AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO, ANSIEDADE E MEMÓRIA DE CAMUNDONGOS MACHOS SUBMETIDOS AO MODELO DE AUTISMO INDUZIDO POR SEPARAÇÃO MATERNA

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

RESUMO

INTRODUÇÃO: O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno neurodesenvolvimental que se caracteriza por déficits de comunicação social, comportamentos estereotipados, interesses restritos e interação social mútua atípica. O transtorno afeta crianças em idade precoce e, apesar de ser observado em ambos os sexos, há uma maior prevalência em indivíduos do sexo masculino. A etiologia do TEA é complexa e multifatorial. Estudos mostraram relação entre doenças gestacionais e o aumento do risco para o TEA, além disso o ambiente pós-natal pode construir gatilhos para o desenvolvimento da doença. Por isso, a Separação Materna (SM) tem sido um dos modelos animais de autismo mais utilizados. **OBJETIVO:** Este estudo buscou analisar e comparar as alterações comportamentais em camundongos machos submetidos ao modelo experimental de autismo por Separação Materna. **METODOLOGIA:** Os animais, exceto o grupo controle, foram submetidos à separação materna do 1º ao 14º Dia Pós Natal (DPN), sendo separados das mães e colocados sozinhos em gaiolas individuais sem maravalha durante 3 h/dia. A fim de avaliar o comportamento exploratório, a locomoção, ansiedade e a memória dos animais, foram realizados os seguintes testes comportamentais relacionados ao autismo durante a infância e adolescência (DPN 28-42): Campo Aberto e Labirinto em Y. Após o último teste comportamental os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical. Os resultados comportamentais foram analisados através do software GraphPad Prism, por meio de teste T não pareado. Valores significativos para todas as análises foram considerados quando $p < 0,05$. **RESULTADOS:** Foi evidenciada uma diferença marcante do número de cruzamentos entre os grupos controle e separação materna ($p = 0.0133$). Com relação ao número de cruzamentos, o grupo de machos controle apresentou uma média de 132,3, enquanto o grupo de machos submetidos à separação materna obteve uma média de 85,60, de modo que o número de cruzamentos foi maior no grupo controle. Na análise dos resultados do teste do labirinto em Y, foram encontradas interações significativas entre os fatores ($p = 0.0145$). Foi identificado, que camundongos machos pertencentes aos grupos separação materna apresentaram um déficit significante na porcentagem de sequências corretas, com uma média de 49,10% em comparação aos controles que tiveram uma média de 60,80. **CONCLUSÃO:** Nesse sentido, sugere-se que este modelo pode ter afetado a memória e a aprendizagem dos camundongos submetidos à experimentação. A locomoção e ansiedade, em contrapartida, não foram diretamente afetadas pelo modelo.

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

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Campus das Auroras, Discente, samillegoncalves@aluno.unilab.edu.br[1]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Campus das Auroras, Discente, aurelio.martins2017@gmail.com[2]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Campus das Auroras, Discente, naralohany@gmail.com[3]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Campus das Auroras, Discente, camilalima8133@gmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Campus das Auroras, Docente, alinesmonte@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é um transtorno neurodesenvolvimental, caracterizado por um déficit de comunicação social, comportamentos estereotipados e repetitivos, interesses restritos e interação social mútua atípica (RELEASES DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS, 2022). O TEA é uma doença de início precoce que, segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 2023), apresenta alta prevalência, pois 1 a cada 160 crianças apresenta este transtorno. A prevalência deste transtorno é quatro vezes maior entre meninos do que entre meninas, e em geral, está associado a outras condições como epilepsia, depressão, ansiedade e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, bem como outros comportamentos desafiadores (SCHOLEY et al., 2022).

Diversos esforços têm sido direcionados para aprofundar o conhecimento sobre a neurobiologia do autismo. Contudo, o uso de modelos humanos ainda apresenta limitações na compreensão dos mecanismos disfuncionais envolvidos na patofisiologia do transtorno. Nesse contexto, os modelos animais são uma alternativa eficaz para aprimorar o entendimento das bases neuroatômicas, moleculares e funcionais afetadas em indivíduos com autismo (MOURA; CAMPOS; CAVALCANTE, 2018.) Pesquisas indicam que animais submetidos a SM exibiram aumento da ansiedade e comportamentos depressivos (ROQUE et al., 2014). Também foram registrados prejuízos no desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e uma diminuição na densidade sináptica no hipocampo, entre outros danos (DORESTE-MENDEZ et al., 2019).

