

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE AMBIENTE VIOLENTO
PRECOCE COM EFEITOS DURADOUROS SOBRE O DESENVOLVIMENTO

Tese de Doutorado

Cláudio Felipe Kolling da Rocha

Porto Alegre
2015

CLÁUDIO FELIPE KOLLING DA ROCHA

CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO ANIMAL DE AMBIENTE VIOLENTO
PRECOCE COM EFEITOS DURADOUROS SOBRE O DESENVOLVIMENTO

Tese apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia como
requisito para obtenção do título de
doutor pela Universidade Federal do
Rio grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Aldo Bolten Lucion

Porto Alegre
2015

Dedico este trabalho a todos aqueles que buscam repostas que visem melhorias na qualidade de vida humana e animal. Dedico também a todos os animais que foram sacrificados com o objetivo de adicionar ao conhecimento humano.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Deborah, minha companheira em todas as horas e em todos os desafios. Agradeço pelo apoio constante, por buscar facilitar o processo de redação da presente tese, mesmo que isso significasse sacrificar seus momentos de descanso. Agradeço pela motivação e por acreditar desde o momento em que esse trabalho era apenas uma ideia.

Agradeço à minha família pelo apoio emocional, pelo ambiente precoce harmônico, pelo cuidado maternal, parental e fraternal que me permitiram ter um bom desenvolvimento cognitivo, emocional e físico.

Agradeço ao meu orientador pelos 10 anos de convivência e por ter acreditado em mim desde o primeiro dia em que conversamos. Por ter me dado desafios que inicialmente pareciam demasiados para um aluno de graduação, mas que me permitiram concluir a pós-graduação com relativa facilidade. Agradeço pela liberdade de pensar e agir com minha própria mente. Liberdade para errar e refazer.

Agradeço aos colegas de laboratório. Em especial ao Bruno, que assumiu comigo a empreitada de tornar o laboratório um lugar melhor e mais adequado a experimentação. À Márcia pelas várias horas de conversa e trabalho pesado na histologia. Ao Wagner, por estar sempre disponível e pronto para trabalhar, cheio de ideias coerente e muitas nem tão coerentes assim. A Silvana, pela ajuda braçal, intelectual e por manter o ambiente de trabalho sempre divertido. Ao Adolfo, pelos seus aparecimentos breves, mas sempre úteis. À Luiza pelo apoio com a parte do processamento dos comportamentos maternos e na rotina do lab.

Agradeço ao Professor Marcelo Grillo pelas inúmeras horas de terapia pelos corredores do ICBS, pelos convites para participar das suas disciplinas e por acreditar em mim como professor.

“Nenhum homem realmente produtivo pensa o tempo todo como se estivesse escrevendo uma dissertação”.

Albert Einstein

APRESENTAÇÃO

A redação de uma tese de doutorado deve atender ao princípio do aprendizado, no momento em que induz o pesquisador em treinamento a uma reflexão final sobre seu processo de doutoramento, mas também deve atender ao princípio do ensino. Durante os primeiros meses de treinamento na pós-graduação, ouvi uma professora comentar em uma banca de defesa de doutorado, que uma tese bem escrita seria aquela que poderia servir de ferramenta educativa para alunos em estágios menos avançados de treinamento. Desde então, essa afirmação ficou marcada e assumi o compromisso de tentar fazer dessa tese uma ferramenta de ensino.

Com o objetivo de honrar tal compromisso, optei por adicionar um anexo a esse documento, relatando todo o trabalho preparatório desenvolvido com o objetivo de minimizar os interferentes e maximizar a qualidade e confiabilidade dos resultados a serem obtidos na fase de experimentação, bem como adequar o ambiente de trabalho e desenvolver as ferramentas e recursos necessários para que o experimento ocorresse com o mínimo de contratempos e o máximo de aproveitamento.

Tive a vantagem e o desafio da autonomia durante todo meu treinamento e sou grato ao meu orientador por essa oportunidade. Pude participar de todas as etapas da criação, manutenção e experimentação de uma nova linha de pesquisa, incluído a busca por recursos financeiros e físicos. Considero essa experiência como essencial na formação do pesquisador que me torno ao concluir essa fase do meu treinamento e, por esse motivo, relato a experiência no referido anexo.

Com essa abordagem, espero inspirar presentes e futuros estudantes a assumir uma postura reflexiva no início de seus treinamentos, associada a uma postura proativa buscando as mudanças necessárias em seu ambiente de trabalho, bem como os recursos físicos e financeiros necessários a execução de seus projetos.

RESUMO

A violência e a agressividade fazem parte integral do comportamento humano. Crianças criadas em ambientes violentos apresentam maior chance de desenvolver psicopatologias como ansiedade e depressão, apresentam menor desempenho escolar e regulação alterada do eixo de resposta ao estresse. Os mecanismos que levam a tais desfechos são complexos e difíceis de estudar em humanos. Até o presente momento, não existem modelos animais especificamente desenvolvidos para estudo do ambiente violento precoce e suas consequências. O presente trabalho objetivou o desenvolvimento e caracterização de um modelo animal para estudo do impacto do ambiente violento precoce sobre o desenvolvimento, com validade de construto, validade de face (aparente) e validade preditiva.

Para tal, utilizamos o estresse social durante a lactação pela inserção de um macho intruso na caixa moradia da fêmea e sua prole por 5 minutos durante o ciclo claro nos dias 3, 5, 7 e 9 de vida pós-natal. Os desfechos avaliados para validade de face foram ansiedade juvenil e adulta, resposta ao estresse e capacidade cognitiva. Os desfechos avaliados para validade preditiva foram os efeitos da variação do

comportamento maternal sobre os desfechos que conferem validade de face ao modelo.

A intervenção com macho intruso teve forte impacto sobre a prole e a genitora. Houve redução do comportamento de amamentação nos 30 minutos após cada intervenção em comparação com ninhadas controles em horário semelhante. As genitoras do grupo violência apresentaram aumento da fração de corticosterona plasmática ligada a proteínas. Filhotes machos do grupo violência apresentaram redução da concentração basal de corticosterona 30-40 minutos após a segunda intervenção, perdurando na idade juvenil e adulta. A intervenção levou ao aumento do comportamento semelhante a ansiedade na idade juvenil em machos e fêmeas. Filhotes machos apresentaram aumento do comportamento semelhante à ansiedade e redução no desempenho cognitivo na idade adulta, além de redução da massa corporal ao longo de toda a vida e resposta exacerbada ao estresse psicológico repetido na idade adulta. Comportamentos maternos tidos como de qualidade (amamentação com dorso arqueado e lambida) foram frequentemente relacionados com proteção contra os efeitos do ambiente violento. Ansiedade da genitora teve correlação direta com os desfechos deletérios sobre os filhotes.

Os desfechos de validação esperados foram confirmados. A Intervenção se mostrou um modelo consistente de ambiente violento precoce, com validade de construto, de face e preditiva.

Palavras-chave: ambiente violento; ambiente neonatal e desenvolvimento da prole; ansiedade juvenil; desenvolvimento cognitivo; modelo animal de violência precoce.

ABSTRACT

Violence and aggressive behavior are part of human society from the beginning. Although there are several public policies for violence control, it is still common and its consequences are present in modern society. Children raised in a violent environment have increased odds of developing psychopathology, like anxiety and depressive behavior, show decreased school performance and poor regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Mechanisms underlying those outcomes are complex and difficult to study in humans. Until present time, there are no animal models developed specifically for the study of early violent environment and its consequences. The aim of the present study was to develop and describe an animal model of early violent environment, with construct validity, face validity and predictive validity.

We choose social stress during lactancy by the insertion of a male intruder in the dams home cage in the presence of its offspring as an intervention. A adult male rat was inserted for 5 minutes in dams home cage on post-natal days 3, 5, 7 and 9, during lights-on period. The outcomes assessed for face validity were Anxiety, stress response and cognitive performance. The outcomes assessed for predictive validity

were maternal care variation and its impact on anxiety, cognitive performance and stress response regulation.

The selected intervention had strong effects on the dams and offspring. Nursing behavior was decreased on the 30 minutes after each intervention. Violent environment dams displayed a shift in plasma corticosterone from the free to the bound fraction. Male pups showed decreased plasma corticosterone 30-40 minutes after the second intruder session, lasting throughout life. Male and female pups had increased juvenile anxiety. Male pups had increased anxiety, decreased cognitive performance and increased response to repeated psychological stress in adulthood. Maternal care quality was frequently associated with reduction better outcomes in the offspring. Maternal anxiety was found to be correlated to deleterious outcomes in the offspring.

The intervention proved to be a consistent model of early violent environment, showing strong construct validity, face validity and predictive validity.

Keywords: exposure to violence; neonatal environment and offspring development; juvenile anxiety; cognitive development; animal model for early violent environment.

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Sigla	Significado
°GL	Graus Gay Lussac
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico ou Corticotrofina
ANOVA	Analysys of Variance (Análise de Variância)
AVP	Arginina-vasopressina
C	Grupo Controle
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
CRF	Fator Liberador de Corticotrofina
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DP	Desvio Padrão
DPN	Dia de Vida Pós-natal
DPP	Dia de Vida Pós-parto
Dur.	Duração

EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Aácido Etilenodiamida Tetracético)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)
EPM	Erro Padrão da Média
F	Símbolo da estatística que testa a razão entre variâncias ou estatística da soma da diferença dos quadrados
Freq.	Frequência
g	Aceleração da Gravidade 9,8m/s ² ou Gramas
H1	Horário de registro de comportamento maternal nos 30 minutos após a retirada do intruso ou equivalente em controles
H2	Horário de registro do comportamento maternal 7h após início do ciclo claro
HCl	Ácido Clorídrico
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IBM	Internacional Business Machina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IQ25	Valor Interquartil 25
IQ75	Valor interquartil 75
L	Litro
LC	<i>Locus coeruleus</i>
M	Média
Md	Mediana
ml	Mililitro

Mn	Mínimo
Mx	Máximo
n	Tamanho amostral
NSO	Núcleo Supra-óptico
ng	Nanograma (1x10 ⁻⁹ gramas)
OMS	Organização Mundial de saúde
p	Nível crítico estatístico
pH	Potencial Hidrogeniônico
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Pacote Estatístico Para as Ciências Sociais)
t	Estatística do teste t de Student ou do teste da menor diferença significativa de Fisher
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
U	Estatística to teste de Wilcoxon-Mann-Whitney
V	Grupo violência
X²	Valor estatístico do teste de quiquadrado.
α - MSH	Hormônio Estimulador de Melanócitos Alfa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Título	Página
Figura 1 - Desenho experimental Experimento 1	36
Figura 2 - Desenho experimental Experimento 2	40
Figura 3 - Desenho experimental Experimento 3	46
Figura 4 – Corticosterona plasmática livre, ligada e total nas genitoras no dia 5 pós-parto	55
Figura 5 – Fração de corticosterona plasmática ligada em relação a total e livre em relação a total em genitoras no dia 5 pós-parto	56
Figura 6 – Prolactina plasmática em genitoras no dia 5 pós-parto	57
Figura 7 – Ocitocina plasmática em genitoras no dia 5 pós-parto	58
Figura 8 – Corticosterona plasmática livre em filhotes aos 5 dias de vida pós-natal	59
Figura 9 – Prolactina plasmática em filhotes aos 5 dias vida pós-natal	60
Figura 10 – Ocitocina plasmática em filhotes de 5 dias de vida pós-natal	61

Figura 11 – Padrão de amamentação com dorso arqueado nos grupos controle e violência	75
Figura 12 – Padrão de amamentação relaxada sobre os filhotes nos grupos controle e violência	76
Figura 13 – Padrão de amamentação em posição supino nos grupos controle e violência	76
Figura 14 – Massa corporal das genitoras nos dias 5 e 22 de vida pós-parto	77
Figura 15 – Corticosterona plasmática basal em filhotes aos 28 dias de vida pós-natal	80
Figura 16 – Latência para sair do braço fechado na primeira tentativa do labirinto em T-Elevado.	89
Figura 17 – Percentual de animais que aprendem a tarefa de labirinto em T-elevado a cada tentativa	90
Figura 18 – Percentual de tempo explorando o novo objeto na tarefa de reconhecimento de objetos para cada animal	91
Figura 19 – Percentual de animais que aprenderam a tarefa de reconhecimento de objetos em cada grupo	92
Figura 20 – Corticosterona plasmática basal em animais do grupo controle e violência	93
Figura 21 –Corticosterona plasmática em animais controles, controles estressados, violência e violência estressados	94
Figura 22 – Curva de ganho de massa corporal no grupo controle e violência	95
Figura 23 – Massa corporal proporcional em filhotes machos	96

Figura 24 – Registro de comportamento maternal no ciclo claro	175
Figura 25 – Registro de comportamento sexual controlado pela fêmea	176

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Título	Página
Quadro 1 – Diluição das amostras para quantificação de corticosterona por ELISA	31
Quadro 2 – Diluição das amostras para quantificação de prolactina por ELISA	32
Quadro 3 – Diluição das amostras para quantificação de ocitocina por ELISA	32
Quadro 4 – Descrição do valor de correlação para cada intervalo de coeficiente.	33
Quadro 5 – Composição das análises por regressão linear múltipla e correlação entre as variáveis independentes e dependentes do experimento 1.	38
Quadro 6 – Composição das análises por regressão linear múltipla e correlação entre as variáveis independentes e dependentes do experimento 2.	44

Quadro 7 – Composição das análises por regressão linear múltipla e correlação entre as variáveis independentes e dependentes do experimento 3.	48
Tabela 1 – Violência doméstica, sexual e outras entre 2009 e 2014 contra a mulher em diferentes locais. Fonte DATASUS.	3
Tabela 2 – Percetual de mulheres vítimas de violência conjugal em diferentes idades.	3
Tabela 3 – Estatística do número de crianças por faixa etária no Brasil de 1970 a 2010 segundo o IBGE	4
Tabela 4 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso nos dias 3 e 5 de vida pós-natal	50
Tabela 5 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso soma de todos os dias	51
Tabela 6 – Comportamento Maternal nos 15 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 3	53
Tabela 7 – Comportamento Maternal nos 15 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 5	53
Tabela 8 – Comportamento Maternal nos 15 minutos posteriores a retirada do macho intruso Total. Soma dos dias de vida pós-natal 3 e 5	54
Tabela 9 – Variáveis correlacionadas à variável fração ligada de corticosterona nas genitoras dos grupos controle e violência, aos 5 dias de vida pós-parto	62
Tabela 10 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de ocitocina nas genitoras dos grupos controle e violência, aos 5 dias de vida pós-parto	62

Tabela 11 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes machos aos 5 dias de vida pós-natal	62
Tabela 12 – Resultados da modelagem por regressão linear Modelo I para a variável dependente níveis plasmáticos de corticosterona dos filhotes machos	63
Tabela 13 – Variáveis correlacionadas à variável fração ligada de corticosterona nas genitoras do grupo violência, aos 5 dias de vida pós-parto	64
Tabela 14 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de ocitocina nas genitoras do grupo violência, aos 5 dias de vida pós-parto	64
Tabela 15 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes machos do grupo violência	64
Tabela 16 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso nos dias 3, 5 de vida pós-natal	65
Tabela 17 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso nos dias 7, 9 de vida pós-natal	66
Tabela 18 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso, soma dos dias 3, 5, 7, 9 de vida pós-natal	66
Tabela 19 – Comportamento Maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 3	68
Tabela 20 – Comportamento Maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 5	69
Tabela 21 – Comportamento Maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 7	69

Tabela 22 – Comportamento Maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 9	70
Tabela 23 – Somatório do Comportamento Maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso, ou equivalente, nos dias de vida pós-natal 3, 5, 7 e 9	70
Tabela 24 – Comportamento Maternal 7 horas após o início do ciclo claro no dia de vida pós-natal 3	71
Tabela 25 – Comportamento Maternal 7 horas após o início do ciclo claro no dia de vida pós-natal 5	72
Tabela 26 – Comportamento Maternal 7 horas após o início do ciclo claro no dia de vida pós-natal 7	72
Tabela 27 – Comportamento Maternal 7 horas após o início do ciclo claro no dia de vida pós-natal 9	73
Tabela 28 – Somatório do Comportamento Maternal 7 horas após o início do ciclo claro nos dias de vida pós-natal 3, 5, 7 e 9	74
Tabela 29 – Somatório do Comportamento Maternal em todos os dias e horários avaliados	75
Tabela 30 – Tempos e frequências de entrada nos braços abertos, fechados e centro do labirinto em cruz elevado em filhotes machos e fêmeas de 29 dias	78
Tabela 31 – Tempos e frequências dos comportamentos exploratórios associados ao labirinto em cruz elevado em filhotes machos e fêmeas de 29 dias	79
Tabela 32 – Variáveis correlacionadas à variável tempo no braço fechado do labirinto em cruz elevado em filhotes machos juvenis, controles e violência	82

Tabela 33 – Variáveis correlacionadas à variável tempo no braço fechado do labirinto em cruz elevado em filhotes fêmeas juvenis, controles e violência	82
Tabela 34 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona em filhotes machos juvenis, controles e violência	83
Tabela 35 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona em filhotes fêmeas juvenis, controles e violência	84
Tabela 36 – Variáveis correlacionadas à variável tempo no braço fechado do labirinto em cruz elevado em filhotes machos juvenis do grupo violência	85
Tabela 37 – Variáveis correlacionadas à variável tempo no braço fechado do labirinto em cruz elevado em filhotes fêmeas juvenis, do grupo violência	86
Tabela 38 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona em filhotes machos juvenis do grupo violência	87
Tabela 39 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona em filhotes fêmeas juvenis do grupo violência	88
Tabela 40 – Variáveis correlacionadas à variável latência para deixar o braço fechado no labirinto em T elevado para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência	97
Tabela 41 – Variáveis correlacionadas à variável número de tentativas para aprender a tarefa labirinto em T elevado para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência	97
Tabela 42 – Variáveis correlacionadas à variável percentual de tempo explorando o novo objeto na tarefa de reconhecimento de objetos para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência	98

Tabela 43 – Variáveis correlacionadas à variável concentração de corticosterona plasmática 24h após última sessão de estresse crônico para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência	99
Tabela 44A – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência	100
Tabela 44B – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência	100
Tabela 45 – Variáveis correlacionadas à variável latência para deixar o braço fechado no labirinto em T elevado para filhotes machos adultos do grupo violência	102
Tabela 46 – Variáveis correlacionadas à variável níveis de corticosterona plasmática 24h após última sessão de estresse crônico para filhotes machos adultos do grupo violência	103
Tabela 47A – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos do grupo violência	104
Tabela 47B – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos do grupo violência	105
Tabela 47C – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos do grupo violência	106

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
APRESENTAÇÃO.....	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VIII
SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XIII
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	XVI
SUMÁRIO.....	XXII
1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	1
1.1 EXPOSIÇÃO À VIOLÊNCIA DOMÉSTICA.....	1

1.1.1.	Epidemiologia	2
1.1.2.	Impacto da sobre o desenvolvimento	4
1.2	MODELOS ANIMAIS DE VARIAÇÃO DO AMBIENTE NEONATAL.....	7
1.2.1.	Período perinatal	7
1.2.2.	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal	9
1.2.3.	Reposta de estresse.....	11
1.2.4.	Período de hiporresponsividade ao estresse.....	11
1.2.5.	Experiências no período neonatal e o desenvolvimento da prole.....	12
1.2.6.	Comportamento agressivo maternal evocado por um macho intruso – construindo o modelo de ambiente violento precoce	14
2.	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1	ANIMAIS.....	23
3.2	QUARENTENA.....	24
3.3	DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL DAS FÊMEAS	24
3.4	CRUZAMENTO	24

3.5	ACOMPANHAMENTO DA GESTAÇÃO.....	25
3.6	ISOLAMENTO DA FÊMEA E PARTO	26
3.7	PADRONIZAÇÃO DAS NINHADAS	26
3.8	TROCAS DE MARAVALHA.....	26
3.9	DESMAME	27
3.10	INTERVENÇÕES	28
3.10.1.	Controle	28
3.10.2.	Macho intruso - ambiente violento.....	28
3.11	REGISTROS COMPORTAMENTAIS	29
3.11.1.	Registro de comportamento agressivo maternal	29
3.11.2.	Registro de comportamento maternal.....	29
3.12	PESAGEM DOS ANIMAIS	29
3.13	COLETA DE AMOSTRAS	30
3.13.1.	Sangue	30
3.13.2.	Separação do plasma.....	30
3.14	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	31
3.14.1.	Corticosterona	31

3.14.2. Prolactina.....	31
3.14.3. Ocitocina.....	32
3.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	32
3.16 EXPERIMENTO PILOTO	34
3.16.1. Teste fêmea intrusa	34
3.16.2. Local de execução do protocolo de macho intruso.....	34
3.17 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DE FILHOTES E GENITORA APÓS A SEGUNDA INTERVENÇÃO.....	35
3.17.1. Grupos experimentais.....	35
3.17.2. Análise de comportamento agressivo maternal	36
3.17.3. Análise de comportamento maternal	36
3.17.4. Dosagens bioquímicas	37
3.17.5. Avaliação das variáveis por correlação	37
3.17.6. Modelagem por regressão linear múltipla.....	37
3.18 EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DOS FILHOTES QUANDO JUVENIS	38
3.18.1. Grupo experimentais	38
3.18.2. Análise de comportamento agressivo maternal	39
3.18.3. Análise de comportamento maternal	41

3.18.4. Massa corporal das genitoras.....	41
3.18.5. Comportamento semelhante à ansiedade	41
3.18.6. Comportamento de locomoção.....	42
3.18.7. Dosagens bioquímicas	43
3.18.8. Análises de correlação	43
3.19 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DOS FILHOTES QUANDO ADULTOS...	44
3.19.1. Grupos e animais.....	44
3.19.2. Avaliação cognitiva	45
3.19.3. Resposta ao estresse repetido	47
3.19.4. Análises de correlação	48
4. RESULTADOS	49
4.1 EXPERIMENTO 1.....	49
4.1.1. Comportamento agressivo maternal.....	49
4.1.2. Comportamento maternal	51
4.1.3. Dosagens bioquímicas - genitora	54
4.1.4. Dosagens bioquímicas - filhotes.....	58
4.1.1. Correlações modelo 1.....	61

4.1.2.	Correlações modelo 2.....	63
4.2	EXPERIMENTO 2.....	65
4.2.1.	Análise de comportamento agressivo-maternal.....	65
4.2.2.	Análise de comportamento maternal	67
4.2.3.	Massa corporal das genitoras nos dias 5 e 21 de vida pós-parto.....	77
4.2.4.	Comportamento semelhante à ansiedade em filhotes juvenis.....	78
4.2.5.	Comportamento de locomoção.....	80
4.2.6.	Dosagens bioquímicas	80
4.2.7.	Correlações modelo 1.....	81
4.2.8.	Correlações modelo 2.....	84
4.3	EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DOS FILHOTES MACHOS QUANDO ADULTOS	89
4.3.1.	Comportamento semelhante a ansiedade	89
4.3.2.	Avaliação cognitiva	89
4.3.3.	Resposta ao estresse repetido	92
4.3.4.	Desenvolvimento corporal	94
4.3.5.	Correlações modelo 1.....	96
4.3.6.	Correlações modelo 2.....	101

5.	DISCUSSÃO	107
5.1	EXPERIMENTO 1.....	107
5.2	EXPERIMENTO 2.....	116
5.3	EXPERIMENTO 3.....	124
6.	CONCLUSÕES.....	137
7.	PERSPECTIVAS	140
	REFERÊNCIAS.....	142
	ANEXO A	165
	ANEXO B	177
	ANEXO C	179

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 EXPOSIÇÃO À VIOLÊNCIA DOMÉSTICA

Atos violentos entre parceiros sexuais e dentro do contexto familiar estão presentes na sociedade humana desde seu início. Embora a violência doméstica seja algo que acompanha a sociedade humana, o seu impacto no desenvolvimento infantil só começou a ser estudado de forma objetiva a partir da década de 60, quando uma série de estudos na área começa a ser publicada (KEMPE *et al.*, 1962; BARTA e SMITH, 1963; CURTIS, 1963; FONTANA *et al.*, 1963; LEIKIN e GUIN, 1963; TELFER *et al.*, 1963; TENBENSEL, 1963; BLOOM, 1964; FONTANA, 1964; GODFREY, 1964; GALDSTON, 1965).

Violência é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como:

A ameaça ou uso efetivo, intencional, de força ou poder físico, contra um indivíduo, grupo ou comunidade, que resulte, ou tenha alto risco de resultar, em lesão, morte, dano psicológico, dano ao desenvolvimento ou privação (OMS, 2014).

A definição de exposição infantil à violência doméstica tem sido discutida, no entanto até o presente momento não existe uma definição padronizada. Embora não haja consenso, a maior parte dos pesquisadores concorda que houve exposição infantil à violência doméstica quando uma criança vê, ouve, está diretamente envolvida ou experiêcia os momentos posteriores ao abuso físico, psicológico ou sexual entre seus cuidadores (EVANS *et al.*, 2008).

Segundo a OMS a violência em si pode ser considerada um problema de saúde pública, visto seu impacto sobre o bem-estar físico e mental dos envolvidos (OMS, 2002). Embora a OMS apresente os maus tratos infantis e a violência contra a mulher como situações distintas em termos de estatística, na prática elas andam juntas (EDLESON, 1999). De acordo com a OMS maus tratos infantis incluem todas as formas de violência física, emocional e sexual exercidas em direção a uma criança, além de negligência e exploração (OMS, 2015).

1.1.1. Epidemiologia

O número real de famílias afetadas pela violência doméstica é difícil de avaliar. No entanto, alguns bancos de dados podem fornecer uma ideia da extensão do problema. Utilizando o banco de dados do Sistema Único de Saúde, DATASUS, buscando estatísticas do atendimento de casos de violência tendo a mulher como vítima, entre os anos de 2009 e 2014, obtemos um total de 480 mil casos, sendo 300 mil ocorridos dentro na própria residência (Tabela 1).

Ano	Total	Residência	Habitação Coletiva	Escola	Local de prática esportiva	Bar ou Similar	Via pública	Comércio/ Serviços
2009	24.135	13.853	118	334	47	313	3.054	243
2010	43.620	26.021	226	636	102	718	6.079	547
2011	70.734	44.314	355	963	187	1.347	9.530	921
2012	108.667	68.006	518	1.609	251	1.786	15.089	1.610
2013	127.428	81.255	678	1.982	282	2.229	17.453	1.732
2014	105.734	67.190	545	1.556	257	1.928	14.927	1.630
Total	480.318	300.639	2.440	7.080	1.126	8.321	66.132	6.683

Tabela 1 – Violência doméstica, sexual e outras entre 2009 e 2014 contra a mulher em diferentes locais. Fonte DATASUS.

Utilizando-se como base o banco de dados da OMS, podemos encontrar que 30% das mulheres entre 15 e 69 anos, em escala global, já foram vítimas de violência doméstica. Considerando as faixas etárias em que há maior probabilidade de se ter filhos ainda criança, encontramos uma taxa média de 33,13% entre 15 e 44 anos (Tabela 2).

Faixa Etária (anos)	Percentual (%)
15-69 (total)	30
15-19	29,4
20-24	31,6
25-29	32,3
30-34	31,1
35-39	36,6
40-44	37,8
45-49	29,2
50-54	25,5
55-59	15,1
60-64	19,6
65-69	22,2

Tabela 2 – Percentual de mulheres vítimas de violência conjugal em diferentes idades – Fonte Organização Mundial de Saúde.

As estatísticas Brasileiras segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que no Brasil, em 2010, havia cerca de 14 milhões de crianças vivas entre 0 e 4 anos, 15 milhões entre 5 a 9 anos e 17 milhões entre 10 e 14 anos (Tabela 3).

Faixa Etária	1970	1980	1991	2000	2010
0 a 4 anos	13.811.806	16.423.700	16.521.114	16.375.728	13.796.159
5 a 9 anos	13.459.508	14.773.741	17.420.159	16.542.327	14.969.375
10 a 14 anos	11.859.119	14.263.322	17.047.159	17.348.067	17.166.761

Tabela 3 – Estatística do número de crianças por faixa etária no Brasil de 1970 a 2010 segundo o IBGE.

Com base nas informações acima, podemos estimar, grosseiramente, que no Brasil temos cerca de 13,5 milhões de crianças sendo expostas ou em risco de serem expostas a um ambiente doméstico violento. Se reduzirmos os efeitos do ambiente violento durante o desenvolvimento infantil apenas aos fatores de longo prazo, termos uma parcela considerável da população sob risco aumentado de desenvolver doenças crônicas como diabetes tipo 2, doença coronariana e síndrome metabólica (GILBERT *et al.*, 2015).

1.1.2. Impacto sobre o desenvolvimento

O interesse pelo impacto da exposição à violência doméstica sobre a criança vem aumentando nos últimos dez anos. Inicialmente a criança era vista como desconectada da disputa entre seus cuidadores, sendo frequentemente rotulada como testemunha silenciosa (MCINTOSH, 2002). No entanto, diversos estudos apontam para uma ligação direta entre a violência doméstica e o abuso infantil (EDLESON, 1999; GUILLE, 2004; CONNELLY *et al.*, 2006). Dessa forma, a criança exposta à violência doméstica não é apenas um expectador, sendo afetado direta e

indiretamente pelo contexto. Apenas observar um de seus cuidadores sofrer abuso físico, moral ou sexual pode ser considerado uma forma de abuso emocional, levando essa criança a ter que racionalizar essa experiência e tentar encontrar formas de escapar do contexto aversivo de um ambiente violento (EVANS *et al.*, 2008; HOLT *et al.*, 2008).

Além da observação direta, alguns autores consideram como exposição à violência doméstica ouvir a discussão entre os cuidadores ou estar envolvido na atmosfera pós disputa, como visualizar danos a estrutura física do ambiente bem como ao corpo físico dos cuidadores (CUNNINGHAM e BAKER, 2004).

Difícilmente os efeitos específicos da exposição à violência doméstica podem ser medidos, uma vez que existe uma forte relação entre violência entre os cuidadores e abuso infantil, seja físico, emocional ou sexual (KELLOGG e MENARD, 2003).

Além do impacto direto da exposição à violência doméstica, alterações da qualidade do cuidado parental oriundo dos efeitos da violência doméstica sobre a mãe podem ter um impacto significativo sobre a criança. Um grande número de evidências apontam para um comprometimento da capacidade de ambos os pais em anteder as necessidades da criança em lares violentos (GERLSMA *et al.*, 1990; LEVENDOSKY e GRAHAM-BERMANN, 2001; MCINTOSH, 2002; BUCHBINDER, 2004; MEZULIS *et al.*, 2006; PEEK-ASA *et al.*, 2007; BENJET *et al.*, 2010; PESONEN *et al.*, 2010; SAMUELSON *et al.*, 2012).

