INFLUÊNCIA DA INDUÇÃO DE AUTISMO POR SEPARAÇÃO MATERNA NA EXPLORAÇÃO E ATIVIDADE MOTORA DE CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS

Jose Aurelio De Almeida Martins[1]
Samille De Souza Gonçalves [2]
Camila Lima Da Costa [3]
Raynara Lima De Sousa [4]
Aline Santos Monte[5]

RESUMO

INTRODUÇÃO: O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição de neurodesenvolvimento caracterizada por dificuldades na comunicação social, interesses restritos e comportamentos repetitivos. Os sinais do TEA costumam aparecer na infância, afetando meninos e meninas, embora sejam mais prevalentes nos meninos. Essa diferença de incidência pode afetar o diagnóstico, especialmente quando os sintomas são semelhantes entre os gêneros. No entanto, a escassez de estudos sobre essa diferença de gênero, especialmente no feminino, destaca a necessidade de mais pesquisas. Estudos recentes focam nos endofenótipos, utilizando modelos animais como da Separação Materna (SM) para compreender como o estresse inicial afeta o desenvolvimento emocional e comportamental, além de permitir a avaliação da sociabilidade e dos principais sintomas do TEA. **OBJETIVO:** Este trabalho buscou investigar a influência da separação materna em camundongos fêmeas, avaliando alterações da exploração, atividade motora e comportamento. **METODOLOGIA:** Camundongos da espécie Swiss, de ambos os sexos, foram colocadas para acasalamento. As fêmeas prenhas foram acompanhadas até o dia do parto, denominado Dia Pós-Natal 0 (DPN0). Após o nascimento dos animais, os filhotes foram divididos em dois grupos: controle e SM. A SM aconteceu do 1º ao 14º Dia Pós Natal (DPN), quando os animais eram separados das mães e colocados sozinhos em gaiolas individuais sem maravalha durante 3 h/dia (de 9h às 12h). No DPN 21 todos os animais foram desmamados e separados por sexo formando 2 grupos: Controle fêmeas e SM fêmeas. Para verificar a influência nos comportamentos dos animais, os testes comportamentais relacionados ao autismo foram realizados durante a adolescência (DPN 28): labirinto em Y, campo aberto e rearing. **RESULTADOS:** A separação materna resultou em uma redução significativa na exploração e atividade motora das fêmeas em todos os testes realizados. No campo aberto, o grupo experimental apresentou uma média de 88,10 versus 143,3 no grupo controle. No labirinto em Y, a média foi de 46,76 para o grupo separação materna contra 62,03 no controle, e no rearing, houve uma queda para 2,300 comparado a 8,000 no grupo controle. **CONCLUSÃO:** O método mostrou ter uma influência significativa no comportamento exploratório e motor de camundongos fêmeas. Os resultados fornecem uma base sólida para o uso deste modelo em estudos de desenvolvimento neurológico e comportamento. Além disso, motiva novos estudos com o intuito de avaliar a influência da SM nos diferentes sexos.

Palavras-chave: autismo; separação materna; modelo animal.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Discente, aurelio.martins2017@gmail.com[1]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Discente, samillegoncalves@aluno.unilab.edu.br[2]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Discente, camilalima8133@gmail.com[3]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Discente, naralohany@gmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Docente, alinesmonte@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição de neurodesenvolvimento caracterizada por dificuldades na comunicação social, interesses restritos e comportamentos repetitivos. Classificado como distúrbio neurobiológico, o TEA resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais que influenciam o desenvolvimento cerebral, com o diagnóstico baseado principalmente nos sintomas (Hodges; Fealko; Soares, 2020).

Os sinais do (TEA) costumam aparecer na infância, afetando meninos e meninas, embora sejam mais prevalentes nos meninos. Essa diferença de incidência pode afetar o diagnóstico, especialmente quando os sintomas são semelhantes entre os gêneros (Bambini et al., 2011). Portanto, é essencial investigar o TEA em ambos os sexos para identificar variações nos sinais e melhorar diagnósticos e intervenções, garantindo equidade no tratamento. No entanto, a escassez de estudos sobre essa diferença de gênero, especialmente no feminino, destaca a necessidade de mais pesquisas (Lyrio; Souza; Cardoso, 2024).

