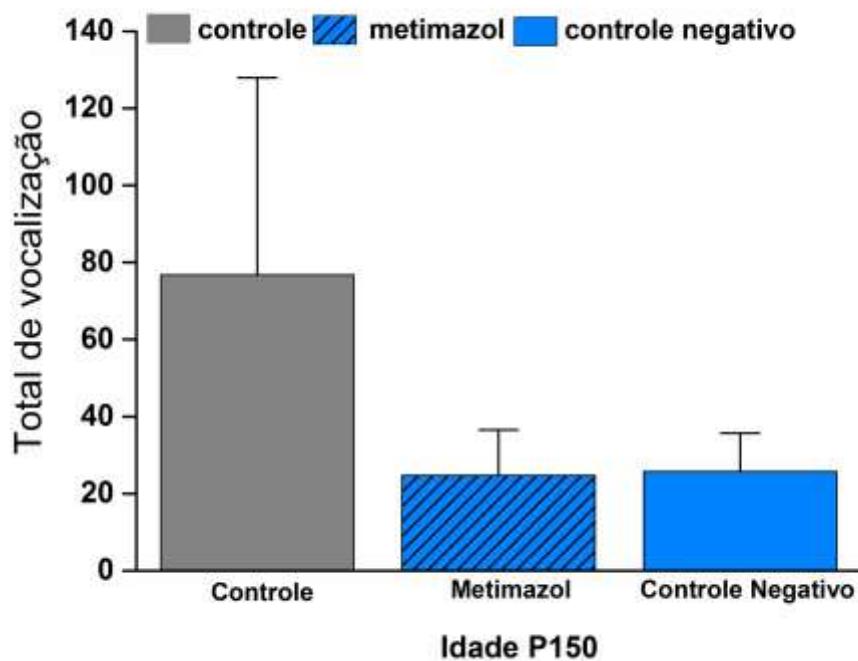
Na avaliação da comunicação acústica ultrassônica. Não observamos alteração quanto a emissão total de vocalização somente em machos em presença de fêmeas ( $p=0,4$ ) pela grande variabilidade no grupo controle (figura 32).

Quando analisamos a complexidade do conteúdo acústico em: vocalização simples (menor complexidade) (tabela 15, figura 33), vocalização modulada (média complexidade) (tabela 16, figura 34) e vocalização harmônica (máxima complexidade) (tabela 17, figura 35).

Foi notada apesar de não significativa uma tendência global no grupo metimazol para a redução de comunicação simples e vocalização harmônica (máxima complexidade) ( $p=0,3$ ).

## Resultados

---



**Figura 32:** Quantidade de vocalização emitida. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  S.E.M. controle =  $76,7 \pm 51,1$ , metimazol =  $24,7 \pm 11,7$  e controle negativo =  $25,7 \pm 9,9$ .

**Tabela 15:** Quantificação total de vocalização ultrassônica simples

Descrição do grupo	Média - S.E (simples)
Controle	$53,7 \pm 38$
Metimazol	$7,25 \pm 4,6$
Controle Negativo	$18,2 \pm 6,2$

**Resultados**

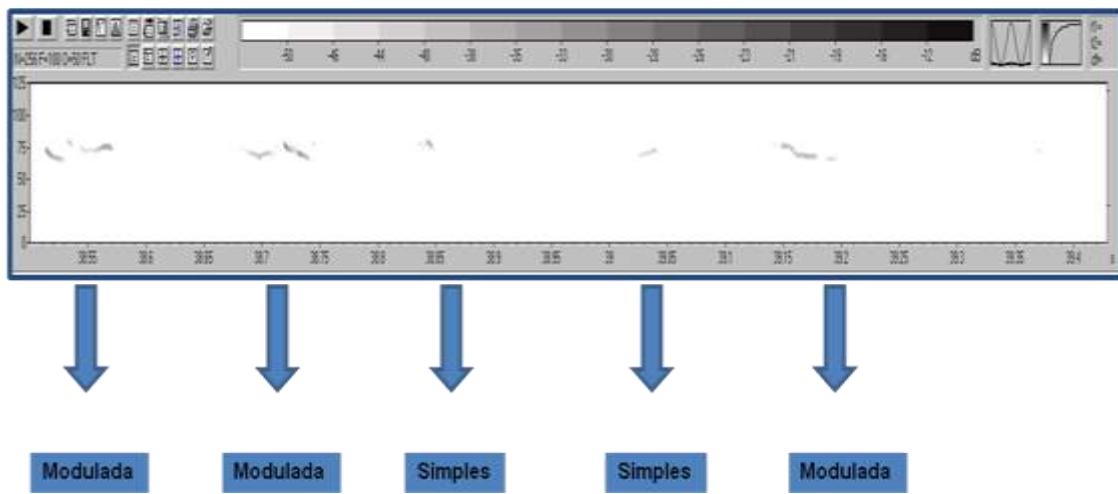
**Figura 33:** Exemplo de vocalização ultrassônica do tipo simples.