Buscando avaliar o impacto da exposição à violência doméstica sobre o desenvolvimento, independentemente de fatores específicos como natureza do abuso, intensidade, frequência e duração dos eventos violentos, as consequências

mais comumente reportadas se enquadram em três categorias: comportamental e emocional, cognitivo e atitudinal e consequências a longo prazo (EDLESON, 2004).

Os desfechos comportamentais mais comuns estão relacionados com a externalização – agressividade, violação de regras e impulsividade – ou internalização – ansiedade, depressão e oscilações de humor. Os desfechos cognitivos são mais comumente evidenciados como dificuldades de aprendizado e de socialização na escola. A longo prazo as consequências estão associadas com depressão, baixa autoestima, abuso de substâncias (EDLESON *et al.*, 2007) e risco aumentado para o desenvolvimento de doenças crônicas (GILBERT *et al.*, 2015).

Embora o número de estudos abordando os efeitos do ambiente violento sobre o desenvolvimento psíquico, físico e cognitivo da criança venha aumentando, pouco se sabe sobre os mecanismos que levam a tais efeitos (CARPENTER e STACKS, 2009). É de comum acordo entre os autores que o estudo da exposição à violência doméstica apresenta muitos desafios (LEVENDOSKY e GRAHAM-BERMANN, 2001; MCINTOSH, 2002; KELLOGG e MENARD, 2003; CUNNINGHAM e BAKER, 2004; CONNELLY *et al.*, 2006; EDLESON *et al.*, 2007; EVANS *et al.*, 2008; CARPENTER e STACKS, 2009; GILBERT *et al.*, 2015). Dentre as principais dificuldades estão a ausência de uma definição padrão de exposição a violência (EVANS *et al.*, 2008), a imprecisão e falta de padronização dos instrumentos de avaliação (EDLESON *et al.*, 2007), a associação da intensidade da exposição com os desfechos (EDLESON *et al.*, 2008) e a falta de informação sobre os mecanismos que levam aos desfechos (CARPENTER e STACKS, 2009). Todos são desafios comuns de quando se trabalha com amostras humanas. Até o momento não existem modelos animais desenvolvidos com o objetivo específico de se avaliar o efeito do ambiente violento sobre o

desenvolvimento da criança. Os modelos normalmente utilizados estão relacionados com modelos de variação do ambiente perinatal, mais comumente modelos de estresse perinatal de diferentes origens (CARPENTER e STACKS, 2009).

1.2 MODELOS ANIMAIS DE VARIAÇÃO DO AMBIENTE NEONATAL

Uma série de modelos animais tem sido utilizados com o objetivo de se avaliar os efeitos das variações do período perinatal sobre o desenvolvimento da prole. Baseados principalmente em roedores – ratos, camundongos e voles – com alguns modelos em primatas não humanos, exploram as características peculiares desse momento determinante para o desenvolvimento dos mamíferos (MACRI e WURBEL, 2007; MACRI *et al.*, 2011).

1.2.1. Período perinatal

Ao longo do processo evolutivo alguns grupos de animais, em especial aves e mamíferos, desenvolveram estratégias de sobrevivência complementares e alternativas à estratégia vigente de procriar em grandes números e curtíssimos espaços de tempo, assumindo novas razões energia gasta/sucesso reprodutivo (KLUG e BONSALL, 2014). As proles são relativamente menores do que as de outros animais, no entanto, o emprego do cuidado parental funciona como uma forma adicional de garantir a sobrevivência do indivíduo e o sucesso da espécie (ALONSO-ALVAREZ e VELANDO, 2012) . Os ratos e humanos estão entre os principais exemplos, uma vez que são animais altriciais: nascem com sistemas motor pouco ativo (apresentam relativa imobilidade) e sensorial pouco desenvolvido (baixa audição e visão) dependendo do cuidado parental para obter alimento e regular a temperatura corporal (TEODOROV *et al.*, 2010; LOMANOWSKA e MELO, 2015).

O período de tempo que circunda o nascimento, compreendendo gestação e lactação, é chamado de período perinatal, variando muito sua duração entre diferentes espécies, estando bem caracterizados em ratos (FERREIRA *et al.*, 2015). Constitui um período crítico no qual as experiências vividas pelo animal irão influenciar de forma definitiva seu desenvolvimento e suas características morfofisiológicas e comportamentais quando jovem e adulto (RAINEKI *et al.*, 2009).

O período perinatal pode ser dividido em duas partes: pré-natal, que se refere ao período gestacional, ou anterior ao nascimento; e o período neonatal, dias iniciais pós-nascimento em que há lactação. As intervenções de interesse para o presente trabalho são aquelas ocorridas no período neonatal, em que o animal se encontra sob os cuidados da genitora.

O cuidado parental é essencial durante o período neonatal, sendo que as experiências vividas pelos genitores podem alterar o cuidado para com a prole, funcionando como uma via de informação do contexto externo para os filhotes (MACRI e WURBEL, 2007; MOLES *et al.*, 2008). As alterações do cuidado parental por sua vez induzem a alterações significativas no desenvolvimento do filhote, como uma tentativa de preparar o animal para o ambiente no qual ele irá viver. A adaptação desse animal, no entanto, dependerá de fatores como o ambiente continuar o mesmo que o encontrado durante o desenvolvimento e do organismo desse animal ter interpretado corretamente as dicas passadas através do cuidado parental (LIU *et al.*, 1997; WURBEL, 2001; MACRI *et al.*, 2011).

Durante o período neonatal, o filhote apresenta uma biologia diferenciada, sendo esta o substrato sobre o qual irão atuar possíveis intervenções, gerando

modificações a longo prazo. Como citado anteriormente, ratos são animais altriciais: capacidade de locomoção extremamente reduzida, audição ineficiente, olhos fechados e sistema nervoso imaturo, sendo o tato, o olfato e as vocalizações as principais formas de interação com o mundo (TEODOROV *et al.*, 2010; LOMANOWSKA e MELO, 2015). Uma característica marcante da fisiologia do neonato é a hiporresponsividade ao estresse, traduzida por uma resposta inexistente ou atenuada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) a estímulos normalmente considerados estressores para animais jovens e adultos (LEVINE, 1957; LEVINE, 1962; LEVINE, 2001).

1.2.2. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

O hipotálamo é o regulador central do sistema endócrino. As informações do estado homeostático da periferia juntamente com informações emocionais oriundas do sistema nervoso central são projetadas para os núcleos hipotalâmicos. Em resposta a alterações na homeostase e no estado emocional do animal, o hipotálamo secreta neuromônios para os dois lobos da hipófise (MOLINA, 2012; MCEWEN *et al.*, 2015).

De forma geral, o hipotálamo coordena a manutenção da homeostase através de eixos de comunicação hipotálamo-hipófise-glândula alvo. Os eixos são compostos pelos neurônios de um ou mais núcleos hipotalâmicos em comunicação com a hipófise que, por sua vez, responde com a liberação ou inibição da liberação de hormônios que medeiam a comunicação com a glândula alvo (CINGOLANI e HOUSSAY, 2004).

No contexto do eixo HHA e da resposta a um evento estressor a comunicação se dá com o lobo anterior da hipófise, através da secreção do fator liberador de

corticotrofina (CRF) na circulação porta-hipofisária pelos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo. Em resposta, a hipófise libera na corrente sanguínea o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula o córtex das glândulas suprarrenais a produzirem glicocorticoides. A produção de glicocorticóides se dá de forma autorregulada: por serem lipofílicos atravessam facilmente a barreira hematoencefálica se ligando a receptores intracelulares em estruturas centrais (hipocampo e o próprio hipotálamo), inibindo a liberação de CRF e ACTH. Por serem hormônios multifuncionais e com diferentes ações quando liberados de forma aguda ou crônica, a regulação fina do eixo HHA é essencial para manutenção da homeostase e da resposta adaptativa ao estresse (CINGOLANI e HOUSSAY, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2005).

Embora os componentes clássicos do eixo HHA sejam CRF-ACTH-glicocorticoides, inúmeras moléculas participam da sua regulação. Dentre elas são de grande importância a arginina-vasopressina (AVP), citocinas como a interleucina-1 (IL-1), 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), noradrenalina, oriunda do *locus coeruleus* (LC), substância P, hormônio estimulador de melanócitos alfa (α -MSH), prolactina, ocitocina, dentre outros (RODRIGUES *et al.*, 2005; NUNES, 2008; MCEWEN *et al.*, 2015).

Além de inúmeras moléculas, diversas estruturas estão envolvidas na resposta e regulação do eixo-HHA, sendo de grande importância o hipocampo, por ser um local de retroalimentação dos glicocorticoides capaz de responder às variações circadianas (NUNES, 2008), e o *locus coeruleus*, fonte de noradrenalina e retro alimentador positivo nos estágios iniciais da resposta de estresse, para que essa resposta possa ser estruturada corretamente (RODRIGUES *et al.*, 2005; MCEWEN *et al.*, 2015).

1.2.3. Reposta de estresse

A resposta aos eventos estressores é caracterizada pela mobilização de múltiplos mecanismos biológicos em resposta a um evento ou estímulo que ameace a homeostase (GOLDSTEIN e KOPIN, 2007). Durante muito tempo se sugeriu que a essa resposta tivesse o papel de restabelecer a homeostase, no entanto, atualmente se sugere que esse processo biológico estabelece um novo estado homeostático no qual a presença do evento/estímulo estressor é considerada levando a um estado de alostase. Esse estado alostático, em que há um gasto aumentado de recursos para se manter o funcionamento do organismo, perdura enquanto houver o estímulo estressor (GOLDSTEIN, 2010).

Com o objetivo de superar o evento/estímulo estressor a resposta de estresse se dá de forma altamente organizada, com a ativação de diversos mecanismos efetores, como o eixo HHA e mediadores da resposta imune, levando a alterações do metabolismo energético, dos processos cognitivos, emocionais e de diversos comportamentos, como sexual, alimentar e social (MCEWEN *et al.*, 2015). No entanto, em algumas situações, a resposta de estresse pode se dar de forma desestruturada, em especial quando presente de forma crônica, levando ao surgimento de processos patológicos (GOSHEN e YIRMIYA, 2009).

1.2.4. Período de hiporresponsividade ao estresse

Em ratos, o período compreendido entre o 2º e o 14º dia de vida pós-natal (embora haja controvérsias quando aos dias de início e fim) é conhecido como período hiporresponsivo ao estresse, no qual se dá a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Durante este período a resposta das suprarrenais ao estresse é mínima ou

inexistente e os glicocorticoides circulantes estão muito reduzidos (LEVINE, 1962; LEVINE, 2001; VARGA *et al.*, 2013). Esse período também é caracterizado por baixos níveis de CRF hipotalâmico e ACTH hipofisário. A manutenção da inatividade desse sistema depende, em grande parte, de fatores relacionados ao cuidado materno (WALKER *et al.*, 2004). As experiências às quais os filhotes são submetidos nesse período influenciam a regulação e os padrões de resposta desse eixo, com efeitos na vida adulta do animal (PADOIN *et al.*, 2001; MEANEY e SZYF, 2005; VETULANI, 2013; PERKEYBILE e BALES, 2015).

1.2.5. Experiências no período neonatal e o desenvolvimento da prole

A noção de que as experiências no período neonatal podem influenciar o comportamento e a fisiologia do adulto já vem de muito tempo, datando do início do século XX com as sugestões de Freud de que a neurose advinha de experiências da infância (FREUD, 1918).

A partir de meados do mesmo século o tema começou a atrair interesse da comunidade científica e evidências experimentais começaram a ser publicadas em maior número (WEININGER, 1954; LEVINE, 1957; LEVINE *et al.*, 1957; LEVINE, 1962). A partir de então inúmeras evidências dão suporte e descrevem a influência das experiências no período neonatal sobre o repertório comportamental e a homeostasia do adulto nas mais diversas espécies: pássaros (GROOTHUIS e CARERE, 2005); porcos-da-índia (HENNESSY *et al.*, 2006), ratos (PADOIN *et al.*, 2001; CIRULLI *et al.*, 2009; RAINEKI *et al.*, 2009; DA SILVA BENETTI *et al.*, 2014); camundongos e primatas não-humanos (CIRULLI *et al.*, 2009).

Os modelos animais que visam estudar como o ambiente neonatal pode influenciar o desenvolvimento do animal podem ser divididos, de forma geral, em dois tipos de intervenção: moderada e severa. Como exemplos de intervenções moderadas temos o forrageamento¹ sob condições de desafio moderado (MACRI e WURBEL, 2007) e o procedimento conhecido por *gentling*, *handling* ou manipulação, primeiramente descrito por Otto Weinger na década de 50 (WEININGER, 1954) e Seymour Levine (LEVINE, 1957; LEVINE *et al.*, 1957).

Dentre as formas de intervenção severa temos o forrageamento sob alta demanda (MACRI e WURBEL, 2007), separação maternal prolongada e privação materna (MACRI *et al.*, 2004; RUEDI-BETTSCHEM *et al.*, 2004; BENETTI *et al.*, 2009) e exposição a altos níveis de corticosterona (YORTY *et al.*, 2004). As intervenções moderadas e severas diferem não apenas na intensidade da intervenção, mas também quanto à resposta ao estímulo e ao desfecho no repertório comportamental e fisiológico do animal ainda quando filhote e também na idade jovem e adulta (MACRI *et al.*, 2011).

Dentre os principais paradigmas de intervenções neonatais severas estão a separação maternal prolongada, 3 a 6 horas diárias por uma ou duas semanas (MACRI *et al.*, 2004; RUEDI-BETTSCHEM *et al.*, 2004; BENETTI *et al.*, 2009) e a privação materna, uma única separação de 24h durante a segunda semana de vida (MACRI e LAVIOLA, 2004). Os animais submetidos a esses protocolos mostram uma resposta aumentada a eventos estressores e ao medo quando adultos (HUOT *et al.*,

¹ No caso de roedores, e no contexto apresentado, consiste na saída da mãe do ninho para a busca de alimento.

2004; MACRI e LAVIOLA, 2004), aumento na expressão e liberação de CRF no hipotálamo, aumento dos níveis ACTH circulante e consequente produção aumentada de corticosterona (MACRI *et al.*, 2004; LIPPMANN *et al.*, 2007; VETULANI, 2013; MARCO *et al.*, 2015). Apresentam também expressão cortical reduzida de receptores de glicocorticoides (GR) (HUOT *et al.*, 2004), menor mobilidade na tarefa de nado forçado, um indicador de depressão (LEE *et al.*, 2007), e desempenho reduzido em tarefas de memória dependente de hipocampo, como o labirinto aquático de Morris (HUOT *et al.*, 2002).

1.2.6. Comportamento agressivo maternal evocado por um macho intruso – construindo o modelo de ambiente violento precoce

O protocolo de estresse social com macho intruso durante a lactação explora uma característica biológica da genitora que é o aumento da agressividade durante este período. O comportamento agressivo maternal é definido como o padrão de agressividade apresentado pela genitora frente a um macho intruso desconhecido, com o objetivo de proteger sua prole (ERSKINE *et al.*, 1980; DE ALMEIDA *et al.*, 2014). O conjunto de respostas que a genitora apresenta frente a um macho intruso, consiste em comportamentos defensivos, como ataques frontais, e ofensivos, como mordidas e ataques laterais (BLANCHARD e BLANCHARD, 1984). Considerando a conduta proativa da genitora em iniciar o comportamento agressivo rapidamente, antes mesmo do intruso se aproximar do ninho, o comportamento agressivo maternal pode ser definido como sendo de natureza ofensiva (DE ALMEIDA *et al.*, 2014).

A ocorrência do comportamento agressivo maternal acompanha a dos comportamentos de cuidado maternal. Inicia-se ao final da gestação, tendo seu pico

em torno do dia do parto e permanecendo elevado por aproximadamente duas semanas, seguindo-se um declínio em direção ao desmame (FERREIRA *et al.*, 2002). O comportamento agressivo-maternal está diretamente relacionado ao comportamento maternal, sendo dependente da estimulação sensorial vinda da presença do filhotes (FERREIRA e HANSEN, 1986; DESCHAMPS *et al.*, 2003).

Assim como os filhotes, fêmeas lactantes são hiporresponsivas ao estresse (LIGHTMAN e YOUNG, 1989; WALKER *et al.*, 2004), enfatizando a importância biológica de que os filhotes não tenham níveis significativos de glicocorticoides circulantes, uma vez que esses hormônios podem ser passados à prole através da lactação (MACRI *et al.*, 2011). No entanto, se o estressor ameaçar diretamente os filhotes, a mãe passa a ser capaz de montar uma resposta aguda ao estresse com aumento de CRF no NPV, ACTH e corticosterona circulante (DESCHAMPS *et al.*, 2003).

A provocação social pela intrusão de um macho desconhecido no ninho de uma fêmea lactante, é uma forma bem caracterizada de estresse social (DA VEIGA *et al.*, 2007; DA VEIGA *et al.*, 2011). Esse modelo é utilizado para avaliar comportamento agressivo frente a um animal desconhecido. Pelo fato dos machos intrusos apresentarem risco para a prole (MENNELLA e MOLTZ, 1988), esse modelo tem sido usado como forma de avaliar a responsividade ao estresse das mães em paradigmas de ameaça aos filhotes, sendo este um modelo capaz de elicitar uma resposta pronunciada ao estresse na mãe (DESCHAMPS *et al.*, 2003). No entanto, esse paradigma foi pouco explorado do ponto de vista do efeito sobre os filhotes.

Os protocolos de provocação social com macho intruso descritos na literatura variam. Normalmente a intervenção é feita no ciclo escuro, utilizando-se um macho menor do que a fêmea lactante por um período de tempo determinado em um ou mais eventos (DA VEIGA *et al.*, 2007; DA VEIGA *et al.*, 2011; CARINI *et al.*, 2013).

O protocolo previamente utilizado em nosso laboratório consistia em, no quinto dia de vida pós-parto, colocar um macho adulto dentro da caixa moradia, contido em uma caixa de acrílico, por 5 minutos. Após essa fase de provocação, um segundo macho, agora em idade juvenil, menor do que a fêmea, era colocado na caixa, sem nenhuma proteção, sempre no ciclo escuro (DA VEIGA *et al.*, 2011). O objetivo dessa intervenção foi provocar uma resposta agressiva por parte da genitora no intuito de avaliar os mecanismos neurais da agressividade maternal (DA VEIGA *et al.*, 2007; DA VEIGA *et al.*, 2011).

Um segundo protocolo, disponível na literatura, consiste em introduzir um macho menor ou igual a fêmea durante 1 hora, diariamente, do dia 2 ao 16 de vida pós-parto, no entanto o autor não descreve se a intervenção é feita no ciclo claro ou escuro (CARINI *et al.*, 2013).

Um terceiro protocolo foi utilizado para experimentar o estresse neonatal sobre comportamento social. Nesse protocolo, primeiramente um macho adulto dentro de uma caixa de acrílico é utilizado como provocador, por 5 minutos. Após 5 minutos de intervalo, um macho juvenil é inserido na caixa por 10 minutos. As intervenções foram feitas nos dias 2 e 5 de vida pós-natal, durante o ciclo escuro (HENRIQUES, 2014).

Ao se desenvolver um modelo animal para o estudo do ambiente violento sobre o desenvolvimento da prole, não apenas os filhotes são importantes, mas também as

alterações na genitora. Considerando-se a dinamicidade do comportamento maternal, o momento de intervenção deve ser cuidadosamente definido. Como ratos são animais noturnos, o ciclo escuro é o momento de maior atividade da genitora. Durante o ciclo escuro ocorre menor interação com os filhotes, como amamentação e lambida, passando a fêmea mais tempo afastada forrageando (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013).

Dessa forma, especulamos que a probabilidade de uma fêmea de roedor em seu habitat natural encontrar um macho adulto desconhecido deva ser maior no ciclo noturno, estando ela mais preparada para esse encontro nesse período (DESCHAMPS *et al.*, 2003). De forma complementar, nas primeiras horas do ciclo claro, temos o período de maior contato da genitora com seus filhotes. A genitora permanece no ninho, frequentemente apresentando comportamentos maternais tidos como de alta qualidade, como amamentação com dorso arqueado e lambida ano-genital (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013). Sendo este o momento em que a genitora se encontra reclusa em seu ninho, acreditamos ser um período em que ela não espera encontrar um macho adulto desconhecido. De fato, o horário de encontro com o intruso é determinante no tipo de resposta que a genitora irá apresentar. Encontros durante o ciclo claro tem maior efeito estressor do que encontros no ciclo escuro (DESCHAMPS *et al.*, 2003).

Um segundo fator a ser considerado é o tamanho do macho a ser utilizado como intruso (ERSKINE *et al.*, 1978). Para garantir um impacto consistente sobre a genitora e a ninhada, um macho adulto, mais pesado do que a fêmea é a opção mais adequada, pois um macho adulto consiste em uma ameaça real para a prole (DESCHAMPS *et al.*, 2003).

Segundo Blanchard e Blanchard, existe uma forte necessidade de se ligar a ciência básica com ciência aplicada. Embora o conhecimento puro acabe trazendo ganhos para a vida humana, devemos superar o ceticismo e o medo de desenvolver novos modelos e técnicas de estudo que sejam mais aplicadas. Ainda nas palavras dos Blanchard, agressividade e violência são especialmente adequadas para o estudo translacional, uma vez que caracterizam um comportamento evolutivo, fortemente conservado em diferentes espécies, não sendo apenas um conceito criado por cientistas e filósofos. Não se espera que um modelo animal traga a total compreensão da situação humana sendo modelada, nem que seja a exata cópia. No entanto o correto desenho experimental e avaliação dos resultados pode trazer luz ao entendimento do processo humano, no momento em que passamos a considerar uma continuidade evolutiva entre os comportamentos animais e humanos (BLANCHARD e BLANCHARD, 1984).

Considerando que as alterações do desenvolvimento causados pela exposição à violência doméstica não sejam uma disfunção e sim um fenótipo comportamental alternativo que é ineficiente no contexto social de uma escola ou sociedade moderna, sugerimos que o uso de um ambiente semelhante em roedores possa trazer luz aos diversos desafios de se estudar a exposição à violência em humanos. Esperamos encontrar uma programação pelo ambiente violento, conservada entre espécies de mamíferos, confirmado a validade de construto de um modelo animal.

Embora o termo violência seja essencialmente humano, optamos por emprega-lo no modelo uma vez que a condição sendo modelada é a condição humana de exposição à violência. Dessa forma a terminologia ambiente violento e grupo violência, se refere aos animais que foram submetidos a intervenção que, no contexto

do presente trabalho, esperamos modelar a condição humana de exposição à violência.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo da presente tese foi avaliar o uso do estresse social com macho intruso durante a lactação como um modelo de ambiente violento precoce com validade de construto, validade aparente ou de face e validade preditiva.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar o efeito agudo da intervenção sobre a genitora e sua prole

(Experimento 1)

Quantificar a concentração plasmática de hormônios relacionados ao estresse e cuidado maternal, especificamente corticosterona, ocitocina e prolactina na genitora após a segunda intervenção com macho intruso.

Quantificar a concentração plasmática de hormônios relacionados ao estresse e vínculo com a genitora, especificamente corticosterona, ocitocina e prolactina, nos filhotes após a segunda intervenção com macho intruso.

Avaliar o efeito do estresse social sobre o comportamento maternal da genitora para com sua prole imediatamente após a primeira e a segunda intervenção com macho intruso.

Verificar a relação entre o comportamento maternal, agressivo maternal e as alterações hormonais da genitora e da prole através de estudos de correlação.

2.2.2. Avaliar o efeito da intervenção repetida sobre o comportamento maternal e agressivo maternal

(Experimento 2)

Quantificar o comportamento agressivo da genitora contra o intruso a cada intervenção.

Avaliar o efeito do estresse social com macho intruso sobre o comportamento maternal da genitora para com sua prole imediatamente após cada intervenção e 7 horas após o início do ciclo claro.

2.2.3. Avaliar o efeito da intervenção sobre a prole a médio prazo

(Experimento 2)

Avaliar o efeito do estresse social com macho intruso durante a lactação sobre o estado basal de ativação do eixo HHA nos filhotes machos e fêmeas quando juvenis (28 dias de vida).

Avaliar o efeito do estresse social com macho intruso durante a lactação sobre o comportamento semelhante a ansiedade nos filhotes machos e fêmeas quando juvenis (29 dias de vida).

2.2.4. Avaliar o efeito da intervenção sobre os filhotes machos a longo prazo

(Experimento 3)

Avaliar o estado de ativação do eixo HHA em estado basal e mediante estresse psicológico repetido nos filhotes machos quando adultos, controles e violência.

Avaliar o comportamento semelhante a ansiedade em filhotes machos quando adultos, controles e violência.

Medir a capacidade cognitiva, especificamente memória espacial de trabalho e memória de reconhecimento de curta duração, em filhotes machos quando adultos controles e violência.

Avaliar o efeito do estresse social com macho intruso durante a lactação sobre o desenvolvimento corporal dos filhotes machos da idade juvenil até a idade adulta.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto para execução dos experimentos que são descritos na presente tese foi apresentado à comissão de ética em pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, sendo aprovado pela mesma. Posteriormente o projeto foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CEUA, sendo aprovado pelo mesmo sob número 21887, conforme apresentado na carta de aprovação (ANEXO B).

3.1 ANIMAIS

Ratos Wistar, machos e fêmeas com 40 dias, foram obtidos do Biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo transportados ao ratário setorial do laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento. Os animais foram acondicionados em grupos de 4 por caixa (65 x 55 x 25 cm) sendo que cada caixa abrigou animais do mesmo gênero.

As condições ambientais do biotério setorial foram mantidas em $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura, ciclo claro escuro 12-12h e comida e água *ad libitum* (NUVILAB CR-1).

3.2 QUARENTENA

Os animais foram habituados ao novo ambiente por 40 dias. Durante o período de quarentena os animais não sofreram nenhuma intervenção além das trocas de maravalha para manter o ambiente limpo e da reposição de comida e água. As trocas foram feitas 2 vezes por semana pelos próprios experimentadores. Durante as trocas as condições gerais de saúde dos animais foram avaliadas. O aspecto das fezes, integridade da pele, desenvolvimento corporal e marcas de estresse como vermelhidão periocular foram observadas. Em caso de indicativo de alteração de algum dos parâmetros anteriores, o animal era retirado do experimento.

3.3 DETERMINAÇÃO DA FASE DO CICLO ESTRAL DAS FÊMEAS

A determinação do ciclo estral nas fêmeas consistiu em coletar o lavado vaginal com salina e analisar os tipos celulares presentes. Para isso introduzimos um conta-gotas na abertura vaginal das fêmeas, lavando o canal vaginal com salina e coletando novamente o produto da lavagem para análise dos tipos celulares em microscópio óptico. A mesma técnica é utilizada para se evidenciar a presença de espermatozoides no lavado vaginal pós-cópula.

O conta gotas é esterilizado com álcool 70°GL antes e após o uso em cada fêmea, evitando a passagem de eventuais microrganismos de um animal para o outro.

3.4 CRUZAMENTO

Como este trabalho visa avaliar o efeito de intervenções pós-natais sobre o cuidado maternal e desenvolvimento da prole, o procedimento mais adequado para minimizar possíveis efeitos pré-natais sobre estas variáveis é efetuar o cruzamento

dos animais no ratário setorial, após período de quarentena. Após o período de habituação, o ciclo estral das fêmeas foi controlado diariamente, de acordo com protocolo descrito no item anterior, sendo a fêmea considerada apta para cruzamento na noite do proestro do 3º ciclo regular.

Em uma caixa isolada, colocada em uma estante específica para esse fim, cada fêmea foi colocada com apenas um macho sexualmente ativo, na noite do 3º proestro regular. O comportamento sexual do casal é acompanhado por 30 minutos. Após constatada a receptividade da fêmea por observação do comportamento sexual em resposta às investidas do macho, ela permaneceu com ele até a manhã do dia subsequente. Foram consideradas prenhas as fêmeas que apresentaram espermatozoides no lavado vaginal.

3.5 ACOMPANHAMENTO DA GESTAÇÃO

O dia 1 de gestação foi considerado o dia pós-cópula, na manhã do qual houve confirmação da prenhez pela avaliação de espermatozoides no lavado vaginal.

Após a cópula o macho foi retirado da caixa e recolocado na sua caixa moradia. A fêmea foi avaliada para constatação da prenhez. Sendo confirmada a prenhez, a fêmea foi colocada em uma nova caixa moradia com outras fêmeas com data de prenhez semelhante (± 1 dia). As caixas foram avaliadas visualmente duas vezes ao dia com o objetivo de garantir um ambiente padronizado durante a gestação.

3.6 ISOLAMENTO DA FÊMEA E PARTO

Aos 19 dias de gestação a fêmea foi isolada em uma nova caixa moradia medindo 49 x 34 x 29 (C x L x A) contendo cinco litros de maravalha. A caixa é feita de policarbonato transparente, o que permite o registro do comportamento maternal.

As caixas foram verificadas duas vezes ao dia para determinação da data de parto. O dia do parto foi considerado o dia pós-natal 0 (DPN 0) para os filhotes e dia pós-parto 0 para as genitoras (DPP 0).

3.7 PADRONIZAÇÃO DAS NINHADAS

No dia de vida pós-natal 1 (DPN1) a caixa moradia foi retirada do ratário para uma sala adjacente nas mesmas condições de luz e temperatura. A genitora foi retirada da caixa moradia e colocada em uma caixa adjacente. Um pouco da maravalha da caixa moradia foi colocada na caixa adjacente para conter o cheiro da genitora e dos filhotes, minimizando os efeitos sobre a genitora. Sem tocar os filhotes e o ninho, foi realizada uma contagem do número de filhotes. Do topo da ninhada foram retirados os animais excedentes, com o mínimo de contato com os demais filhotes. Cada ninhada deve permanecer com 8 filhotes. A genitora foi então devolvida à caixa moradia e esta retornada ao seu local no ratário. O procedimento completo durava menos de três minutos.

3.8 TROCAS DE MARAVALHA

Para troca de maravalha nas caixas com filhotes, a caixa foi removida do local de moradia até a mesa de trabalho dentro do ratário. A mãe foi retirada para uma caixa adjacente. Um pouco da maravalha da caixa moradia foi colocada na caixa adjacente

para conter o cheiro da genitora e dos filhotes, minimizando os efeitos sobre a genitora.

Toda a maravalha que não faz parte do ninho foi removida e substituída por maravalha limpa suficiente para completar o que foi retirado. Imediatamente após a troca a mãe foi devolvida para a caixa moradia e essa foi repostada na estante no exato local de origem.

Para animais já desmamados, efetuamos a troca de aproximadamente 95% da maravalha. No processo a caixa foi removida para a mesa de trabalho do biotério. Um punhado de maravalha suja foi colocada em uma caixa com maravalha limpa. Após, os animais foram transferidos para a caixa limpa e devolvidos ao local original na estante de biotério.

