

INFLUÊNCIA DO MODELO ANIMAL DE AUTISMO INDUZIDO POR SEPARAÇÃO MATERNA EM CAMUNDONGOS SWISS MACHOS

José Aurelio de Almeida Martins¹

Aline Santos Monte²

Raniere Sales de Souza Santos³

RESUMO

Introdução: O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é um distúrbio neurodesenvolvimental que se caracteriza por problemas na interação social, interesses limitados e comportamentos repetitivos. Os sintomas geralmente se manifestam na infância, atingindo tanto meninos quanto meninas, embora sejam mais comuns nos meninos. Pesquisas recentes se concentram nos endofenótipos, empregando modelos animais como a Separação Materna para entender como o estresse no início da vida impacta o desenvolvimento emocional e comportamental, além de possibilitar a análise da sociabilidade e dos sintomas mais comuns do TEA. **Objetivo:** Este trabalho buscou avaliar comportamento tipo autista em camundongos *Swiss* machos submetidos ao modelo animal de autismo induzido por separação materna. **Metodologia:** Foram colocados para acasalamento camundongos da espécie *Swiss*, de ambos os sexos. As fêmeas em gestação foram monitoradas até o dia do nascimento, conhecido como DPN0. Depois de nascerem, os animais foram divididos em dois grupos: controle e SM A implementação do método ocorreu do primeiro ao décimo quarto DPN período em que a prole era separada de suas mães e colocados em gaiolas individuais sem maravalha por três horas diárias (das 9h às 12h). No 21º, todos os animais foram desmamados e divididos em dois grupos: machos controle e machos separação materna. No 28º DPN fase correspondente a adolescência dos animais, foram conduzidos testes comportamentais relacionados ao autismo nos animais com a finalidade de verificar a influência da metodologia nos animais testados. **Resultados:** A separação materna resultou em uma redução significativa na interação social, a média no grupo controle foi de 58,90, enquanto a do grupo SM foi de -38,20. No labirinto em Y, o grupo SM apresentou menor exploração (média: 50,98) comparado ao controle (média: 61,27), com diferença significativa ($p < 0,0277$), indicando influência da separação materna. No teste de enterramento de esferas, o grupo SM apresentou menor atividade (média: 2,9) em comparação ao controle (média: 6,3), com diferença significativa ($p = 0,0084$). No teste de campo aberto, a separação materna reduziu a locomoção dos animais, evidenciada pela menor média de cruzamentos no grupo SM (82,8) em comparação ao controle (132,3), com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0063$). A separação materna influenciou o comportamento de autolimpeza, com o grupo SM apresentando uma média maior de episódios (3,2) em comparação ao controle (1,7), diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0408$). No comportamento de rearing (levantar as patas traseiras), notou-se uma diferença significativa entre os grupos (P-valor $< 0,0001$), sugerindo um efeito considerável da separação materna sobre essa ação. A média de rearing do grupo controle foi de 6,6 episódios, enquanto a média do grupo SM foi de 1,1 episódios. **Conclusão:** O modelo animal de separação materna foi capaz de induzir sintomas semelhantes (pobreza na interação social, déficit de memória e estereotípias) ao TEA em camundongos machos. 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 comparar a influência da separação materna nos diferentes sexos.

Descritores: Autismo; Separação materna; Camundongo *Swiss*.

ABSTRACT

Introduction: Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by difficulties in social interaction, restricted interests, and repetitive behaviors. Symptoms typically manifest in childhood, affecting both boys and girls, although they are more common in boys. Recent research has focused on endophenotypes, employing animal models such as Maternal Separation to understand how early-life stress impacts emotional and behavioral development, as well as enabling the analysis of sociability and the most common symptoms of ASD. **Objective:** This study aimed to evaluate autism-like behavior in male Swiss mice subjected to the maternal separation-induced autism animal model. **Methodology:** Swiss mice of both sexes were paired for mating. Pregnant females were monitored until the day of birth, known as PND0. After birth, the animals were divided into two groups: control and MS. The implementation of the method occurred from the first to the fourteenth PND, during which the offspring were separated from their mothers and placed in individual cages without bedding for three hours daily (from 9 a.m. to 12 p.m.). On the 21st PND, all animals were weaned and divided into two groups: control males and maternal separation males. On the 28th PND, corresponding to adolescence in mice, behavioral tests related to autism were conducted to assess the influence of the methodology on the tested animals. **Results:** Maternal separation resulted in a significant reduction in social interaction, with the control group averaging 58.90, while the MS group averaged -38.20. In the Y-maze test, the MS group exhibited lower exploration (mean: 50.98) compared to the control group (mean: 61.27), with a significant difference ($p < 0.0277$), indicating the influence of maternal separation. In the marble-burying test, the MS group showed less activity (mean: 2.9) compared to the control group (mean: 6.3), with a significant difference ($p = 0.0084$). In the open-field test, maternal separation reduced locomotion, as evidenced by the lower mean number of crossings in the MS group (82.8) compared to the control group (132.3), with a statistically significant difference ($p = 0.0063$). Maternal separation influenced self-grooming behavior, with the MS group exhibiting a higher mean number of episodes (3.2) compared to the control group (1.7), a statistically significant difference ($p = 0.0408$). Regarding rearing behavior (standing on hind legs), a significant difference was observed between the groups (p -value < 0.0001), suggesting a considerable effect of maternal separation on this action. The control group had a mean of 6.6 rearing episodes, while the MS group had a mean of 1.1 episodes. **Conclusion:** The maternal separation animal model was able to induce symptoms similar to ASD (impaired social interaction, memory deficits, and stereotypies) in male mice. The results provide a solid foundation for using this model in studies on neurological development and behavior. Furthermore, they encourage further studies to compare the influence of maternal separation between sexes.