**Tabela 16:** Quantificação total de vocalização ultrassônica modulada

Descrição do grupo	Média - S.E (modulada)
Controle	19,5 ± 12
Metimazol	17,5 ± 7,6
Controle Negativo	6,00± 3,0

## Resultados

---

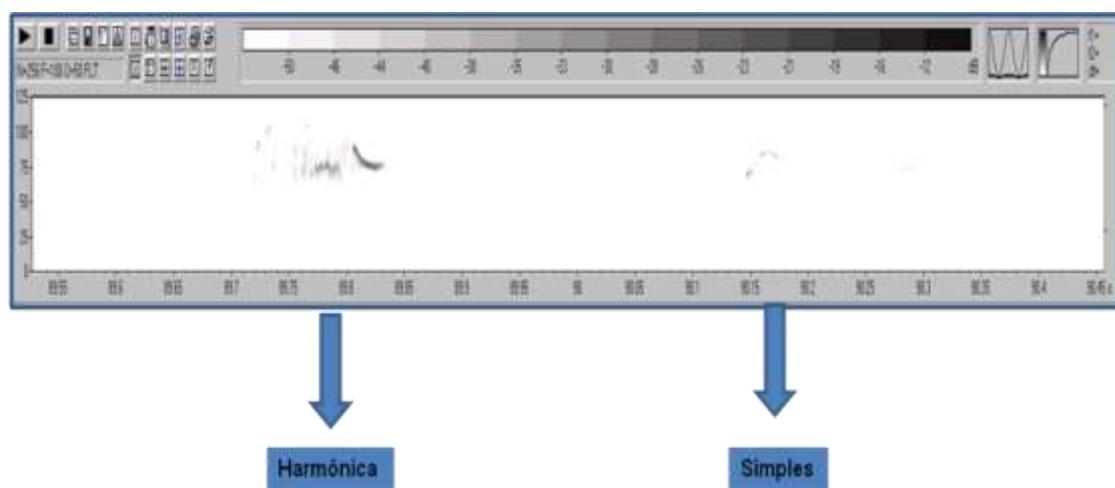


**Figura 34:** Sonograma exemplificando os tipos de vocalização no grupo controle.

**Tabela 17:** Quantificação total de vocalização ultrassônica harmônica

Descrição do grupo	Média - S.E (harmônica)
Controle	$3,5 \pm 2,0$
Metimazol	0
Controle Negativo	$1,5 \pm 1,1$

## Resultados



**Figura 35:** Sonograma exemplificando os tipos de vocalização no grupo controle harmônica e simples.

---

## **6. Discussão**

### **6.1 Do modelo experimental**

Os hormônios tireoidianos de origem materna são essenciais para o processo de neurodesenvolvimento e citoarquitetura fetal, sendo o cérebro um dos órgãos-alvos principais de captação dos HTS, especialmente na fase de desenvolvimento e durante o processo de regeneração neuronal em adultos (Kassem *et al.*, 2006). Perturbações no eixo da tireoide, por exemplo, devido a redução dos HTS pode ocasionar prejuízos neurológicos irreversíveis sendo conduzidos ao longo da vida (Gilbert *et al.*, 2013).

Há mais de um século é reconhecido em humanos o profundo efeito no desenvolvimento neurológico deletério do hipotireoidismo materno e fetal causado pela deficiência de iodo. Evidências experimentais mais recentes sugerem associação prejudicada com o desenvolvimento cerebral fino (Chevrier *et al.*, 2011) cuja clínica mostra-se nos déficits cognitivos seletivos foram identificados: comprometimento de habilidade matemática, prejuízo na comunicação e na coordenação motora fina (Huo *et al.*, 2011).

Podemos atribuir uma associação com os chamados dessaranjos sociais, como exemplo os classificados dentro do espectro autista. Esta é uma condição do desenvolvimento neurológico identificada por dificuldade de comunicação social e gama restrita de interesse repertório (Smith, 2015). No nosso trabalho procuramos realizar uma investigação em modelo murino, tendo como objetivo esclarecer aspectos cognitivos com base nos, comportamentos exploratórios, comportamentos sociais e de comunicabilidade. Dentre as esferas de diferenciação entre machos e fêmeas na idade pós-puberal e provavelmente perpetuada na vida adulta.

## Discussão

---

O estudo comportamental da prole foi embasado na indução do hipotireoidismo materno leve ou subclínico farmacologicamente a partir do antitireoidiano metimazol em camundongas da linhagem C57BL/6J antes do início da gestação. A determinação da indução do hipotireoidismo ocorreu com base de outros modelos: 1) Propiltiouracil (PTU) que apresenta potencial teratogênico e 2) A remoção da glândula tireóide através da tireoidectomia cujo desafio técnico não fora vencido além do potencial desequilíbrio de cálcio secundário atribuído à localização da glândula paratireóide (Buras *et al.*, 2014).

As camundongas foram tratadas 30 dias antes do acasalamento, sendo o tratamento suspenso a partir do momento em que realizamos o pareamento do macho com a fêmea. Ressaltamos que em camundongas, o período de gestação varia entre 19 a 21 dias. A glândula tireoide fetal inicia o seu desenvolvimento no 8º dia de gestação e no 14º dia tem a presença de receptores do hormônio tireoesimulante nos tecidos tireoidianos, sendo a sua produção prontamente estabelecida em torno do 16º e 17º dias (Brown *et al.*, 2000).

Em estudos de exploração comportamental/cognitivo o delineamento e abordagem das técnicas experimentais necessitam de um rigor maior no acompanhamento da ninhada e sua adaptação. Com base nessa necessidade todos os paradigmas comportamentais adotados no presente estudo foram validados pelo nosso grupo com a linhagem C57BL/6J controle em um mesmo biotério submetido às mesmas condições de acondicionamentos e manipulação humana. Através desse refinamento estabelecemos a ordem experimental, tendo como objetivo principal evitar possíveis fatores de interferência de um paradigma em relação ao outro e garantindo assim a sensibilidade e eficiência de cada ensaio.