Considerando que a separação materna (SM) é um estresse aplicado nos primeiros estágios da vida, capaz de gerar alterações comportamentais duradouras, diversas pesquisas têm adotado diferentes protocolos desse modelo animal para induzir comportamentos semelhantes aos observados no autismo (GOMES, 2020). Tendo em vista a maior prevalência deste transtorno em machos, este estudo busca investigar a influência da separação materna nas respostas comportamentais de camundongos machos submetidos ao modelo de autismo induzido por esse método, buscando identificar e comparar os déficits comportamentais entre o grupo controle e o grupo separação materna. Deste modo, esse estudo visa, dentro de uma abordagem translacional, induzir ambientalmente endofenótipos relacionados ao Transtorno do Espectro Autista (TEA), utilizando protocolos de separação materna.

METODOLOGIA

2.1. Animais

As atividades experimentais foram desenvolvidas no Biotério da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB. Inicialmente, foram utilizados 9 camundongos, 3 machos e 6 fêmeas, provenientes do Biotério da UNILAB, como matrizes para reprodução e posterior uso de seus filhotes para experimentação. Os animais foram mantidos no Biotério da UNILAB em uma sala com temperatura controlada (23 ± 1º C), com alimentos e água ad libitum e com ciclos claro/escuro de 12/12 horas.

As fêmeas matrizes foram então monitoradas diariamente para detecção da prenhez. As que ficaram prenhes foram então separadas em gaiolas individuais, sendo acompanhadas diariamente até o dia do parto, denominado dia pós-natal 0 (DPN0). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e após ter sido aprovado pelo o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UNILAB.

2.2. Procedimento experimental

Após o nascimento dos animais, os filhotes foram divididos em dois grupos: controle e separação materna. A separação materna ocorreu do 1º ao 14º DPN. Para isso, os animais foram separados das mães e colocados sozinhos em gaiolas individuais sem maravalha, dentro de pequenos potes, mantidos sob o aquecimento de

ISSN: 2447-6161

bolsas térmicas para evitar hipotermia, durante 3 h/dia (de 10h às 13h).

Logo após o período de isolamento diário, os filhotes foram transferidos de volta à gaiola original com suas mães. Após 14 dias de isolamento, os filhotes permaneceram com suas mães continuamente até o desmame no DPN 21. Durante o período em que os animais do Grupo Separação Materna foram privados do contato com a mãe, os animais do Grupo Controle não foram submetidos a qualquer manipulação. Posteriormente, no DPN 21, os animais foram separados por sexo, sendo selecionados apenas os machos, formando 2 grupos: I) Controle machos e II) Separação materna machos, onde cada grupo foi composto por um "n" de 10 animais.

2.3. Testes Comportamentais

Os testes comportamentais relacionados ao autismo, foram realizados durante o período da infância e adolescência (DPN 28-42) de todos os animais, sempre no mesmo horário, entre 10:00 e 16:00. Após o último teste comportamental os animais foram eutanasiados através de deslocamento cervical. Foram realizados dois testes comportamentais: Campo Aberto e Labirinto em Y.

2.3.1. Teste do Campo Aberto

Trata-se de um teste para avaliação do comportamento exploratório e locomoção dos animais estudados. Esse teste foi realizado utilizando um aparato que consiste em uma plataforma em acrílico transparente, de modo que o animal em teste não pudesse fugir. Para facilitar a quantificação da atividade locomotora dos animais, o piso do campo aberto é dividido em nove espaços, por entre os quais o animal circulava. Foi analisado, por 5 minutos, o número de cruzamentos entre os quadrados e a frequência com que o roedor se sustentava apenas sobre as patas traseiras no campo (rearing).