3.9 DESMAME

No vigésimo primeiro dia de vida pós-natal (DPN 21) os animais foram desmamados. O procedimento consistiu em remover a caixa moradia para a mesa de trabalho do biotério e isolar a mãe em uma caixa adjacente. Após, o gênero do filhote foi determinado pela observação da genitália externa. Cada animal foi acondicionado em nova caixa moradia com irmãos do mesmo gênero. Para ser considerada adequada para o experimento, uma ninhada deve ter, pelo menos, 3 animais de cada gênero.

A cauda dos animais foi marcada com caneta específica para esse fim, com o objetivo de identificação. Um mesmo animal é acompanhado pela sua identificação por todo o experimento.

3.10 INTERVENÇÕES

3.10.1. Controle

O grupo controle consiste em animais que sofreram apenas uma intervenção no primeiro dia de vida para a padronização da ninhada em 8 filhotes e foram desmamados aos 21 dias de vida. Sofreram 3 trocas de maravalha antes do desmame, no dia 11, 15 e 18 de vida pós-natal.

3.10.2. Macho intruso - ambiente violento

Para simular um ambiente aversivo/violento, exploramos uma característica natural de roedores que é o comportamento agressivo maternal frente a um macho intruso (DE ALMEIDA *et al.*, 2014). Para tanto, um rato macho adulto, pesando entre 330 e 410 gramas é introduzido por 5 minutos na caixa da fêmea nos dias 3 e 5 ou 3, 5, 7 e 9 de vida pós-natal, sempre no ciclo claro, entre 3 e 4h após o acendimento das luzes. Um mesmo macho não foi utilizado duas vezes na mesma caixa. Cada macho foi utilizado até 4 vezes, com um período de 3 dias de descanso entre cada uso. O macho pai da ninhada não foi utilizado como intruso.

A provocação social foi feita *in loco*. A caixa moradia não foi removida da estante moradia para evitar alterações de comportamento por parte da fêmea.

3.11 REGISTROS COMPORTAMENTAIS

3.11.1. Registro de comportamento agressivo maternal

O comportamento da fêmea genitora para com o macho intruso foi registrado por filmagem contínua durante todo o tempo de permanência do macho na caixa, utilizando-se o sistema de registro descrito no ANEXO A.

3.11.2. Registro de comportamento maternal

O comportamento da fêmea genitora para com sua prole foi registrado imediatamente após as intervenções (com um horário equivalente nas ninhads controles) e 7 horas após o início do ciclo claro. Os registros têm duração média de 30 minutos de filmagem contínua.

3.12 PESAGEM DOS ANIMAIS

Para avaliar o desenvolvimento corporal dos filhotes, acompanhamos o ganho de peso. Os animais foram pesados nos dias 25, 28, 30, 33, 36, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 de vida pós-natal. Para executar a pesagem, a caixa moradia dos animais foi movida para a mesa de trabalho dentro do ratário. Cada animal da caixa foi então pesado utilizando-se como base um pote plástico contendo maravalha. O peso foi então registrado em uma planilha de acompanhamento do animal. Após o término da pesagem a caixa moradia foi devolvida ao local de origem.

Também avaliamos o peso das genitoras nos dias 5 e 22 pós-parto, sendo que em cada dia o conjunto de animais utilizados foi diferente. Para o dia 5 pesamos as fêmeas que foram coletadas no DPN5 e para o dia 22 pesamos as genitoras dos animais dos experimentos 2 e 3 pós-desmame.

3.13 COLETA DE AMOSTRAS

3.13.1. **Sangue**

As amostras de sangue foram obtidas após decapitação por guilhotina ou, no caso dos filhotes, tesoura especialmente designada para esse fim. O sangue troncular foi coletado em tubo de vidro de 5 mililitros lavado em EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) 2,5 milimol/litro, contendo 25 microlitros de EDTA 0,5 mol/litro, para uma concentração final aproximada de 2,5 milimol de EDTA por litro de sangue.

O sangue dos filhotes de 5 dias foi coletado após decapitação em tubo plástico contendo 1 microlitro de EDTA 0,5 mol/litro.

3.13.2. **Separação do plasma**

Imediatamente após a coleta, o sangue foi colocado em centrífuga previamente refrigerada a 4 graus Celsius. O sangue foi centrifugado a 1200 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado em 3 tubos plásticos de 1,5ml colocando aproximadamente 800 microlitros por tubo. O plasma foi congelado de forma rápida em gelo seco e mantido lá até ser transferido para armazenamento em Freezer 80 graus negativos.

O plasma dos filhotes de 5 dias seguiu o mesmo procedimento, no entanto o sobrenadante rendeu aproximadamente 100 microlitros.

3.14 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

3.14.1. Corticosterona

As concentrações plasmática de corticosterona livre e total foram medidas através da técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) com kits da Cayman Biochemical® (catálogo 500655) seguindo-se as instruções do fabricante.

Para quantificação da corticosterona total as amostras passaram por um processo de extração de fração lipídica com o objetivo de solubilizar a corticosterona ligada em proteínas carreadoras. Para extração da fração lipídica, foi utilizado o protocolo proposto pelo fabricante.

Tanto as amostras extraídas quanto as amostras íntegras foram diluídas em solução fornecida pelo fabricante, de acordo com o quadro abaixo (Quadro 1).

Animal	Diluição
Genitora DPN5	200 vezes
Filhotes DPN5	20 vezes
Filhotes DPN28	350 vezes
Filhotes DPN130	400 vezes

Quadro 1 – Diluição das amostras para quantificação de corticosterona por ELISA

3.14.2. Prolactina

A concentração plasmática de prolactina foi medida através da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com kits da USCNK Life Sciences Inc. (catálogo CEA846Ra) seguindo-se as instruções do fabricante.

As amostras de plasma íntegras foram diluídas de acordo com o quadro abaixo (Quadro 2).

Animal	Diluição
Genitora DPN5	3000 vezes
Filhotes DPN5	1000 vezes

Quadro 2 – Diluição das amostras para quantificação de prolactina por ELISA

3.14.3. Ocitocina

A concentração plasmática de ocitocina foi medida através da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) com kits da ENZO Life Sciences (catálogo ADI-901-153) seguindo-se as instruções do fabricante.

As amostras de plasma íntegras foram diluídas de acordo com o quadro abaixo (Quadro 3).

Animal	Diluição
Genitora DPN5	2 vezes
Filhotes DPN5	2 vezes

Quadro 3 – Diluição das amostras para quantificação de ocitocina por ELISA

3.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para comparação de médias entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student quando os dados seguiam distribuição normal e o teste U de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para comparação de médias entre mais de dois grupos ou em caso de amostras pareadas em diferentes tempos, foi utilizado teste de análise de variância ANOVA e ANOVA de medidas repetidas seguido do pós-teste da mínima diferença significativa de Fisher ou múltiplas comparações de Bonferroni

respectivamente. No caso de múltiplos grupos em que um ou mais não seguia uma distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

As relações entre as variáveis investigadas nesse estudo foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Pearson para correlações lineares e de Spearman para correlações monotônicas.

As correlações foram interpretadas como descrito no Quadro 4.

Coeficiente de Correlação	Correlação
$r = 1$	Perfeita positiva
$1 > r > 0,75$	Forte Positiva
$0,75 > r > 0,5$	Moderada Positiva
$0,5 > r > 0,1$	Fraca Positiva
$0,1 > r > - 0,1$	Nula
$- 0,1 > r > - 0,5$	Fraca Negativa
$- 0,5 > r > - 0,75$	Moderada Negativa
$- 0,75 > r > -1$	Forte negativa
$r = - 1$	Perfeita Negativa

Quadro 4 – Descrição do valor de correlação para cada intervalo de coeficiente.

Com o objetivo de definir as variáveis independentes que influenciam as diferentes variáveis dependentes no modelo e suas inter-relações, utilizamos regressão linear múltipla pelo método de avanço por etapas (NATHANS *et al.*, 2012).

Todas as análises foram realizadas com uso dos programas SPSS 15, da empresa IBM e Prism 5 da empresa Graphpad. O nível de significância estatística foi estipulado como sendo $p < 0,05$.

3.16 EXPERIMENTO PILOTO

3.16.1. Teste fêmea intrusa

Com o objetivo de isolar o efeito do macho sobre a ninhada, se testou a viabilidade de se utilizar como controle adicional uma fêmea intrusa, considerando-se que existem relatos da literatura de que fêmeas lactantes de ratos wistar podem apresentar comportamento agressivo contra uma fêmea intrusa (LUKAS e NEUMANN, 2014). No entanto o uso de fêmea intrusa não desencadeou o comportamento agressivo esperado, sendo excluído o procedimento do protocolo experimental.

3.16.2. Local de execução do protocolo de macho intruso

Inicialmente o protocolo de macho intruso consistia em remover a caixa moradia para uma sala adjacente, nas mesmas condições de temperatura e luminosidade do ratário. Um teste com quatro ninhadas foi executado para verificar a resposta da mãe e a viabilidade do processo. As fêmeas foram removidas para uma sala adjacente e, após 20 minutos de ambientação, um macho foi introduzido na caixa. A resposta da mãe contra o intruso foi inexistente. O comportamento da fêmea genitora pareceu indicar que ela estava mais estressada com a alteração de ambiente do que com o macho intruso.

Um segundo protocolo foi então proposto e testado. O macho intruso seria colocado dentro da caixa moradia no local de residência dentro do ratário, sem movimentação da ninhada. Com o segundo protocolo obtivemos o comportamento agressivo esperado por parte da mãe contra o macho intruso. O comportamento de

ninhadas controles próximas foi monitorado com o objetivo de verificar se o comportamento agressivo da fêmea iria desencadear alguma resposta nas genitoras controles. Nenhuma alteração evidente de comportamento pode ser registrada. Dessa forma, optados por executar o protocolo de macho intruso *in loco*, evitando o impacto da locomoção sobre as ninhadas.

3.17 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DE FILHOTES E GENITORA APÓS A SEGUNDA INTERVENÇÃO

A primeira etapa experimental consistiu em analisar os efeitos sobre os filhotes e as genitoras após a segunda intromissão do macho. O objetivo dessa análise é buscar informações sobre o que está ocorrendo com a ninhada durante a intervenção.

3.17.1. Grupos experimentais

O grupo controle (n=6) consistiu em animais que sofreram apenas a intervenção de padronização de ninhada. Na manhã do DPN5 foram coletados os filhotes do gênero feminino e masculino, bem como a genitora. A genitora foi coletada primeiro, sendo que os filhotes permaneceram menos de 5 minutos na ausência da genitora antes de serem coletados.

O grupo violência (n=8) sofreu a intervenção de provocação com macho intruso nos dias 3 e 5 de vida pós-natal além da intervenção para a padronização de ninhada. As coletas ocorreram no dia 5 de vida pós-natal, entre 30 e 40 minutos após a intervenção com macho intruso. Foram coletados os filhotes do gênero feminino e masculino, bem como a genitora. A genitora foi coletada primeiro, sendo que os

filhotes permaneceram menos de 5 minutos na ausência da genitora antes de serem coletados. O desenho experimental está representado graficamente na figura 1.

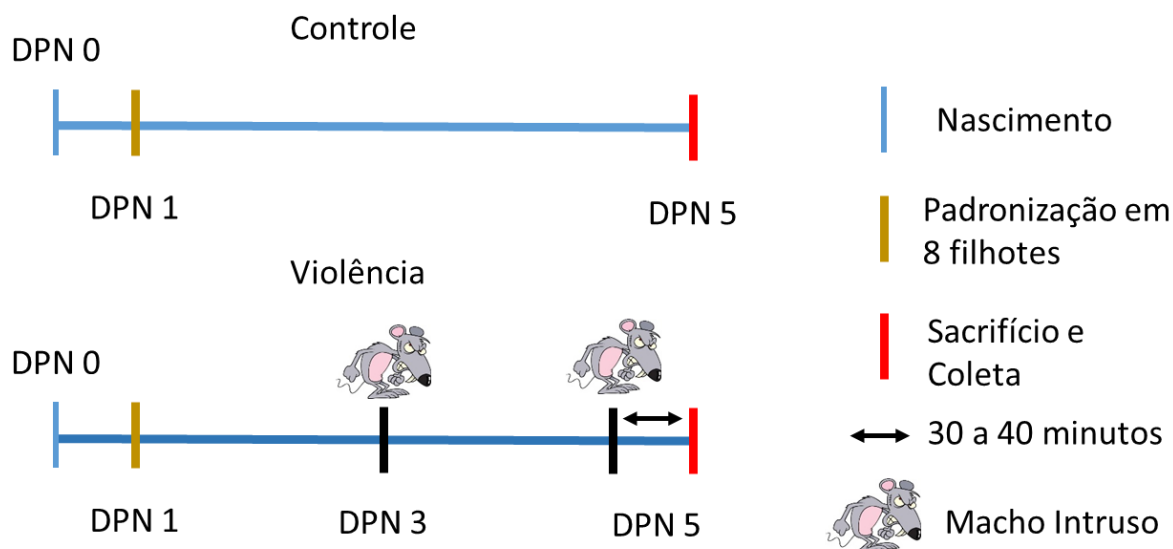


Figura 1 – Desenho experimental Experimento 1

3.17.2. Análise de comportamento agressivo maternal

O comportamento da genitora contra o macho intruso foi analisado com o auxílio do software *The Observer* (Noldus). Foram quantificados os seguintes comportamentos: Duração e frequência total de comportamentos agressivos, ataques, boxeando e chutando, subjugação do intruso pela genitora, subjugação da genitora pelo intruso, interação do Intruso com os Filhotes e frequência de mordidas. Protocolo adaptado de Veiga 2007 (DA VEIGA *et al.*, 2007).

3.17.3. Análise de comportamento maternal

O comportamento da genitora para com sua prole foi analisado com o auxílio do software *The Observer* (Noldus). Os registros dos 15 minutos após a retirada do macho intruso da caixa e do período correspondente nos controles foi analisado nos dias 3 e 5. Foi quantificada a duração e/ou frequência dos seguintes comportamentos:

amamentação com dorso arqueado (High), amamentação em posição supino, amamentação relaxada sobre os filhotes (Blanket), amamentação total, amamentação com dorso arqueado/amamentação total, tempo no ninho, tempo Construindo o Ninho, lambendo os filhotes, autolimpeza. (SZYF *et al.*, 2005; CHAMPAGNE *et al.*, 2008).

3.17.4. Dosagens bioquímicas

As concentrações plasmáticas de corticosterona total e livre das genitoras foram quantificadas de acordo com o que foi disposto anteriormente. Também foram quantificadas as concentrações de ocitocina e prolactina. A concentração plasmática de corticosterona total foi quantificada nos filhotes machos e fêmeas, bem como os de prolactina e ocitocina.

3.17.5. Avaliação das variáveis por correlação

As relações entre as variáveis independentes e dependentes do experimento foram avaliadas pelos coeficientes de correlação de Pearson e Spearman, seguindo a descrição anterior. As variáveis envolvidas na análise são descritas no Quadro 5.

3.17.6. Modelagem por regressão linear múltipla

Para determinar se variáveis relacionadas com amamentação interagem com a variável concentração de corticosterona plasmática ligada da genitora para determinar a concentração plasmática de corticosterona dos filhotes machos, efetuamos análise por regressão linear múltipla.

Modelo	Grupos	Variáveis Independentes		Variáveis dependentes
Modelo 1	Controle e Violência	Amamentação High, supino e Blanket, Amamentação total, High/Amamentação Total, Tempo no ninho, Tempo Construindo o Ninho, Lambida/Limpeza dos Filhotes, Autolimpeza	DPN3, DPN5 e Soma de todos os dias	Corticosterona total, livre e fração ligada das genitoras. Ocitocina das genitoras.
		Anteriores mais corticosterona total, livre e fração ligada e ocitocina das genitoras.		Corticosterona filhotes fêmeas e machos
Modelo 2	Violência	Amamentação High, supino e Blanket, Amamentação total, High/Amamentação Total, Tempo no ninho, Tempo Construindo o Ninho, Lambida/Limpeza dos Filhotes, Autolimpeza	DPN3, DPN5 e Soma de todos os dias	Corticosterona total, livre e fração ligada das genitoras. Ocitocina das genitoras.
		Agressivo total, mordidas, Ataques, Boxeando e Chutando, Subjugação do Intruso pela Genitora, Subjugação da Genitora pelo Intruso e Interação do Intruso com os Filhotes		
		Anteriores mais corticosterona total, livre e fração ligada e ocitocina das genitoras.		Corticosterona filhotes fêmeas e machos

Quadro 5 – Composição das análises por regressão linear múltipla e correlação entre as variáveis independentes e dependentes do experimento 1.

3.18 EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DOS FILHOTES QUANDO JUVENIS

3.18.1. Grupo experimentais

O grupo controle consistiu em animais que sofreram apenas a intervenção de padronização de ninhada, trocas de maravalha e desmame. Um filhote de cada

gênero em cada ninhada foi coletado no dia 28 de vida pós-natal. Dois filhotes de cada gênero em cada ninhada foram utilizados para os testes comportamentais.

O grupo Violência sofreu a intervenção de provocação com macho intruso nos dias 3, 5, 7 e 9 de vida pós-natal além da intervenção para a padronização de ninhada, troca de maravalha e desmame. Um filhote de cada gênero em cada ninhada foi coletado no dia 28 de vida pós-natal. Dois filhotes de cada gênero em cada ninhada foram utilizados para os testes comportamentais. O desenho experimental está representado graficamente na figura 2.

3.18.2. Análise de comportamento agressivo maternal

O comportamento da genitora contra o macho intruso foi analisado com o auxílio do software *The Observer* (Noldus). Foram quantificados os seguintes comportamentos: Duração e frequência total de comportamentos agressivos, ataques, boxeando e chutando, subjugação do intruso pela genitora, subjugação da genitora pelo intruso, interação do Intruso com os Filhotes e frequência de mordidas. Protocolo adaptado de Veiga 2007 (DA VEIGA *et al.*, 2007).

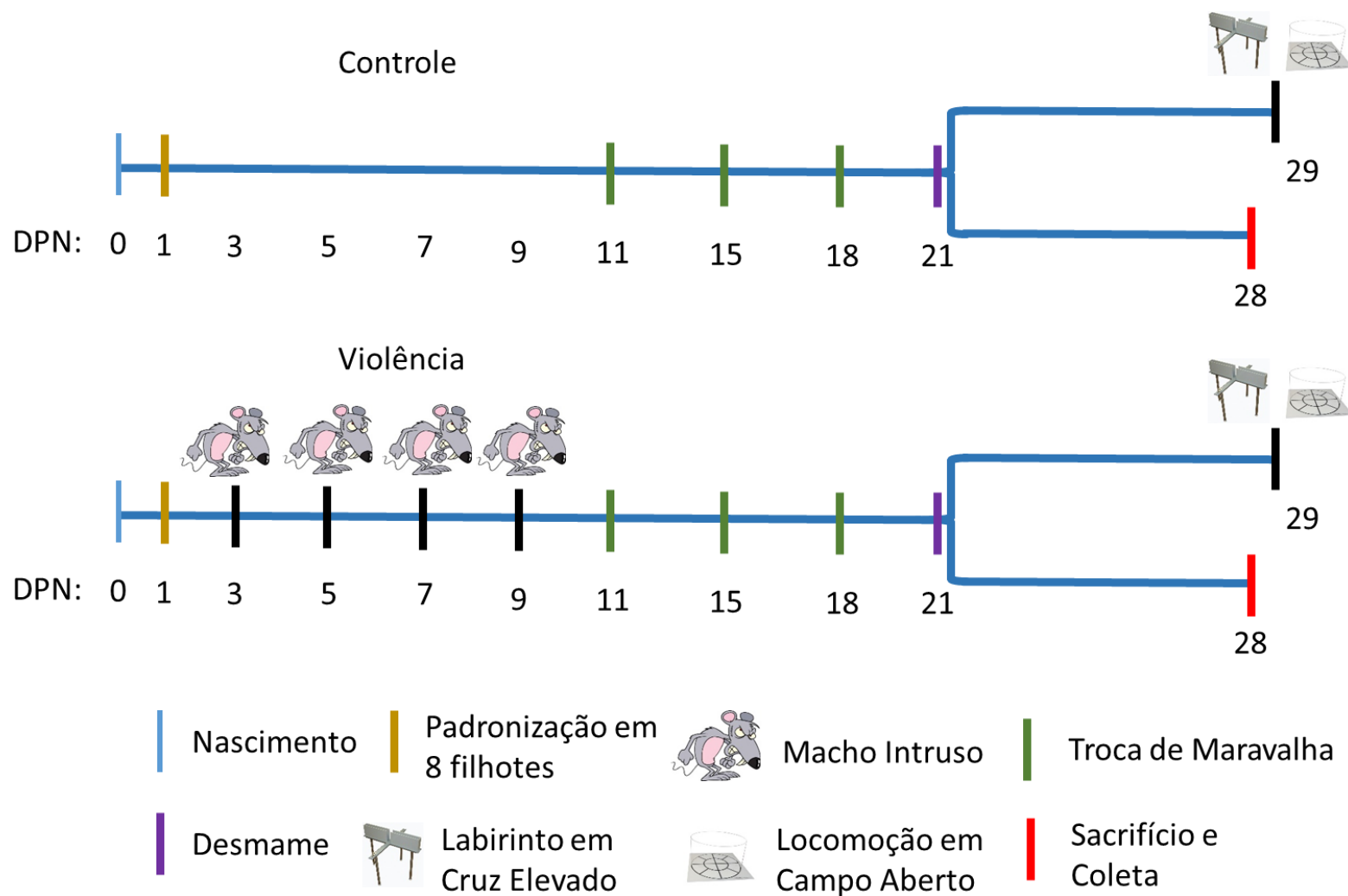


Figura 2 – Desenho experimental Experimento 2

3.18.3. Análise de comportamento maternal

O comportamento da genitora para com sua prole foi analisado com o auxílio do software *The Observer* (Noldus). Os registros dos 30 minutos após a retirada do macho intruso da caixa e do período correspondente nos controles foi analisado nos dias 3, 5, 7 e 9 – Horário 1 (H1). Foi quantificada a duração e/ou frequência dos seguintes comportamentos: amamentação high, amamentação supino, amamentação blanket, amamentação total, amamentação high/amamentação total, tempo no ninho, tempo construindo o ninho, lambendo os filhotes, autolimpeza (SZYF *et al.*, 2005; CHAMPAGNE *et al.*, 2008).

A mesma análise foi repetida 7h após o início do ciclo claro – Horário 2 (H2).

3.18.4. Massa corporal das genitoras

A massa corporal das genitoras foi medida imediatamente antes da coleta no dia 5 de vida pós-parto. Um segundo conjunto de animais teve sua massa corporal avaliada no dia 22 de via pós-parto, após o desmame.

3.18.5. Comportamento semelhante à ansiedade

Para avaliação de comportamento semelhante a ansiedade, utilizamos a técnica do labirinto em cruz elevado no 29º dia de vida pós-natal. O labirinto consiste em uma cruz elevada 40 centímetros do chão, com dois braços fechado – paredes com 40 centímetros de altura – e dois braços abertos – sem nenhuma contenção lateral. O aparato é fabricado me policarbonato preto.

Os animais foram avaliados no ciclo claro, entre 7 e 9h após o acendimento das luzes. Os animais foram transferidos para a sala de comportamento em caixas

individuais. Houve um período de ambientação de no mínimo 30 minutos antes do início dos testes. A iluminação da sala tem um padrão difuso, sendo reduzida em relação ao ratário, com o intuito de facilitar o comportamento de exploração.

Para o teste, os animais foram colocados no centro do aparato, virados para um dos braços abertos. O comportamento foi registrado em filme, com tempo total de cinco minutos.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Frequência de entradas e tempo nos braços abertos;
- Frequência de entradas e tempo nos braços fechados;
- Frequência de entradas e tempo no centro do labirinto;
- Comportamento complementares: mergulho; esticar; levantar; limpeza

O aparato foi completamente higienizado com álcool 30°GL entre animais, com tempo suficiente para que haja evaporação do mesmo.

A análise dos vídeos foi realizada com o software PlusMZ.

Os protocolos foram desenvolvidos e aplicados com base no estudo de Walf e Frye (WALF e FRYE, 2007).

3.18.6. Comportamento de locomoção

Para avaliar problemas com locomoção, utilizamos o paradigma de locomoção em campo aberto, por ser a medida padrão ouro. Após o registro do comportamento no labirinto em cruz elevado, os animais foram transferidos para o aparato de campo aberto. O aparato é fabricado em policarbonato, consistindo em uma arena circular de

90 cm de diâmetro, com parede de 40 centímetros de altura. O fundo da arena possui marcação para que se possa medir a locomoção. Os animais foram colocados no centro da arena e o comportamento foi registrado por 5 minutos.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Tempo nos quadrantes periféricos;
- Tempo nos quadrantes centrais;
- Número de cruzamentos nos quadrantes centrais;
- Número de cruzamentos nos quadrantes periféricos;
- Número total de cruzamentos;
- Comportamento complementares: mergulho; esticar; levantar; limpeza

O aparato foi completamente higienizado com álcool 30°GL entre animais, com tempo suficiente para que haja evaporação do mesmo. A análise dos vídeos foi realizada com auxílio do software OpenFLD.

3.18.7. Dosagens bioquímicas

A concentração de corticosterona plasmática total foi quantificada de acordo com o que foi disposto anteriormente.

3.18.8. Análises de correlação

Com o objetivo de verificar relações entre as variáveis independentes oriundas do comportamento maternal e agressivo sobre as variáveis dependentes ansiedade e níveis basais de corticosterona, utilizamos os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman, como descrito anteriormente.

As variáveis foram correlacionadas como apresentado no Quadro 6.

Análise	Grupos Utilizados	Variáveis Independentes		Variáveis dependentes
Modelo 1	Controle e Violência	Amamentação High, supino e Blanket, Amamentação total, High/Amamentação Total, Tempo no ninho, Tempo Construindo o Ninho, Lambida/Limpeza dos Filhotes, Autolimpeza	DPN3, DPN5, DPN7, DPN9 e Soma de todos os dias, soma de todos os dias e horários;	Escores de Ansiedade Juvenil, Corticosterona Basal.
Modelo 2	Violência	Amamentação High, supino e Blanket, Amamentação total, High/Amamentação Total, Tempo no ninho, Tempo Construindo o Ninho, Lambida/Limpeza dos Filhotes, Autolimpeza.	nos horários pós-intruso e 3h após retirada do intruso	Escores de Ansiedade Juvenil, Corticosterona Basal.
		Agressivo total, mordidas, Ataques, boxeando e chutando, Subjugação do Intruso pela Genitora, Subjugação da Genitora pelo Intruso e Interação do Intruso com os Filhotes, Interação da Genitora com os Filhotes, Autolimpeza.	DPN3, DPN5, DPN7, DPN9 e soma de todos os dias	

Quadro 6 – Composição das análises por regressão linear múltipla e correlação entre as variáveis independentes e dependentes do experimento 2.

3.19 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DOS FILHOTES QUANDO ADULTOS

3.19.1. Grupos e animais

No experimento 3 foram utilizados para comportamento os mesmos animais do comportamento de ansiedade do experimento 2. As avaliações de estresse foram realizadas com os animais que restaram das ninhadas do experimento 2.

Os animais foram mantidos em condições padrão de biotério durante o seu crescimento, até atingirem a idade para cada um dos testes. O desenho experimental está apresentado graficamente na figura 3.

3.19.2. Avaliação cognitiva

Nesse experimento foram utilizados animais com idades de 100 a 107 dias de idade.

O labirinto em T-elevado é uma técnica utilizada para avaliar curva de aprendizado espacial através da memória de trabalho, bem como um indicador de comportamento semelhante a ansiedade. O aparato consiste em um T, sendo um braço fechado e dois abertos. O aparato se encontra elevado do solo em 40 centímetros.

O animal foi colocado ao fundo do braço fechado, virado para a abertura. O tempo que o animal leva para sair para os braços fechados é medido como basal, sendo um indicador de comportamento semelhante à ansiedade. Após sair para o braço aberto, o animal foi retirado do labirinto e devolvido à caixa moradia por 60 segundos, após os quais o procedimento foi repetido. Repetiu-se o treino até que o animal permaneceu 180 segundos no braço fechado ou tenha atingido um total de 7 tentativas.

Esse protocolo explora o medo de espaços abertos e elevados em roedores. O comportamento normal esperado é de que após 2 ou três tentativas o animal permaneça os 180 segundos no braço fechado, evitando a situação ansiogênica do espaço aberto e elevado. (ASTH *et al.*, 2012).

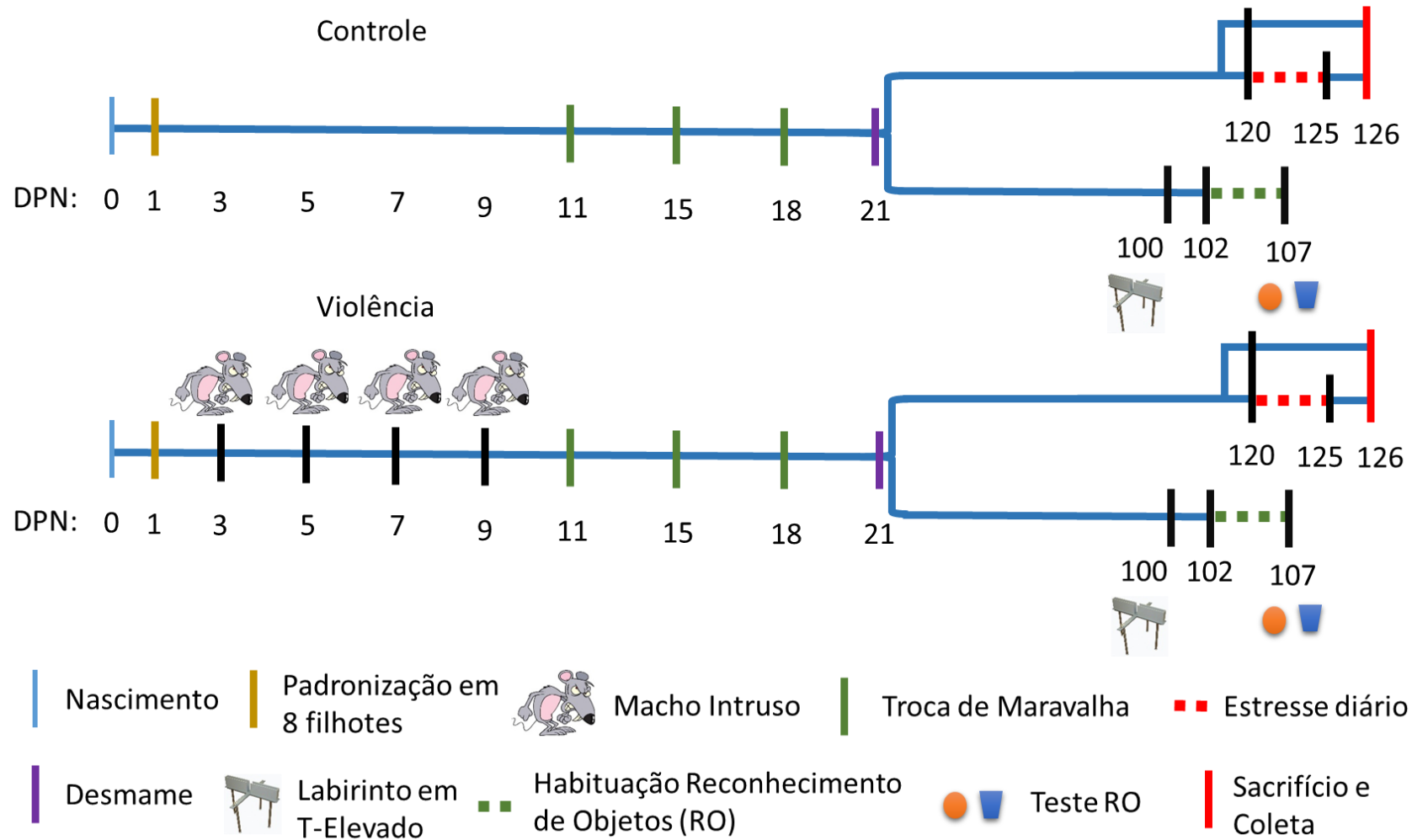


Figura 3 – Desenho experimental Experimento 3. Observação: em ambos os grupos, os animais que foram submetidos aos testes cognitivos são aqueles que foram avaliados para ansiedade no DPN 29.