Notavelmente essa triagem inicial foi fundamental para estabelecer o perfil basal dito típico da linhagem.

## **6.2 Dos testes comportamentais não específicos**

Em relação aos efeitos deletérios ocasionados pelo hipotireoidismo materno na idade pós-puberal machos e fêmeas foram submetidos à sequência de paradigmas comportamentais. As variações e enfoques entre as técnicas mostraram que o metimazol não alterou o perfil de atividade exploratória em ambos os sexos quando os animais foram submetidos ao paradigma de campo aberto.

Os dados apresentados corroboram com o que condiz a literatura, diante da abordagem experimental realizada em ratos da linhagem wistar, que não foram identificados prejuízos de atividade global (Dias *et al.*, 2014). Dessa maneira os achados sugerem a exclusão do comprometimento das atividades motoras no modelo estudado. Os resultados do campo aberto também não sugeriram alterações no perfil de ansiedade manifesta, o que globalmente não reflete padrões específicos da espécie estudada nem aponta uma correlação a algum desarranjo psiquiátrico preponderante.

A técnica de ‘marble burying’ não revelou os efeitos de comportamento compulsivo e neofóbicos no nosso estudo em paralelo na literatura pelo uso do metimazol nestas condições experimentais. Entretanto, podemos realizar uma analogia com outros estudos experimentais na esfera de desarranjos sociais. Um exemplo foi a exposição de animais a um potencial de risco farmacológico durante a gestação, com o emprego do ácido valpróico. Neste modelo a prole demonstrou elevação do comportamento repetitivo similar ao manifesto em quadros de TEA (Baronio *et al.*, 2015).

## Discussão

---

Considerando outra proposta comportamental realizada em camundongos a partir da deleção da PTEN – Proteína da via de sinalização intracelular que desempenha papel importante na mediação das anomalias comportamentais elas as relacionadas também ao TEA, quando os animais foram submetidos ao paradigma de 'marble burying' o comportamento de repetição surgiu de forma significativa (Lugo *et al.*, 2014).

Entre os achados mais relevantes deste estudo podemos considerar o teste de labirinto em cruz elevado, nos quais os machos do grupo do metimazol apresentaram uma permanência no braço fechado e redução no centro da arena. Esses comportamentos estão associados com maior índice de ansiedade provocada e podemos atribuir também uma redução para tomadas de decisão à aparente inclinação de redução na parte central.

Outros autores não detectaram de forma sensível a alteração em ansiedade de ratos submetidos à tireoidectomia total com base no comportamento neonatal e perinatal (Pineda-Reynoso *et al.*, 2010). No entanto, quando realizados a mesma abordagem com a linhagem C57BL/6J estudada aqui os achados evidenciam a redução de tempo no braço aberto (Buras *et al.*, 2014).

Considerando os aspectos de termoregulação e bem-estar, avaliados através do paradigma 'nest-building', o comportamento geralmente de primeira resposta do animal ao estresse térmico é realizado através do isolamento térmico com o objetivo de reduzir o calor para o ambiente o que resulta no consumo reduzido de ração e confere redução da energia que está sendo metabolizada através da termogênese (Gaskill *et al.*, 2013). Podemos atribuir déficits na construção dos ninhos nas fêmeas de metimazol e em ambos os sexos de controle negativo. Nossa dificuldade foi na quantificação destes padrões restando uma análise mais subjetiva e qualitativa quanto aos prejuízos de organização na termoregulação.

## Discussão

---

Identificamos em fêmeas uma acentuação do comportamento materno em animais provenientes da prole controle, cujos déficits são evidenciados em fêmeas dos grupos metimazol e controle negativo. Podemos atribuir esse comportamento à redução de interatividade social no aspecto emocional e cuidado parental de forma constante e não-reversível na segunda prole o que sugere efeitos permanentes da fisiologia da gestação ou do contato pós-natal com a própria fêmea uma vez afetada pela disfunção tireoidiana.

Diante dos padrões de agressividade, a manifestação agressiva foi considerada um fenômeno dicotômico, pertencentes a dois sistemas motivacionais diferentes: um representando a autodefesa com a prevenção de ameaças e perigo, e o outro representando pelo planejamento e execução de ataques ativos, sendo a agressão definida em termos neurobiológicos como uma resposta funcional à ameaça real ou hipotética (Moran, Weierstall e Elbert, 2014).

Na prole masculina o teste de residente-intruso que caracteriza a agressividade ofensiva, não houve clara evidência dos achados positivos no decorrer de três semanas de teste. Apenas na primeira semana notamos uma tendência de redução para a latência do ataque nos animais proveniente de mães tratadas com metimazol. Apesar dos achados sugerirem uma diminuição de agressividade geral nos vários aspectos, não houve robustez estatística em nenhuma análise isolada (e.g: latência para ataque, número de ataques, tempo do ataque). Esses achados facilitam a hipótese de que os hormônios tireoidianos têm papel no cérebro e nas regiões que a regulação da serotonina implicada na agressividade pode estar alterada em situações de desarreglos endócrinos.

Finalmente a vocalização ultrassônica, visa compreender os aspectos de comunicabilidade social e emocionalidade. Nessa esfera podemos realizar

## Discussão

---

um paralelo com disfunções sociais mais sutis, como por exemplo, diretamente com TEA em que os pacientes apresentam prejuízo de linguagem (Takahashi, Shiroishi e Koide, 2014).