Keywords: Autism; Maternal separation; Swiss mice.

INTRODUÇÃO

Eugen Bleuler, inicialmente, cunhou o termo "Autismo" para caracterizar o distanciamento da realidade em pacientes com esquizofrenia. Contudo, em 1943, Leo Kanner remodelou a ideia ao analisar um conjunto de crianças com comportamentos parecidos, definindo o diagnóstico de "Autismo Infantil" (Araujo *et al.*, 2023). Desde os anos 70, chegou-se a um acordo sobre a importância de investigar o autismo de maneira separada da esquizofrenia, resultando na formulação de critérios diagnósticos específicos (Oliveira; Souza, 2021).

Em 1980, o Autismo Infantil foi oficialmente reconhecido pelo *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM) III e, atualmente, é categorizado como F84.0 no CID-10, diferenciando-se do Autismo Atípico e da Síndrome de Asperger. A atualização para o DSM-V unificou esses diagnósticos sob o nome de Transtorno do Espectro Autista (TEA), que se caracteriza por problemas na comunicação, interação social e comportamentos repetitivos. Esta classificação também será implementada na CID-11, em vigor desde 2022, com o código 6A02, levando em conta a existência ou não de deficiência intelectual e o comprometimento da linguagem funcional (American Psychiatric Association, 2022).

O transtorno é um tipo comum de distúrbio de desenvolvimento e têm uma grande variedade de apresentações clínicas. O distúrbio impacta os mecanismos cerebrais fundamentais e precoces relacionados à sociabilidade. Como resultado, os padrões normais de desenvolvimento social, cognitivo e de comunicação são afetados (Silva; Brandão; Chapanski, 2021). Evidências mostram a influência de fatores genéticos e ambientais na origem do TEA. Estudos experimentais com gêmeos monozigóticos sugerem que, embora a hereditariedade afete o desenvolvimento do TEA, os fatores ambientais também influenciam a intensidade dos sintomas (Costa *et al.*, 2024).

De acordo com o Centro de controle de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, o número de pessoas acometidas com TEA está aumentando cada vez mais nos últimos anos (Bertaglia, 2022). Partindo desse número, segundo Christensen *et al.* (2016) e Satterstrom *et al.* (2020) há uma prevalência de aproximadamente quatro vezes mais casos de TEA em homens do que em mulheres.

Os períodos pré e pós-natal são fundamentais para o desenvolvimento do sistema nervoso, sendo que eventos traumáticos nas fases iniciais da vida podem causar impactos duradouros nas estruturas neuronais e no comportamento, persistindo até a idade adulta (Neves *et al.*, 2024). Essas adversidades estão associadas à etiologia de diversos transtornos, como depressão, ansiedade, distúrbios neurológicos, transtornos psiquiátricos e doenças

neurodegenerativas. Para investigar os efeitos desses eventos em modelos animais, a Separação Materna (SM) é um modelo amplamente utilizado, caracterizado por separações diárias dos filhotes em relação à mãe nos primeiros dias após o nascimento, permitindo a análise das consequências do estresse neonatal (Napolitano et al., 2022).

A maioria das pesquisas que exploram a Separação Materna (SM) como um modelo para o estudo do autismo é conduzida com ratos, sendo amplamente aceitas para avaliar os efeitos do estresse precoce no neurodesenvolvimento e no comportamento social (Manzini, 2022). Contudo, o uso de camundongos neste cenário ainda é pouco explorado, mesmo sendo de grande importância como modelo experimental. Levando em conta as variações entre essas espécies no desenvolvimento neurológico e na reação ao estresse, pesquisas com camundongos podem oferecer novas visões sobre os impactos da SM no autismo, expandindo o entendimento dos processos envolvidos e permitindo a validação deste modelo em um espectro mais extenso de organismos (Braga *et al.*, 2022).

A expansão dos modelos experimentais utilizados no estudo do autismo é fundamental para aprimorar a compreensão dos mecanismos envolvidos no transtorno. Nesse contexto, o presente estudo buscou avaliar se o modelo animal de autismo induzido por separação materna durante os primeiros dias de vida de camundongos machos foi capaz de promover comportamentos semelhantes ao transtorno.

METODOLOGIA

Tipo de estudo

Este é um estudo experimental conduzido com animais de laboratório, especificamente camundongos *Swiss*, onde o modelo de Separação Materna foi empregado para induzir comportamentos associados ao TEA. Este estudo pré-clínico obedeceu aos protocolos éticos definidos para estudos com animais, assegurando o bem-estar dos animais e a replicabilidade dos resultados.

Foram utilizados critérios de inclusão e exclusão para a escolha dos animais. Incluíram-se camundongos *Swiss* saudáveis, provenientes de ninhadas de tamanho uniforme, assegurando a uniformidade da amostra. Os animais que apresentavam malformações congênitas, indícios de enfermidades ou comportamentos incomuns antes da implementação do protocolo experimental foram eliminados do estudo. Esses critérios tinham como objetivo reduzir variáveis de confusão e garantir a confiabilidade das descobertas.