Uma segunda abordagem foi utilizada para avaliação da memória de reconhecimento de curta duração. A técnica de reconhecimento de objetos tem como objetivo avaliar o desempenho do animal em um paradigma de memória de reconhecimento de curta duração.

Quarenta e oito horas após o teste do labirinto em T-elevado, foi iniciado o teste de reconhecimento de objetos. Os animais foram habituados à arena de teste durante 4 dias consecutivos por 3 minutos ao dia. No quinto dia o animal foi colocado na arena juntamente com 2 objetos distintos, por 3 minutos. Após 1h o animal retornou à arena com um dos objetos anteriores e um objeto novo, diferente de ambos os anteriores. O tempo que o animal passa explorando cada um dos objetos foi medido. Considerou-se que a tarefa foi aprendida quando o animal passou mais de 55% do tempo de exploração no objeto novo. Modificado de Barker e Warburton 2011 (BARKER e WARBURTON, 2011).

3.19.3. Resposta ao estresse repetido

Animais adultos, 120 dias de vida, foram submetidos a um protocolo de estresse repetido por contenção. Durante 5 dias, sempre entre 8 e 10h da manhã, os animais foram transportados para sala adjacente ao ratário. Os animais foram pesados no dia 1 e então foram colocados em contêntores de acrílico adequados ao seu tamanho por 45 minutos. A contenção foi repetida por mais 4 dias, sempre no mesmo horário. Após cada evento estressor os animais foram devolvidos a sua caixa moradia e ao local de origem no ratário. 24h após o último evento de contenção, os animais foram pesados novamente e então decapitados. Seu sangue e encéfalo foram coletados e suas glândulas adrenais pesadas.

3.19.4. Análises de correlação

Com o objetivo de verificar relações entre as variáveis independentes oriundas do comportamento maternal e agressivo sobre as variáveis dependentes ansiedade, aprendizado e níveis basais de corticosterona e após estresse repetido, utilizamos os coeficientes de correlação de Pearson e Spearman, como descrito anteriormente. As variáveis são descritas no Quadro 7

Análise	Grupos Utilizados	Variáveis Independentes		Variáveis dependentes
Modelo 1	Controle e Violência	Amamentação High, supino e Blanket, Amamentação total, High/Amamentação Total, Tempo no ninho, Tempo Construindo o Ninho, Lambida/Limpeza dos Filhotes, Autolimpeza	DPN3, DPN5, DPN7, DPN9 e Soma de todos os dias, soma de todos os dias e horários; nos horários pós-intruso e 3h após retirada do intruso	Latência para deixar o braço aberto do labirinto em T, número de tentativas para aprender a tarefa de labirinto em T-elevado, aprendizado na tarefa de reconhecimento de objetos. Corticosterona Basal, corticosterona após estresse crônico.
		Amamentação High, supino e Blanket, Amamentação total, High/Amamentação Total, Tempo no ninho, Tempo Construindo o Ninho, Lambida/Limpeza dos Filhotes, Autolimpeza		Latência para deixar o braço aberto do labirinto em T, número de tentativas para aprender a tarefa de labirinto em T-elevado, aprendizado na tarefa de reconhecimento de objetos. Corticosterona Basal, corticosterona após estresse crônico.
Modelo 2	Violência	Agressivo total, mordidas, Ataques, boxeando e chutando, Subjugação do Intruso pela Genitora, Subjugação da Genitora pelo Intruso e Interação do Intruso com os Filhotes, Interação da Genitora com os Filhotes, Autolimpeza.	DPN3, DPN5, DPN7, DPN9 e soma de todos os dias	Latência para deixar o braço aberto do labirinto em T, número de tentativas para aprender a tarefa de labirinto em T-elevado, aprendizado na tarefa de reconhecimento de objetos. Corticosterona Basal, corticosterona após estresse crônico.

Quadro 7 – Composição das análises por regressão linear múltipla e correlação entre as variáveis independentes e dependentes do experimento 3

4. RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1. Comportamento agressivo maternal

O comportamento agressivo maternal frente ao macho intruso foi avaliado nos dias 3 e 5 de vida pós-natal e também a soma dos dois dias. Como esperado, as fêmeas lactantes apresentam comportamento agressivo quando um macho é introduzido na caixa moradia. Existe uma variabilidade interna na intensidade e nos tipos de comportamento apresentados. Os dados referentes ao DPN3 e DPN5 se encontram resumidos na tabela 4. Os dados que descrevem a soma do comportamento agressivo nos dois dias são tabela 5. Dados são apresentados em média e erro padrão da média e também em mínimo e máximo.

Comportamento	DPN 3			DPN5		
	Média	Erro Padrão da Média	Mínimo/Máximo	Média	Erro Padrão da Média	Mínimo/Máximo
Ataques (Freq.)	6	2,17	0/17	7,75	2,40	2,01/23
Boxear e Chutar (Freq.)	4,88	1,42	0/10	6,38	2,39	1/21,01
Mordidas (Freq.)	3,13	1,17	0/9	3,25	0,65	0/5
Subjugação da Genitora (Freq.)	1,25	0,68	0/5	1,5	0,65	0/5
Subjugação do Intruso (Freq.)	1,38	0,91	0/6	1,88	0,48	0/4
Interação Intruso-Filhotes (Freq.)	3,5	1,35	0/12	1	0,38	0/3
Agressivo Total (Freq.)	24,21	9,05	1,4/68	40,85	9,74	10,8/88,6
Ataques (Dur.)	19,21	8,90	0/67	27,13	7,56	5/64,9
Boxear e Chutar (Dur.)	5	1,80	0/13,2	13,73	5,27	2,3/41
Subjugação da Genitora (Dur.)	3,18	2,04	0/16,3	4,29	1,93	0/15
Subjugação do Intruso (Dur.)	3,7	2,42	0/15,2	6,1	1,57	0/12,1
Interação Intruso-Filhotes (Dur.)	39,04	22,26	0/162	17,59	11,20	0/82
Agressivo Total (Dur.)	14	3,99	1,1/36	17,38	4,94	3/49,00

Tabela 4 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso nos dias 3 e 5 de vida pós-natal. n=8; DPN – Dia de Vida Pós-natal; Freq. – frequência; Dur. – Duração.

Comportamento	Soma de todos os dias		
	Média	Erro Padrão da Média	Mínimo/Máximo
Ataques (Freq.)	13,75	3,54	3,01/31
Boxear e Chutar (Freq.)	11,25	2,79	1/24,01
Mordidas (Freq.)	6,38	1,50	0/12
Subjugação da Genitora (Freq.)	2,75	1,11	0/8
Subjugação do Intruso (Freq.)	3,25	1,11	0/9
Interação Intruso-Filhotes (Freq.)	4,5	1,21	1/12,01
Agressivo Total (Freq.)	65,06	13,27	13,5/110,4
Ataques (Dur.)	46,34	12,72	8,8/104,4
Boxear e Chutar (Dur.)	18,73	5,48	2,9/49,9
Subjugação da Genitora (Dur.)	7,46	2,85	0/22,5
Subjugação do Intruso (Dur.)	9,8	3,10	0/25,2
Interação Intruso-Filhotes (Dur.)	56,63	21,43	1,2/162
Agressivo Total (Dur.)	31,38	6,42	4/62,01

Tabela 5 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso soma de todos os dias. n=8; DPN – Dia de Vida Pós-natal; Freq. – frequência; Dur. – Duração.

4.1.2. Comportamento maternal

O comportamento maternal da fêmea para com sua ninhada foi analisado nos 15 minutos que se seguiram à exposição ao macho intruso. Os dados são apresentados nas tabelas 6, 7 e 8 para o DPN3, DPN5 e soma de todos dias respectivamente.

A intervenção com macho intruso levou à extinção do comportamento de amamentação com dorso arqueado ($K_3 = 14,2$; $p = 0,003$) tanto no DNP3 ($p > 0,0001$) quanto no DPN5 ($p = 0,02$). O comportamento de amamentar relaxada sobre os filhotes

foi reduzido no DPN5 ($p = 0,005$), impactando o comportamento na soma dos dois dias ($t_{12}=3,24$ $p=0,007$). A redução dos dois comportamentos anteriores levou a uma redução na amamentação total ($K_3= 15,8$; $p=0,001$) no DPN3 ($p=0,006$), DPN5 ($p = 0,005$) e na soma dos dois dias ($t_{12}=8,4$; $< 0,0001$). A fração de amamentação de alta qualidade (dorso arqueado – high) em relação ao total de amamentação também foi reduzido ($K_3= 23,8$; $p<0,0001$) em ambos os dias (DPN3 $p > 0,001$; DPN5 $p = 0,018$) e, conseqüentemente, na soma de todos os dias ($U=4$; $p = 0,003$).

O tempo que a genitora passa no ninho também sofreu redução com a intervenção ($K_3= 14,1$; $p=0,003$) nos dois dias analisados (DPN3 $p = 0,009$; DPN5 $p = 0,03$), acarretando uma redução no tempo total de permanência no ninho ($t_{12}=7,9$; $p < 0,0001$). Houve um aumento no comportamento de construção de ninho ($K_3=11,4$; $p=0,01$) nos dois dias analisados (DPN3 $p = 0,03$; DPN5 $p = 0,015$) e na soma dos dois dias ($U=5,5$; $p=0,01$). Também houve aumento no comportamento de autolimpeza ($K_3= 14,2$; $p=0,003$) nos dois dias avaliados (DPN3 $p = 0,007$; DPN5 $p = 0,02$) e na soma dos dois dias ($U=2$; $p = 0,003$).

Comportamento	DPN3		
	Controle	Violência	<i>p</i>
Amamentação com dorso arqueado (High)	528 (348-617)	0 (0-0)	< 0,001 ***
Amamentação relaxada sobre os filhotes (blanket)	276 (120-340)	74 (0-300)	> 0,05
Amamentação em Supino	0 (0-0)	0 (0-0)	> 0,05
Amamentação Total	467 (423-900)	74 (0-300)	0,006 ***
High/Amamentação Total	0,69 (0,51-0,72)	0 (0-0)	< 0,0001 ***
Genitora no Ninho	900 (490-900)	187 (46-347)	0,009 **
Construindo o Ninho	0 (0-13)	144 (11-241)	0,03 *
Lambendo os Filhotes	17 (1-140)	52 (10-182)	> 0,05
Autolimpeza	7 (4-38)	171 (105-289)	0,007 ***

Tabela 6 – Comportamento Maternal nos 15 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 3 (DPN3). Dados apresentados em segundos - mediana (interquartil 25 – interquartil 75). Controle n=6; Violência n=8.

Comportamento	DPN5		
	Controle	Violência	<i>p</i>
Amamentação com dorso arqueado (High)	324 (40-560)	0 (0-0)	0,02 *
Amamentação relaxada sobre os filhotes (blanket)	360 (251-782)	0,5 (0-163)	0,005 **
Amamentação em Supino	0 (0-0)	0 (0-0)	> 0,05
Amamentação Total	900 (644-900)	0,5 (0-163)	0,005 *
High/Amamentação Total	0,5 (0,05-0,62)	0 (0-0)	0,02 *
Genitora no Ninho	900 (662-900)	93 (16-280)	0,03 *
Construindo o Ninho	0 (0-0)	11 (1-497)	0,015 *
Lambendo os Filhotes	30 (0-331)	5 (0-103)	> 0,05
Autolimpeza ¹	90 ± 50	291 ± 71	0,02*

Tabela 7 – Comportamento Maternal nos 15 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 5 (DPN5). Dados apresentados em segundos - mediana (interquartil 25 – interquartil 75) exceto ¹ apresentado em média ± erro padrão da média. Controle n=6; Violência n=8

Comportamento	Soma de todos os dias		
	Controle	Violência	p
Amamentação com dorso arqueado (High)	573 (573-966)	0 (0-0)	0,0003 ***
Amamentação relaxada sobre os filhotes (blanket) ¹	695,1 ± 151,2	196,4 ± 71,56	0,007 **
Amamentação em Supino	0 (0-0)	0 (0-0)	> 0,05
Amamentação Total ¹	1494 ± 147,5	210,4 ± 73,28	< 0,0001 ****
High/Amamentação Total	0,53 (0,22-0,65)	0 (0-0)	0,003 **
Genitora no Ninho ¹	1510 ± 146,6	353,5 ± 66,05	< 0,0001 ****
Construindo o Ninho	0 (0-13)	151 (14-738)	0,01 **
Lambendo os Filhotes ¹	183,3 ± 64,30	133,7 ± 47,33	> 0,05
Autolimpeza	74 (35-160)	395 (322-728)	0,003 **

Tabela 8 – Comportamento Maternal nos 15 minutos posteriores a retirada do macho intruso na soma dos dias de vida pós-natal 3 (DPN3) e 5 (DPN5) Dados apresentados em segundos - mediana (interquartil 25 – interquartil 75) exceto ¹ apresentado em média ± erro padrão da média. Controle n=6; Violência n=8.

4.1.3. Dosagens bioquímicas - genitora

As concentrações de corticosterona plasmática livre, ligada e total das genitoras no dia 5 de vida pós-parto são apresentado na figura 4. As frações ligada em relação ao total e livre em relação ao total são apresentadas na figura 5.

Não houve diferença entre os grupos na concentração plasmática de corticosterona livre (Teste t de Student: $t_{14}=0,40$; $p=0,7$), ligada ($t_{14}=1,40$; $p=0,183$), total ($t_{14}=0,7$; $P=0,5$). Controle (C) n=8; Violência (V) n=8. As médias e o erro padrão da média foram como se segue: Corticosterona Livre C: 133,1 ng/ml ± 17,57 vs V: 123,2 ng/ml ± 17,39; Ligada C: 166,8 ng/ml ± 23,45 vs V: 215,7 ng/ml ± 25,88; Total C: 299,8 ng/ml ± 36,66 vs V: 338,9 ng/ml ± 42,65.

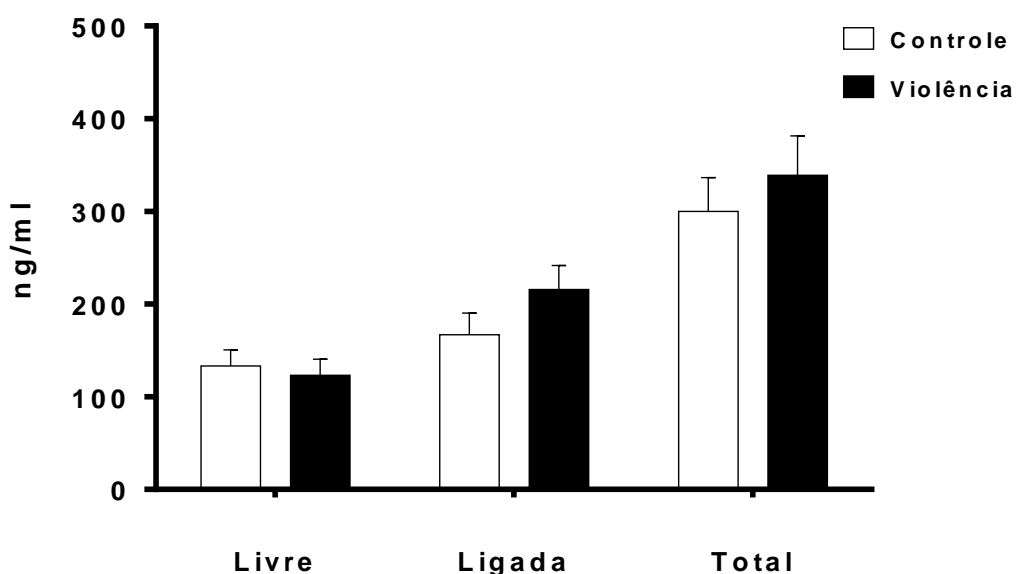


Figura 4 – Corticosterona plasmática livre, ligada e total nas genitoras no dia 5 pós-parto – Dados apresentados em média \pm erro padrão da média.

As genitoras do grupo violência apresentaram uma maior fração de corticosterona ligada em relação ao total quando comparadas com o grupo controle (Teste t de Student $t_{14}=2,508$; $p=0,025$) e, conseqüentemente, uma menor fração livre em relação ao total ($t_{14}=2,508$; $p=0,025$). A média da fração ligada foi de $55,64\% \pm 3,08$ $n=8$ nas genitoras controle, passando a $64,04\% \pm 1,32$ $n=8$ nas genitoras do grupo violência. De forma complementar, a média da fração livre nas genitoras controle é de $44,36\% \pm 3,08$ contra $35,96\% \pm 1,32$ das genitoras do grupo violência.

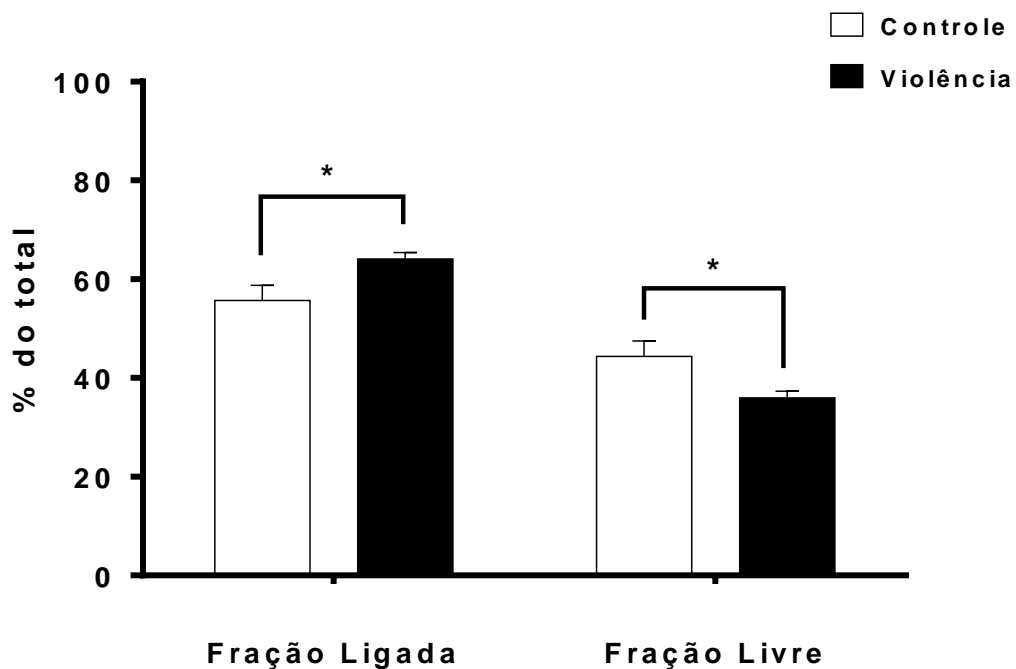


Figura 5 – Fração de corticosterona plasmática ligada em relação a total e livre em relação a total em genitoras no dia 5 pós-parto. Dados apresentados em média \pm EPM; n=8.

Os dados de prolactina plasmática das genitoras no dia 5 de vida pós-parto são apresentados na figura 6. Não houve efeito da intervenção sobre a concentração plasmática de prolactina (Teste t de Student: $t_{12}=0,58$; $p = 0,57$). A média da concentração de prolactina plasmática no grupo controle foi de $8,146 \text{ ng/ml} \pm 1,428$ n=7 e no grupo violência foi de $9,456 \text{ ng/ml} \pm 1,742$ n=7.

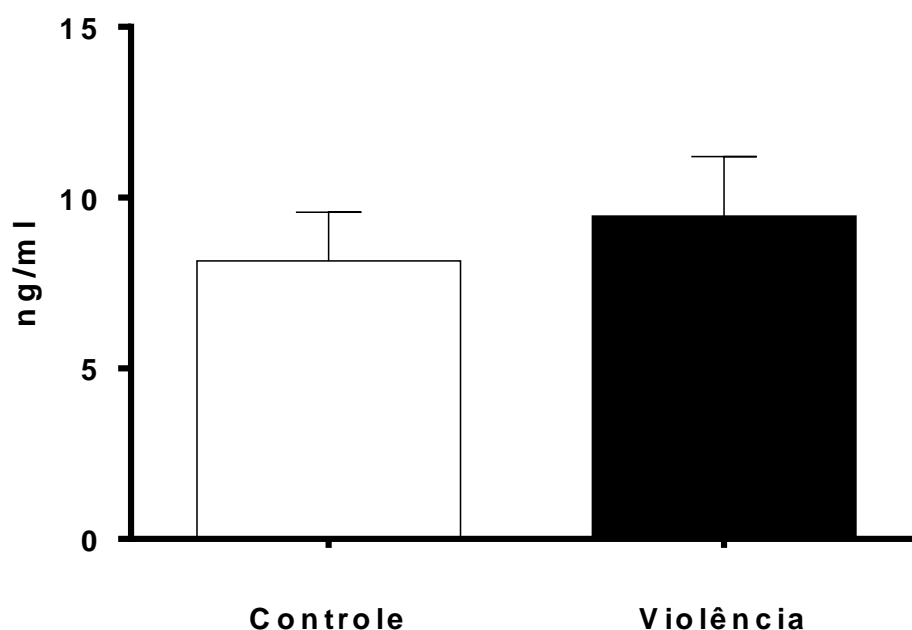


Figura 6 – Prolactina plasmática em genitoras no dia 5 pós-parto. Dados apresentados em média \pm EPM. n=7.

Os dados referentes aos níveis plasmáticos de ocitocina nas genitoras no dia 5 pós-parto são apresentados na figura 7. Não foram encontradas diferenças significativas ($U= 14$; $p=0,23$) para as medianas referentes a concentração plasmática de ocitocina entre as genitoras do grupo controle (165,2 ng/ml IQ25 63,2 IQ75 356,7 n=6) em comparação com as genitoras do grupo SS (114 ng/ml IQ25 66,9, IQ75 120 n=8). No entanto houve grande diferença na variabilidade interna de cada grupo (Teste F para comparação de variâncias $F_{5,7}=34$; $p=0,0002$).

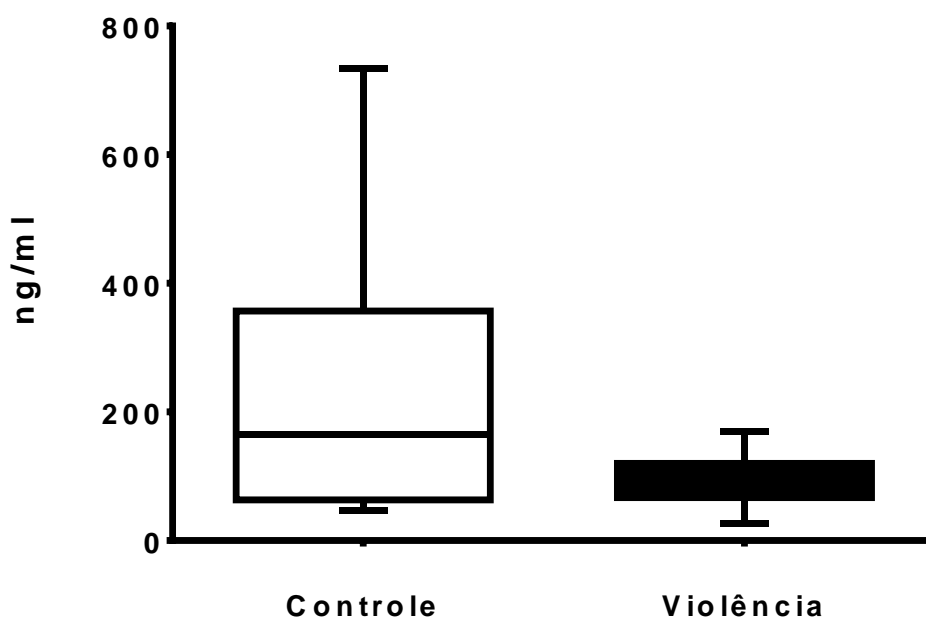


Figura 7 – Ocitocina plasmática em genitoras no dia 5 pós-parto. C: n=6 v.s. V: n=8.

4.1.4. Dosagens bioquímicas - filhotes

A concentração plasmática de corticosterona livre em filhotes de 5 dias, 30 minutos após a retirada do intruso, é apresentada na figura 8. O grupo violência apresentou concentrações plasmáticas mais baixas de corticosterona livre em comparação com o grupo controle (ANOVA de duas vias: $F_{\text{intervenção}1,24}=7,456$; $p<0,05$) sendo o efeito da intervenção confirmada pelo pós-teste apenas no gênero masculino (menor diferença significativa de Fisher $t_{24}=2.649$; $p<0,05$). Machos Controle: n=6; 12,19 ng/ml \pm 2,66 vs Violência: n=8; 5,56 ng/ml \pm 0,88; Fêmeas Controle: n=6; 9.63 ng/ml \pm 2,5 vs Violência: n=8; 6,59 ng/ml \pm 1,13.

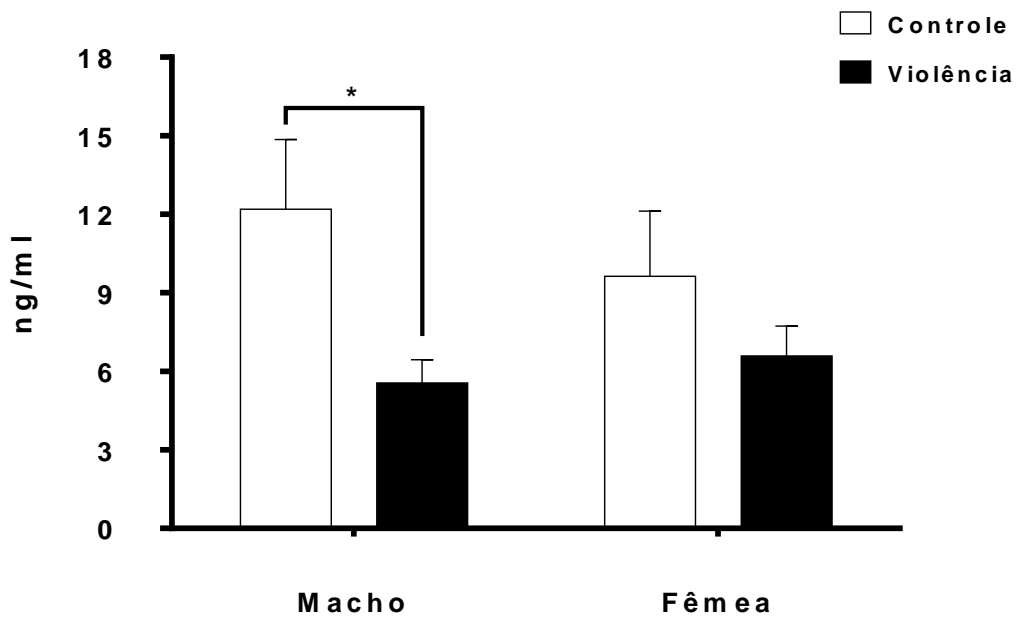


Figura 8 – Corticosterona plasmática livre em filhotes aos 5 dias de vida pós-natal. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média.. Machos Controle: n=6; Violência: n=8; Fêmeas Controle: n=6; Violência: n=8;.

As concentrações plasmática de prolactina em filhotes de 5 dias são apresentadas na figura 9. Houve efeito do gênero nos níveis de prolactina, como esperado (ANOVA de duas vias $F_{\text{gênero}1,24}=50,45$; $p<0,0001$). No entanto, não houve efeito da intervenção sobre os níveis de prolactina em nenhum dos gêneros (ANOVA de duas vias $F_{\text{intervenção}1,24}=0,428$ $p=0,52$). Machos Controle: n=7; 1,93 ng/ml \pm 0,79 vs Violência: n=7; 2,44 ng/ml \pm 0,431; Fêmeas Controle: n=7; 24,44 ng/ml \pm 4,3 vs Violência: n=7; 28,4 ng/ml \pm 5,23.

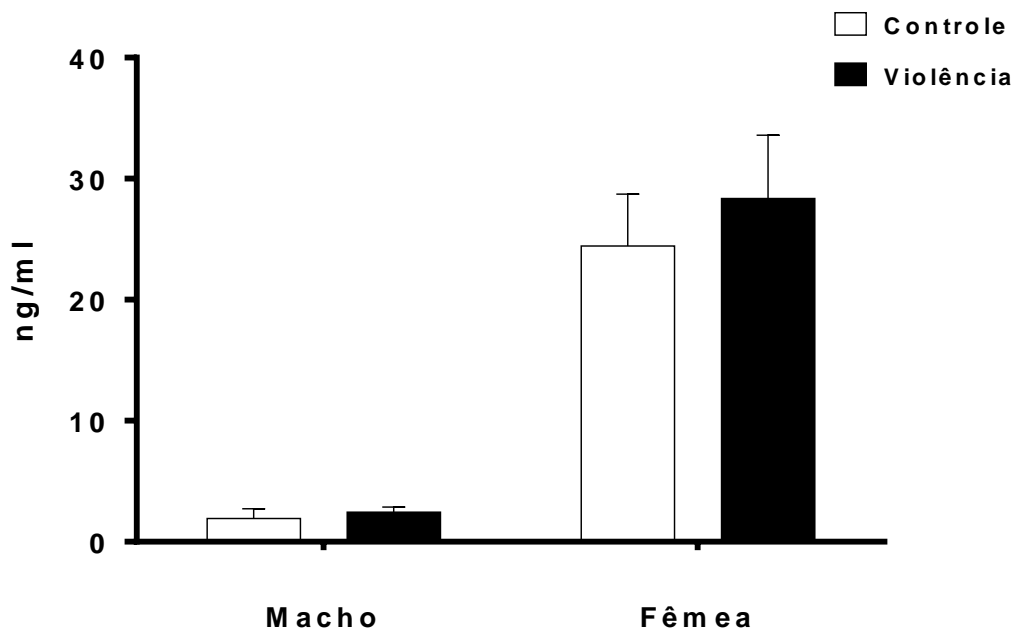


Figura 9 – Prolactina plasmática em filhotes aos 5 dias vida pós-natal. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média. n=7.

