

## ANÁLISE DO COMPORTAMENTO PRÓ SOCIAL DO TIPO EMPÁTICO NO MODELO ANIMAL DE AUTISMO

Rafael Kazmirczak<sup>1,2,3\*</sup>, Mellanie Fontes-Dutra<sup>1,2,3</sup>, Gustavo Della-Flora Nunes<sup>1,3,5</sup>, Júlio Santos-Terra<sup>1,2,3</sup>, Walquíria Souza-Nunes<sup>1</sup>, Guilherme Bauer-Negrini<sup>1,2,3</sup>, Mauro Mozael Hirsch<sup>1,2,3</sup>, Lily Green<sup>6</sup>, Rudimar dos Santos Riesgo<sup>1,3,4</sup>, Carmem Gottfried<sup>1,2,3</sup>, Victorio Bambini-Júnior<sup>1,3,6</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Estudos Translacionais do Transtorno do Espectro Autista (GETTEA); <sup>2</sup>Laboratório de Plasticidade Neuroglial, Departamento de Bioquímica - UFRGS, Porto Alegre, Brasil; <sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em NeuroImmunomodulação, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; <sup>4</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>5</sup>Departamento de Bioquímica da Universidade de Buffalo, The State University of New York, NY, USA; <sup>6</sup>Faculty of Clinical and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire (UCLan); \*Email : rafael.k.m@hotmail.com

### INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA) é uma desordem do neurodesenvolvimento caracterizada por (a) prejuízos na interação e comunicação social e (b) comportamentos repetitivos e interesses restritos<sup>1</sup>. Muitos aspectos dessa desordem podem ser observados no modelo animal induzido por exposição pré-natal ao ácido valproico (VPA)<sup>2</sup>. Nosso grupo já demonstrou que o resveratrol (RSV), uma molécula antioxidante e anti-inflamatória, é capaz de prevenir tanto déficits sociais no teste três camaras<sup>3</sup>, quanto no teste de interação social recíproca<sup>4</sup> no modelo animal induzido pelo VPA. A empatia é um comportamento complexo que pode ser entendido em humanos como a capacidade de entender e compartilhar o estado emocional de outros, criando uma resposta emocional mais apropriada com a condição do outro. Muitos estudos indicam que indivíduos com TEA possuem déficits no comportamento empático<sup>5</sup>. Estudos recentes mostraram que roedores podem apresentar formas primordiais de empatia ao avaliar testes comportamentais<sup>6</sup>. O desenvolvimento desse novo paradigma possibilitou ao grupo conduzir a primeira investigação do comportamento pró-social do tipo-empático no modelo animal de autismo e o efeito do RSV nos mesmos parâmetros.

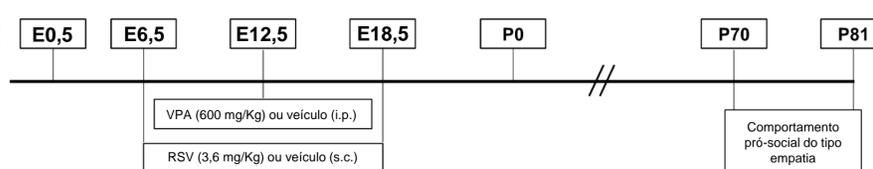
### OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento do tipo empático no modelo animal de autismo induzido pelo ácido valproico (VPA) e o efeito do tratamento pré-natal com resveratrol RSV, que já tinha prevenido déficits sociais nos animais VPA

### METODOLOGIA

Ratas Wistar prenhes (CEUA: 23884) foram tratadas diariamente com RSV (3,6 mg/kg) ou veículo (E6,5-E18,5) e receberam uma dose de VPA (600 mg/kg) ou salina (E12,5), de acordo com a linha do tempo do experimento mostrada ao lado.