Desenho experimental

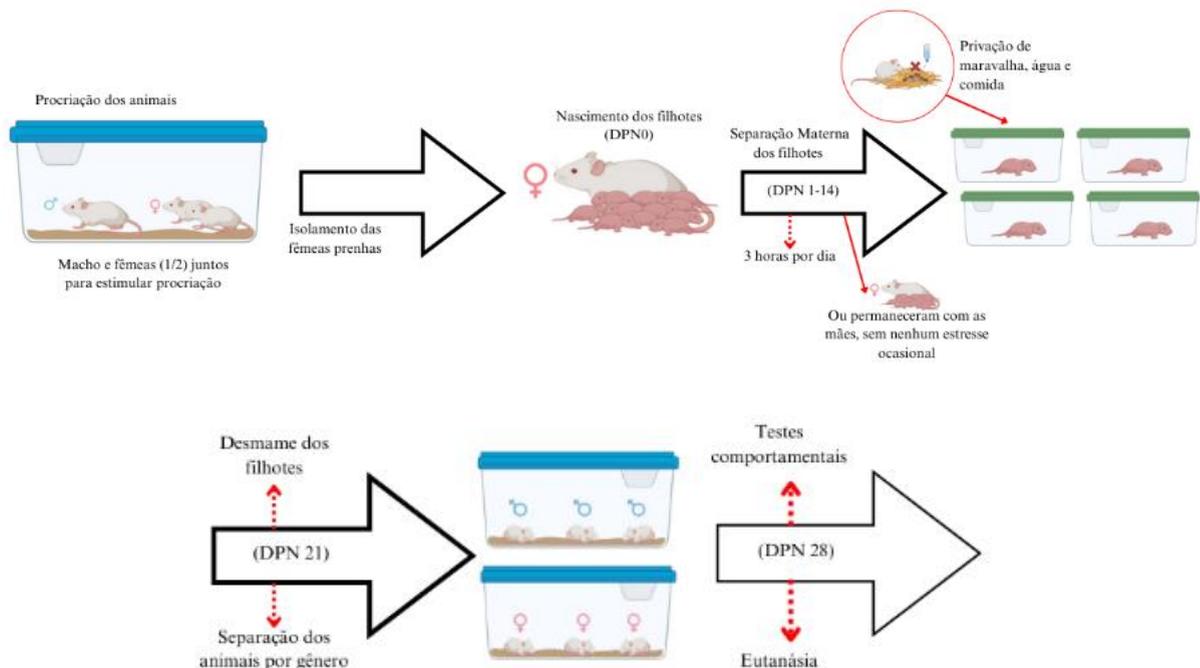
O procedimento foi conduzido nas dependências físicas do biotério da Universidade

da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), instituído no campus dos Palmares em Acarape/Ceará. Para o desenvolvimento do projeto, inicialmente, foram utilizados 6 camundongos, da linhagem Swiss, sendo 2 machos e 4 fêmeas, denominadas matrizes, pois foram destinadas para fins de reprodução e posterior uso dos filhotes para experimentação.

As matrizes foram provenientes do próprio biotério da UNILAB e foram mantidas, durante todo o percurso da pesquisa, em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$), com alimentos e água *ad libitum* e com ciclos claro/escuro de 12/12 horas. As matrizes foram organizadas em gaiolas por “haréns”, onde eram divididas machos e fêmeas, em uma proporção 1/2 respectivamente, com a finalidade de estimular o cruzamento.

Após uma semana com as fêmeas matrizes, os machos foram retirados das gaiolas. Seguido ao procedimento, as fêmeas foram monitoradas diariamente para detecção da prenhez. Aquelas que ficaram prenhas foram separadas em gaiolas individuais. As ratas fêmeas foram acompanhadas diariamente até o dia do parto, denominado Dia Pós-Natal 0 (DPN0). O procedimento experimental seguiu o fluxograma abaixo (figura 1).

Figura 1 – Procedimento experimental.



Fonte: Autoria própria, 2025.

Após o nascimento dos animais, os filhotes foram divididos em dois grupos: controle e SM. A SM ocorreu do 1º ao 14º DPN. Para isso, os animais foram separados das mães e colocados sozinhos em potes de plástico individuais sem maravalha durante 3h/dia (de 9h às 12h) (MANSOURI et al., 2021). Logo após o 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 DPN21.

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. No DPN 21 os animais foram separados por sexo, sendo utilizados para esse estudo, apenas os machos formando 2 grupos: I) Controle machos; II) Separação materna machos; onde cada grupo contém um “n” de 10 animais.

Os testes comportamentais relacionados ao autismo foram realizados durante o período da adolescência no DPN 28, sempre no mesmo horário, entre 10:00 e 16:00. Após o último teste comportamental os animais foram eutanasiados através do método de deslocamento cervical. Durante todo o percurso trabalhado, do nascimento até o desmame, qualquer manipulação nas gaiolas foi feita utilizando-se luvas de procedimento. Acrescentando, após colocar as luvas, o experimentador esfregou suas mãos em maravalha limpa e, em seguida, em maravalha retirada da gaiola da prole a ser manipulada. Isso foi feito com a finalidade de neutralizar odores diferentes daqueles aos quais os animais já estarão submetidos.

Testes comportamentais

Teste de Interação Social

Foi utilizado um aparato que consiste em uma caixa retangular (60 x 40cm) de acrílico dividido em três câmaras iguais, no qual o animal tem acesso às três câmaras por meio de pequenas aberturas (6 x 6 cm) presentes nas divisórias entre as câmaras. Foi então, acrescentado um animal estranho dentro de uma gaiola em uma das câmaras laterais (câmara social) e uma gaiola vazia na outra câmara lateral (câmara oposta). O animal teste pôde percorrer e explorar todas as câmaras por um período de 8 minutos. Após o período determinado, o tempo que o animal passar em cada uma das três câmaras foi cronometrado e a interação social foi definida como: (o tempo gasto na câmara social) – (o tempo gasto na câmara oposta). A preferência social e interação foram definidas como permanecer significativamente mais tempo com o animal estranho (na câmara social) do que na câmara oposta.