As concentrações de ocitocina plasmática em filhotes de 5 dias são apresentadas na figura 10. Não houve efeito de gênero ($F_{\text{gênero}1,24}=0,75$; $p=0,395$) e nem da intervenção sobre a variável. ($F_{\text{intervenção}1,24}=1,051$; $p=0,32$). Machos Controle: n=7; 117,65 pg/ml \pm 16 vs Violência: n=7; 86,4 pg/ml \pm 25,18; Fêmeas Controle: n=6; 123,76 9g/ml \pm 23 vs Violência: n=8; 114,10 pg/ml \pm 14,5.

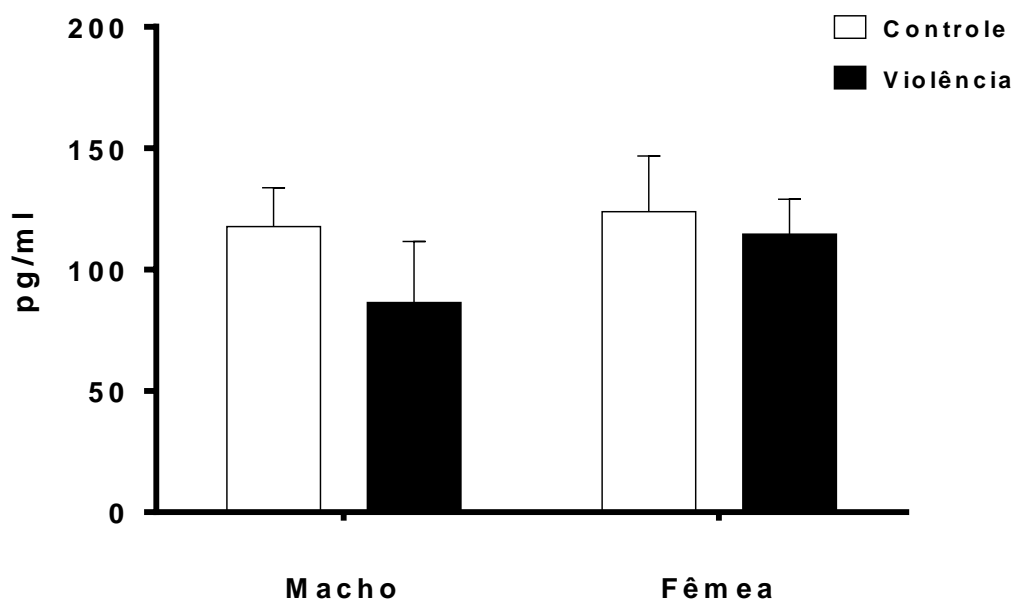


Figura 10 – Ocitocina plasmática em filhotes de 5 dias de vida pós-natal. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média. Machos Controle: n=7; Violência: n=7; Fêmeas Controle: n=6; Violência: n=8.

4.1.1. Correlações modelo 1

Com o objetivo de compreender as relações entre as variáveis avaliadas no comportamento maternal e as alterações bioquímicas, foi realizado um estudo de correlação entre elas, usando os grupos controle e violência, conforme descrito na seção de materiais e métodos. As correlações entre comportamento maternal e a fração de corticosterona plasmática ligada em relação ao total das genitoras são apresentadas na tabela 9. As mesmas correlações foram avaliadas em relação à à ocitocina plasmática da genitora (tabela 10) e corticosterona plasmática em filhotes machos (tabela 11).

Fração Ligada de Corticosterona Genitoras			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes DPN5	-0,627	0,016	14
Genitora no Ninho DPN3 + DPN5	-0,618	0,018	14
Genitora no Ninho DPN5	-0,598	0,024	14
Amamentação Total DPN3 + DPN5	-0,574	0,032	14
Amamentação com Dorso Arqueado DPN3	-0,564	0,036	14
Amamentação Total DPN5	-0,558	0,038	14
Autolimpeza DPN3 + DPN5	0,549	0,042	14

Tabela 9 – Variáveis correlacionadas à variável fração ligada de corticosterona nas genitoras dos grupos controle e violência, aos 5 dias de vida pós-parto, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal;

Níveis Plasmáticos de Ocitocina Genitora			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Amamentação com Dorso Arqueado DPN3	0,588	0,035	13

Tabela 10 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de ocitocina nas genitoras dos grupos controle e violência, aos 5 dias de vida pós-parto, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal;

Níveis Plasmáticos de Corticosterona Filhotes Machos			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Fração Ligada de Corticosterona da Genitora	-0,656	0,011	14
Amamentação Total DPN3	0,55	0,042	14
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes DPN3 + DPN5	0,553	0,04	14
Genitora no Ninho DPN3	0,536	0,048	14

Tabela 11 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes machos aos 5 dias de vida pós-natal, nos grupos controle e violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal;

Para avaliar uma possível interação entre os comportamentos de amamentação e a fração ligada de corticosterona na determinação da concentração plasmática de corticosterona dos filhotes machos, realizamos modelagem linear como descrito nos materiais e métodos. Para corticosterona dos filhotes machos, apenas a variável Fração Ligada de corticosterona da genitora foi vista como preditor, sendo esta responsável por 42% do efeito ($sr^2=0,42$ $p=0,008$), sendo que variação da variável dependente é inversa à variação da variável independente (Tabela 12).

Níveis Plasmáticos de Corticosterona Filhotes Machos							
Variável	B	EP	Beta	p	Zero-Order	sr ²	Contribuição
Constante	59,974	18,529		0,0080			
Fração Ligada Genitora	-72,698	25,617	-0,650	0,0160	-0,65	0,42	42%

R² = 0,42

Tabela 12 – Resultados da modelagem por regressão linear Modelo I para a variável dependente níveis plasmáticos de corticosterona dos filhotes machos.

4.1.2. Correlações modelo 2

Buscando compreender os efeitos do comportamento agressivo e do comportamento maternal sobre as variáveis bioquímicas avaliadas, um estudo de correlação foi realizado utilizando apenas o grupo violência. As variáveis correlacionadas à fração ligada de corticosterona plasmática das genitoras são apresentadas na tabela 13. A mesma análise foi repetida para as variáveis concentração plasmática de ocitocina nas genitoras (tabela 14) e concentração plasmática de corticosterona em filhotes (tabela 15).

Fração Ligada de Corticosterona da Genitora			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Subjugação do Intruso (Dur.) DPN5	-0,81	0,015	8
Autolimpeza DPN5	0,782	0,022	8
Ataques (Freq) DPN3 + DPN5	-0,762	0,028	8
Autolimpeza DPN3+DPN5	0,739	0,036	8
Subjugação do Intruso (Freq.) DPN5	-0,738	0,037	8
Construindo Ninho DPN5	-0,701	0,005	8

Tabela 13 – Variáveis correlacionadas à variável fração ligada de corticosterona nas genitoras do grupo violência, aos 5 dias de vida pós-parto, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; Freq.= frequência; Dur. = duração.

Níveis Plasmáticos de Ocitocina da Genitora			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Genitora no Ninho DPN3 + DPN5	-0,942	0,0001	8
Amamentação Total DPN3 + DPN5	-0,938	0,001	8
Lambendo os Filhotes DPN3 + DPN5	-0,932	0,001	8
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes DPN3 + DPN5	-0,913	0,002	8
Lambendo os Filhotes DPN3	-0,759	0,029	8

Tabela 14 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de ocitocina nas genitoras do grupo violência, aos 5 dias de vida pós-parto, através do coeficiente de correlação de Pearson.

Níveis Plasmáticos de Corticosterona Filhotes Machos			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Subjugação da Genitora (Dur.) DPN5	-0,799	0,017	8
Interação Macho-filhotes (Dur). soma de todos os dias	0,766	0,027	8

Tabela 15 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes machos do grupo violência, aos 5 dias de vida pós-natal, através do coeficiente de correlação de Spearman.

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1. Análise de comportamento agressivo-maternal

Os resultados referentes a descrição do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso se encontram apresentados na tabela 16, 17 e 18. Como esperado, houve uma resposta consistente das fêmeas contra os machos intrusos.

Comportamento	DPN3			DPN5		
	Media	EPM	Mínimo/Máximo	Media	EPM	Mínimo/Máximo
Agressivo Total (Freq.)	7,8	1,65	0/20	10,5	1,41	0/20
Mordidas (Freq.)	1,7	0,46	0/5	3,4	1,27	0/15
Ataques (Freq.)	3,1	0,78	0/9	3,8	0,64	0/8
Agressivo Total (Dur.)	14,4	4,30	0/53	20,6	4,53	0/59
Subjugação do Macho (Dur.)	2,7	1,21	0/14	8,6	4,94	0/52
Subjugação da Genitora (Dur.)	11,9	5,77	0/47	1,9	0,92	0/10
Autolimpeza (Dur.)	38,1	8,37	3/89	26,3	7,16	0/66
Interação Genitora-Filhotes (Dur.)	101,0	27,60	14/252	86,0	25,61	0/333
Interação Intruso-Filhotes (Dur.)	19,8	7,88	0/85	7,7	5,02	0/55
Interação Intruso-Genitora (Dur.)	45,5	7,62	14/105	23,6	10,71	0/115

Tabela 16 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso nos dias 3, 5 de vida pós-natal. Freq. – frequência; Dur. – duração. n=12

Comportamento	DPN7			DPN9		
	Média	EPM	Mínimo/Máximo	Média	EPM	Mínimo/Máximo
Agressivo Total (Dur.)	28,3	6,73	0/82	31,1	8,11	0/95
Agressivo Total (Freq.)	10,7	2,17	0/25	11,8	2,25	1/24
Mordidas (Freq.)	3,1	1,30	0/15	3,6	1,04	0/12
Ataques (Freq.)	3,8	0,81	0/8	3,6	0,75	0/9
Subjugação do Macho (Dur.)	2,7	0,72	0/6	1,0	0,81	0/9
Subjugação da Genitora (Dur.)	5,9	2,28	0/22	4,6	2,02	0/23
Autolimpeza (Dur.)	40,3	9,50	0/124	43,5	6,12	13/82
Interação Genitora-Filhotes (Dur.)	86,4	19,17	3/205	61,8	16,83	5/166
Interação Intruso-Filhotes (Dur.)	10,5	5,02	0/57	19,3	14,00	0/171
Interação Intruso-Genitora (Dur.)	28,4	14,84	0/183	28,6	6,78	0/67

Tabela 17 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso nos dias 7, 9 de vida pós-natal. Freq. – frequência; Dur. – Duração. n=12

Comportamento	Soma de todos os dias		
	Média	EPM	Mínimo/Máximo
Agressivo Total (Dur.)	94,3	44,5	1/146
Agressivo Total (Freq.)	40,8	16,9	1/65
Mordidas (Freq.)	11,8	12,1	0/40
Ataques (Freq.)	14,3	6,6	0/26
Subjugação do Macho (Dur.)	14,5	17,2	0/54
Subjugação da Genitora (Dur.)	24,3	29,9	0/86
Autolimpeza (Dur.)	148,1	77,5	52/302
Interação Genitora-Filhotes (Dur.)	335,2	216,7	32/661
Interação Intruso-Filhotes (Dur.)	57,4	56,1	6/182
Interação Intruso-Genitora (Dur.)	127,0	112,9	26/441

Tabela 18 – Estatística descritiva do comportamento agressivo maternal contra o macho intruso, soma dos dias 3, 5, 7, 9 de vida pós-natal. Freq. – frequência; Dur. – duração. n=12

4.2.2. Análise de comportamento maternal

Os resultados da avaliação do comportamento maternal referentes aos 30 minutos posteriores ao intruso, ou horário equivalente nas ninhadas controle, estão descritos nas tabelas 19, 20, 21, 22 e 23, para os dias 3, 5, 7 e 9 de vida pós-natal e soma de todos os dias, respectivamente. O horário de registro pós-intruso ou equivalente será referido como Horário 1 (H1). Os dados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas, no entanto, os dados são apresentados separadamente em cada dia para facilitar a visualização. O valor de p é relativo ao pós-teste da menor diferença significativa de Fisher. No caso da amamentação em posição supino, os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, uma vez que são dados não paramétricos. Um total de 9 ninhadas no grupo controle e 12 no grupo violência foram analisadas.

A intervenção levou a redução da amamentação com dorso arqueado ($F_{\text{intervenção}_{1,19}} = 35,6$; $p < 0,0001$) nos dias 3 ($p = 0,0002$), 5 ($p = 0,0001$) e no somatório de todos os dias ($p = 0,0001$). Também houve redução da amamentação total ($F_{\text{intervenção}_{1,19}} = 24,2$; $p < 0,0001$) nos dias 3 ($p = 0,003$), 5 ($p = 0,0008$) e soma de todos os dias ($p = 0,0001$). A fração de amamentação de alta qualidade (dorso arqueado – high) em relação ao total de amamentação também foi reduzida ($F_{\text{intervenção}_{1,19}} = 13,6$; $p = 0,002$) no DPN3 ($p = 0,02$), DPN5 ($p = 0,001$) e soma de todos os dias ($p = 0,002$). O tempo de permanência de genitora no ninho sofreu redução ($F_{\text{intervenção}_{1,19}} = 14,4$; $p = 0,001$) nos dias 3 ($p = 0,02$), 5 ($p = 0,003$) e soma de todos os dias ($p = 0,002$).

A duração do comportamento de construção do ninho foi maior no grupo violência ($F_{\text{intervenção}_{0,1,19}} = 14$; $p = 0,001$) nos dias 3 ($p = 0,01$) e na soma de todos os dias ($p=0,002$). A intervenção levou a um aumento do comportamento de autolimpeza ($F_{\text{intervenção}_{0,1,19}} = 13$; $p = 0,002$) nos dias 3 ($p = 0,014$), 9 ($p = 0,49$) e no somatório de todos os dias ($p = 0,002$).

Comportamento	DPN3 (H1)		p
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	1008 ± 145,9	243,9 ± 80,1	0,0002 ***
Amamentação relaxada sobre os filhotes	508,8 ± 130,8	551,1 ± 130,8	> 0,05
Amamentação em Supino	77,9 ± 75,8	0 ± 0	> 0,05
Amamentação Total	1549 ± 93,1	794,98 ± 103,2	0,003 **
High/Amamentação Total	0,62 ± 0,077	0,30 ± 0,105	0,02 *
Genitora no Ninho	1608,3 ± 86,6	1024,2 ± 94,6	0,02 *
Construindo o Ninho	27,8 ± 20,8	215,8 ± 50,8	0,01 **
Lambendo os Filhotes	167,3 ± 48,3	285,9 ± 39,6	> 0,05
Autolimpeza	107,5 ± 26,9	351,1 ± 58,9	0,014 *

Tabela 19 – Comportamento maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 3 (DPN3) – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. Controle n=9 e violência n=12

Comportamento	DPN5 (H1)		<i>p</i>
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	1172,2 ± 193	288,9 ± 136,7	0,0001 ****
Amamentação relaxada sobre os filhotes	394,1 ± 127,4	388,9 ± 56,1	> 0,05
Amamentação em Supino	11,9 ± 11,9	0 ± 0	> 0,05
Amamentação Total	1578,2 ± 197,1	677,8 ± 161,8	0,0008 ***
High/Amamentação Total	0,66 ± 0,11	0,21 ± 0,091	0,001 ***
Genitora no Ninho	1592,2 ± 195,0	815,17 ± 156	0,003 **
Construindo o Ninho	8,3 ± 5,6	272,4 ± 82,5	0,0006 ***
Lambendo os Filhotes	174,3 ± 90,4	224,1 ± 55,7	> 0,05
Autolimpeza	116,6 ± 53,1	280,8 ± 40,4	> 0,05

Tabela 20 – Comportamento maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 5 (DPN5) – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. Controle n=9 e violência n=12

Comportamento	DPN7 (H1)		<i>p</i>
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	327,6 ± 139,6	299,6 ± 99,4	> 0,05
Amamentação relaxada sobre os filhotes	421,5 ± 125,9	585 ± 99,3	> 0,05
Amamentação em Supino	409,6 ± 231,7	0 ± 0	> 0,05
Amamentação Total	1158 ± 243,4	884,6 ± 158,6	> 0,05
High/Amamentação Total	0,22 ± 0,081	0,23 ± 0,067	> 0,05
Genitora no Ninho	1241,2 ± 230,4	986,5 ± 165,9	> 0,05
Construindo o Ninho	21,4 ± 11,4	164,9 ± 37,9	> 0,05
Lambendo os Filhotes	184,9 ± 57,1	365,7 ± 69,9	> 0,05
Autolimpeza	325,1 ± 50,2	378,05 ± 59,7	> 0,05

Tabela 21 – Comportamento maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 7 (DPN7) – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. Controle n=9 e violência n=12

Comportamento	DPN9 (H1)		p
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	463,2 ± 176,5	247,4 ± 146,6	> 0,05
Amamentação relaxada sobre os filhotes	465,9 ± 74,3	239,5 ± 90,5	> 0,05
Amamentação em Supino	225,8 ± 113,9	166,3 ± 149,4	> 0,05
Amamentação Total	1155 ± 230,9	653,3 ± 216,9	> 0,05
High/Amamentação Total	0,28 ± 0,10	0,18 ± 0,09	> 0,05
Genitora no Ninho	1197,8 ± 222,9	765,6 ± 208,4	> 0,05
Construindo o Ninho	29,5 ± 28,4	192,9 ± 66	> 0,05
Lambendo os Filhotes	202,2 ± 50,9	161,7 ± 54,5	> 0,05
Autolimpeza	131,8 ± 50,2	324,6 ± 97,7	0,049 *

Tabela 22 – Comportamento maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso no dia de vida pós-natal 9 (DPN9) – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. Controle n=9 e violência n=12

Comportamento	Somatório (H1)		p
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	2971 ± 291,9	1080 ± 167,2	0,0001 ****
Amamentação relaxada sobre os filhotes (blanket)	1790 ± 176,9	1764 ± 182,4	> 0,05
Amamentação em Supino ¹	666 (8-1403)	0 (0-0)	0,009 **
Amamentação Total	5487 ± 343,0	3011 ± 351,6	0,0001 ****
High/Amamentação Total	0,44 ± 0,045	0,23 ± 0,036	0,002 **
Genitora no Ninho	5640 ± 347,8	3591 ± 386,5	0,002 ***
Construindo o Ninho*	39 (1-121)	889 (200-1271)	0,0002 ***
Lambendo os Filhotes	728,7 ± 141,9	1037 ± 111,7	> 0,05
Autolimpeza	681,0 ± 111,6	1335 ± 132,1	0,002 ***

Tabela 23 – Somatório do comportamento maternal nos 30 minutos posteriores a retirada do macho intruso, ou equivalente, nos dias de vida pós-natal 3, 5, 7 e 9 – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. ¹ dados não paramétricos analisados pelo teste de Mann Whitney.

Os resultados do comportamento maternal 7 horas após o início do ciclo claro se encontram apresentados nas tabelas 24, 25, 26 e 27 para os dias 3, 5, 7 e 9 de vida respectivamente. Os registros efetuados 7 horas após o início do ciclo claro serão referidos como Horário 2 (H2). Os dados foram avaliados por ANOVA de medidas repetidas seguidas do pós-teste da menor diferença significativa de Fisher. Não houve efeito da intervenção em nenhuma das variáveis analisadas no segundo horário de análise (H2). Um total de 11 ninhadas no grupo controle e 12 ninhadas no grupo violência foram analisadas.

Comportamento	DPN3 (H2)		p
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	613,9 ± 161,1	641,1 ± 146,1	> 0,05
Amamentação relaxada sobre os filhotes	589,6 ± 130,4	494,8 ± 119,6	> 0,05
Amamentação em Supino	47,4 ± 47,4	52 ± 49,6	> 0,05
Amamentação Total	1250,9 ± 173	1187,9 ± 152,3	> 0,05
High/Amamentação Total	0,43 ± 0,105	0,49 ± 0,09	> 0,05
Genitora no Ninho	1281,1 ± 166,5	1238,7 ± 160	> 0,05
Construindo o Ninho	102,2 ± 44,5	47,1 ± 27,1	> 0,05
Lambendo os Filhotes	110,7 ± 32,7	114,7 ± 41,7	> 0,05
Autolimpeza	163,5 ± 45,9	160,2 ± 41	> 0,05

Tabela 24 – Comportamento maternal 7 horas após o início do ciclo claro no dia de vida pós-natal 3 (DPN3) – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. Controle n=11 e violência n=12

Comportamento	DPN5 (H2)		p
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	439,9 ± 118,6	538,8 ± 118,5	> 0,05
Amamentação relaxada sobre os filhotes	782,8 ± 134,3	568,6 ± 116,7	> 0,05
Amamentação em Supino	44 ± 35,3	0 ± 0	> 0,05
Amamentação Total	1266 ± 176,3	1107,4 ± 198,6	> 0,05
High/Amamentação Total	0,32 ± 0,09	0,45 ± 0,09	> 0,05
Genitora no Ninho	1360,9 ± 162,9	1142,2 ± 200	> 0,05
Construindo o Ninho	74,1 ± 35	6 ± 4	> 0,05
Lambendo os Filhotes	243,2 ± 55,2	166,4 ± 40,5	> 0,05
Autolimpeza	181 ± 44,7	230,7 ± 63,7	> 0,05

Tabela 25 – Comportamento maternal 7 horas após o início do ciclo claro no dia de vida pós-natal 5 (DPN5) – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. Controle n=11 e violência n=12

Comportamento	DPN7 (H2)		p
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	682,3 ± 183	601,1 ± 127,9	> 0,05
Amamentação relaxada sobre os filhote	553,9 ± 97,6	732,3 ± 115	> 0,05
Amamentação em Supino	304,3 ± 183,6	40,4 ± 25,9	> 0,05
Amamentação Total	1540,5 ± 91,3	1737,7 ± 148,3	> 0,05
High/Amamentação Total	0,41 ± 0,11	0,39 ± 0,08	> 0,05
Genitora no Ninho	1553,3 ± 89	1387 ± 148,3	> 0,05
Construindo o Ninho	0,6 ± 0,4	14,4 ± 8,7	> 0,05
Lambendo os Filhotes	130,6 ± 36	132,6 ± 53,9	> 0,05
Autolimpeza	123,6 ± 48,9	82,7 ± 27,1	> 0,05

Tabela 26 – Comportamento maternal 7 horas após o início do ciclo claro no dia de vida pós-natal 7 (DPN7) – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. . Controle n=11 e violência n=12

Comportamento	DPN9 (H2)		p
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	204,6 ± 117,8	266,4 ± 106,5	> 0,05
Amamentação relaxada sobre os filhotes (blanket)	529,5 ± 155,1	324,5 ± 61,3	> 0,05
Amamentação em Supino¹	245 ± 111	283,7 ± 157,5	> 0,05
Amamentação Total	979,1 ± 217,9	874,6 ± 213	> 0,05
High/Amamentação Total	0,16 ± 0,08	0,2 ± 0,08	> 0,05
Genitora no Ninho	1002,2 ± 224,4	884,4 ± 212,4	> 0,05
Construindo o Ninho	69,3 ± 61,6	23,1 ± 12,1	> 0,05
Lambendo os Filhotes	54,4 ± 19	110,6 ± 23,2	> 0,05
Autolimpeza	44,1 ± 15,4	90,5 ± 35,3	> 0,05

Tabela 27 – Comportamento maternal 7 horas após o início do ciclo claro no dia de vida pós-natal 9 (DPN9) – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. ¹ dados não paramétricos analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

O somatório de todos os dias para cada comportamento no horário H2 está apresentado na tabela 28. Os dados foram analisados pelo teste t de Student quando seguiam distribuição normal e pelo teste de Mann Whitney quando seguiam distribuição não paramétrica. Não houve efeito da intervenção para os comportamentos avaliados no segundo horário (H2).

Comportamento	Somatório (H2)		p
	Controle	Violência	
Amamentação com dorso arqueado (High)	1941 ± 281,3	2047 ± 307,2	> 0,05
Amamentação relaxada sobre os filhotes (blanket)	2456 ± 281,6	2120 ± 191,8	> 0,05
Amamentação em Supino ¹	640,6 ± 226,8	376,1 ± 184,2	> 0,05
Amamentação Total	5037 ± 382,6	4544 ± 435,2	> 0,05
High/Amamentação Total	0,33 ± 0,03	0,38 ± 0,04	> 0,05
Genitora no Ninho	5197 ± 371,9	4652 ± 444,6	> 0,05
Construindo o Ninho	5197 ± 371,9	4652 ± 444,6	> 0,05
Lambendo os Filhotes	538,8 ± 70,87	524,2 ± 60,88	> 0,05
Autolimpeza	512,1 ± 88,70	564,1 ± 65,63	> 0,05

Tabela 28 – Somatório do comportamento maternal 7 horas após o início do ciclo claro nos dias de vida pós-natal 3, 5, 7 e 9 – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. ¹ dados não paramétricos analisados pelo teste de Mann-Whitman. Controle n=11 e violência n=12.

O somatório de todos os dias e todos os horários para cada comportamento está apresentado na tabela 29. Os dados foram analisados pelo teste t de Student quando seguiam distribuição normal e pelo teste de Mann Whitney quando seguiam distribuição não paramétrica. Um total de 9 ninhadas no grupo controle e 12 ninhadas no grupo violência foram avaliadas.

A intervenção causou redução dos comportamentos de amamentação com dorso arqueado ($t_{19}=3,2$; $p=0,005$), amamentação total ($t_{19}=3,3$; $p=0,004$), fração de amamentação de alta qualidade (dorso arqueado/total) ($t_{19}=2,3$; $p=0,04$) e tempo de permanência no ninho ($t_{19}=2,7$; $p=0,02$). Ainda levou a um aumento na duração dos comportamentos de construção de ninho ($U=19$; $p = 0,01$) e autolimpeza ($t_{19}=3,9$; $p = 0,001$).

Comportamento	Somatório de todos os dias e horários (H1 + H2)		
	Controle	Violência	p
Amamentação com dorso arqueado (High)	4729 ± 363,8	3127 ± 332,0	0,005 **
Amamentação relaxada sobre os filhotes (blanket)	1351 ± 399,8	542,4 ± 307,9	> 0,05
Amamentação em Supino ¹	1800 (95-1852)	95 (0-569)	> 0,05
Amamentação Total	10322 ± 560,2	7554 ± 596,3	0,004 **
High/Amamentação Total	0,38 ± 0,03	0,31 ± 0,02	0,04 *
Genitora no Ninho	10632 ± 563,4	8244 ± 654,3	0,02*
Construindo o Ninho ¹	183 (44-549)	922 (279-1507)	0,01**
Lambendo os Filhotes	1275 ± 157,1	1562 ± 138,3	> 0,05
Autolimpeza	1157 ± 123,9	1899 ± 136,7	0,001 ***

Tabela 29 – Somatório do Comportamento Maternal em todos os dias e horários avaliados – dados apresentados em tempo médio em segundos ± erro padrão da média. ¹ dados não paramétricos analisados pelo teste de Mann-Whitman. Controle n=9 e violência n=12.

Os padrões de amamentação nos dois grupos são mostrados nas figuras 11, 12 e 13 para amamentação com dorso arqueado, amamentação relaxada sobre os filhotes e amamentação supino respectivamente.

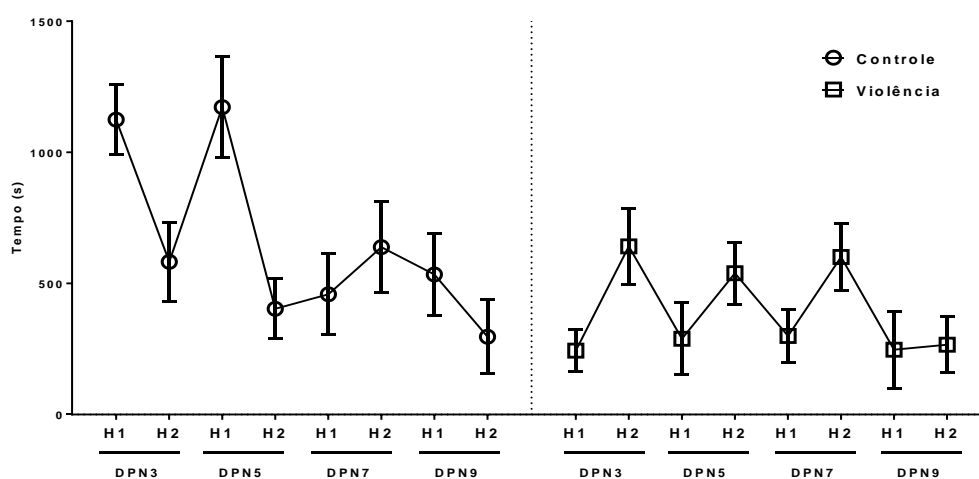


Figura 11 – Padrão de amamentação com dorso arqueado nos grupos controle e violência nos horários H1 (após intruso ou equivalente) e H2 (7h após acendimentos das luzes). Dados apresentados em média ± erro padrão da média. Tempo em segundos.

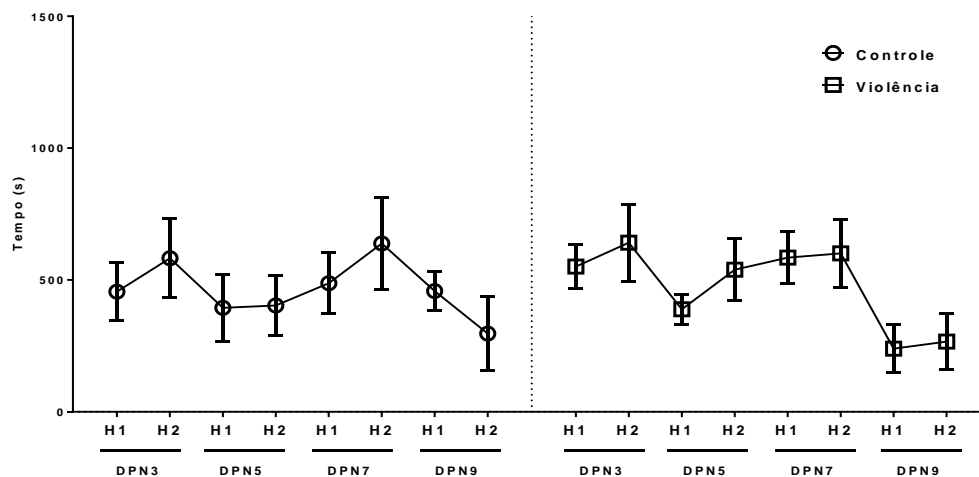


Figura 12 – Padrão de amamentação relaxada sobre os filhotes nos grupos controle e violência nos horários H1 (após intruso ou equivalente) e H2 (7h após acendimentos das luzes). Dados apresentados em média \pm erro padrão da média. Tempo em segundos.