O teste comportamental para avaliar a empatia foi precedido por três dias de habituação com o aparato e analisado ao longo de doze consecutivos (P70-P81), com uma hora para cada tentativa por dia. Todas as tentativas foram registradas em vídeo. Todos os parâmetros comportamentais foram analisados utilizando equações de estimativas generalizadas (GEE) e ajustados por ninhada. Comparações entre os grupos foram feitas usando teste de Bonferroni. Todos os dados foram descritos como média ± SEM e os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ . O teste comportamental para análise do comportamento pró-social consiste na avaliação da complacência dos ratos de abrirem o aparato onde há um outro rato aprisionado, adaptado de Bartal *et al*<sup>6</sup>.



Os animais não foram ensinados a abrir o aparato nem recompensados por realizar a tarefa em nenhum momento. Tanto as aberturas quanto a latência foram registradas e os movimentos foram registrados com o uso do software ANYmaze. Os animais foram definidos abridores se fossem capazes de abrir a porta do aparato por pelo menos três dias consecutivos ou abrirem a porta por três grupos de dois dias seguidos. O teste foi considerado finalizado assim que o animal era liberado do aparato.

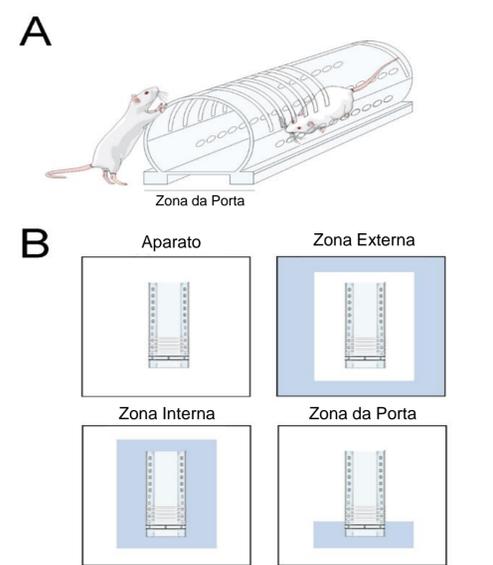


Figura 1. Representação esquemática do aparato do teste (A) e as regiões consideradas nas análises (B). A zona interna foi delimitada para que as bordas estejam exatamente na metade entre a borda da caixa de madeira e do aparato. A zona da porta é uma parte da zona interna que circunda a frente do aparato. O aparato foi construído em acrílico (25 x 8,75 x 7,5 cm; comprimento, largura, altura) e tem uma porta customizada que abre apenas para o lado de fora.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Animais expostos ao VPA demonstraram atraso no primeiro dia de abertura** ( $p=0,001$ ; Figura 2A). Consequentemente, animais dos grupos VPA e RSV+VPA demonstraram tendência à redução no número total de aberturas ( $p=0,056$ ; Figura 2B). Quando os dados foram organizados em grupos de quatro dias, animais expostos ao VPA mostraram uma redução na porcentagem de aberturas nos dias 1 a 4 ( $p=0,009$ ; Figura 2C). Curiosamente, uma vez que os animais abriam o aparato pela primeira vez eles continuaram a abrir na mesma taxa em todos os grupos (Figura 2D). Com o objetivo de entender os padrões comportamentais do comportamento pró-social, nós realizamos duas análises: 1) Primeiro dia de abertura, comparando o comportamento dos animais abridores com irmãos que não abriam o aparato no dia, e 2) Primeiro dia de teste, comparando os que mais tarde tornaram-se abridores com aqueles que não apresentaram esse desfecho.

**A velocidade média dos abridores está aumentada no primeiro dia de abertura e no primeiro dia de teste** ( $p < 0,001$ ; Figura 3A,  $p=0,001$ ; Figura 4A). Levando em consideração as diferentes áreas do aparato, o presente dado revelou que os ratos abridores se movem em uma velocidade média maior na zona da porta ( $p=0,004$ , Figura 3B). Resultados similares foram encontrados também no primeiro dia de teste ( $p=0,009$ , Figura 4B). Abridores e não abridores mostraram mapas de calor similares, que indicam tempo gasto em cada região (Figura 4C), bem como traçados das zonas visitadas pelo animal (Figura 4D) semelhantes.