Labirinto em Y

Neste aparato, os três braços do labirinto em Y foram divididos em 1, 2 e 3. Os animais foram posicionados no meio do labirinto, logo em seguida foram contabilizados cinco minutos, após isso, as entradas dos camundongos em cada braço foram registradas. Depois de finalizar o tempo do teste, foi realizada a análise das entradas em cada braço, sendo visitas em sucessão aos braços 1, 2 e 3 contadas como um único trio para avaliar o comportamento de alternância espontânea. Quando um animal entrou no primeiro braço após o segundo (por exemplo, 1, 2 e

1) sem mudar, foi interpretado como uma visita falsa. A fórmula para calcular o índice de alternância espontânea no labirinto Y pode ser expressa da seguinte forma: Taxa de Alternância = $(\text{Número de alternâncias} / \text{Total de visitas} - 2) \times 100\%$ (Ukkirapandian et al., 2024).

O número de alternâncias refere-se ao número de vezes que o animal escolhe um braço diferente do anterior na sequência de três visitas consecutivas (por exemplo, 1, 2, 3). O total de visitas representa o número total de entradas nos braços do labirinto, e é subtraído por 2 para descontar o início e o final do teste, onde não há escolha anterior para ser comparada. O resultado é multiplicado por 100 para expressar a taxa de alternância como um percentual.

Teste de enterramento de esferas de vidro

Esse teste foi realizado em uma gaiola convencional, contendo uma “cama” de maravalha com profundidade de 2 cm, sobre a qual foram colocadas 12 esferas de vidro (“bolas de gude”) dispostas em 3 colunas com 4 esferas em cada coluna, espaçadas com 55 mm entre cada uniformemente e equidistantes. Os animais foram colocados na gaiola-teste e deixados durante 10 minutos. Ao final, foi feita a análise anotando quantas esferas tiveram mais de 2/3 de enterramento na maravalha. A quantidade de esferas que o animal enterra sinaliza o grau de estereotipia por meio da demonstração do comportamento repetitivo, compulsivo e persistente em modelos animais. Assim, este teste foi empregado para verificar a ansiedade e comportamentos repetitivos semelhantes comuns no TEA (Njung’e; Handley, 1991).

Teste do Campo Aberto

Foi utilizado um aparato com formato cilíndrico, base em acrílico de 70 cm x 70 cm. Dimensões em cm (A x Ø): 50 x 60. O piso dividido em 12 quadrantes, por entre os quais o animal pôde circular. O animal foi colocado no centro do aparato, em seguida, foram analisados, por 10 minutos, o número de cruzamentos entre os quadrados.

Teste do comportamento repetitivo de autolimpeza (grooming) e rearing

Nesse teste, o animal foi inserido no mesmo aparato do campo aberto, o primeiro minuto do teste foi apenas para habituação. Nos 10 minutos seguintes, foram pontuadas a quantidade de vezes que o animal manifestou o movimento. Além disso, nesse mesmo período de tempo, foram contabilizadas os movimentos denominados de “rearing”. Este refere-se ao ato do animal ficar em pé sobre as patas traseiras, podendo apoiar-se nas paredes da arena ou permanecer sem apoio.

Análise dos dados e aspectos éticos

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 (SEM) foram calculados para descrever as diferenças entre os grupos.

Ressalta-se que 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 com o número de parecer 0777264.

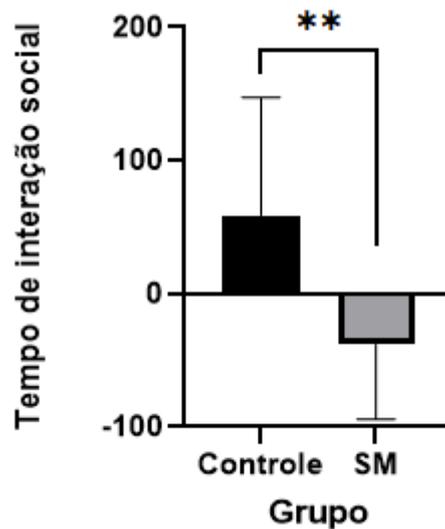
RESULTADOS

Ao analisar os resultados do teste de interação social com camundongos machos, foi observada uma diferença significativa entre os grupos controle e SM ($P < 0,0089$), indicando impacto relevante da separação materna sobre o comportamento social. A média do grupo controle foi de 58,90, enquanto a do grupo SM foi de -38,20, demonstrando uma diminuição significativa na interação social. A discrepância entre as médias ficou em $-97,10 \pm 33,13$, dentro de um intervalo de confiança de 95% que vai de -166,7 a -27,50. Estes achados destacam que a separação materna afetou profundamente os comportamentos sociais nos machos examinados, o resultado pode ser visualizado abaixo, na figura 2.

Uma das características mais significativas do TEA consiste no prejuízo de interação social, que pode ser evidenciado através da dificuldade em participar de atividades de grupo, tendência ao isolamento, desapego afetivo e falta de empatia social (Eslinger *et al.*, 2021). Nesse sentido, o teste de interação social foi empregado para analisar o comportamento e interação social dos animais. Esses resultados estão em conformidade com pesquisas anteriores que apontaram resultados semelhantes ao do estudo (Elnahas *et al.*, 2020; Mattos *et al.*, 2020).