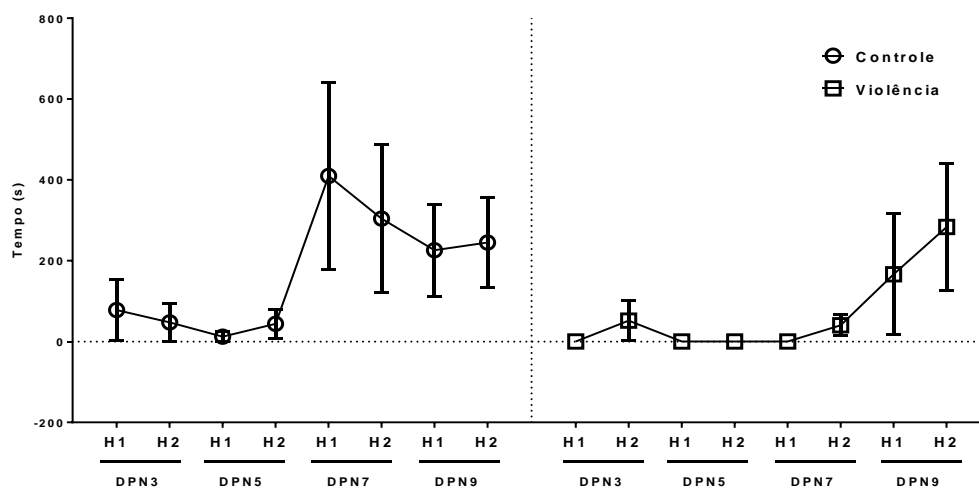


Figura 13 – Padrão de amamentação em posição supino nos grupos controle e violência nos horários H1 (após intruso ou equivalente) e H2 (7h após acendimentos das luzes). Dados apresentados em média \pm erro padrão da média. Tempo em segundos.

4.2.3. Massa corporal das genitoras nos dias 5 e 21 de vida pós-parto

A massa corporal das genitoras foi avaliada nos dias 5 e 22 de vida pós-parto (Figura 14). Os animais utilizados na análise do dia 5 são as genitoras do experimento 1, enquanto que os animais utilizados nas análises do dia 22 são as genitoras do experimento 2. Houve efeito do tempo ($F_{1,32}=23,9$; $p<0,0001$) e da intervenção ($F_{1,32}=4,36$ $p=0,044$) sobre a variável em análise. As genitoras do grupo violência apresentam menor massa corporal no dia 22 de vida pós-parto ($290,3g \pm 3,8$; $n=11$) quando comparadas às genitoras do grupo controle ($318,6g \pm 9,8$; $n= 10$; teste da menor diferença significativa de Fisher; $p=0,005$). Não houve diferença de peso entre as genitoras no DPP 5.

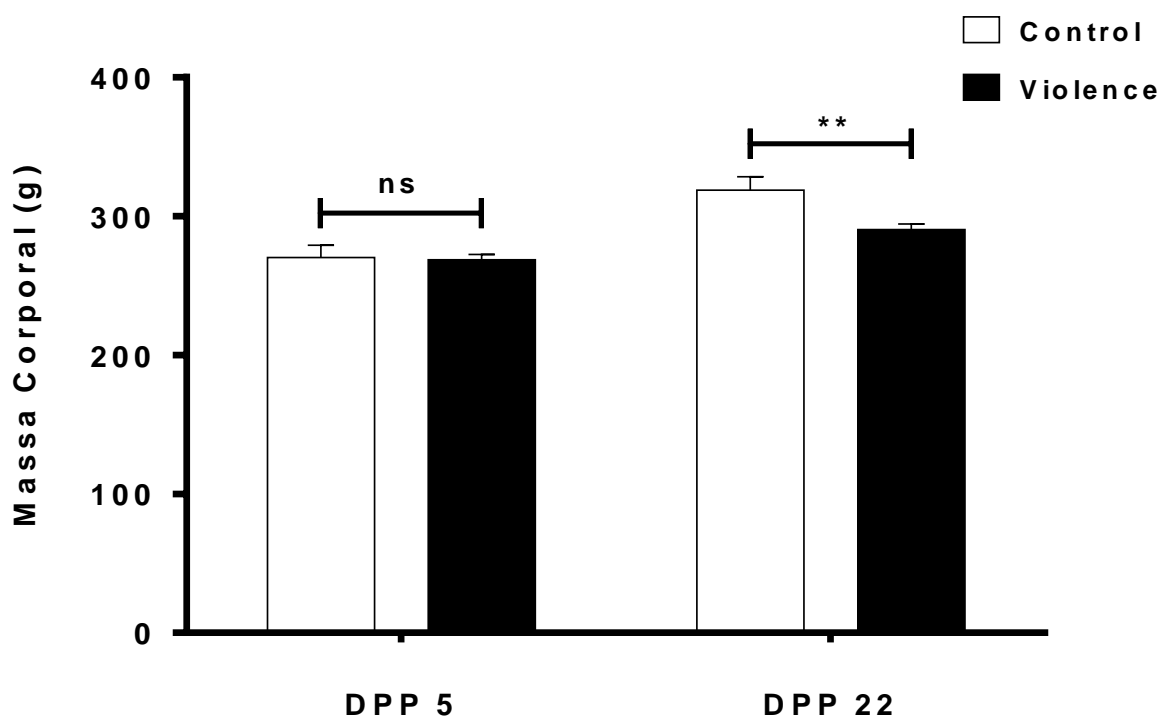


Figura 14 – Massa corporal das genitoras nos dias 5 e 22 de vida pós-parto – Dados apresentados em média \pm erro padrão da média. Houve diferença entre os grupos apenas no dia 22 de vida pós-parto. Controle DPP 5 $n=7$; Violência DPP 5 $n= 8$; Controle DPP 22 $n= 10$; Violência DPP 22: $n=11$. DPP = dia de vida pós-parto.

4.2.4. Comportamento semelhante à ansiedade em filhotes juvenis

Os animais na idade juvenil, 29 dias de vida pós-natal, foram avaliados para comportamento semelhante à ansiedade utilizando-se o protocolo de Labirinto em Cruz Elevado. Os dados de tempo e número de entradas nos braços abertos, fechados e centro são apresentados na tabela 30. Os comportamentos considerados de avaliação de risco (mergulho, levantamento nas patas traseiras, esticar e autolimpeza) são apresentados na tabela 31.

Os animais do grupo violência apresentaram menor frequência de entrada ($F_{\text{intervenção}_{1,60}}=21$; $p<0,0001$) e tempo de permanência ($F_{\text{intervenção}_{1,60}}=24$; $p<0,0001$) nos braços abertos em ambos os gêneros, passando mais tempo que os controles no braço fechado ($F_{\text{intervenção}_{1,60}}=17$; $p=0,0001$).

Comportamento	Machos			Fêmeas		
	Controle	Violência	p	Controle	Violência	p
Braços Abertos (Dur.)	38,86 ± 5,9	16,8 ± 3,5	0,001	37,9 ± 4,8	15,2 ± 3,6	0,0009
Braços Fechados (Dur.)	201 ± 10,3	247,13 ± 7,3	0,002	204,7 ± 13,1	242,1 ± 8,8	0,01
Centro (Dur.)	60,1 ± 7,3	36 ± 5,2	0,02	57,4 ± 9,8	42,6 ± 5,9	> 0,05
Braços Abertos (Freq.)	4,4 ± 0,4	2,5 ± 0,4	0,01	4,6 ± 0,7	1,9 ± 0,5	0,0003
Braços Fechados (Freq.)	8,8 ± 0,8	6,1 ± 0,7	0,017	8,2 ± 0,8	5,5 ± 0,8	0,017
Centro (Freq.)	12,4 ± 1,1	7,6 ± 0,8	0,004	11,8 ± 1,4	6,9 ± 1,1	0,003

Tabela 30 – Tempos e frequências de entrada nos braços abertos, fechados e centro do labirinto em cruz elevado em filhotes machos e fêmeas de 29 dias. Freq. = frequência; Dur. = duração em segundos. Valor de p se refere ao valor calculado pelo pós-teste da mínima diferença significativa de Fisher. Foram avaliados 16 animais de cada gênero em cada grupo.

Houve interação entre a intervenção e gênero na determinação da duração do comportamento de mergulhar ($F_{\text{intervenção} \times \text{gênero}_{1,60}}=13,8$; $p=0,0004$), ocorrendo uma

redução nos machos violência em comparação aos controles ($p=0,003$) e um aumento nas fêmeas violência em relação aos controles ($p=0,034$). Um efeito semelhante ocorreu na frequência do mesmo comportamento ($F_{\text{intervenção} \times \text{gênero}_{1,60}}=24$; $p=0,0007$). Não houve diferença entre os grupos para os comportamentos de levantar nas patas traseiras e autolimpeza (frequência e duração). Para a duração do comportamento de esticar, houve efeito do tratamento ($F_{\text{intervenção}_{1,60}}=23$; $p<0,0001$) e interação ($F_{\text{intervenção} \times \text{gênero}_{1,60}}=7,8$; $p=0,007$), com aumento da duração apenas nos machos ($p<0,0001$). Os resultados para a frequência do comportamento de esticar foram semelhantes. Houve efeito tanto de gênero ($F_{\text{gênero}_{1,60}}=11$; $p=0,0015$) quanto da intervenção ($F_{\text{intervenção}_{1,60}}=9,1$; $p<0,0037$), havendo também interação entre eles ($F_{\text{intervenção} \times \text{gênero}_{1,60}}=4,6$; $p=0,04$). O efeito foi confirmado pelo pós-teste em machos, havendo aumento do comportamento no grupo violência em comparação com o grupo controle ($p=0,0005$).

Comportamento	Machos			Fêmeas		
	Controle	Violência	p	Controle	Violência	p
Mergulhar (Dur.)	13,8 ± 2,1	5,2 ± 0,9	0,003	6,6 ± 1,4	12,7 ± 2,9	0,034
Levantar nas patas traseiras (Dur.)	31,4 ± 3,7	25,4 ± 4,5	> 0,05	19,4 ± 2,5	25,5 ± 3,4	> 0,05
Esticar (Dur.)	10,8 ± 1,8	29 ± 3,5	< 0,0001	13,3 ± 1,6	18,2 ± 2,2	> 0,05
Autolimpeza (Dur.)	11,9 ± 2,6	13,3 ± 3	> 0,05	15,9 ± 3,2	13 ± 3,5	> 0,05
Mergulhar (Freq.)	16,8 ± 2,7	6,2 ± 1,2	0,0001	6,8 ± 1,1	9,3 ± 1,9	> 0,05
Levantar nas patas traseiras (Freq.)	25,8 ± 2	23,3 ± 3,5	> 0,05	13,8 ± 1,5	16 ± 2	> 0,05
Esticar (Freq.)	12,9 ± 2	22,1 ± 2,2	0,0005	10,8 ± 1,3	12,3 ± 1,5	> 0,05
Autolimpeza (Freq.)	4,9 ± 0,9	5,1 ± 1,2	> 0,05	3,4 ± 0,7	3,1 ± 0,7	> 0,05

Tabela 29 – Tempos e frequências dos comportamentos exploratórios associados ao labirinto em cruz elevado em filhotes machos e fêmeas de 29 dias. Freq. = frequência; Dur. = duração em segundos. Valor de p se refere ao valor calculado pelo pós-teste da mínima diferença significativa de Fisher. Foram avaliados 16 animais de cada gênero em cada grupo.

4.2.5. Comportamento de locomoção

Não houve diferença entre os grupos no teste de locomoção em campo aberto em ambos os gêneros.

4.2.6. Dosagens bioquímicas

Os níveis de corticosterona basal dos filhotes aos 28 dias de vida pós-natal foram medidos. Os resultados se encontram apresentados graficamente na figura 15. Houve efeito da intervenção sobre os níveis de corticosterona plasmática basal ($F_{\text{intervenção}_{1,28}}=14,5$ $p=0,0007$). Os níveis encontrados foram: Machos C: 285,8 ng/ml \pm 55,1; n= 7 vs V 129,9 ng/ml \pm 23,8; n=8; $p=0,006$; Fêmeas C: 283 ng/ml \pm 26,8; n=10 vs V: 173,1 ng/ml \pm 29,9; n=8; $p=0,02$.

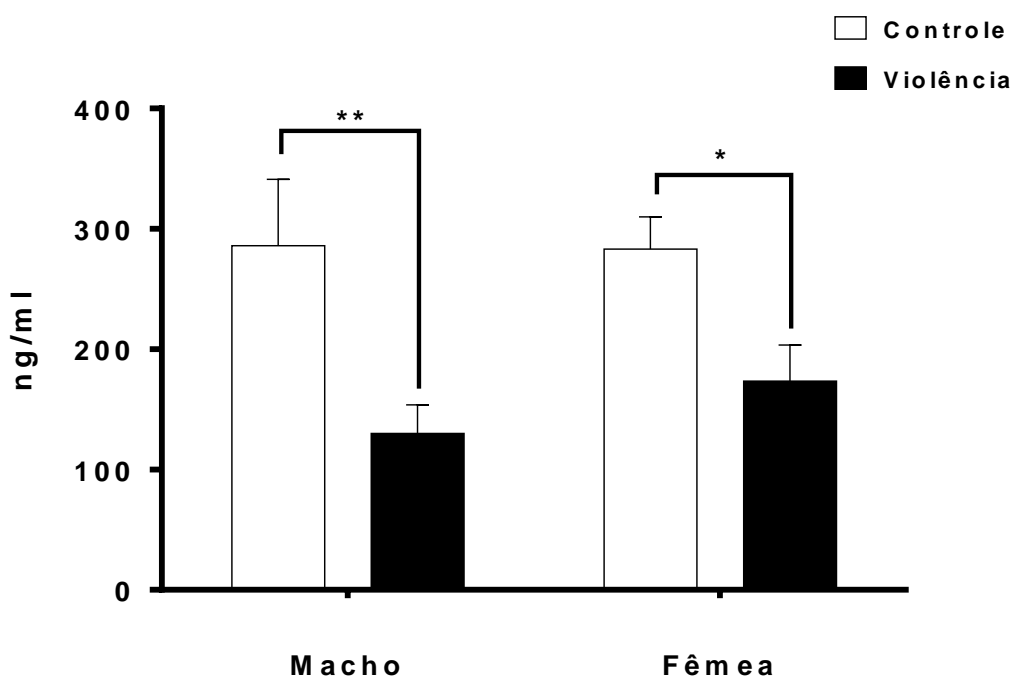


Figura 15 – Corticosterona plasmática basal em filhotes aos 28 dias de vida pós-natal - Dados apresentados em média \pm erro padrão da média - Machos C: n= 7 vs V: n=8; C: n=10 vs V: n=8; $p=0,02$.

4.2.7. Correlações modelo 1

Com o objetivo de compreender as relações entre as variáveis avaliadas no comportamento maternal e as alterações no teste de labirinto em cruz elevado e nos níveis de corticosterona, foi realizado um estudo de correlação, usando os grupos controle e violência, conforme descrito na seção de materiais e métodos. As correlações entre comportamento maternal e o tempo de permanência no braço fechado são apresentados tabela 32 para filhotes machos e na tabela 33 para filhotes fêmeas. As mesmas correlações foram avaliadas em relação aos níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes machos (Tabela 34) e fêmeas (Tabela 35).

Tempo Braço Fechado Filhotes Machos Juvenis			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Construindo Ninho H1 DPN5	0,568	0,002	26
Amamentação Relaxada Sobre Os Filhotes H1 DPN5	0,519	0,007	26
Amamentação Supino H1 Soma de todos os dias	-0,514	0,007	26
Amamentação Supino Soma de todos os dias e horários	-0,514	0,007	26
Genitora no Ninho H2 Soma de todos os dias	-0,498	0,01	26
Amamentação Total H2 soma de todos os dias	-0,475	0,014	26
Amamentação com Dorso Arqueado H1 DPN5	-0,47	0,015	26
Construindo Ninho H1 Soma de todos os Dias	0,454	0,02	26
Construindo Ninho Soma de todos os dias e horários	0,454	0,02	26
Amamentação Supino H2 DPN7	-0,431	0,028	26
Lambendo os Filhotes H1 DPN9	-0,429	0,029	26
Construindo Ninho H1 DPN3	0,423	0,031	26
Autolimpeza H2 Soma de Todos os Dias	0,423	0,031	26
Autolimpeza H2 DPN5	0,412	0,036	26
Genitora no Ninho H1 DPN9	-0,407	0,039	26

Amamentação Total H1 DPN9	-0,397	0,044	26
Amamentação Total H2 DPN7	-0,392	0,047	26
Genitora no Ninho H2 DPN9	-0,39	0,049	26

Tabela 32 – Variáveis correlacionadas à variável tempo no braço fechado do labirinto em cruz elevado em filhotes machos juvenis, controles e violência através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso.

Tempo Braço Fechado Filhotes Fêmeas Juvenis			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Amamentação com Dorso Arqueado H1 DPN3	-0,634	0,001	26
Genitora no Ninho H1 DPN3	-0,612	0,001	26
Amamentação Total H1 DPN3	-0,595	0,001	26
Amamentação com Dorso Arqueado H1 Soma de todos os dias	-0,498	0,01	26
Amamentação com Dorso Arqueado Soma de todos os Dias e Horários	-0,498	0,01	26
Amamentação com Dorso Arqueado H1 DPN5	-0,442	0,024	26
Autolimpeza H2 DPN9	0,442	0,024	26
Autolimpeza H1 DPN3	0,423	0,031	26
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes H2 DPN3	-0,418	0,034	26
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes H2 DPN5	-0,415	0,035	26
High/Amamentação Total H1 DPN3	-0,409	0,038	26
High/Amamentação Total H1 Soma de Todos os Dias	-0,402	0,042	26
High/Amamentação total Soma de Todos os dias e Horários	-0,402	0,042	26
Construindo o Ninho H1 DPN3	0,397	0,044	26

Tabela 33 – Variáveis correlacionadas à variável tempo no braço fechado do labirinto em cruz elevado em filhotes fêmeas juvenis, controles e violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado.

Níveis Plasmáticos de Corticosterona Filhotes Machos Juvenis			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Autolimpeza H2 DPN9	0,735	0,003	14
Amamentação Total H2 DPN5	0,562	0,036	14
Amamentação Total/Genitora no Ninho H2 Soma de todos os dias	0,559	0,038	14
Amamentação Total/Genitora no Ninho H1 DPN9	0,548	0,042	14

Tabela 34 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona em filhotes machos juvenis, controles e violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso.

Níveis Plasmáticos de Corticosterona Filhotes Fêmeas Juvenis			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Genitora no Ninho H1 DPN3	0,8	0,0003	15
Construindo Ninho H1 Soma de todos os Dias	-0,784	0,001	15
Construindo o Ninho Soma de Todos os Horários e Dias	-0,784	0,001	15
Amamentação Total H1 DPN3	0,761	0,001	15
Construindo o Ninho H1 DPN5	-0,732	0,002	15
Construindo o Ninho H1 DPN3	-0,703	0,003	15
Amamentação com Dorso Arqueado H1 Soma de todos os dias	0,692	0,004	15
Amamentação com Dorso Arqueado Soma de todos os Horários e dias	0,692	0,004	15
Amamentação com Dorso Arqueado H1 Soma de todos os dias	0,668	0,007	15
High/Amamentação Total Soma de todos os dias e horários	0,668	0,007	15
Construindo o Ninho H1 DPN7	-0,636	0,011	15
Amamentação com Dorso Arqueado H1 DPN3	0,624	0,013	15
Amamentação com Dorso Arqueado H1 DPN5	0,618	0,014	15
Amamentação Total H1 soma de todos os dias	0,611	0,016	15

Amamentação Total soma de todos os dias e horários	0,611	0,016	15
Amamentação Total H2 DPN7	0,594	0,02	15
Genitora no Ninho H1 DPN7	0,59	0,021	15
Genitora no Ninho H1 Soma de todos os dias	0,584	0,022	15
Genitora no Ninho soma de todos os horários e dias	0,584	0,022	15
High/Amamentação Total H1 DPN5	0,579	0,024	15
Autolimpeza H1 DPN3	-0,576	0,025	15
Amamentação relaxada sobre os filhotes H2 DPN5	0,541	0,037	15
Amamentação Total H1 DPN5	0,519	0,047	15

Tabela 35 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona em filhotes fêmeas juvenis, controles e violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado.

4.2.8. Correlações modelo 2

Buscando compreender as relações entre as variáveis avaliadas no comportamento maternal e agressivo-maternal e as alterações no teste de labirinto em cruz elevado e nos níveis de corticosterona, foi realizado um estudo de correlação, usando apenas o grupo violência, conforme descrito na seção de materiais e métodos. As correlações entre comportamento maternal e agressivo maternal e o tempo de permanência no braço fechado são apresentados tabela 36 para filhotes machos e na tabela 37 para filhotes fêmeas. As mesmas correlações foram avaliadas em relação aos níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes machos (Tabela 38) e fêmeas (Tabela 39).

Tempo Braço Fechado Filhotes Machos Juvenis			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Amamentação Total H2 Soma de todos os dias	-0,661	0,005	16
Genitora no Ninho H2 Soma de todos os dias	-0,661	0,005	16
Amamentação relaxada sobre os filhotes H2 soma de todos os dias	-0,641	0,007	16
Autolimpeza durante o Agressivo DPN7	0,579	0,019	16
Amamentação supino H2 DPN3	-0,558	0,025	16
Genitora no Ninho H2 DPN9	-0,555	0,026	16
Construindo Ninho H1 DPN5	0,553	0,026	16
Autolimpeza H2 soma de todos os dias	0,551	0,027	16
Ataques (Freq.) DPN9	0,551	0,027	16
Amamentação relaxada sobre os filhotes H2 DPN5	-0,531	0,034	16
Subjugação da Genitora DPN3	0,528	0,036	16
Ataques Totais DPN5	-0,517	0,04	16
Interação Intruso-Filhotes (Dur.) Soma de todos os dias	0,516	0,041	16
Amamentação supino H1 DPN9	-0,512	0,043	16
Amamentação supino H1 soma de todos os dias	-0,512	0,043	16
Lambendo os Filhotes H2 DPN7	-0,506	0,045	16

Tabela 36 – Variáveis correlacionadas à variável tempo no braço fechado do labirinto em cruz elevado em filhotes machos juvenis do grupo violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; Freq. = frequência; Dur. = duração.

Tempo Braço Fechado Filhotes Fêmeas Juvenis			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Interação Genitora-Filhotes soma de todos os dias	-0,564	0,023	16
Subjugação do Intruso soma de todos os dias	0,562	0,023	16
Interação Genitora-Filhotes DPN3	-0,555	0,026	16
Amamentação Relaxada Sobre os filhotes H2 soma de todos os dias	-0,553	0,026	16
Interação Genitora-Filhotes DPN5	-0,532	0,034	16
Autolimpeza durante o agressivo DPN7	0,51	0,043	16
Ataques (Freq.) DPN7	0,508	0,045	16

Tabela 37 – Variáveis correlacionadas à variável tempo no braço fechado do labirinto em cruz elevado em filhotes fêmeas juvenis, do grupo violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; Freq. = frequência; Dur. = duração.

Níveis Plasmáticos de Corticosterona Filhotes Machos Juvenis			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Boxeando e Chutando (Dur.) PND5	0,914	0,002	8
Lambendo os Filhotes H2 DPN5	0,865	0,006	8
Amamentação Total/Genitora no Ninho H1 DNP7	-0,864	0,006	8
Interação Genitora-Filhotes DPN3	0,862	0,006	8
Construindo Ninho H2 DPN9	0,825	0,012	8
Autolimpeza H2 DPN9	0,814	0,014	8
Ataques (Dur.) DPN7	0,813	0,014	8
High/Amamentação Total H1 DPN9	0,804	0,016	8
Ataques (Freq.) DPN3	-0,768	0,026	8
Agressivo Total (Dur.) DNP7	0,767	0,026	8

Amamentação Supino H2 DPN7	0,764	0,027	8
Autolimpeza Durante o Agressivo (Freq.) DNP3	0,764	0,027	8
Ataques (Dur.) DPN3	-0,756	0,03	8
Amamentação Total H1 DPN7	-0,752	0,031	8
Genitora no Ninho H1 DPN7	-0,744	0,034	8
Interação Genitora-Filhotes (Dur.) Soma de todos os dias	0,729	0,04	8
Amamentação com dorso Arqueado H1 DPN9	0,72	0,044	8

Tabela 38 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona em filhotes machos juvenis do grupo violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; Freq. = frequência; Dur. = duração; High = Amamentação com dorso arqueado.

Níveis Plasmáticos de Corticosterona Filhotes Fêmeas Juvenis			
Variáveis	Coeficiente de Correlação	Significância	N
Genitora no Ninho H1 PND3	0,926	0,001	8
Amamentação com Dorso Arqueado H2 DPN7	0,867	0,005	8
Interação Genitora-Intruso (Dur.) DPN3	0,857	0,007	8
Amamentação Total H2 Soma de todos os dias	0,852	0,007	8
Mordidas (Freq.) DPN7	-0,851	0,007	8
Amamentação Total H1 DPN3	0,837	0,01	8
Genitora no Ninho H2 Soma de todos os dias	0,831	0,011	8
Interação Genitora-Intruso (Dur.) Soma de todos os dias	0,822	0,012	8
Subjugação da Genitora (Dur.) DPN7	-0,821	0,012	8
High/Amamentação Total H2 DPN7	0,819	0,013	8
Boxeando e Chutando (Dur.) PND7	-0,818	0,013	8

Construindo o Ninho H1 soma de todos os dias	-0,815	0,014	8
Construindo o Ninho H1 soma de todos os dias e horários	-0,815	0,014	8
Autolimpeza PND9	0,794	0,019	8
Amamentação com Dorso Arqueado H2 soma de todos os dias	0,783	0,022	8
Subjugação da Genitora (Freq.) DPN7	-0,78	0,022	8
Construindo o Ninho H1 DPN5	-0,779	0,023	8
Amamentação Total H2 DPN7	0,771	0,025	8
Subjugação da Genitora (Freq.) Soma de todos os dias	-0,768	0,026	8
Subjugação da Genitora (Dur.) Soma de todos os dias	-0,764	0,027	8
Subjugação da Genitora (Dur.) DPN3	-0,763	0,027	8
Interação Genitora-Intruso (Dur.) DPN5	0,759	0,029	8
Genitora no Ninho H2 DPN7	0,753	0,031	8
Agressivo (Freq.) Total DPN7	-0,739	0,036	8
Interação Genitora-Intruso (Freq.) Soma de todos os dias	0,732	0,039	8
Mordidas (Freq.) Soma de todos os dias	-0,727	0,041	8
Amamentação Total H2 DPN3	0,718	0,045	8

Tabela 39 – Variáveis correlacionadas à variável níveis plasmáticos de corticosterona em filhotes fêmeas juvenis do grupo violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; Freq. = frequência; Dur. = duração; High = Amamentação com dorso arqueado.

4.3 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DOS FILHOTES MACHOS QUANDO ADULTOS

4.3.1. Comportamento semelhante a ansiedade

A latência para deixar o braço fechado do labirinto em T-elevado na primeira tentativa foi medida como um indicador da ansiedade dos animais. Os resultados são apresentados graficamente na figura 16. Os animais do grupo violência apresentaram latência significativamente maior para sair do braço fechado (81,43 segundos \pm 18,77 n=16) quando comparados com os animais do grupo controle (31,05 segundos \pm 10,20 n=16; $t_{30}=2,36$; $p=0,025$).

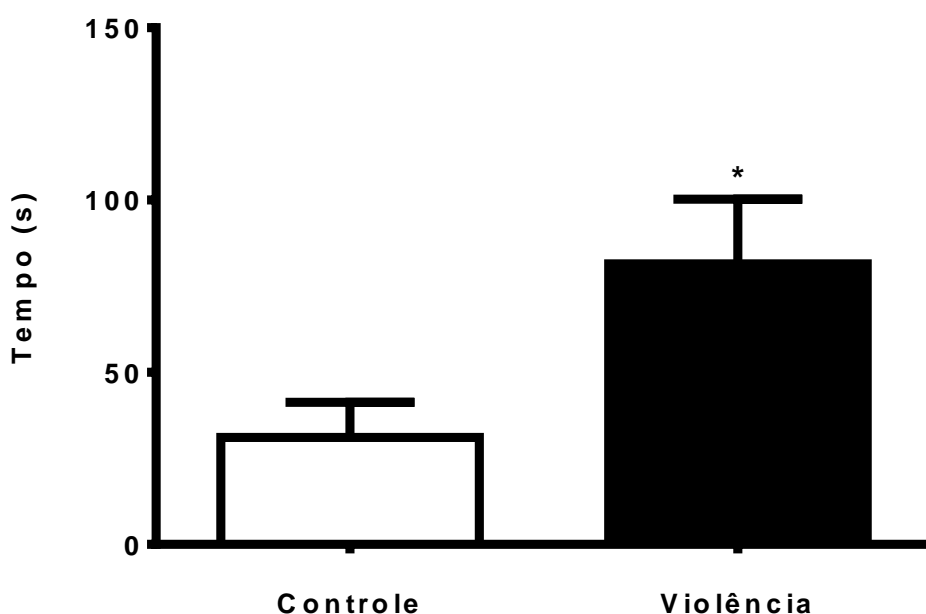


Figura 16 – Latência para sair do braço fechado na primeira tentativa do labirinto em T-Elevado. Dados apresentados em Média \pm erro padrão da média em segundos. C n=16 vs V: n=16.

4.3.2. Avaliação cognitiva

A memória espacial de trabalho foi avaliada através do protocolo de Labirinto em T-elevado. Os dados estão apresentados graficamente na figura 17. Os animais

que atingiram o teto de tempo (180 segundos) na primeira tentativa foram excluídos da análise. A distribuição do percentual de animais que aprendem a tarefa por número de tentativas foi avaliada pelo teste de Quiquadrado. As distribuições foram significativamente diferentes entre os grupos ($X^2_6 = 81,7$; $p < 0,0001$).