Sabemos que o comportamento de comunicação em roedores é composto por dois mecanismos de produção de som. 1)comunicação audível, abaixo de 20 kHz que é produzido como a fala humana, quando o ar flui para fora das pregas vocais e ocorre a vibração através das ondas sonoras e 2) acredita-se que os ultrassons são caracterizado quando o ar flui através de um pequeno orifício formando por dobras vocais apertadas produzindo o ultra-sons de freqüências individuais quase puro através de um apito aerodinâmico (Sirotin, Costa e Laplagne, 2014). Enfatizamos que a emissão de vocalização ocorre basicamente em duas grandes situações: 1) filhote diante das mães e 2) machos diante do comportamento sexual com fêmeas.

Com base na segunda hipótese em que ocorre a vocalização no contexto sexual, não observamos uma redução significativa dos animais do grupo metimazol e controle negativo em termos do total de vocalização emitida de 30 à 110 kHz e diante dos padrões vocal podemos especular menor complexidade acústica emitida nos grupos metimazol e controle negativo.

Na literatura, estes achados não são em isolado, pois modelos translacionais no estudo do espectro autista em camundongos com mutação nas proteínas pós-sinápticas PROSAP1/SHANK2:

- 1) Camundongos selvagens mostraram um elevado nível de organização em sequências de vocalização ultrasônicas quando comparados aos mutantes;
- 2) Sequência de vocalização pode estar associadas ao comportamento de corte entre machos e fêmeas;

## Discussão

---

3) Identificação de anormalidades estruturais na vocalização. Os autores ressaltam a necessidade de novas abordagens para testar as sinapses excitatórias a fim de determinar as regiões do cérebro envolvidas neste processo (Ey *et al.*, 2013).

Outros achados corroboram com os nossos resultados de vocalização ultrassônica para dessaranjos sociais, em um modelo proposto em camundongos geneticamente modificados para reelina, que é uma glicoprotéina que regula a migração neuronal durante o neurodesenvolvimento.

Redução completa de sinalização de reelina prejudica a conectividade neuronal e plasticidade sináptica em última instância. Os autores enfatizam que os achados de vocalização com filhotes mostraram uma redução de comunicação no grupo reelina quando comparado ao controle, podendo ser concluído um possível atraso no desenvolvimento emocional/comunicativo nessa linha de animais mutantes (Romano *et al.*, 2013).

Desse modo, alguns dos nossos achados sugerem similaridade do ponto de vista comportamental com as disfunções sociais principais e mais relevantes no TEA: 1) acometimento principal da prole masculina (Lai *et al.*, 2015); 2) afetação de aspectos específicos e induzidos do perfil de ansiedade e emocionalidade (Weiss, 2014); 3) déficits de comunicabilidade (Pan *et al.*, 2015).

## Conclusão

---

- ❖ Acreditamos que este seja o primeiro trabalho demonstrado em camundongos com a utilização com o objetivo de investigar o perfil e efeito do hipotireoidismo na primeira geração (grupo metimazol) e na segunda geração (controle negativo).
  
- ❖ Nossos dados corroboram, em grande parte, com os achados da literatura, apesar de em ambos os sexos evidenciamos alterações pontuais ou específicas do comportamento social, o maior interesse no enfoque por diversos autores é realizar os estudos com machos pelas correlações com TEA.
  
- ❖ Os presentes resultados mostraram que a exposição ao metimazol pré-gestacional ocasionou déficits nos perfis de emocionalidade às custas de aumento do comportamento ansioso provocado e indícios do prejuízo abrangente em comunicação vocal.
  
- ❖ Resta caracterizarmos bioquimicamente o perfil hormonal tireoidiano nas fêmeas durante o tratamento com metimazol e subsequentemente nas etapas de gestacionais e pós-gestacionais. O mesmo procedimento precisa ser realizado e ampliado para a prole em termos de seguimento fino da ação tireoidiana durante seu neurodesenvolvimento.

**Referências**

---

ABDELOUAHAB, N. et al. Maternal and cord-blood thyroid hormone levels and exposure to polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls during early pregnancy. **Am J Epidemiol**, v. 178, n. 5, p. 701-13, Sep 1 2013. ISSN 0002-9262.

ALVES, I. G. et al. Experimental hypothyroidism during pregnancy affects nociception and locomotor performance of offspring in rats. **Eur J Pain**, v. 17, n. 9, p. 1291-8, Oct 2013. ISSN 1090-3801.

AMARAL, D. G.; SCHUMANN, C. M.; NORDAHL, C. W. Neuroanatomy of autism. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 3, p. 137-45, Mar 2008. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236.

ANTONICA, F. et al. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. In: (Ed.). **Nature**. England, v.491, 2012. p.66-71. ISBN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking).

ARRIAGA, G.; JARVIS, E. D. Mouse vocal communication system: are ultrasounds learned or innate? **Brain Lang**, v. 124, n. 1, p. 96-116, Jan 2013. ISSN 1090-2155 (Electronic) 0093-934X (Linking).

BARONIO, D. et al. Effects of an H3R Antagonist on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0116363, 2015. ISSN 1932-6203.

BAYERL, D. S.; KLAMPFL, S. M.; BOSCH, O. J. Central v1b receptor antagonism in lactating rats: impairment of maternal care but not of maternal aggression. **J Neuroendocrinol**, v. 26, n. 12, p. 918-26, Dec 2014. ISSN 0953-8194.

BIANCO, A. C. et al. American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models. **Thyroid**, v. 24, n. 1, p. 88-168, Jan 2014. ISSN 1050-7256.