Ademais, estudos apontam que lesões no hipocampo são frequentes em pessoas com TEA e também podem ser observadas em animais submetidos ao Ácido Valpróico (VPA) (Cristiano *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2020). Esta estrutura tem um papel crucial na interpretação da linguagem, semântica, criatividade e na gestão do comportamento emocional. Mudanças no hipocampo podem prejudicar a habilidade dos animais de explorar e interagir socialmente, contribuindo para os déficits identificados (Taleb *et al.*, 2021).

Figura 2 – Teste de interação social



Fonte: Autoria própria, 2025.

No labirinto em Y, constatou-se uma diferença notável entre os grupos controle e SM (P-valor < 0,0277), evidenciando que a separação materna influenciou o comportamento de exploração dos animais. O grupo controle teve uma média de 61,27%, ao passo que o grupo SM teve uma média diminuída de 50,98%. Isso resultou em uma diferença média de $-10,30 \pm 4,297$, com um intervalo de confiança de 95% que varia de -19,32 a -1,268. Tais informações indicam que a separação materna reduz a exploração dos braços do labirinto em Y, sinalizando possíveis mudanças cognitivas ou de ansiedade nos machos (figura 3).

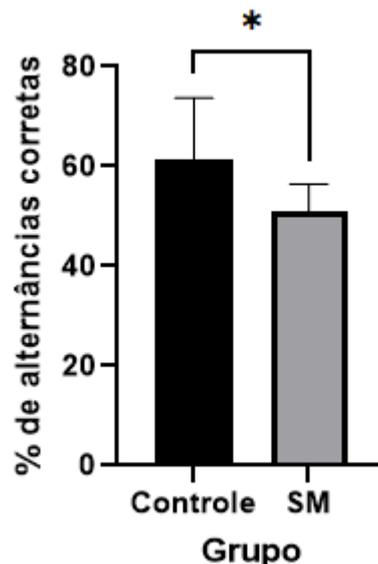
O Córtex Pré-Frontal (CPF) tem uma função crucial em várias facetas do comportamento social em mamíferos, como a motivação social, o reconhecimento e a tomada de decisões. Em seres humanos, a área medial do CPF (mCPF) está ligada a funções sociais mais complexas, como o processamento autorreferencial, a mentalização e o controle emocional. Ademais, problemas no CPF têm sido ligados a vários distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo o Transtorno do Espectro Autista (TEA) (Oliveira *et al.*, 2021).

A diminuição na exploração dos braços do labirinto em Y no grupo SM indica que a separação materna teve um impacto significativo no comportamento de exploração dos animais. Essa mudança pode estar ligada tanto a problemas cognitivos quanto a um crescimento da ansiedade. Isso ocorre porque a relutância em explorar novos ambientes pode indicar uma maior aversão ao risco ou uma menor motivação para explorar (Souza, 2023)

Ademais, a perda materna pode impactar áreas cerebrais responsáveis pela regulação do comportamento exploratório, como o hipocampo e a amígdala, estruturas cruciais para a regulação da memória espacial e da reação ao estresse (Gomes, 2020). Portanto, os achados corroboram a suposição de que o estresse precoce pode provocar mudanças neurobiológicas que

prejudicam a habilidade exploratória dos animais.

Figura 3 – Teste de labirinto em Y.



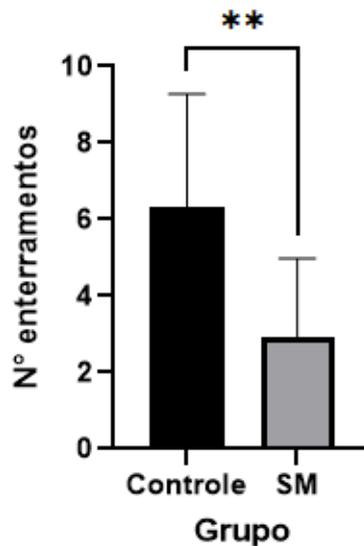
Fonte: Autoria própria, 2025.

No estudo sobre o enterramento de esferas em camundongos machos, observou-se uma diferença estatisticamente relevante entre os grupos controle e SM (P-valor = 0,0084), sugerindo que a separação materna afetou essa conduta. A média do grupo controle foi de 6,3, enquanto a do grupo SM foi de 2,9. Isso gerou uma diferença média de $-3,4 \pm 1,15$. O intervalo de confiança de 95% varia de -5,816 a -0,9842. Estes achados indicam que a separação materna reduziu consideravelmente o comportamento de enterrar esferas, o que pode indicar mudanças nos padrões de ansiedade ou na reação ao ambiente (figura 4).

O ato de enterrar esferas é comumente usado como um sinal de ansiedade ou estresse em modelos animais. Uma diminuição nesse comportamento pode estar ligada a uma maior resistência ao novo ambiente ou a uma possível alteração na reação ao estresse (Viana *et al.*, 2021).

A queda acentuada na média de enterramentos no grupo SM em relação ao controle pode indicar alterações nos processos de regulação emocional ou comportamental dos animais, possivelmente ligadas a transformações no sistema nervoso central, especialmente no hipocampo e na amígdala, áreas envolvidas na reação emocional e no processamento de estímulos ambientais (SOUZA, 2020). Assim, os achados corroboram a noção de que a separação materna pode afetar não só a exploração do ambiente, mas também as reações emocionais e comportamentais dos camundongos. Isso pode sugerir que o estresse precoce afeta a regulação da ansiedade e do comportamento adaptativo.