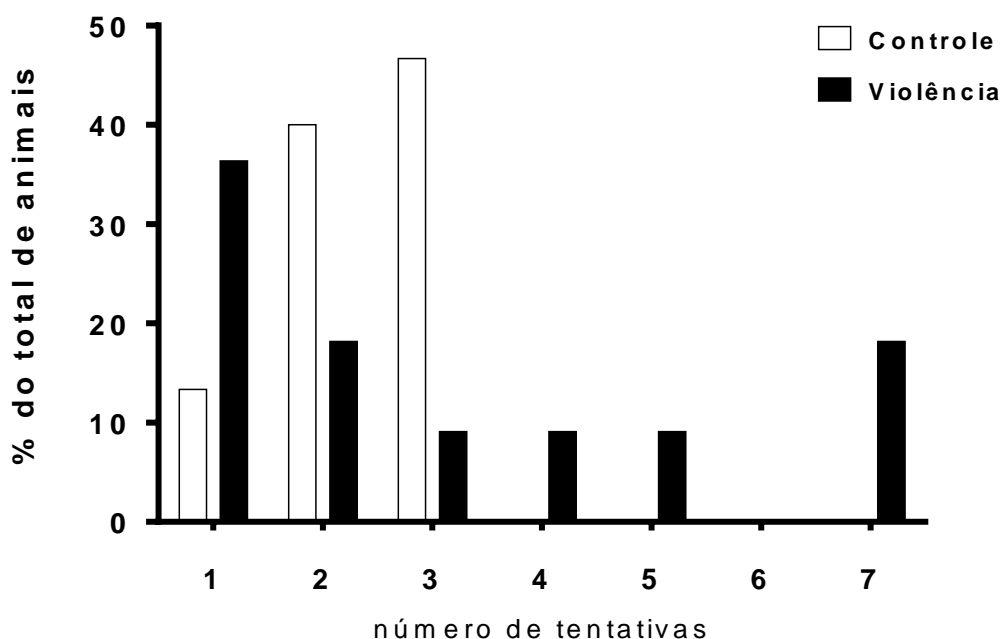


Figura 17 – Percentual de animais que aprendem a tarefa de labirinto em T-elevado a cada tentativa. Dados apresentados em percentual de animais do total que aprendem a tarefa a cada tentativa.

A capacidade cognitiva dos animais na idade adulta também foi avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos. O percentual de tempo explorando o novo objeto para cada animal em cada grupo está representado graficamente na figura 18. Foi considerado como tarefa aprendida os animais que passaram 55% do tempo ou mais explorando o novo objeto na sessão de teste.

Dos 16 animais do grupo controle, 11 conseguiram passar mais tempo explorando o novo objeto durante o teste, sendo considerado como tarefa aprendida. No grupo violência apenas 5 aprenderam a tarefa, sendo a distribuição do

aprendizado significativamente diferente nos dois grupos ($X^2_1=4,5$; $p=0,03$). O percentual de animais que aprenderam a tarefa em cada grupo é apresentado na figura 19.

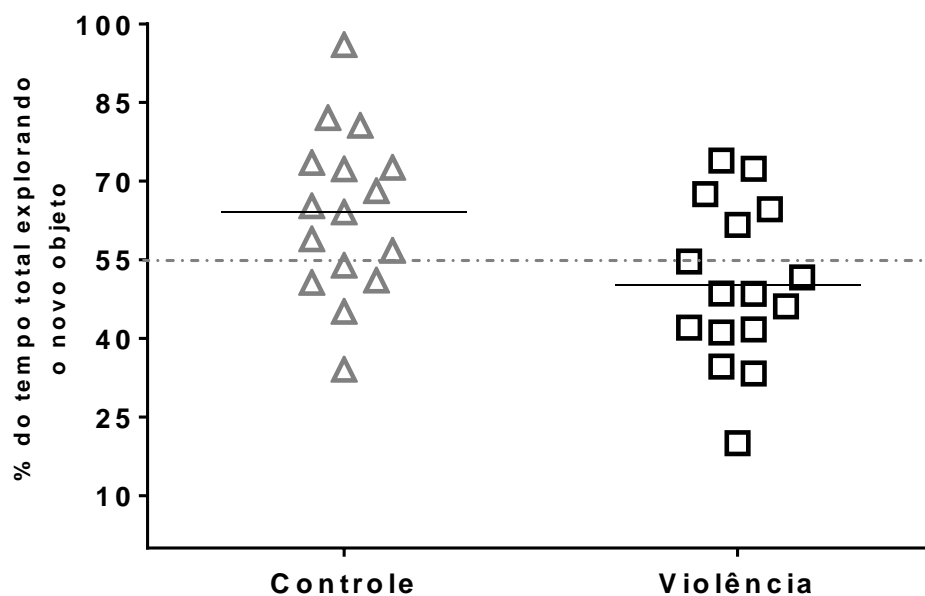


Figura 18 – Percentual de tempo explorando o novo objeto na tarefa de reconhecimento de objetos para cada animal – A barra contínua representa a média. A linha tracejada representa a divisão entre aprender e não-aprender a tarefa. $n=16$ animais por grupo.



Figura 19 – Percentual de animais que aprenderam a tarefa de reconhecimento de objetos em cada grupo.

4.3.3. Resposta ao estresse repetido

Os níveis de corticosterona basal foram significativamente menores no grupo violência (110,6 ng/ml \pm 18,07 n=8) quando comparado com o grupo controle (240,3 ng/ml \pm 64,32 n=6; $t_{11}=2,2$; $p = 0,04$) (Figura 20). A variância foi significativamente menor no grupo violência em comparação ao grupo controle ($F_5=9,5$; $p = 0,01$).

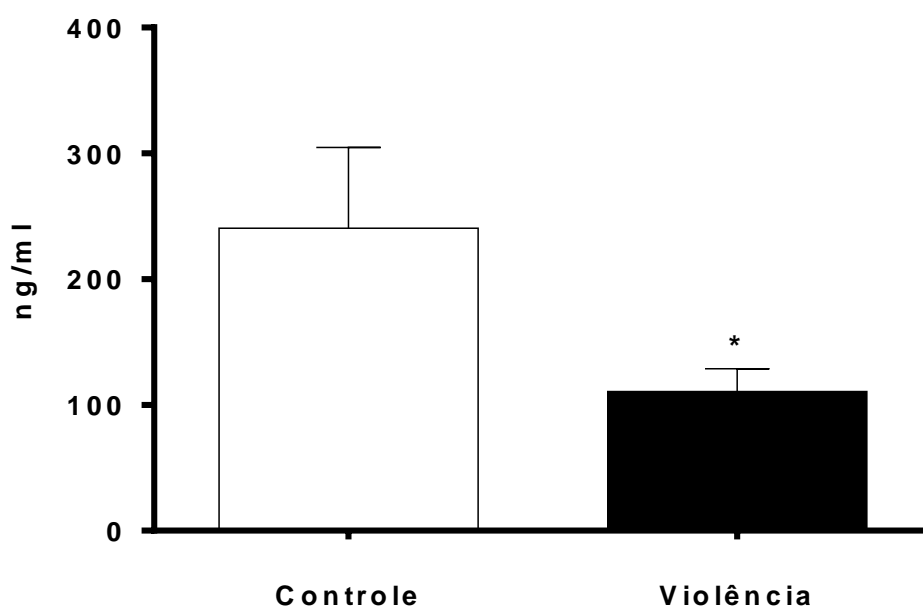


Figura 20 – Corticosterona plasmática basal em animais do grupo controle e violência. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média em nanogramas por mililitro de plasma. C: n=6 vs V: n=8).

Além do efeito direto do estresse ($F_{\text{estresse}_{1,36}}=895$; $p=0,005$) houve interação das variáveis independentes intervenção e estresse na definição dos níveis de corticosterona 24h após a última sessão de estresse por contenção ($F_{\text{intervenção} \times \text{estresse}_{1,36}}= 4,6$; $p = 0,04$). Os níveis de corticosterona plasmática do grupo violência estressado foram significativamente maiores do que os do grupo violência basal (pós-teste da diferença mínima significativa de Fisher $p = 0,0006$). Não houve diferença entre os níveis de corticosterona do grupo controle basal e controle estressado. Média Controle Basal 240,3 ng/ml \pm 64,32 n=6 x Controle Estresse 289,3 ng/ml \pm 30,32 n=14 e Violência Basal 110,6 ng/ml \pm 18,07 n=8 x Violência Estresse 403,4 ng/ml \pm 75 n=12. Dados apresentados graficamente na Figura 21.

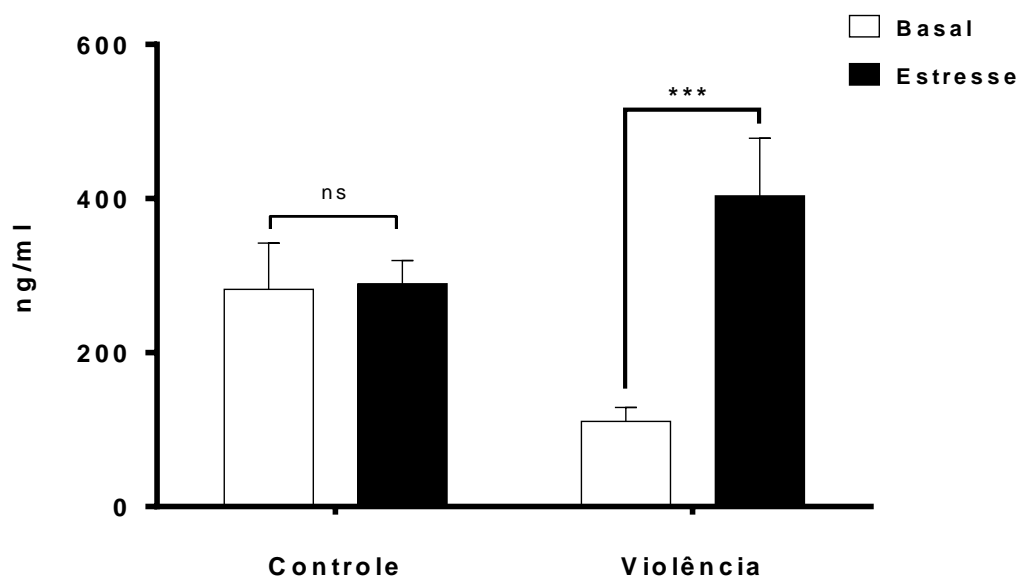


Figura 21 – Corticosterona plasmática em animais controles, controles estressados, violência e violência estressados. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média em nanogramas por mililitro de plasma. Controle Basal n=6 x Controle Estresse n=14 e Violência Basal n=8 x Violência Estresse n=12.

4.3.4. Desenvolvimento corporal

As curvas de desenvolvimento corporal do dia 28 ao dia 120 de vida pós-natal são apresentadas na Figura 22. As diferenças no ganho de massa corporal foram avaliadas através do estabelecimento da equação polinomial de terceira ordem que prediz 90% ou mais dos casos em cada grupo. As equações de cada grupo foram então comparadas para verificar se são significativamente diferentes. A equação que prediz os valores de massa corporal do grupo controle ($R^2 = 0,95$) é significativamente diferente da equação que prediz os valores de massa corporal dos animais do grupo violência ($R^2 = 0,94$ diferença da soma dos quadrados $F_4 = 38,8$ $p < 0,0001$).

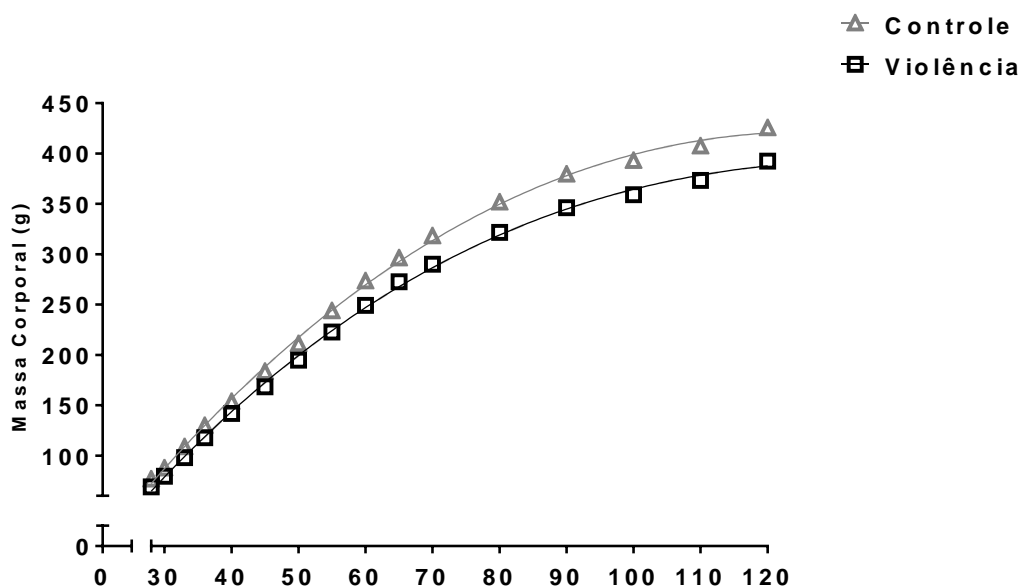


Figura 22 – Curva de ganho de massa corporal no grupo controle (triângulos) e violência (quadrados). Os símbolos representam a média do grupo no dia da pesagem.

A comparação da massa corporal proporcional entre os grupos nos fornece uma visão mais precisa das diferenças de desenvolvimento corporal em cada dia de pesagem. A média da massa do grupo controle em cada dia de pesagem foi considerada como 100% e a média do grupo violência foi expressa como fração do total (média grupo violência/média grupo controle). As comparações foram feitas a partir dos coeficientes de variância e do número de casos de cada média, utilizando-se o teste ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Houve diferença significativa na massa corporal entre os grupos em todos os dias de pesagem (p de 0,05 a 0,001). Dados apresentados graficamente na figura 23.

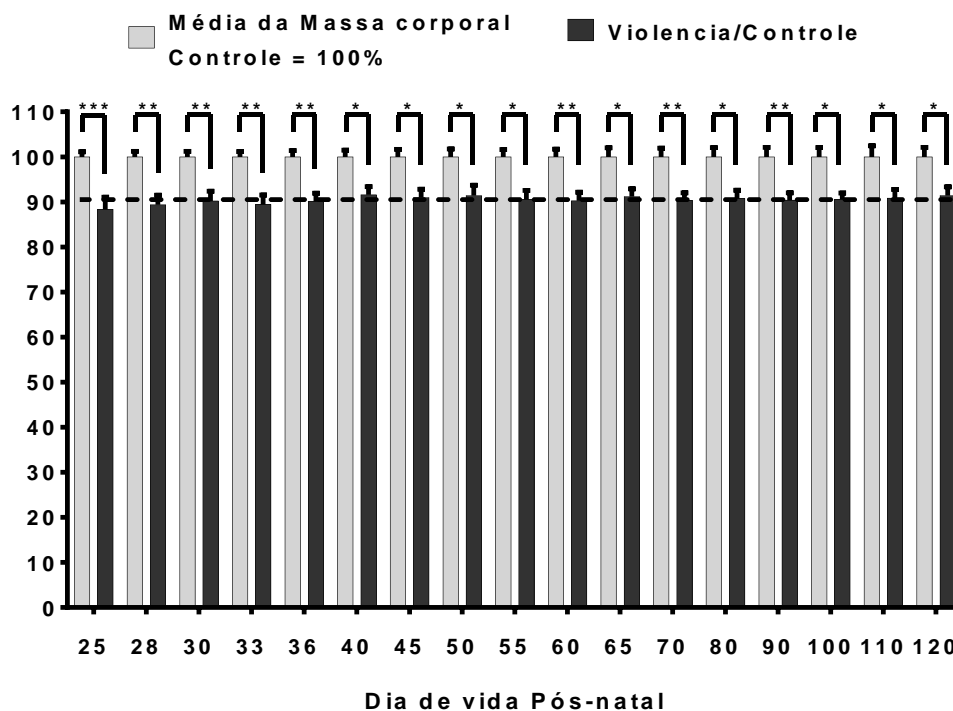


Figura 23 – Massa corporal proporcional em filhotes machos – Média da massa corporal do grupo controle = 100%. Média do grupo violência expressa como fração do controle (Média do grupo violência/média do grupo controle em cada dia) barras de variabilidade representam coeficiente de variação %. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4.3.5. Correlações modelo 1

As relações entre as variáveis avaliadas no comportamento maternal e agressivo-maternal e as alterações no teste de labirinto em T elevado, reconhecimento de objetos, resposta ao estresse repetido e ganho de massa corporal, foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson para dados paramétricos e de Spearman para dados não paramétricos, incluindo os grupos controle e violência.

As correlações entre comportamento maternal e a latência para deixar o braço fechado no teste de labirinto em T elevado são apresentados na tabela 40. As mesmas correlações foram avaliadas em relação ao número de tentativas para aprender a tarefa de labirinto em T-elevado (tabela 41), percentual de tempo explorando o novo

objeto (Tabela 42), concentração de corticosterona plasmática após estresse repetido (tabela 43) e peso corporal 4 dias após o desmame, DPN25 (tabela 44A e B).

Latência Para Deixar o Braço Fechado Labirinto em T Elevado Filhotes Machos Adultos			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Autolimpeza H1 DPN5	0,497	0,007	28
Construindo Ninho H1 DPN7	0,462	0,013	28
Autolimpeza H1 DPN3	0,441	0,019	28
Autolimpeza H2 DPN7	0,411	0,03	28

Tabela 40 – Variáveis correlacionadas à variável latência para deixar o braço fechado no labirinto em T elevado para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso;

Número de tentativas para aprender a tarefa Labirinto em T Elevado Filhotes Machos Adultos			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Autolimpeza H2 DPN9	0,596	0,003	22
Lambendo os Filhotes H2 soma de todos os dias	-0,574	0,005	22
Amamentação Supino H2 DPN7	0,562	0,007	22
Construindo o Ninho H2 DPN3	0,521	0,013	22
Lambendo os Filhotes H2 DPN5	-0,512	0,015	22
High/Amamentação Total H1 DPN9	-0,441	0,04	22
Amamentação Total H1 DPN5	0,433	0,044	22
Autolimpeza H2 soma de todos os dias	-0,429	0,046	22
Lambendo os Filhotes H2 DPN9	-0,371	0,089	22

Tabela 41 – Variáveis correlacionadas à variável número de tentativas para aprender a tarefa labirinto em T elevado para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30

minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado.

Percentual de Tempo Explorando o Novo Objeto Filhotes Machos Adultos			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Amamentação com Dorso Arqueado H2 DPN3	0,385	0,043	28
Amamentação Supino H2 DPN5	0,378	0,048	28

Tabela 42 – Variáveis correlacionadas à variável percentual de tempo explorando o novo objeto na tarefa de reconhecimento de objetos para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência, através do coeficiente de correlação de Spearman. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado.

Concentração de Corticosterona Plasmática Pós-estresse crônico Filhotes Machos Adultos			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Construindo Ninho H1 DPN9	0,68	0,0002	25
Construindo Ninho H1 DPN7	0,66	0,0003	25
Construindo Ninho H1 soma de todos os dias	0,607	0,001	25
Construindo Ninho Soma de todos os dias e Horários	0,607	0,001	25
Genitora no Ninho H1 DPN3	-0,603	0,001	25
Autolimpeza H1 DPN3	0,573	0,003	25
Construindo Ninho H1 DPN3	0,554	0,004	25
Amamentação Total H1 soma de todos os dias	-0,516	0,008	25
Amamentação Total soma de todos os dias e horários	-0,516	0,008	25
Amamentação Total H1 DPN3	-0,514	0,009	25
Amamentação com Dorso Arqueado H1 DNP3	-0,507	0,01	25
Genitora no Ninho H1 Soma de todos os dias	-0,498	0,011	25
Genitora no Ninho Soma de todos os dias e horários	-0,498	0,011	25

High/Amamentação Total H1 DPN3	-0,492	0,012	25
Amamentação com Dorso Arqueado H1 Soma de todos os dias	-0,444	0,026	25
Amamentação com Dorso Arqueado H2 DNP9	0,444	0,026	25
Amamentação com Dorso Arqueado Soma de todos os dias e Horários	-0,444	0,026	25
Amamentação Relaxada sobre os Filhotes H1 DPN9	-0,442	0,027	25
Autolimpeza H1 Soma de todos os dias	0,442	0,027	25
Autolimpeza Soma de todos os dias e horários	0,442	0,027	25
High/Amamentação Total H1 soma de todos os dias	-0,44	0,028	25
High/Amamentação Total soma de todos os dias e horários	-0,44	0,028	25

Tabela 43 – Variáveis correlacionadas à variável concentração de corticosterona plasmática 24h após última sessão de estresse crônico para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado.

Massa Corporal aos 25 dias de Vida Pós-natal Filhotes Machos - A			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Autolimpeza H1 DPN9	-0,706	< 0,0001	48
Amamentação Total/Genitora no Ninho H2 DPN5	0,67	< 0,0001	48
Lambendo os Filhotes H1 DPN3	-0,655	< 0,0001	48
Autolimpeza H2 DPN3	-0,629	< 0,0001	48
Autolimpeza H1 Soma de todos os dias	-0,608	< 0,0001	48
Autolimpeza Soma de todos os dias e horários	-0,608	< 0,0001	48
Amamentação Supino H2 DPN9	-0,589	< 0,0001	48
High/Amamentação total H1 DPN3	0,582	< 0,0001	48
Amamentação com Dorso Arqueado H1 DPN3	0,567	0,001	48

Autolimpeza H1 DPN3	-0,562	< 0,0001	48
Construindo o Ninho H2 Soma de todos os dias	0,516	< 0,0001	48
Amamentação Total/Genitora no Ninho H1 DPN9	0,508	0,0002	48
Amamentação relaxada sobre os filhotes H1 DPN3	-0,503	0,0003	48
High/Amamentação total H1 DPN7	0,469	0,001	48
Lambendo os Filhotes H2 DPN9	-0,459	0,001	48
Genitora no Ninho H2 DPN7	0,431	0,002	48
Amamentação total H2 DPN7	0,43	0,002	48
Lambendo os Filhotes H2 DPN3	-0,422	0,003	48
Lambendo os Filhotes H2 DPN7	0,415	0,001	48
Amamentação relaxada sobre os filhotes H1 DPN9	0,401	0,005	48

Tabela 44A – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado.

Massa Corporal aos 25 dias de Vida Pós-natal Filhotes Machos - B			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Construindo o Ninho H2 DPN3	0,398	0,005	48
Genitora no Ninho H2 DPN5	0,39	0,006	48
Amamentação relaxada sobre os filhotes H2 DPN5	0,384	0,007	48
Genitora no Ninho H1 DPN3	0,381	0,008	48
Amamentação total H1 DPN3	0,376	0,008	48
Genitora no Ninho H1 DPN9	0,376	0,008	48
Amamentação com Dorso Arqueado H1 DPN7	-0,375	0,009	48

Amamentação relaxada sobre os filhotes H2 Soma de todos os dias	0,357	0,013	48
Amamentação total H2 DPN5	0,355	0,013	48
Amamentação total H1 DPN9	0,351	0,014	48
High/Amamentação total H2 DPN5	0,342	0,017	48
Amamentação Total/Genitora no Ninho H1 Soma de todos os dias	0,33	0,021	48
Lambendo os Filhotes H1 DPN9	0,293	0,043	48
Autolimpeza H1 DPN5	-0,291	0,045	48
Amamentação com Dorso Arqueado H2 DPN9	0,285	0,049	48

Tabela 44B – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos dos grupos controle e violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado.

4.3.6. Correlações modelo 2

Buscando compreender as relações entre as variáveis avaliadas no comportamento maternal e agressivo-maternal e as alterações no teste de labirinto em T elevado, reconhecimento de objetos, resposta ao estresse repetido e ganho de massa corporal dentro do grupo violência, foi realizado um estudo de correlação, usando apenas o grupo violência, conforme descrito na seção de materiais e métodos. As correlações entre comportamento maternal e agressivo maternal e a latência para deixar o braço fechado no teste de labirinto em T-elevado são apresentados na tabela 45. As mesmas correlações foram avaliadas em relação ao número de tentativas para aprender a tarefa de labirinto em T-elevado e percentual de tempo explorando o novo objeto, não havendo correlações significativas, níveis de corticosterona plasmática

após estresse repetido (tabela 46) e peso corporal 4 dias após o desmame, DPN25 (tabela 47A, B e C).

Latência Para Deixar o Braço Fechado Labirinto em T-Elevado Filhotes Machos Adultos			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Interação Intruso-Filhotes (Dur.) Soma de todos os dias	-0,631	0,009	16
Autolimpeza H1 DPN3	0,603	0,013	16
Ataques (Dur.) DPN5	0,587	0,017	16
Lambendo os Filhotes H2 DPN7	0,584	0,018	16
Agressivo Total (Dur.) DPN5	0,584	0,017	16
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes H2 DPN9	0,58	0,018	16
Lambendo os Filhotes Durante o Agressivo (Freq.) DPN3	-0,579	0,019	16
Interação Genitora-Intruso DPN5	-0,565	0,023	16
Autolimpeza durante o agressivo (Freq.) soma de todos os dias	-0,563	0,023	16
Construindo o Ninho H1 DPN7	0,549	0,027	16
Autolimpeza durante o agressivo (Dur.) DPN3	-0,529	0,035	16
Autolimpeza durante o agressivo (Freq.) DPN3	-0,522	0,038	16
Lambendo os Filhotes H2 DPN3	-0,514	0,041	16
Autolimpeza durante o agressivo (Dur.) Soma de todos os dias	-0,508	0,045	16
Autolimpeza H2 DPN3	-0,505	0,046	16
Amamentação Total H1 DPN3	-0,497	0,05	16
Lambendo os Filhotes Durante o Agressivo (Dur.) DPN3	-0,496	0,05	16

Tabela 45 – Variáveis correlacionadas à variável latência para deixar o braço fechado no labirinto em T-elevado para filhotes machos adultos do grupo violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; Freq. = frequência; Dur. Duração;

Níveis de Corticosterona Plasmática Pós-estresse crônico Filhotes Machos Adultos			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Construindo Ninho H1 DPN9	0,667	0,018	12
Agressivo Total (Dur.) DPN5	0,664	0,019	12
Lambendo os Filhotes H1 DPN9	0,657	0,02	12
Ataques (Dur.) DPN5	0,642	0,024	12
Ataques (Freq.) DNP3	0,636	0,026	12
Ataques (Freq.) Soma de todos os dias	0,629	0,029	12
Boxeando e Chutando (Dur.) DPN7	0,575	0,051	12
Genitora no Ninho H1 DPN7	-0,572	0,05	12

Tabela 46 – Variáveis correlacionadas à variável níveis de corticosterona plasmática 24h após última sessão de estresse crônico para filhotes machos adultos do grupo violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; Freq. = frequência; Dur. = duração.

Massa Corporal aos 25 dias de Vida Pós-natal Filhotes Machos - A			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Interação Intruso-Filhotes (Dur.) Soma de todos os dias	-0,865	< 0,001	27
Amamentação Total/Genitora no ninho H2 DPN3	0,851	< 0,001	27
Interação Intruso-Filhotes (Dur.) DPN9	-0,849	< 0,001	27
Subjugação Genitora (Dur.) DPN5	-0,814	< 0,001	27
Autolimpeza durante o agressivo (Dur.) DPN7	-0,807	< 0,001	27
Amamentação Total/Genitora no ninho H2 DPN5	0,798	< 0,001	27
Autolimpeza durante o agressivo (Dur.) soma de todos os dias	-0,798	< 0,001	27
Amamentação com dorso Arqueado H1 DPN7	-0,795	< 0,001	27
Chutando (Dur.) DPN5	-0,777	< 0,001	27

Chutando (Dur.) Soma de todos os dias	-0,777	< 0,001	27
High/Amamentação total H1 DPN7	-0,776	< 0,001	27
Interação Genitora-Filhotes (Dur.) DPN9	0,75	< 0,001	27
Subjugação do Macho (Dur.) DPN3	-0,727	< 0,001	27
Ataques (Dur.) DPN3	-0,719	< 0,001	27
High/Amamentação total H2 DPN5	0,689	< 0,001	27
Boxeando (Freq.) Soma de todos os dias	-0,688	< 0,001	27
Lambendo os Filhotes H1 DPN3	-0,682	< 0,001	27
Interação Genitora-Intruso (Freq.) DPN7	-0,672	< 0,001	27
Autolimpeza H2 DPN3	-0,67	< 0,001	27
Autolimpeza H1 DPN9	-0,658	< 0,001	27

Tabela 47A – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos do grupo violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado; Freq. = frequência; Dur. = Duração.

Massa Corporal aos 25 dias de Vida Pós-natal Filhotes Machos - B			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Amamentação com dorso Arqueado H1 Soma de todos os dias	-0,657	< 0,001	27
Agressivo Total (Dur.) DPN3	-0,657	< 0,001	27
Interação Genitora-Filhotes (Dur.) DPN7	0,656	< 0,001	27
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes H1 DPN5	-0,638	< 0,001	27
Autolimpeza durante o agressivo (Freq.) DPN5	-0,621	0,001	27
Interação Genitora-Filhotes (Dur.) Soma de todos os dias	0,619	0,001	27
Autolimpeza durante o agressivo (Dur.) DPN9	-0,613	0,001	27

Amamentação Total/Genitora no ninho H2 Soma de todos os dias	0,597	0,001	27
Ataques (Dur.) DPN3	-0,581	0,001	27
Boxeando (Dur.) Soma de todos os dias	-0,573	0,002	27
Boxeando (Dur.) DPN9	-0,57	0,002	27
Genitora no Ninho H1 DPN5	-0,569	0,002	27
Amamentação Total H1 DPN5	-0,562	0,002	27
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes H2 DPN7	0,56	0,002	27
Amamentação Total H1 DPN7	-0,559	0,002	27
Genitora no Ninho H1 DPN7	-0,557	0,003	27
Amamentação com dorso Arqueado H1 DPN3	0,552	0,003	27
Lambendo os Filhotes H2 DPN3	-0,551	0,003	27
Ataques (Dur.) DPN7	0,54	0,004	27
Amamentação Supino H2 DPN9	-0,537	0,004	27

Tabela 47B – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos do grupo violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado; Freq. = frequência; Dur. = Duração.