BRANCHI, I.; SANTUCCI, D.; ALLEVA, E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. In: (Ed.). **Behav Brain Res**. Netherlands, v.125, 2001. p.49-56. ISBN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking).

BROADBENT, J.; GALIC, I.; STOKES, M. A. Validation of autism spectrum quotient adult version in an Australian sample. **Autism Res Treat**, v. 2013, p. 984205, 2013. ISSN 2090-1925 (Print) 2090-1933.

BROOKS, L. R. et al. Maternal behavior in transgenic mice with reduced fibroblast growth factor receptor function in gonadotropin-releasing hormone neurons. **Behav Brain Funct**, v. 8, p. 47, 2012. ISSN 1744-9081.

BROWN, R. S. et al. Developmental regulation of thyrotropin receptor gene expression in the fetal and neonatal rat thyroid: relation to thyroid morphology and to thyroid-specific gene expression. **Endocrinology**, v. 141, n. 1, p. 340-5, Jan 2000. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227.

BURAS, A. et al. Thyroid hormones regulate anxiety in the male mouse. **Horm Behav**, v. 65, n. 2, p. 88-96, Feb 2014. ISSN 0018-506x.

CAROLA, V.; MIRABEAU, O.; GROSS, C. T. Hidden Markov model analysis of maternal behavior patterns in inbred and reciprocal hybrid mice. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e14753, 2011. ISSN 1932-6203.

CATLI, G. et al. Subclinical hypothyroidism in childhood and adolescence. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 27, n. 11-12, p. 1049-57, Nov 2014. ISSN 0334-018x.

CHABOUT, J. et al. Adult male mice emit context-specific ultrasonic vocalizations that are modulated by prior isolation or group rearing environment. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29401, 2012. ISSN 1932-6203.

CHAKER, L. et al. Subclinical thyroid dysfunction and the risk of stroke: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Epidemiol**, v. 29, n. 11, p. 791-800, Nov 2014. ISSN 0393-2990.

CHEVRIER, J. et al. Maternal Thyroid Function during the Second Half of Pregnancy and Child Neurodevelopment at 6, 12, 24, and 60 Months of Age. **J Thyroid Res**, v. 2011, p. 426427, 2011.

COSTA, S. M. D. et al. Hipotireoidismo na gestação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 4, p. 351-358, 2004. ISSN 1519-3829.

DE BOER, S. F. et al. Selective antiaggressive effects of alnespirone in resident-intruder test are mediated via 5-hydroxytryptamine1A receptors: A comparative pharmacological study with 8-hydroxy-2-dipropylaminotetralin, ipsapirone, buspirone, eltoprazine, and WAY-100635. **J Pharmacol Exp Ther**,

v. 288, n. 3, p. 1125-33, Mar 1999. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking).

DE ESCOBAR, G. M.; OBREGON, M. J.; DEL REY, F. E. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 18, n. 2, p. 225-48, Jun 2004. ISSN 1521-690X (Print) 1521-690x.

DEFENSOR, E. B. et al. Facial expressions of mice in aggressive and fearful contexts. **Physiol Behav**, v. 107, n. 5, p. 680-5, Dec 5 2012. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking).

DELANGE, F. et al. Iodine deficiency in the world: where do we stand at the turn of the century? **Thyroid**, v. 11, n. 5, p. 437-47, May 2001. ISSN 1050-7256 (Print) 1050-7256.

DIAS, G. R. et al. Diphenyl diselenide supplemented diet reduces depressive-like behavior in hypothyroid female rats. **Physiol Behav**, v. 124, p. 116-22, Jan 30 2014. ISSN 0031-9384.

EY, E. et al. The Autism ProSAP1/Shank2 mouse model displays quantitative and structural abnormalities in ultrasonic vocalisations. **Behav Brain Res**, v. 256, p. 677-89, Nov 1 2013. ISSN 0166-4328.

FAUSTINO, L. C.; ORTIGA-CARVALHO, T. M. Thyroid hormone role on cerebellar development and maintenance: a perspective based on transgenic mouse models. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 5, p. 75, 2014. ISSN 1664-2392.

FRIESEMA, E. C. et al. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. **Mol Endocrinol**, v. 22, n. 6, p. 1357-69, Jun 2008. ISSN 0888-8809 (Print) 0888-8809.

GASKILL, B. N. et al. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. **J Vis Exp**, n. 82, p. 51012, 2013. ISSN 1940-087x.

GIBBS, K. A.; URBANOWSKI, M. L.; GREENBERG, E. P. Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. **Science**, v. 321, n. 5886, p. 256-9, Jul 11 2008. ISSN 0036-8075.

GILBERT, M. E. et al. An animal model of marginal iodine deficiency during development: the thyroid axis and neurodevelopmental outcome. In: (Ed.). **Toxicol Sci**. United States, v.132, 2013. p.177-95. ISBN 1096-0929 (Electronic) 1096-0929 (Linking).

GRISOM, N. M. et al. Dissociable Deficits of Executive Function Caused by Gestational Adversity are Linked to Specific Transcriptional Changes in the Prefrontal Cortex. **Neuropsychopharmacology**, Nov 24 2014. ISSN 0006-3223.

HAGENBUCH, B.; MEIER, P. J. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. **Biochim Biophys Acta**, v. 1609, n. 1, p. 1-18, Jan 10 2003. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

HASEGAWA, M.; WADA, H. Developmental hypothyroidism disrupts visual signal detection performance in rats. **Physiol Behav**, v. 112-113, p. 90-5, Mar 15 2013. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking).

HEUER, H. et al. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1701-6, Apr 2005. ISSN 0013-7227 (Print) 0013-7227.