Figura 4 – Teste de enterramento de esferas.

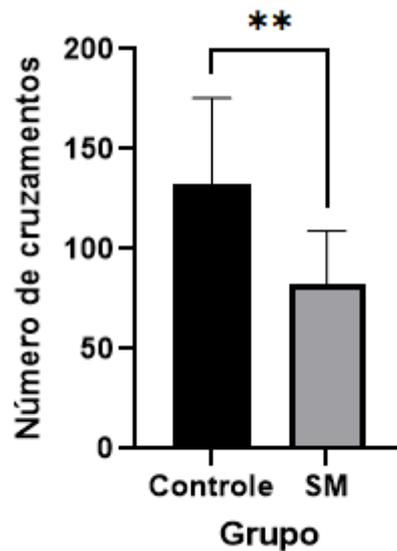


Fonte: Autoria própria, 2025.

No teste de campo aberto (CA), no que tange aos cruzamentos realizados pelos animais, notou-se uma diferença estatisticamente relevante entre os grupos analisados (P -valor = 0,0063), sugerindo que a separação materna impactou a capacidade de locomoção. A média de cruzamentos do grupo controle foi de 132,3 enquanto a do grupo SM foi de 82,80. Isso resultou em uma diferença média de $-49,50 \pm 16,03$, com um intervalo de confiança de 95% variando de -83,17 a -15,83. Essas informações indicam que a separação materna reduziu consideravelmente a atividade motora dos machos no teste de campo aberto (figura 5).

A queda na atividade motora no grupo SM pode estar ligada a mudanças em sistemas neurobiológicos que controlam o comportamento motor, como o sistema dopaminérgico, que desempenha um papel fundamental na modulação da locomoção e da motivação. Ademais, esse comportamento pode ser visto como uma possível evidência de um aumento na ansiedade ou uma redução na motivação para explorar o ambiente, características comumente notadas em modelos animais de estresse inicial (RAZAVI *et al.*, 2025). Assim, esses achados sugerem que a separação materna teve um impacto significativo no comportamento motor e na exploração dos camundongos, oferecendo mais evidências de que o estresse precoce pode influenciar o crescimento comportamental e emocional desses animais (BRUCE *et al.*, 2023).

Figura 5 – Teste de Campo Aberto, parâmetro: cruzamentos.



Fonte: Autoria própria, 2025.

No que diz respeito ao comportamento de autolimpeza, foi perceptível uma diferença estatisticamente relevante entre os grupos (P-valor = 0,0408), sugerindo que a separação materna afetou o comportamento. A média de episódios de autolimpeza do grupo controle foi de 1,7, enquanto a do grupo SM foi de 3,2 episódios, gerando uma diferença média de $1,5 \pm 0,6807$. O intervalo de confiança de 95% varia de 0,06993 a 2,930. Essas informações indicam que a separação da mãe aumentou consideravelmente o comportamento de autolimpeza, possivelmente ligado a padrões de ansiedade ou estresse (figura 6).

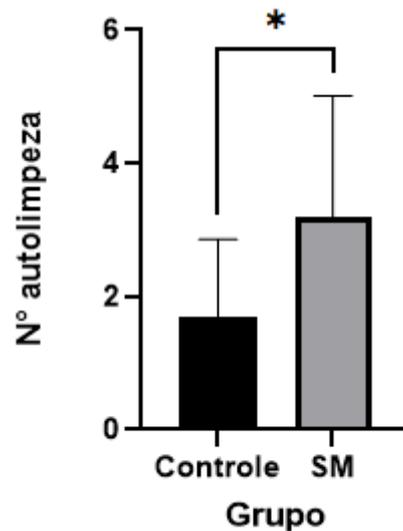
A atividade de autolimpeza, movimento em que o animal lambe as patas anteriores, a barriga e o dorso, é um comportamento natural e demonstra o estado de ansiedade do animal. Sua avaliação teve como objetivo observar a presença de estereotípias e suas repetitividades semelhantes ao de indivíduos humanos com o transtorno (Hirsch et al., 2018). Os animais típicos (não induzidos ao TEA) normalmente friccionam os pelos com as patas anteriores com tempo de duração de segundos. Entre uma autolimpeza e outra deve haver um intervalo maior ou igual a 5 segundos, caso contrário caracteriza sequência do mesmo comportamento de autolimpeza (Cai et al., 2017).

O crescimento no comportamento de autolimpeza no grupo SM pode ser visto como uma reação ao estresse ou à ansiedade, já que comportamentos de autolimpeza intensificados estão comumente ligados a problemas emocionais e mudanças no sistema de regulação do estresse. Pesquisas passadas sugerem que essa atitude pode ser uma estratégia de defesa, comumente vista em modelos de estresse ou ansiedade em animais (KARIMI *et al.*, 2024). Ademais, a separação materna pode ter provocado a ativação de mecanismos neurofisiológicos ligados ao estresse, como a ativação do eixo HPA (hipotálamo-hipófise-adrenal), o que pode ter

influenciado esses comportamentos (Farzan *et al.*, 2023).

Portanto, os achados indicam que o estresse decorrente da separação materna teve um impacto considerável nos comportamentos de autolimpeza, oferecendo mais provas dos impactos psicológicos e comportamentais do estresse inicial.

Figura 6 – Teste de Campo Aberto, parâmetro: Autolimpeza (Grooming).



Fonte: Autoria própria, 2025.