**Foi encontrada relação positiva entre abrir o aparato no primeiro dia e se tornar um abridor** ( $p=0,008$ ), com risco relativo (Exp (B)) de 7,514. Ainda foi encontrada uma relação positiva entre a velocidade média na zona da porta e se tornar abridor ( $p=0,048$ , Exp (B) = 1,519). Representações ilustrativas das correlações são mostradas nas figuras 4E e 4F. Esse resultado sugere que aprender a liberar o rato preso no primeiro dia de teste impacta na manifestação futura desse comportamento.

**Tratamento pré-natal com RSV não demonstrou efeitos preventivos nos déficits no comportamento do tipo empático nos animais VPA.** Já que o RSV é capaz de prevenir outros déficits sociais no modelo animal de TEA induzido por VPA, é provável que o comportamento pró-social avaliado no nosso teste possa requerir outros substratos neurais, indicando que comportamentos sociais e do tipo empático são distintos.

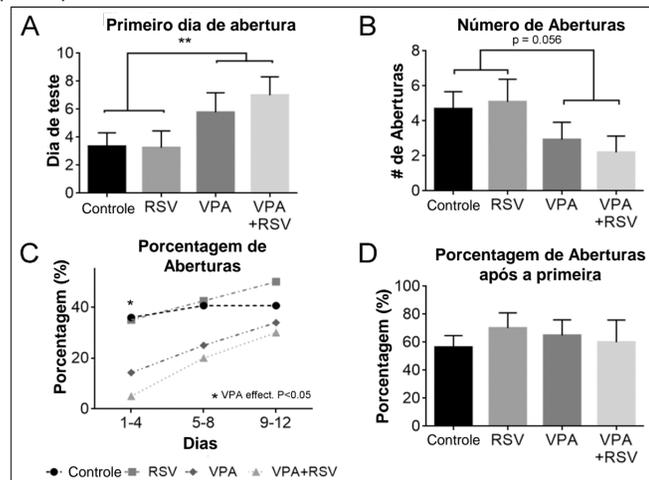


Figura 2. Exposição pré-natal ao VPA atrasa a manifestação do comportamento do tipo empático. (A) Primeiro dia de abertura. (B) Número total de aberturas. (C) Porcentagem de aberturas em dias diferentes. (D) Porcentagem de aberturas após a primeira abertura.

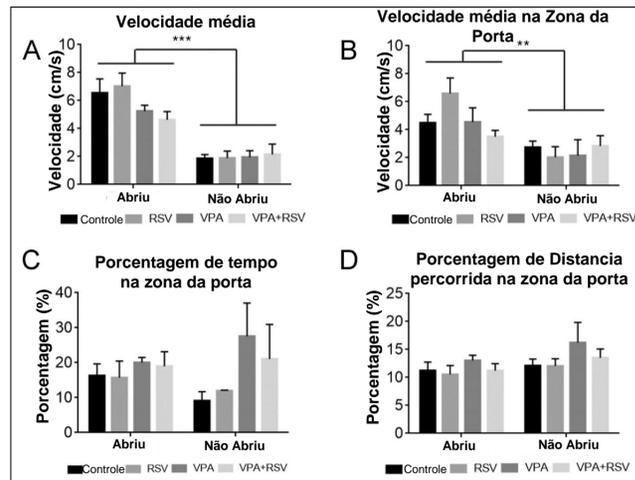


Figura 3. A velocidade dos animais durante o primeiro dia de abertura é maior se comparada aos irmãos que não foram capazes de abrir a porta do aparato. (A) Velocidade média no primeiro dia de abertura (B) Velocidade média no primeiro dia de abertura na zona da porta (C) Porcentagem de tempo gasto na zona da porta no primeiro dia de teste e (D) Porcentagem de distância percorrida na zona da porta no primeiro dia de teste.