2.3.2. Teste Labirinto em Y

Esse teste foi realizado em um labirinto em forma de Y com três braços plásticos opacos em um ângulo entre si de 120°. Após a introdução no centro do labirinto, era permitido ao animal, explorar livremente os três braços. Ao longo de múltiplas entradas nos braços, o animal deveria mostrar uma tendência para entrar em um braço diferente do que visitou anteriormente. A sequência de entradas era registrada, com o objetivo de calcular a percentagem de alternância. Era considerada uma entrada quando todos os quatro membros do animal estavam dentro do braço.

2.4. Análise Estatística

O "n" total de animais utilizados experimentalmente foi de 21 animais. Foram realizados os testes com todos os animais, totalizando um n de 10 animais no grupo Controle Machos e 11 no grupo Separação Materna Machos. Para a análise estatística dos resultados dos testes comportamentais, foi selecionado um "n" de 10 animais para cada grupo. A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 9.5.0. Os resultados obtidos nos testes comportamentais foram analisados através do teste T não pareado. Valores significativos para todas as análises foram considerados quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teste do Campo Aberto

Esse teste avalia o comportamento exploratório e locomoção dos animais estudados. Conforme mostrado na Figura 1, foi evidenciada uma diferença marcante do número de cruzamentos entre os grupos controle e separação materna ($p = 0.0133$). Com relação ao número de cruzamentos, o grupo de machos controle

ISSN: 2447-6161

apresentou uma média de 132,3, enquanto o grupo de machos submetidos à separação materna obteve uma média de 85,60, de modo que o número de cruzamentos foi maior no grupo controle. Conforme Dutra et al., (2023), comportamentos estereotipados, repetitivos e rígidos são amplamente considerados como características e atributos diagnósticos centrais e definidores do TEA. O número de cruzamentos do teste de campo aberto pode ser usado como uma medida da locomoção basal, bem como um indicador de comportamentos de ansiedade. No estudo desenvolvido por Soztutar et al. (2016), ratos machos e fêmeas que passaram pela separação materna e um estressor posterior mostraram um aumento nos movimentos horizontais em comparação com aqueles em grupos não estressados. Sendo assim, o estresse associado à SM poderia exercer um efeito na locomoção. No presente estudo, todavia, apesar de ter sido identificada uma diferença entre os grupos, tal resultado foi o inverso do esperado, pois os animais do grupo separação materna apresentaram menor locomoção, sugerindo assim que o modelo de indução do autismo por separação materna não impactou nesses comportamentos de ansiedade e resultou em uma menor locomoção.

Outro parâmetro avaliado no teste do campo aberto foi a quantidade de vezes em que o animal realizava o movimento de “rearing”, que consiste no comportamento no qual o animal eleva-se sobre as patas posteriores, permanecendo na posição vertical. Como observado na Figura 1, não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo separação materna, sendo observada uma média de 6,60 movimentos no grupo controle e 11,30 no grupo separação materna. Esse resultado sugere que a separação materna também não afeta o comportamento de rearing.

Figura 1 – Resultado Análise Estatística Teste do Campo Aberto e Rearing.



Fonte: Autoria própria (2024).

3.2. Teste de labirinto em Y

Na análise dos resultados do teste do labirinto em Y, foram encontradas interações significativas entre os fatores ($p = 0.0145$). Foi identificado, que camundongos machos pertencentes aos grupos separação materna apresentaram um déficit significante na porcentagem de sequências corretas, com uma média de 49,10% em comparação aos controles que tiveram uma média de 60,80% (Figura 2). Tal resultado indica que a separação materna tem um efeito significativo no desempenho do labirinto em Y, possivelmente refletindo alterações no comportamento exploratório ou na memória dos animais.

O Transtorno do Espectro Autista é caracterizado pelo início precoce de alterações de memória (Amri et al., 2022). Nessa perspectiva, o estudo de Yin et al. (2021) mostrou que animais com comportamentos semelhantes ao do autismo mostraram uma menor sequência de alternâncias corretas no labirinto em Y quando comparados ao grupo controle. Semelhante a isto, o nosso estudo mostrou que os animais submetidos à separação materna apresentaram uma menor porcentagem de alternâncias corretas quando comparados ao grupo controle, sugerindo que a separação materna impactou na memória e aprendizagem desses camundongos.