HONG, M. Critical domains within the sequence of human organic anion transporting polypeptides. **Curr Drug Metab**, v. 15, n. 3, p. 265-70, Mar 2014. ISSN 1389-2002.

HONG, T.; PANETH, N. Maternal and infant thyroid disorders and cerebral palsy. **Semin Perinatol**, v. 32, n. 6, p. 438-45, Dec 2008. ISSN 0146-0005.

HUO, K. et al. Risk factors for neurodevelopmental deficits in congenital hypothyroidism after early substitution treatment. **Endocr J**, v. 58, n. 5, p. 355-61, 2011. ISSN 0918-8959.

JEREMY WILLSEY, A.; STATE, M. W. Autism spectrum disorders: from genes to neurobiology. **Curr Opin Neurobiol**, v. 30c, p. 92-99, Feb 2015. ISSN 0959-4388.

JOHNSON, A. M.; CIUCCI, M. R.; CONNOR, N. P. Vocal training mitigates age-related changes within the vocal mechanism in old rats. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 68, n. 12, p. 1458-68, Dec 2013. ISSN 1079-5006.

KANNER, L. Autistic disturbances of affective contact. **Acta Paedopsychiatr**, v. 35, n. 4, p. 100-36, 1968. ISSN 0001-6586 (Print) 0001-6586.

KASSEM, N. A. et al. Role of transthyretin in thyroxine transfer from cerebrospinal fluid to brain and choroid plexus. **Am J Physiol Regul Integr**

**Comp Physiol**, v. 291, n. 5, p. R1310-5, Nov 2006. ISSN 0363-6119 (Print)  
0363-6119.

KASTEN-JOLLY, J. et al. Developmental lead effects on behavior and brain gene expression in male and female BALB/cAnNTac mice. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 5, p. 1005-20, Oct 2012. ISSN 1872-9711 (Electronic) 0161-813X (Linking).

KEDIA, S.; CHATTARJI, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. **J Neurosci Methods**, v. 233c, p. 150-154, Jun 14 2014. ISSN 0165-0270.

LAHVIS, G. P.; ALLEVA, E.; SCATTONI, M. L. Translating mouse vocalizations: prosody and frequency modulation. **Genes Brain Behav**, v. 10, n. 1, p. 4-16, Feb 2011. ISSN 1601-183x.

LAI, M. C. et al. Sex/gender differences and autism: setting the scene for future research. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 54, n. 1, p. 11-24, Jan 2015. ISSN 0890-8567.

LUGO, J. N. et al. Deletion of PTEN produces autism-like behavioral deficits and alterations in synaptic proteins. **Front Mol Neurosci**, v. 7, p. 27, 2014. ISSN 1662-5099.

MALLELA, M. K. et al. Evaluation of developmental toxicity of propylthiouracil and methimazole. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 101, n. 4, p. 300-7, Aug 2014. ISSN 1542-9733.

MANDEL, S. J.; COOPER, D. S. The use of antithyroid drugs in pregnancy and lactation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 6, p. 2354-9, Jun 2001. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972x.

MANNA, D.; ROY, G.; MUGESH, G. Antithyroid drugs and their analogues: synthesis, structure, and mechanism of action. **Acc Chem Res**, v. 46, n. 11, p. 2706-15, Nov 19 2013. ISSN 0001-4842.

MAYERL, S. et al. Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. **J Clin Invest**, v. 124, n. 5, p. 1987-99, May 1 2014. ISSN 0021-9738.

MEGREMI, A. S. Is fever a predictive factor in the autism spectrum disorders? **Med Hypotheses**, v. 80, n. 4, p. 391-8, Apr 2013. ISSN 0306-9877.

MESFIN, M.; ASRES, K.; SHIBESHI, W. Evaluation of anxiolytic activity of the essential oil of the aerial part of *Foeniculum vulgare* Miller in mice. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, n. 1, p. 310, Aug 23 2014. ISSN 1472-6882.

MOLES, A. et al. Ultrasonic vocalizations emitted during dyadic interactions in female mice: a possible index of sociability? In: (Ed.). **Behav Brain Res**. Netherlands, v.182, 2007. p.223-30. ISBN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking).

MORAN, J. K.; WEIERSTALL, R.; ELBERT, T. Differences in brain circuitry for appetitive and reactive aggression as revealed by realistic auditory scripts. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 425, 2014. ISSN 1662-5153.

MULLUR, R.; LIU, Y. Y.; BRENT, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. **Physiol Rev**, v. 94, n. 2, p. 355-82, Apr 2014. ISSN 0031-9333.

NARDO, M. et al. Cannabidiol reverses the mCPP-induced increase in marble-burying behavior. **Fundam Clin Pharmacol**, Oct 3 2013. ISSN 0767-3981.

NATHAN, N.; SULLIVAN, S. D. Thyroid disorders during pregnancy. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 43, n. 2, p. 573-97, Jun 2014. ISSN 0889-8529.

NEALE, D. M.; COOTAUZO, A. C.; BURROW, G. Thyroid disease in pregnancy. **Clin Perinatol**, v. 34, n. 4, p. 543-57, v-vi, Dec 2007. ISSN 0095-5108 (Print) 0095-5108.

NEGRO, R.; STAGNARO-GREEN, A. Diagnosis and management of subclinical hypothyroidism in pregnancy. **Bmj**, v. 349, p. g4929, 2014. ISSN 0959-535x.