Logo, estudos recentes focam nos endofenótipos, características que conectam genética e manifestação clínica do Transtorno do Espectro Autista (TEA), utilizando modelos animais. Em particular, os efeitos da separação materna (SM) em camundongos fêmeas pois ajudam a compreender como o estresse inicial afeta o desenvolvimento emocional e comportamental, além de permitir a avaliação da sociabilidade e dos principais sintomas do TEA (Gomes, 2020).

Após a SM, testes comportamentais são aplicados para identificar aspectos do TEA e avaliar intervenções (Freitas et al., 2024). O Labirinto em Y avalia a memória de trabalho de curto prazo em roedores, onde a escolha de um braço não explorado indica boa memória, enquanto falhas refletem dificuldades de comportamento exploratório (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019). O teste de campo aberto avalia o comportamento e a atividade motora, considerando a distância percorrida, o tempo em áreas sociais e parâmetros como número de levantamentos (rearing), autolimpeza (grooming), tempo em movimento, permanência no centro e frequência de defecações. Esses parâmetros são essenciais para entender a sociabilidade e os desafios de interação no autismo (Gould; Dao; Kovacsics, 2009).

Dessa forma, este estudo não apenas investiga a influência da separação materna em camundongos fêmeas, mas também destaca a relevância dessas descobertas para a prática clínica, visando aprimorar intervenções futuras e ampliar o entendimento sobre as particularidades do TEA.

METODOLOGIA

2.1 Procedimento experimental

Este trabalho é o resultado de uma pesquisa experimental desenvolvida entre os meses de outubro de 2023 a agosto de 2024. A pesquisa aconteceu no biotério da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), cediado no campos dos Palmares, em Acarape-CE. Para o experimento, camundongos machos e fêmeas foram utilizados para fins de reprodução, sendo organizados em hárens em proporção 1 macho para 2 fêmeas. Após a detecção da prenhez das fêmeas, estas eram movidas para gaiolas individuais até que seus filhotes nascessem.

Depois do nascimento, os animais eram divididos em grupos controle e Separação Materna (SM). O grupo SM foi separado de suas mães 3 horas por dia, entre 9h e 12h da manhã, deste o primeiro dia de nascimento (DPN1) até o 14° dia de nascimento (DPN14). O grupo controle permaneceu com suas mães, privados de

ISSN: 2447-6161

qualquer manipulação. Finalizados os 14 dias de SM, os animais ficaram com suas mães até o dia 21, no qual é destinado ao desmame dos filhotes. Os filhotes oriundos da ninhada foram divididos por sexo em gaiolas, reservando apenas as fêmeas para a realização da presente pesquisa. O procedimento foi repetido até que fosse atingido o número de 10 fêmeas para o grupo SM e 10 fêmeas para o grupo controle.

Com o objetivo de avaliar os impactos advindos da metologia desenvolvida do experimento na exploração, atividade motora e comportamento dos animais, foram desenvolvidos diferentes testes com ambos os grupos. Os testes comportamentais foram realizados ao atingirem o 28° dia de nascimento. Sendo realizados os testes de labirinto em Y, campo aberto e rearing.

A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 9.5.0. Os resultados comportamentais foram analisados utilizando o teste de T não pareado. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para $P < 0,05$, com o P-valor ajustado conforme o tipo de teste. A média e o erro padrão da média foram calculados para descrever as diferenças entre os grupos. Vale ressaltar que os experimentos estão respaldados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNILAB.