Figura 2 – Resultado Análise Estatística Teste do Labirinto em Y.



Fonte: Autoria própria (2024).

CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível observar que o modelo de indução do autismo por separação materna de fato pode ter uma influência relevante no surgimento de comportamentos semelhantes ao do autismo. Com base nas

ISSN: 2447-6161

análises estatísticas realizadas, sugere-se que este modelo pode ter afetado a memória e a aprendizagem dos camundongos submetidos à experimentação. A locomoção e ansiedade, em contrapartida, não foram diretamente afetadas pelo modelo. Esses resultados indicam que o modelo é válido e induz tais comportamentos semelhantes ao autismo em camundongos machos submetidos à separação materna. Tal descoberta é de extrema relevância pois permite a implantação e validação de um modelo animal experimental de autismo realizado em sua totalidade nas dependências da Unilab, servindo como base para que futuras pesquisas com o modelo sejam feitas na Unilab.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa intitulada “Estudo da influência do sexo em camundongos submetidos ao modelo de autismo induzido por Separação Materna” e executada entre 01/09/2023 e 31/08/2024, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic) da Unilab. Agradeço ainda à Professora Doutora Aline Santos Monte, pela orientação e apoio que foram cruciais para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

AL-AMRI, A. H. et al. PDZD8 Disruption Causes Cognitive Impairment in Humans, Mice, and Fruit Flies. Biological Psychiatry, v. 92, n. 4, p. 323–334, 15 ago. 2022.

DORESTE-MENDEZ, R. et al. Effects of Environmental Enrichment in Maternally Separated Rats: Age and Sex-Specific Outcomes. Frontiers in behavioral neuroscience, v. 13, 29 ago. 2019.

DUTRA, M. L. et al. Maternal immune activation induces autism-like behavior and reduces brain-derived neurotrophic factor levels in the hippocampus and offspring cortex of C57BL/6 mice. Neuroscience Letters, v. 793, p. 136974, 10 jan. 2023.

GOMES, J. M. P. Isolamento neonatal em ratos induz endofenótipos do transtorno do espectro autista com diferenças entre sexos. 30 jan. 2020.

MOURA, P. J. DE; CAMPOS, M. L. R.; CAVALCANTI, H. M. Modelos animais no estudo dos Transtornos Invasivos do Desenvolvimento. Cadernos de Pós-Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento, v. 6, n. 1, 16 mar. 2018.

OPAS – Organização Pan- Americana de Saúde – Transtorno do Espectro Autista. 2023. Disponível em: https://www.paho.org/pt/topicos/transtorno-do-espectro-autista. Acesso em: 06 out. 2024.

RELEASES DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS. APA. Disponível em: https://www.psychiatry.org/newsroom/news-releases/apa-releases-diagnostic-and-statistical-manual-of-mental-disorders-fifth-edition-text-revision-dsm-5-tr. Acesso em: 06 out. 2024.

ROQUE, S. et al. The behavioral and immunological impact of maternal separation: A matter of timing. Frontiers in Behavioral Neuroscience, v. 8, n. MAY, p. 192, 22 maio 2014

SCHOLEY, A. et al. Vitamin A Status Is More Commonly Associated With Symptoms and Neurodevelopment in Boys With Autism Spectrum Disorders-A Multicenter Study in China. Frontiers in Nutrition | www.frontiersin.org, v. 1, p. 851980, 2022.

SOZTUTAR, E.; COLAK, E.; ULUPINAR, E. Gender- and anxiety level-dependent effects of perinatal stress exposure on medial prefrontal cortex. Experimental neurology, v. 275 Pt 2, p. 274–284, 1 jan. 2016.

YIN, B. et al. GM1 Reduced the Symptoms of Autism Spectrum Disorder by Suppressing α-Syn Through Activating Autophagy. Journal of molecular neuroscience : MN, v. 73, n. 4–5, p. 287–296, 1 maio 2023a.

ISSN: 2447-6161

ISSN: 2447-6161