NGOUNOU WETIE, A. G. et al. A Pilot Proteomic Analysis of Salivary Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. **Autism Res**, Jan 27 2015. ISSN 1939-3806.

NORDAHL, C. W. et al. Brain enlargement is associated with regression in preschool-age boys with autism spectrum disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 50, p. 20195-200, Dec 13 2011. ISSN 0027-8424.

OGAWA, S. et al. Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 4, p. 1476-81, Feb 18 1997. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

OZGUNER, G.; SULAK, O. Size and location of thyroid gland in the fetal period. **Surg Radiol Anat**, v. 36, n. 4, p. 359-67, May 2014. ISSN 0930-1038.

PAN, Y. et al. Association of genetic variants of GRIN2B with autism. **Sci Rep**, v. 5, p. 8296, 2015. ISSN 2045-2322.

PINEDA-REYNOSO, M. et al. Hypothyroidism during neonatal and perinatal period induced by thyroidectomy of the mother causes depressive-like behavior in prepubertal rats. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 6, p. 137-43, 2010. ISSN 1178-2021 (Electronic) 1176-6328 (Linking).

PRASAD, P. D. et al. Human LAT1, a subunit of system L amino acid transporter: molecular cloning and transport function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 255, n. 2, p. 283-8, Feb 16 1999. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

ROBINSON, S.; PENATTI, C. A.; CLARK, A. S. The role of the androgen receptor in anabolic androgenic steroid-induced aggressive behavior in C57BL/6J and Tfm mice. In: (Ed.). **Horm Behav**. United States: 2011 Elsevier Inc, v.61, 2012. p.67-75. ISBN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking).

ROMANO, E. et al. Characterization of neonatal vocal and motor repertoire of reelin mutant mice. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64407, 2013. ISSN 1932-6203.

SCHUMANN, C. M. et al. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. **J Neurosci**, v. 24, n. 28, p. 6392-401, Jul 14 2004. ISSN 0270-6474.

SCHUTKOWSKI, A. et al. Tissue-specific expression of monocarboxylate transporters during fasting in mice. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112118, 2014. ISSN 1932-6203.

SCHWEIZER, U.; KOHRLE, J. Function of thyroid hormone transporters in the central nervous system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 7, p. 3965-73, Jul 2013. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

SIROTIN, Y. B.; COSTA, M. E.; LAPLAGNE, D. A. Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 399, 2014. ISSN 1662-5153.

SKEAFF, S. A. Iodine deficiency in pregnancy: the effect on neurodevelopment in the child. **Nutrients**, v. 3, n. 2, p. 265-73, Feb 2011. ISSN 2072-6643.

SMITH, A. D. Spatial navigation in autism spectrum disorders: a critical review. **Front Psychol**, v. 6, p. 31, 2015. ISSN 1664-1078.

TAKAHASHI, A.; SHIROISHI, T.; KOIDE, T. Genetic mapping of escalated aggression in wild-derived mouse strain MSM/Ms: association with serotonin-related genes. **Front Neurosci**, v. 8, p. 156, 2014. ISSN 1662-4548 (Print) 1662-453x.

TELL, D.; DAVIDSON, D. Emotion recognition from congruent and incongruent emotional expressions and situational cues in children with autism spectrum disorder. **Autism**, May 22 2014. ISSN 1362-3613.

TRUMPFF, C. et al. Mild iodine deficiency in pregnancy in Europe and its consequences for cognitive and psychomotor development of children: a review. **J Trace Elem Med Biol**, v. 27, n. 3, p. 174-83, Jul 2013. ISSN 0946-672x.

VULSMA, T.; GONS, M. H.; DE VIJLDER, J. J. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or

thyroid agenesis. **N Engl J Med**, v. 321, n. 1, p. 13-6, Jul 6 1989. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 322-8, 2007. ISSN 1750-2799.

WANG, Z.; STORM, D. R. Maternal behavior is impaired in female mice lacking type 3 adenylyl cyclase. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 4, p. 772-81, Mar 2011. ISSN 0006-3223.

WEATHINGTON, J. M.; ARNOLD, A. R.; COOKE, B. M. Juvenile social subjugation induces a sex-specific pattern of anxiety and depression-like behaviors in adult rats. In: (Ed.). **Horm Behav**. United States: 2011 Elsevier Inc, v.61, 2012. p.91-9. ISBN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking).

WEISS, J. A. Transdiagnostic Case Conceptualization of Emotional Problems in Youth with ASD: An Emotion Regulation Approach. **Clin Psychol (New York)**, v. 21, n. 4, p. 331-350, Dec 2014. ISSN 0969-5893 (Print) 0969-5893.

WILLIAMS, G. R. Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. In: (Ed.). **J Neuroendocrinol**. England, v.20, 2008. p.784-94. ISBN 1365-2826 (Electronic) 0953-8194 (Linking).

WILLOUGHBY, K. A.; MCANDREWS, M. P.; ROVET, J. Effects of Early Thyroid Hormone Deficiency on Children's Autobiographical Memory Performance. In: (Ed.). **J Int Neuropsychol Soc**. England, v.19, 2013. p.419-29. ISBN 1469-7661 (Electronic) 1355-6177 (Linking).

WITTMANN, G. et al. Parallel regulation of thyroid hormone transporters OATP1c1 and MCT8 during and after endotoxemia at the blood-brain barrier of male rodents. **Endocrinology**, p. en20141830, Jan 16 2015. ISSN 0013-7227.

WU, Y.; DUAN, Z. Social network analysis of international scientific collaboration on psychiatry research. **Int J Ment Health Syst**, v. 9, n. 1, p. 2, 2015. ISSN 1752-4458.