No comportamento de rearing (levantar as patas traseiras), notou-se uma diferença significativa entre os grupos (P -valor $< 0,0001$), sugerindo um efeito considerável da separação materna sobre essa ação. A média de rearing do grupo controle foi de 6,6 episódios, enquanto a média do grupo SM foi de 1,1 episódios. Isso resultou em uma diferença média de $-5,500 \pm 0,8901$, com um intervalo de confiança de 95% que varia de $-7,370$ a $-3,630$. Estes achados sugerem que a separação materna reduziu significativamente o comportamento de rearing nos machos, o que pode indicar uma possível mudança nas respostas emocionais ou motoras, como a diminuição da exploração ou o crescimento da ansiedade (figura 7).

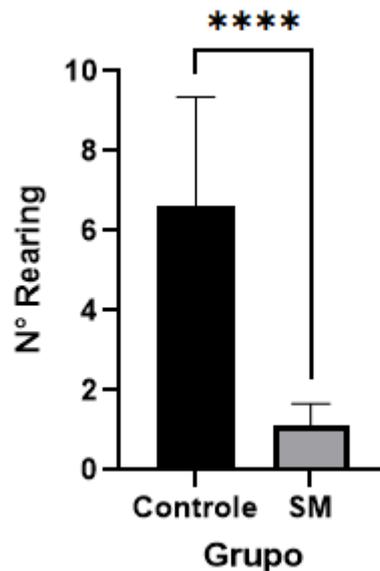
Tal comportamento apresenta papel importante para a exploração nos animais estudados. Dessa forma, foi considerado eficiente com o intuito de buscar informações acerca de outros comportamentos exploratórios.

A diminuição na atividade de rearing no grupo SM pode indicar que a separação materna prejudicou a habilidade dos animais de explorar e interagir com o meio ambiente. Frequentemente, o comportamento de rearing está ligado à exploração e à curiosidade, e a diminuição dessa atitude pode indicar uma diminuição na motivação para explorar ou uma mudança nas reações emocionais. Esta mudança pode ser ligada ao crescimento dos níveis de ansiedade ou à deterioração de circuitos motores e emocionais em decorrência do estresse

provocado pela separação materna (Árabe, 2021).

Adicionalmente, pesquisas prévias sugerem que a redução no comportamento de rearing pode sinalizar mudanças na regulação emocional ou na reação ao estresse, corroborando a suposição de que a separação materna causa um efeito negativo no desenvolvimento comportamental e emocional dos animais (Jolodar *et al.*, 2021). Assim, os resultados indicam que a separação da mãe levou a uma diminuição considerável na exploração do ambiente, possivelmente ligada ao aumento da ansiedade e alterações nas reações emocionais dos animais.

Figura 7 – Teste de Campo Aberto, parâmetro: Rearing.



Fonte: Autoria própria, 2025.

CONCLUSÃO

De acordo com o encontrado após a implementação dos testes comportamentais, O modelo animal de autismo induzido por separação materna foi capaz de promover comportamentos semelhantes ao TEA em camundongos machos. Essa abordagem corrobora para a ampliação das possibilidades de investigação, permitindo uma análise mais abrangente dos efeitos do estresse neonatal sobre o neurodesenvolvimento e o comportamento social da espécie analisada.

Algumas restrições do trabalho envolvem a utilização apenas de camundongos machos, dessa forma, as diferenças entre os sexos não foram analisadas, o que poderia proporcionar um entendimento mais abrangente dos impactos da separação materna. Outra restrição diz respeito à falta de estudos moleculares ou neuroquímicos, limitado pela falta de recursos necessários para análise desses parâmetros na instituição, a implementação desses dados poderia elucidar os processos por trás das mudanças comportamentais notadas.

Conclui-se, que os resultados fornecem uma base sólida para o uso deste modelo em estudos de desenvolvimento neurológico e comportamento utilizando camundongos *Swiss*. Além disso, motiva novos estudos com o intuito de avaliar a influência da SM nos diferentes sexos com a implementação de potenciais agentes farmacológicos ou toxicológicos.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). **Psychiatry.org - APA Releases Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders**. 2022. Disponível em: <https://www.psychiatry.org/News-room/News-Releases/APA-Releases-Diagnostic-and-Statistical-Manual-of>. Acesso em: 1 mar. 2024.

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.

ARAÚJO, Ana Gabriela Rocha. *et al.* Autismo, neurodiversidade e estigma: perspectivas políticas e de inclusão. **Psicologia Escolar e Educacional**, [S.l.], v. 27, p. 1-10, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2175-35392023-247367>.

BERTAGLIA, B. Uma a cada 44 crianças é autista, segundo CDC. 2022. Disponível em: <https://autismoerealidade.org.br/2022/02/04/uma-a-cada-44-criancas-e-autista-segundo-cdc/#:~:text=Em%20mar%C3%A7o%20de%202020%2C%20o%20Centro%20de%20Control>. Acesso em: 22 fev. 2024.

BRAGA, D. S. *et al.* Avaliação e diagnóstico do Transtorno do Espectro Autista - TEA. **Conjecturas**, v. 22, n. 13, p. 846–860, 29 set. 2022.

BRUCE, Matthew R. *et al.* Altered behavior, brain structure, and neurometabolites in a rat model of autism-specific maternal autoantibody exposure. **Molecular Psychiatry**, [S.l.], v. 28, n. 5, p. 2136-2147, 27 mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41380-023-02020-3>.

CAI, Y. *et al.* Autism-like behavior in the BTBR mouse model of autism is improved by propofol. **Neuropharmacology**, v. 118, p. 175–187, 15 maio. 2017.