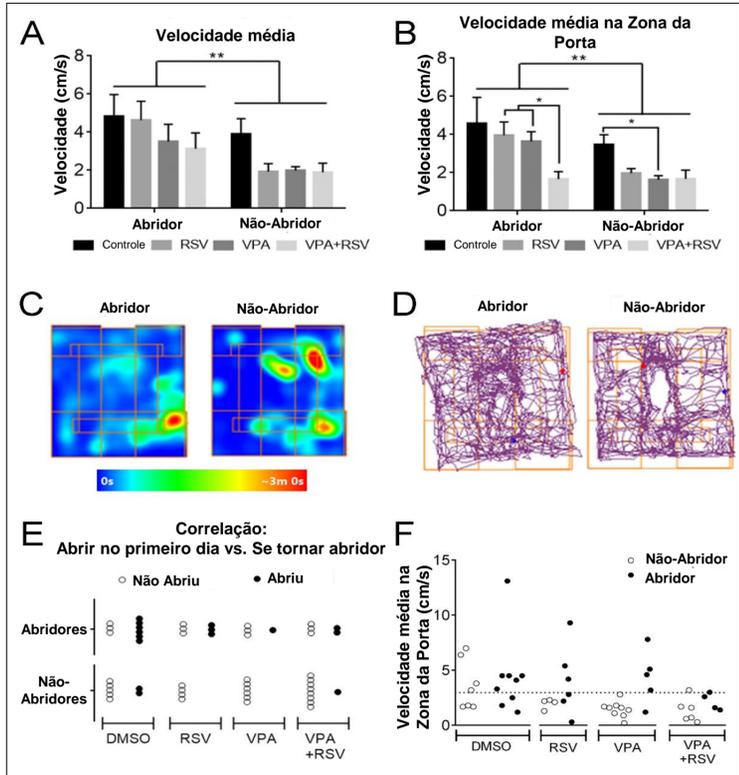


Figura 4. Animais que se tornam abridores se movem mais rápido no primeiro dia de teste do que aqueles que se tornam não-abridores. (A) Abridores e não-abridores apresentam diferença significativa na velocidade média e (B) Maior velocidade na zona da porta no primeiro dia de teste. (C) Mapa de calor representativo e (D) Rastreamento de um animal abridor (VPA) e um não abridor (RSV) durante os primeiros 10 minutos de teste. (E) Existe uma importante correlação entre abrir o aparato no primeiro dia de teste e "se tornar um abridor". Há também uma importante correlação entre a velocidade média na zona da porta no primeiro dia de teste e o destino final (abridor vs não-abridor). (F) A linha tracejada representa a velocidade média dos animais na zona da porta.

### CONCLUSÃO

O presente trabalho mostra, pela primeira vez, que a **exposição pré-natal ao VPA atrasa a manifestação do comportamento pró-social do tipo empático**, mas não afeta a continuidade dessa comportamento, uma vez manifestado. Além disso o desfecho de se tornar abridor está relacionado com a capacidade de abrir o aparato no primeiro dia do teste e maiores velocidades na zona da porta nesse mesmo dia. Mais investigações se fazem necessárias para entender os processos neurais envolvidos nas alterações de empatia nos indivíduos com autismo.

### REFERÊNCIAS

- [1] Bambini-Junior V. et al. 2011, Brain Research. 1408(0):8-16. [2] Schneider, T. et al. 2005, Neuropsychopharmacology. 30, pp. 80-89. [3] Bambini-Junior, V. et al. 2014, Neurosci Lett. 583, 176-181 [4] Hirsch, M. M. et al. 2018, Food Chem Toxicol. 115, 336-343. [5] Baron-Cohen, S. & Wheelwright, S. 2004, Autism Dev Disord. 34, 163-175. [6] Ben-Ami Bartal, I., Decety, J. & Mason, P. 2011, Science. 334, 1427-1430