2.2 Testes comportamentais

No teste de labirinto em Y, os animais foram colocados no centro de um labirinto com 3 braços distintos, enumerados de 1 a 3. Durante 8 minutos as entradas em cada braço foram registradas. As visitas consecutivas a braços diferentes (1, 2, 3) foram contadas como trios para avaliar a alternância espontânea. Para o teste, as entradas repetidas no mesmo braço foram consideradas erradas. A taxa de alternância foi calculada usando a fórmula: (Número de alternâncias / Total de visitas – 2) × 100%, expressando o resultado em percentual.

Para a realização do teste de campo aberto, foi utilizado um aparato em forma de caixa, medindo 47 x 48 x 50 cm, com o piso dividido em 9 quadrantes, pelos quais o animal circulou. Na implementação do procedimento, os animais forma colocados no primeiro quadrante, localizado ao meio. Em seguida, foram analisados os seguintes parâmetros durante 10 minutos: número de cruzamentos entre os quadrados e números de rearings executados pelos animais durante o teste.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise do Labirinto em Y entre fêmeas que passaram por separação materna e fêmeas do grupo controle mostraram uma diferença significativa no comportamento exploratório entre os dois grupos. O grupo de fêmeas controle apresentou uma média de 62,03, enquanto o grupo de fêmeas submetidas à separação materna obteve uma média de 46,76. Essa diferença foi analisada por meio de um teste t não pareado, que revelou um resultado significativo ($P<0,0001$), indicando que a diferença entre os dois grupos é altamente significativa.

Figura 1 – Resultados do teste de labirinto em Y.



C= Controle; SM= Separação Materna.

Fonte: Autoria própria, 2024.

No experimento de campo aberto com camundongos fêmeas, a análise revelou uma diferença altamente significativa entre os grupos ($P<0,0001$), confirmando que o impacto da separação materna no comportamento exploratório é estatisticamente relevante. A média de atividade locomotora no grupo controle foi de 143,3, enquanto no grupo de fêmeas separadas da mãe foi de 88,10, indicando uma redução significativa na exploração e locomoção no grupo experimental.

ISSN: 2447-6161

No experimento de rearing com camundongos fêmeas, que avalia o comportamento exploratório vertical (erguer-se sobre as patas traseiras), foi observada uma diferença significativa entre os grupos, com valor de P igual a 0,0012, indicando que a diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa. As fêmeas controle apresentaram uma média de 8 episódios de rearing, enquanto as fêmeas separadas da mãe mostraram uma média de 2,3, evidenciando uma redução substancial no comportamento exploratório vertical.

Figura 2 – Resultados do teste de campo aberto e rearing.



C= Controle; SM= Separação Materna.

Fonte: Autoria própria, 2024.

Os dados inferem mudanças nos comportamentos de locomoção e redução da exploração dos animais testados, o que corrobora com vários modelos animais utilizados para avaliar o autismo. Resultados similares em outras espécies e contextos, vão de encontro com a teoria de que o estresse provocado pela separação materna pode prejudicar o crescimento comportamental. Ademais, a diminuição na atividade exploratória pode estar relacionada a mudanças na neuroquímica cerebral, como a diminuição dos níveis de dopamina ou serotonina, neurotransmissores associados à motivação e ao comportamento exploratório (Souza, 2023).

Esses resultados corroboram a teoria de que o estresse precoce, como a separação da mãe, pode modificar o comportamento e o desenvolvimento neuropsicológico, estimulando características comuns de TEA. Pesquisas passadas indicaram que animais expostos a esse tipo de estresse precoce apresentaram mudanças em comportamentos sociais e exploratórios, geralmente ligados a problemas de interação e reação ao ambiente, características notadas em modelos de autismo (Gomes, 2020).

Pesquisas anteriores em modelos de separação materna também apontaram uma diminuição considerável no comportamento de rearing, o que está em concordância com os achados deste experimento. O comprometimento do comportamento exploratório vertical pode sugerir déficits em circuitos neurológicos envolvidos na motivação e na resposta a estímulos ambientais, reforçando a relevância da separação materna como um modelo válido para estudar esses transtornos (Árabe, 2021).