CHEN, O. *et al.* The early overgrowth theory of autism spectrum disorder: insight into convergent mechanisms from valproic acid exposure and translational models. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, Amsterdam, vol. 173, p. 275-300, 2020.

CHRISTENSEN, Deborah L. *et al.* Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. **Mmwr. Surveillance Summaries**, [S.l.], v. 65, n. 3, p. 1-23, 1 abr. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.ss6503a1>.

COSTA, A. de A. *et al.* Transtorno do espectro do autismo e o uso materno e paterno de medicamentos, tabaco, álcool e drogas ilícitas. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 29, p. 0194, 2

fev. 2024.

CRISTIANO, C. *et al.* Behavioral, anti-inflammatory, and neuroprotective effects of a novel FPR2 agonist in two mouse models of autism. **Pharmaceuticals**, Berne, vol. 15, p. 16-18, 2022.

ELNAHAS, E. M. *et al.* Validation of prenatal versus postnatal valproic acid rat models of autism: a behavioral and neurobiological study. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Amsterdam, v. 108, p. 110185, 2020.

ESLINGER, Paul J. *et al.* The neuroscience of social feelings: mechanisms of adaptive social functioning. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S.l.], v. 128, p. 592-620, set. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.05.028>.

FARZAN, Mahour. *et al.* Protective effects of vanillic acid on autistic-like behaviors in a rat model of maternal separation stress: behavioral, electrophysiological, molecular and histopathological alterations. **International Immunopharmacology**, [S.l.], v. 118, p. 110112, maio. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110112>.

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.

HIRSCH, M. M. *et al.* Behavioral alterations in autism model induced by valproic acid and translational analysis of circulating microRNA. **Food and Chemical Toxicology**, v. 115, p. 336–343, 1 maio. 2018.

JOLODAR, Sedigheh Khanjani. *et al.* Hypericin Ameliorates Maternal Separation-Induced Cognitive Deficits and Hippocampal Inflammation in Rats. **Mini-Reviews In Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 21, n. 9, p. 1144-1149, jun. 2021. Bentham Science Publishers Ltd. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/1389557520666200727154453>.

KARIMI, Parnian *et al.* Umbelliprenin via increase in the MECP2 and attenuation of oxidative stress mitigates the autistic-like behaviors in mouse model of maternal separation stress. **Frontiers In Pharmacology**, [S.l.], v. 14, p. 1-10, 8 jan. 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2023.1300310>.

MANZINI, C. E. **Análise da Expressão de miRNAs em neurônios diferenciados a partir de iPSC in vitro de indivíduos diagnosticados com Transtorno do Espectro Autista (TEA)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/server/api/core/bitstreams/9d251137-9264-4df9-97bb-1fe24f8db792/content>. Acesso em: 9 maio. 2024.

MATTOS, B. S. *et al.* Quercetin prevents alterations of behavioral parameters, delta-aminolevulinic dehydratase activity, and oxidative damage in brain of rats in a prenatal model of autism. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Nova York, vol. 80, p. 287-302, 2020.

MOHAPATRA, Alok Nath *et al.* The role of the prefrontal cortex in social interactions of animal models and the implications for autism spectrum disorder. **Frontiers In Psychiatry**,

[S.l.], v. 14, p. 1-10, 20 jun. 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fpsyt.2023.1205199>.

NAPOLITANO, A. *et al.* Sex Differences in Autism Spectrum Disorder: Diagnostic, Neurobiological, and Behavioral Features. **Frontiers in Psychiatry**, v. 13, 13 maio 2022.

NEVES, Luana Tavares. *et al.* Autismo e seus impactos no desenvolvimento neuropsicomotor. **Revista Foco**, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 4937-4947, 13 maio 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.54751/revistafoco.v17n5-074>.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 38, n. 1, p. 63–67, 1 jan. 1991.

OLIVEIRA, Cecília Rezende de Almeida *et al.* Neurobiologia do autismo infantil. **Research, Society and Development**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 11910111495-11910111500, 4 jan. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11495>.

RAZAVI, Seyedeh Zahra. *et al.* Modulation of neuroinflammation and oxidative stress by Echinacea purpurea extract: therapeutic potential in maternal separation-induced autism spectrum disorder. **Journal Of Psychiatric Research**, [S.l.], v. 184, p. 118-127, abr. 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2025.02.038>.

SATTERSTROM, F. Kyle. *et al.* Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. **Cell**, [S.l.], v. 180, n. 3, p. 568-584, fev. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036>.

SILVA, F. M. DA; BRANDÃO, J. G.; CHAPANSKI, G. O desenvolvimento no transtorno do espectro autista a partir das histórias vividas e a contribuição da família. **In Litteras**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 2021.

SOUZA, Bruno Rezende de. **Efeitos de diferentes protocolos de estresse por separação maternal no comportamento de camundongos juvenis**. 2020. 95 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

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 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.

TALEB, A. *et al.* Emerging mechanisms of valproic acid-induced neurotoxic events in autism and its implications for pharmacological treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdam, vol. 137, 111322, 2021.

UKKIRAPANDIAN, K. *et al.* Behavioral and Biochemical Assays for Autism Models of Wistar Rats. **Cureus**, 10 jan. 2024.

VIANA, Caroline de Oliveira *et al.* Testes comportamentais em roedores para o estudo do transtorno do espectro autista. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, [S.l.], v. 33, n. 2, p. 106-116, 30 jun. 2021. Conselho Federal de Farmácia. DOI: <http://dx.doi.org/10.14450/2318->

9312.v33.e2.a2021.pp106-116.