YOUNG, S. N. The neurobiology of human social behaviour: an important but neglected topic. **J Psychiatry Neurosci**, v. 33, n. 5, p. 391-2, Sep 2008. ISSN 1180-4882.

ZOELLER, R. T.; ROVET, J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. **J Neuroendocrinol**, v. 16, n. 10, p. 809-18, Oct 2004. ISSN 0953-8194 (Print) 0953-8194.

## DOS MODELOS ANIMAIS À INVESTIGAÇÃO DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: CORRELAÇÃO COM A FONTE MATERNA?

Carlos Alberto Avellaneda Penatti<sup>1</sup> & Juciara da Costa Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Professor de graduação e pós-graduação em Medicina – UNINOVE – SP - UNINOVE - Campus Vergueiro.

<sup>2</sup> Aluna de Mestrado em Medicina – UNINOVE/SP

Autor para correspondência:  
Carlos Alberto Avellaneda Penatti

E-mail: carlospenatti@uninove.br

Recebido para a publicação: 18/02/2014

ACEITO PARA PUBLICAÇÃO: 24/02/2014

Transtorno do Espectro Autista (TEA) representa um conjunto de perfis amplamente variado cujas etiologias permanecem relativamente obscuras com destaque aos déficits nas interações sociais, comunicação e atribuição comportamental restrita e de repertório. Diante da necessidade em oferecer suporte à comunidade que lida diretamente com TEA, pesquisadores e experimentalistas têm demonstrado promotores exploratórios para desvendar alguns dos mecanismos neurais e fisiopatológicos ainda não estabelecidos. Dentro dessa janela do neurodesenvolvimento infantil, destacam-se os estudos em modelos animais, normalmente indispensáveis para avanços na área médica. Nesta breve revisão crítica, abordaremos dois modelos animais sendo: (I) A infusão de IgG (imunoglobulina) em primatas e (II) a inoculação com endotoxina (LPS) em roedores, ambos durante o período gestacional. Os resultados nos dois estudos têm como destaque o surpreendente comportamento TEA-símile observado na prole. Modelos de experimentação como estes enfatizam a necessidade de uma busca científica continuada, para oferecer o suporte terapêutico e assistencial multidisciplinar.

**Palavras-chave:** Autismo. Neurodesenvolvimento. Gestação. Modelos animais

### RESUMO

Durante a gestação, inúmeras são as expectativas do casal em relação ao processo de desenvolvimento do futuro filho ou filha. Questionamentos e preocupações são extremamente comuns nessa nova fase entre elas: qual a primeira palavra que o bebê irá falar? Com qual idade irá andar? Como será a festa de primeiro aninho? Como será o seu desempenho escolar? Os pais passam por isto com certa ansiedade no contraponto da satisfação das alegrias por vir do nascimento ao progredir de um desenvolvimento saudável de alguém já muito esperado e querido na dinâmica familiar em nova construção. Nem sempre, porém, a criança encontra um desenvolvimento esperado e alguns desarranjos em órgãos e sistemas se tornam evidentes no decorrer do tempo. O ‘timing’ de uma possível disfunção pode ser variável bem como

sua abrangência indefinida num primeiro momento. Em muitas destas situações a palavra *doença* geralmente não cabe, pois esta não descreve fielmente condições particulares do desenvolvimento da criança que talvez sejam passageiras ou modificáveis com intervenções clínica, psicológica, pedagógica e social. Neste consórcio de condições do desenvolvimento infantil, afecções do neurodesenvolvimento como as que compõem o termo “autismo” são desarranjos na esfera cognitiva e de sociabilidade.

Hoje o termo “autismo” tem seu leque de apresentações clínica e psicológica com a nomenclatura Transtorno do Espectro Autista (TEA): um retrato mais pertinente de perfis amplamente variados, cujas etiologias específicas ainda permanecem relativamente obscuras. A proximidade de

## Breve Comunicação

### **Paradigmas comportamentais de experimentação em roedores: em busca do entendimento das interações sociais na ansiedade**

Juciara da Costa Silva<sup>1</sup>, Rodrigo Fernandes de Barros<sup>2</sup> & Carlos Alberto Avellaneda Penatti<sup>3</sup>

1. Aluna de Mestrado em Medicina – UNINOVE – SP; 2. Aluno de Mestrado em Medicina – UNINOVE – SP e 3. Professor de graduação e pós-graduação em Medicina – UNINOVE – SP.

**AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA:** Juciara da Costa Silva – [juciaracsilva@yahoo.com.br](mailto:juciaracsilva@yahoo.com.br)

**DATA RECEBIMENTO:** 10/11/2014

**ACEITO PARA A PUBLICAÇÃO:** 09/03/2015

#### **RESUMO**

Os transtornos de ansiedade (TA) representam importantes alterações psiquiátricas caracterizando-se por: 1) acompanhamento de depressão, 2) a distimia, 3) facilita o abuso e dependência de álcool e drogas, 4) aumenta a incidência de transtornos alimentares e 5) suicídio. Diante da necessidade de avanços e novas abordagens científicas que consolidem a experimentação e a prática médica e/ou assistência de saúde, buscamos alternativas experimentais que possam oferecer suporte para a compreensão e o desenvolvimento de novos tratamentos para o TA. Nesta breve comunicação, abordaremos paradigmas experimentais: I) campo-aberto ou '*open field*', (II) labirinto em cruz elevado ou '*plus-maze*', (III) '*marble burying*', (IV) vocalização