Dessa forma, os achados contribuem para a construção de uma a noção sólida de que a separação da mãe não impacta somente a locomoção, mas também comportamentos exploratórios mais complexos. Isso pode trazer consequências significativas para a pesquisa de distúrbios psiquiátricos, particularmente aqueles que envolvem mudanças na motivação e na reação a estímulos do ambiente. A redução significativa indica que medidas destinadas a atenuar os efeitos do estresse precoce em crianças, podem ser fundamentais para evitar mudanças comportamentais mais extensas ao decorrer dos anos.

CONCLUSÕES

Baseado nos achados testes desenvolvidos, a SM mostrou ter uma influência significativa no comportamento exploratório e motor de camundongos fêmeas. Ao serem submetidas ao teste de campo aberto, as fêmeas SM apresentaram uma redução significativa na atividade locomotora em comparação com o grupo controle indicando uma diminuição na exploração do ambiente. No teste de labirinto em Y, foi observada uma queda no desempenho exploratório, com o grupo de separação materna exibindo uma média de 46,76, comparado à média de 62,03 no grupo controle, reforçando a hipótese de que a separação materna afeta negativamente o comportamento exploratório. Por fim, no parâmetro de rearing, o grupo experimental apresentou uma redução acentuada na exploração vertical, com uma média de apenas 2,300, em comparação com 8,000 no grupo controle, evidenciando um menor interesse em explorar o ambiente. Conclui-se, que os resultados fornecem uma base sólida para o uso deste modelo em estudos de desenvolvimento neurológico e

ISSN: 2447-6161

comportamento. Além disso, motiva novos estudos com o intuito de avaliar a influência da SM nos diferentes sexos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) pelo apoio financeiro e à Professora Doutora Aline Santos Monte, pela orientação valiosa e incentivo durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço à equipe do biotério, cujas colaborações foram essenciais para o progresso da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ÁRABE, Laila Blanc. **Efeitos Do Estresse Por Separação Maternal Em Micróglias De Camundongos Machos E Fêmeas**. 2021. 73 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

BAMBINI-JUNIOR, V. et al. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. **Brain Research**, v. 1408, p. 8–16, 23 ago. 2011.

FREITAS, Madna Costa et al. Protocolo Experimental do modelo de indução de Transtorno do Espectro autista por ácido valpróico em roedores para mimetização de sintomas comportamentais. In: **Ciência, Cuidado e Saúde: Contextualizando saberes-volume 2**. Editora Científica Digital, 2024. p. 74-84.

GOMES, J. M. P. **Isolamento neonatal em ratos induz endofenótipos do transtorno do espectro autista com diferenças entre sexos**. 2020. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

GOULD, Todd D.; DAO, David T.; KOVACSICS, Colleen E. The open field test. **Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests**, p. 1-20, 2009

HODGES, Holly; FEALKO, Casey; SOARES, Neelkamal. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. **Translational Pediatrics**, v. 9, S1, p. S55—S65, fev. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.21037/tp.2019.09.09. Acesso em: 3 out. 2024.

KRAEUTER, Ann-Katrin; GUEST, Paul C.; SARNYAI, Zoltán. **The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice**. In: Pre-Clinical Models. Humana Press, New York, NY, 2019. p. 105-111.

LYRIO, Bruna da Silva; MOURÃO, Gabriela Lima Reis; CARDOSO, Rachel da Silva Serejo. Autismo e diversidade de gênero em jovens adultos: Como estereótipos de gênero influenciam no subdiagnóstico. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 9, p. e1313946709, 8 set. 2024. Disponível em: https://doi.org/10.33448/rsd-v13i9.46709. Acesso em: 3 out. 2024.

SOUZA, Regina Andressa Caetano de. **Estresse por separação materna em ratos wistar e programação do comportamento tipo ansioso na fase adulta em ambos os sexos: efeitos de dietas acrescidas com**

ISSN: 2447-6161

diferentes tipos de óleos. 2023. 80 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/Rs, 2023.

ISSN: 2447-6161