Massa Corporal aos 25 dias de Vida Pós-natal Filhotes Machos - C			
Variáveis	Coefficiente de Correlação	Significância	N
Genitora no Ninho H2 DPN5	0,513	0,006	27
High/Amamentação total H2 soma de todos os dias	0,512	0,006	27
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes H1 DPN3	-0,508	0,007	27
Agressivo Total (Dur.) DPN7	0,508	0,007	27
Amamentação Total H2 DPN5	0,502	0,008	27
High/Amamentação total H1 DPN3	0,499	0,008	27
High/Amamentação total H1 DPN5	-0,497	0,008	27
Autolimpeza H1 soma de todos os dias	-0,494	0,009	27
Autolimpeza H1 soma de todos os dias e horários	-0,494	0,009	27
Interação Genitora-Filhotes (Dur.) DPN5	0,485	0,01	27
Amamentação com dorso Arqueado H1 DPN5	-0,482	0,011	27
Chutando (Freq.) soma de todos os dias	-0,482	0,011	27
Lambendo os Filhotes H2 DPN7	0,481	0,011	27
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes H1 soma de todos os dias	-0,476	0,012	27
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes soma de todos os dias e horários	-0,476	0,012	27
Interação Genitora-Filhotes (Dur.) DPN9	0,472	0,013	27
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes H1 DPN5	0,47	0,013	27
Ataques (Dur.) soma de todos os dias	0,47	0,013	27
Construindo o Ninho H2 DPN7	0,459	0,016	27
Amamentação Relaxada Sobre os Filhotes H2 soma de todos os dias	0,448	0,019	27

Tabela 47C – Variáveis correlacionadas à variável massa corporal no dia de vida pós-natal 25 para filhotes machos adultos do grupo violência, através do coeficiente de correlação de Pearson. DPN = dia de vida pós-natal; H1 = registro de comportamento maternal nos 30 minutos posteriores ao macho intruso ou horário correspondente em controles; H2 = registro de comportamento 3 horas após o macho intruso; High = Amamentação com dorso arqueado; Freq. = frequência; Dur. = Duração.

5. DISCUSSÃO

Estudar processos fisiológicos e comportamentos humanos em modelos animais é um grande desafio. Ao mesmo tempo, é uma necessidade, visto que as análises em humanos, em especial crianças, é muito limitada. Respeitando-se os limites dos modelos animais, podemos aprender muito, desde que os modelos sejam bem construídos e apresentem informações coerentes.

5.1 EXPERIMENTO 1

O primeiro passo na construção do modelo animal proposto, consistiu em demonstrar que o ambiente é, efetivamente, violento. As genitoras em todas as ninhadas apresentaram comportamento agressivo consistente frente ao macho intruso, caracterizando um ambiente em que ocorre eventos violentos.

Quando avaliamos o efeito da intervenção sobre a genitora, uma resposta clássica ao estresse não foi diretamente evidenciada. Embora o macho intruso seja uma ameaça significativa para prole, a literatura descreve que os aumentos de corticosterona nesse caso são rápidos e transitórios, visando não impactar a prole

com a passagem de glicocorticoides pela amamentação (DESCHAMPS *et al.*, 2003). A coleta para dosagens hormonais na genitora foi executada 30 a 40 minutos após a intervenção, sendo esse período suficiente para restaurar os níveis basais de corticosterona em uma fêmea lactante (DESCHAMPS *et al.*, 2003).

Considerando relatos da literatura, encontramos que submeter uma fêmea lactante ao odor de um macho desconhecido aumenta de forma rápida e transitória seus níveis de corticosterona plasmática, sendo que estes retornam ao normal após 30 minutos (MOLES *et al.*, 2008). Provocar uma fêmea lactante com a inserção de um macho adulto em sua caixa moradia na presença da prole causa efeito semelhante (DESCHAMPS *et al.*, 2003).

Ao avaliarmos as frações livres e ligada a proteínas da corticosterona plasmática, encontramos um deslocamento da corticosterona para a fração ligada nas genitoras do grupo violência. Segundo Qian e colaboradores (QIAN *et al.*, 2011) uma liberação rápida de grandes quantidades de proteína ligadora de corticosteroides pelo fígado é uma forma eficiente de se evitar que a elevação rápida dos níveis de glicocorticoides circulantes, em resposta a um evento estressor agudo, atinja outros compartimentos, como o leite. Dessa forma, o aumento da fração ligada de corticosterona nas genitoras do grupo violência pode ser interpretada como uma tentativa de proteger os filhotes dos aumentos transitórios da corticosterona plasmática na presença do macho intruso. A presença aumentada de proteínas ligadoras desloca a corticosterona plasmática para a fração ligada, deixando menos corticosterona livre para ser passada aos filhotes via amamentação, agindo como um fator anti-corticosterona (TINNIKOV, 1999). Essas alterações, quando consideradas à luz da literatura, indicam que a intervenção com macho intruso tem um impacto sobre

a genitora, provavelmente elicitando uma resposta transitória ao estresse (DESCHAMPS *et al.*, 2003; MOLES *et al.*, 2008).

Ao avaliarmos as variáveis correlacionadas à fração ligada de corticosterona nas genitoras notamos que o contato com o filhote – amamentação e presença da genitora do ninho – se destacam. As variáveis se correlacionam de forma inversa moderada com a variável em análise. Considerando o aumento da fração ligada como uma resposta de controle ao aumento da corticosterona plasmática, os resultados estão de acordo com a literatura, que mostra que a presença dos filhotes é essencial para manutenção da quiescência do eixo HHA, característica da lactação (WALKER *et al.*, 1992; WINDLE *et al.*, 1997; WALKER *et al.*, 2004). Encontramos também uma correlação positiva moderada com o comportamento de autolimpeza. Níveis aumentados de comportamento de autolimpeza, encontrados nas genitoras do grupo violência, estão associados a maiores níveis de ansiedade (DENMARK *et al.*, 2010). Assim, as genitoras mais ansiosas tendem a apresentar maior fração de corticosterona ligada.

Quando avaliamos as variáveis correlacionadas com a fração ligada de corticosterona apenas das genitoras do grupo violência, as relações entre ansiedade e fração ligada se tornam mais claras. Os coeficientes de correlação com o comportamento de autolimpeza nos diferentes dias de avaliação se tornam mais fortes. Um segundo fator muito interessante emerge dessa análise: genitoras que conseguem subjugar o macho intruso com maior frequência e por mais tempo no DPN5, tem menor fração ligada de corticosterona (Coeficiente de correlação = -0,81 $p=0,015$ – correlação forte negativa). Possivelmente, as fêmeas que conseguem subjugar o macho intruso o percebem como uma ameaça aos filhotes que pode ser

evitada. O conjunto de comportamentos agressivos apresentado pela fêmea tem justamente o objetivo de proteger a prole. Subjugar o macho intruso pode ser visto como uma resposta eficiente de proteção (MENNELLA e MOLTZ, 1988; DE ALMEIDA *et al.*, 2014). De fato, quando correlacionamos o tempo e a frequência de subjugação do macho intruso com os comportamentos de autolimpeza, existe uma correlação forte negativa entre a frequência de subjugação do intruso e o comportamento de autolimpeza DNP3+5 (Coeficiente de correlação de Spearman = -0,786; $p=0,021$; $n=8$) e uma correlação moderada negativa entre o tempo de subjugação do intruso e comportamento de autolimpeza DPN3+5 (Coeficiente de correlação de Spearman = -0,738; $p=0,037$; $n=8$). Fica, assim, evidente a relação entre subjugar o macho e a ansiedade da genitora. De forma geral, as genitoras que conseguem dominar o intruso têm menor fração ligada de corticosterona e são menos ansiosas, possivelmente estando menos estressadas.

A intervenção com macho intruso também teve um impacto interessante sobre os níveis de ocitocina circulantes nas genitoras do grupo violência. Embora as medianas não sejam significativamente diferentes, a variabilidade da concentração de ocitocina plasmática foi drasticamente reduzida. Respostas hormonais apresentam um intervalo fisiológico, no qual tem seu funcionamento adequado. Uma redução do intervalo é um forte indicativo de alterações no eixo endócrino relacionado.

A ocitocina é um componente essencial na estruturação do vínculo entre a mãe e seus filhotes bem como dos comportamentos maternos e ejeção do leite (RILLING e YOUNG, 2014). Eventos que aumentam os níveis de corticosterona circulante durante a lactação, tem um efeito direto sobre os níveis de ocitocina mediado pelos glicorticoides (VILELA *et al.*, 2013). Ao correlacionarmos os níveis de corticosterona

livre, ligada, total e fração ligada com os níveis de ocitocina, não encontramos correlação significativa. No entanto, as variações de corticosterona imediatamente após a intromissão do macho intruso, não avaliadas nesse trabalho, podem ter um papel mais significativo nas variações dos níveis de ocitocina na genitora.

A estimulação do mamilo pela sucção do neonato é um dos estímulos mais fortes para a secreção de ocitocina na circulação neuroipofisária, pelos neurônio magnocelulares do núcleo supra-óptico (NSO) (SVENNERSTEN-SJAUNJA e OLSSON, 2005; OLSSON e HOGBERG, 2009). Quando buscamos as variáveis correlacionadas com os níveis plasmáticos de ocitocina na genitora, encontramos uma correlação moderada com o tempo de amamentação com dorso arqueado no DPN 3, estando de acordo com o esperado.

Em fêmeas não lactantes, estímulos estressores causam aumento da liberação de ocitocina para circulação (ONAKA, 2004), o mesmo não sendo válido para fêmeas durante a gestação e lactação (LIGHTMAN e YOUNG, 1989; NEUMANN *et al.*, 1999). A inibição da liberação de ocitocina para circulação em resposta a um evento estressor durante a lactação agiria como uma forma de manter as reservas de ocitocina para uso em reposta à sucção do mamilo, por exemplo. Essa inibição se daria pelos níveis centrais elevados de ocitocina na fêmea lactante (NEUMANN *et al.*, 1999). Dessa forma, três fatores podem estar atuando para causar uma redução na variação dos níveis de ocitocina circulante: um aumento transitório nos níveis de corticosterona frente ao macho intruso; inibição da liberação de ocitocina para circulação pelos níveis aumentados de ocitocina central devido ao período de lactação; e o tempo reduzido de contato com o filhote e amamentação.

Ao avaliarmos as variáveis correlacionadas com os níveis de ocitocina plasmática nas genitoras apenas no grupo violência, encontramos resultados peculiares. Comportamentos que normalmente se correlacionam com aumentos de ocitocina, nos animais que sofreram intervenção, a correlação é inversa. Encontramos correlações inversas fortes com o tempo que a genitora permanece no ninho nos dois dias avaliados, bem como o tempo total de amamentação. Existe uma série de relatos na literatura mostrando o papel da ocitocina encefálica (atuante dentro do próprio sistema nervoso central como neuromodulador) na regulação dos comportamentos maternos e comportamento agressivo (ARGIOLAS e GESSA, 1991; BOSCH *et al.*, 2005; CLINTON *et al.*, 2010; BOSCH e NEUMANN, 2012; CURLEY *et al.*, 2012), mas pouco se fala de do papel da ocitocina circulante nesses comportamentos. O papel da ocitocina circulante está melhor descrito em relação a contração uterina durante o parto e a ejeção do leite durante a amamentação (SVENNERSTEN-SJAUNJA e OLSSON, 2005; OLSSON e HOGBERG, 2009).

De forma geral, parece haver uma alteração no sistema ocitocinérgico nas genitoras do grupo violência, no entanto as conclusões dependem de uma investigação mais profunda desse sistema.

Ao direcionarmos nossa atenção à prole, dentro dos primeiros resultados apresentados, a redução da corticosterona em filhotes machos no quinto dia de vida chama a atenção. Considerando o ambiente violento como um ambiente estressor, em uma resposta clássica ao estresse, esperaríamos um aumento na liberação de glicocorticoides (CAMPBELL e EHLERT, 2012). No entanto, é importante notar que esse estressor está ocorrendo em um momento muito particular em relação ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Para compreender a resposta a um evento aversivo,

como o macho intruso, durante o período hiporresponsivo, se torna necessária a observação de diversos fatores, principalmente a resposta da genitora frente ao intruso (WALKER *et al.*, 2004).

Objetivando explicar os níveis de corticosterona encontrados nos filhotes machos devemos considerar dois mecanismos, pelos menos: primeiro um efeito direto do ambiente aversivo sobre os filhotes e, segundo, um efeito mediado pela genitora.

Um estressor diretamente aplicado ao filhote – lesão na pata – no período neonatal pode ocasionar uma redução dos níveis de corticosterona, embora o mecanismo não esteja claro (VICTORIA *et al.*, 2014). Ward e colaboradores demonstraram que filhotes criados artificialmente, na ausência da genitora, do dia 5 ao 12 de vida pós-natal, apresentam níveis reduzidos de corticosterona em resposta ao estresse por injeção intraperitoneal, quando comparados a animais controles (WARD *et al.*, 2004). A privação materna por si só constitui um modelo de estresse social (MARCO *et al.*, 2015). Somando-se a menor permanência da genitora no ninho à redução da amamentação em um horário crítico, a intervenção pode estar mimetizando um processo de privação que, somado a presença do macho intruso, leva a um quadro de estresse em que há uma redução da corticosterona circulante.

Considerando o papel da genitora como mediadora, um primeiro caminho a seguir seria assumir que uma parte significativa da corticosterona circulante no filhote vem da mãe via amamentação (MACRI *et al.*, 2011). Como a amamentação está reduzida em um período crítico que é o início do ciclo claro, os níveis de corticosterona no filhote também estariam reduzidos (BRUMMELTE *et al.*, 2010). Ao verificarmos os coeficientes de correlação entre os níveis de corticosterona plasmática nos filhotes

machos e variáveis relacionadas com amamentação, encontramos apenas uma correlação moderada positiva com a amamentação total no DPN3 (coeficiente de Pearson = 0,55) e com a soma da amamentação relaxada sobre os filhotes nos dias 3 e 5 de vida pós-natal (coeficiente de Pearson = 0,55). Para se confirmar uma relação mais direta entre amamentação e os níveis de corticosterona dos filhotes, esperaríamos uma correlação mais forte entre os eventos de amamentação no DPN 5 e a variável.

As genitoras do grupo violência apresentam um maior percentual de corticosterona ligada a proteínas carreadoras do que as genitoras do grupo controle. Se assumirmos que apenas a corticosterona livre é capaz de chegar ao leite, a fração ligada pode influenciar a quantidade de corticosterona que a fêmea está passando para o filhote através da amamentação. De fato, os níveis de corticosterona no leite estão diretamente relacionados aos níveis de corticosterona plasmática livre, atingindo cerca de um décimo desses. (YEH, 1984) Na análise por correlação, a variável com maior correlação com os níveis plasmáticos de corticosterona nos filhotes machos foi a fração de corticosterona da genitora que se encontrava sob a forma ligada (negativa moderada $\rho = -0,652$; $p=0,011$).

Com o objetivo de verificar possíveis interações entre a amamentação e a fração ligada de corticosterona da mãe na definição dos níveis de corticosterona do filhote, utilizamos regressão linear para estabelecer quais fatores estão influenciando os níveis de corticosterona dos filhotes machos. A modelagem confirmou o papel da fração livre independentemente das variáveis relacionadas com a amamentação ($R^2 = 0,42$, $p=0,016$ ver tabela 12). Dessa forma, a fração ligada de corticosterona da genitora parece ter um papel importante na determinação dos níveis plasmáticos de

corticosterona nos filhotes machos. Avaliar o comportamento de amamentação em outros horários que não imediatamente após o intruso podem esclarecer melhor a relação entre amamentação, fração ligada de corticosterona da genitora e níveis de corticosterona do filhote.

Ainda dentro do contexto da genitora como mediadora das alterações de corticosterona dos filhotes, um estudo realizado por Moles e colaboradores submeteu fêmeas lactantes ao odor de um macho desconhecido em uma caixa separada da ninhada por 15 minutos. A retirada da fêmea por 15 minutos não causou alteração na corticosterona dos filhotes mas, após 30 minutos de contato com essa genitora, os níveis de corticosterona nos filhotes foi reduzido a menos da metade dos níveis de animais com genitoras não estressadas (MOLES *et al.*, 2008). Esse experimento indica que a interação com uma genitora estressada tem efeitos pronunciados sobre os níveis plasmáticos de corticosterona dos seus filhotes.

Quando correlacionamos os níveis de corticosterona dos filhotes machos do grupo violência com as variáveis do comportamento maternal e agressivo encontramos uma forte correlação negativa com o tempo de subjugação da genitora. Dessa forma, a experiência da genitora durante o comportamento agressivo tem relação direta com os níveis de corticosterona dos filhotes, confirmado os resultados encontrados por Moles e colaboradores (MOLES *et al.*, 2008).

Houve uma segunda correlação, forte positiva, com o tempo de interação entre o macho intruso e os filhotes, indicando um possível efeito direto do intruso sobre os mesmos. No entanto, a emergência do comportamento de congelamento, aumento de corticosterona e ativação da amígdala frente ao odor de um macho intruso, ocorre

apenas depois do DPN10 (TAKAHASHI, 1992; WIEDENMAYER e BARR, 2001; WIEDENMAYER *et al.*, 2003; MORICEAU *et al.*, 2004), indicando que possivelmente os efeitos da presença do macho no ninho não sejam diretos.

Considerando-se o todo, os principais efeitos parecem ser mediados pela genitora. Levando-se em conta a natureza altricial dos filhotes, esse resultado tem coerência biológica e está de acordo com a literatura (LIU *et al.*, 1997; WEAVER *et al.*, 2004; MACRI e WURBEL, 2007; MOLES *et al.*, 2008; MACRI *et al.*, 2011; FODOR e ZELENA, 2014). Embora os filhotes apresentem baixa capacidade sensorial, a presença do macho no ninho teve efeito sobre os filhotes, como mostrado pelo estudo de correlação. No entanto, não podemos excluir a possibilidade de que a visita do macho ao ninho intensifique o estado de estresse da genitora, levando a um efeito indireto.

5.2 EXPERIMENTO 2

Ao repetirmos a intervenção nesse segundo conjunto de animais, a resposta agressiva da mãe frente ao macho intruso, no protocolo sugerido, foi confirmada. Dessa forma, podemos afirmar que os filhotes e a genitora foram submetidos a um ambiente violento. Houve consistência também nas alterações de comportamento maternal, com redução da amamentação com dorso arqueado, amamentação total e tempo de permanência da genitora no ninho nos 30 minutos posteriores a retirada do intruso. Dessa forma, confirmamos a reprodutibilidade da intervenção quanto à evocação de resposta agressiva por parte da genitora e quanto às alterações de comportamento maternal.

O comportamento maternal é um conjunto de ações da genitora que visam promover o cuidado necessário para a sobrevivência e o bem-estar físico e mental da prole (DULAC *et al.*, 2014). Consiste em um comportamento estruturado, variando as ações de acordo com horários específicos e idade da prole (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013). Alterações na estrutura do comportamento maternal tem efeitos significativos sobre o desenvolvimento comportamental da prole e sobre o vínculo mãe-filhote (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013; REIS *et al.*, 2014). Ao optarmos por efetuar a intervenção poucas horas após o início do ciclo claro, interferimos no momento em que a fêmea passa mais tempo em contato com o filhote (genitora no ninho) e em que o comportamento de amamentação ocorre com maior intensidade e qualidade (amamentação com dorso arqueado) (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013). Estar presente no ninho e amamentar com dorso arqueado tem relação direta com o correto desenvolvimento físico, emocional e cognitivo dos filhotes (CARINI *et al.*, 2013; SCHMAUSS *et al.*, 2014; VAN VUGT *et al.*, 2014).

As alterações de comportamento maternal encontradas se devem em grande parte à ruptura do padrão de cuidado pela intromissão de um macho estranho. Aproximadamente três horas após a retirada do intruso o comportamento já está normalizado, mas o momento específico de alto contato com o filhote e amamentação de alta qualidade está perdido.

A presença de um macho intruso no ninho durante o ciclo claro tem efeito profundo sobre as genitoras. Não fomos capazes de demonstrar um aumento de corticosterona nas genitoras frente ao macho intruso, devido ao momento de coleta. No entanto, a mudança no padrão de distribuição das frações de corticosterona livre e ligada nos indicam uma resposta transitória ao estresse nesses animais,

rapidamente obliterada por proteínas ligadoras circulantes (QIAN *et al.*, 2011). Um segundo indicativo de que um evento estressor está ocorrendo, deriva do menor ganho de peso durante a lactação nas genitoras do grupo violência. Não houve diferença de massa corporal entre as genitoras do grupo violência e do grupo controle no DPN5, no entanto, no DPN21 as genitoras do grupo violência apresentavam massa corporal reduzida em relação às controles. A injeção de corticosterona exógena em fêmeas lactantes reduz drasticamente o ganho de peso durante a lactação (BRUMMELTE *et al.*, 2010), de forma semelhante ao encontrado na intervenção com o macho intruso.

Dessa forma, o ganho de peso reduzido das genitoras do grupo violência está provavelmente relacionado ao estresse intermitente a que esses animais são submetidos, ao experiencarem a intervenção com macho intruso.

A segunda parte do experimento dois objetivou avaliar os efeitos sobre os filhotes a médio prazo. A ligação entre experiências adversas precoces e o desenvolvimento de psicopatologias na adolescência e idade adulta se encontra bem documentado na literatura (BRYER *et al.*, 1987; KESSLER *et al.*, 1997; SPINHOVEN *et al.*, 2010; CIVIDANES *et al.*, 2014), com especial atenção ao papel dos cuidadores e do ambiente gerado por eles (GERLSMA *et al.*, 1990; ALLOY *et al.*, 1999; ALLOY *et al.*, 2006; MEZULIS *et al.*, 2006).

Embora diferentes tipos de adversidades na infância aumentem o risco do desenvolvimento de doenças psicológicas, a violência familiar, abuso e negligência são as que conferem maior risco (BENJET *et al.*, 2010). Dentre as psicopatologias, comportamentos internalizantes, em especial ansiedade, estão aumentados em

crianças/adolescentes submetidas a ambiente violento (violência doméstica) (KERNIC *et al.*, 2003).

Os cuidadores tem papel central na exacerbação ou redução dos efeitos deletérios do ambiente violento precoce sobre desenvolvimento psicoemocional da criança (GERLSMA *et al.*, 1990; KESSLER *et al.*, 1997; MEZULIS *et al.*, 2006; PEEK-ASA *et al.*, 2007; SAMUELSON *et al.*, 2012). Uma das principais hipóteses para explicar o papel dos pais no desenvolvimento da ansiedade consiste na interação entre a criança e de um cuidador ansioso, que responde exageradamente à ansiedade dos filhos. A resposta exacerbada dos genitores a pequenas situações estressantes faz com que os filhos interpretem o mundo como aversivo, no qual qualquer ameaça é extrema (RAPEE, 1997; HUDSON e RAPEE, 2001).

Nesse contexto, os comportamentos de ansiedade e sua relação com o cuidado parental são de especial importância no estudo do ambiente violento. Para validação do modelo, o comportamento semelhante a ansiedade na prole foi definido como um dos desfechos a ser analisado.

A intervenção com macho intruso induziu um aumento consistente no comportamento semelhante a ansiedade nos filhotes quando juvenis, tanto em machos quanto em fêmeas. Não houve diferença de locomoção entre os animais dos dois grupos na tarefa de campo aberto, dessa forma, os dados podem ser expressos e avaliados em tempos absolutos (WALF e FRYE, 2007). Houve aumento do tempo de permanência no braço fechado, com redução do tempo de permanência no braço aberto, bem como da frequência de entradas em cada um dos braços. Dos comportamentos associados, esticar e autolimpeza aumentados são indicadores de

ansiedade, enquanto que aumentos nos comportamentos de levantar nas patas traseiras e mergulhar indicam comportamentos de exploração inversamente relacionados ao comportamento de ansiedade (WALF e FRYE, 2007). Os machos do grupo violência apresentaram redução do comportamento de mergulhar e aumento do comportamento de esticar. De forma um tanto contraditória, as fêmeas apresentaram aumento no comportamento de mergulhar, mesmo apresentando tempo elevado no braço fechado.

Quando avaliamos as variáveis correlacionadas com o tempo que os filhotes machos e fêmeas passam no braço fechado, com frequência visualizamos os comportamentos de construção do ninho e autolimpeza, indicativos de ansiedade maternal, apresentando correlação positiva (DENMARK *et al.*, 2010). De forma complementar, comportamentos como presença da genitora no ninho e amamentação com dorso arqueado, que indicam um cuidado maternal estável e dedicado aos filhotes, se correlacionam de forma inversa com o comportamento de ansiedade.

Considerando apenas os animais do grupo violência – correlações Modelo II – a compensação da amamentação no segundo horário registrado (H2) tem efeito protetor nos machos contra ansiedade – correlação negativa moderada. Nas fêmeas, o maior efeito protetor vem da interação da mãe com os filhotes durante a intervenção com macho intruso – correlação negativa moderada.

De forma geral, o estado de ansiedade da genitora parece estar diretamente relacionado com o desenvolvimento de comportamentos semelhante a ansiedade em juvenis. Genitoras menos ansiosas, que permanecem mais tempo no ninho e amamentam com mais qualidade, tem filhotes menos ansiosos. Já aquelas que

apresentam indicadores de ansiedade mais intensos, como comportamento de autolimpeza e construção do ninho, tem filhotes mais ansiosos, estando de acordo com a hipótese proposta por Reed e colaboradores para ansiedade em humanos (RAPEE, 1997; HUDSON e RAPEE, 2001; MIHALOPOULOS *et al.*, 2015).

A programação precoce de ansiedade e medo aumentados na adolescência podem ser interpretados como uma tentativa de adaptação a um ambiente possivelmente aversivo. Se a prole interpretar corretamente as dicas passada pelos cuidadores e o ambiente permanecer aversivo, a prole será bem adaptada ao ambiente. No entanto, a sociedade moderna valoriza indivíduos centrados e com foco, capazes de desenvolver atividades de alta demanda intelectual, fazendo com que quadros de ansiedade possam facilmente tornar uma pessoa disfuncional (RAPAPORT *et al.*, 2005).

Além dos efeitos comportamentais, a intervenção também teve efeitos endócrino que perduram a médio prazo. Avaliar efeitos duradouros do ambiente perinatal sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) pode ser considerado uma abordagem clássica para essa área de estudo. Essas relações vêm sendo estudadas desde o início da década de 50 e até os dias de hoje (WEININGER, 1954; LEVINE, 1957; MCEWEN *et al.*, 2012; ANACKER *et al.*, 2014).

Em mamíferos, o comportamento da genitora para com sua prole é de suma importância na programação da resposta do eixo HHA na idade juvenil e adulta, tanto basal quando em situações de estresse (LIU *et al.*, 1997; MACRI *et al.*, 2004; SZYF *et al.*, 2005; JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013; SCHMID *et al.*, 2013; HENRIQUES *et al.*, 2014). O padrão de cuidado que a genitora oferece a sua prole

tem efeitos diretos sobre o número de neurônios e na sinaptogênese em áreas ligadas a resposta ao estresse (LIU *et al.*, 2000; BREDY *et al.*, 2003; LUCION *et al.*, 2003), na expressão de receptores para glicocorticóides em diferentes tecidos (LIU *et al.*, 1997; SZYF *et al.*, 2005), desenvolvimento da glândula hipófise (GANELLA *et al.*, 2015), dentre outros efeitos.

Considerando o caráter disruptivo que a intervenção teve sobre o comportamento maternal – a genitora reduz comportamentos acolhedores e aumenta comportamentos agressivos – alterações de regulação do eixo HHA eram esperadas para o modelo. A intervenção levou a alterações persistentes na regulação do eixo HHA, fazendo com que tanto machos quanto fêmeas apresentassem níveis basais de corticosterona reduzidos em comparação com animais controles na idade juvenil (28 dias de vida pós-natal).

Com o objetivo de compreender as relações entre o ambiente gerado pela intervenção e as alterações do eixo HHA, realizamos estudos de correlação como descrito na seção de materiais e métodos. Considerando que animais controles apresentam maiores níveis de corticosterona basal, foram consideradas variáveis protetoras aquelas que aumentam os níveis de corticosterona basal dos filhotes e deletérias aquelas que reduzem.

Nas correlações utilizando tanto o grupo controle quanto o grupo violência, fica claro o papel da amamentação, em especial amamentação com dorso arqueado, (correlações moderadas e fortes positivas) na determinação dos níveis basais de corticosterona dos filhotes, tanto machos quanto fêmeas. Considerando apenas os filhotes fêmeas, a presença da genitora no ninho também se destaca como fator

protetor (correlação forte positiva). O comportamento de construir o ninho, em especial no horário H1, está correlacionado de forma inversa forte com os níveis de corticosterona basal dos filhotes fêmeas. Dentro do padrão do comportamento maternal, o horário H1 é um horário de maior contato direto com os filhotes, envolvendo comportamentos como presença no ninho e amamentação de alta qualidade (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013). Deixar o ninho para reforçar a construção do mesmo, pode ser interpretado como uma ruptura do padrão do comportamento maternal, levando a alteração da regulação do eixo HHA nas fêmeas juvenis (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013; SCHMID *et al.*, 2013; DULAC *et al.*, 2014; HENRIQUES *et al.*, 2014; VAN VUGT *et al.*, 2014).

Um segundo conjunto de correlações foi realizado com o objetivo de compreender os fatores que levam à redução dos níveis de corticosterona no grupo violência. Quando avaliamos apenas os animais do grupo violência, a agressividade da genitora contra o intruso é o fator que confere maior proteção quanto aos níveis de corticosterona basais em machos (correlação forte positiva). A compensação da lambida no segundo horário de registro (H2) também tem forte efeito protetor, sendo que o dia de vida pós-natal 5 parece ser o dia de maior importância para esses dois efeitos protetores. O comportamento de lambida ano-genital, juntamente com a amamentação com dorso arqueado são essenciais para o correto desenvolvimento do eixo HHA, principalmente em machos (MEANEY e SZYF, 2005). A interação da genitora com os filhotes durante a primeira intervenção também tem caráter protetor. Amamentar os filhotes após o intruso tem efeito deletério sobre os níveis de corticosterona basal dos filhotes, exceto no DPN9.

De uma forma geral, para os filhotes machos, a agressividade da fêmea contra o intruso e cuidar dos filhotes durante e algumas horas após a intervenção despontam como os principais fatores protetores.

Para as fêmeas juvenis, a presença da genitora no ninho e amamentação, principalmente a compensação no segundo horário registrado (H2), são os comportamentos com maior efeito protetor – correlações fortes positivas – para os níveis basais de corticosterona.

Os resultados corroboram os achados da literatura que mostram que a qualidade do comportamento maternal é essencial na determinação do nível basal de ativação do eixo HHA (LIU *et al.*, 1997; LEVINE, 2001; HUOT *et al.*, 2004; MACRI *et al.*, 2004; MEANEY e SZYF, 2005; MACRI *et al.*, 2011; SCHMID *et al.*, 2013; GANELLA *et al.*, 2015).

Em humanos, exposição a ambiente precoce adverso (abuso, negligência e violência) está relacionado com baixos níveis de cortisol diurno (BRUCE *et al.*, 2009; BERNARD *et al.*, 2015; SUOR *et al.*, 2015), embora haja grande variação nos relatos da literatura (GONZALEZ, 2013).

5.3 EXPERIMENTO 3

No experimento 3, focamos no impacto a longo prazo da intervenção com macho intruso apenas nos animais do gênero masculino. Os animais do gênero feminino foram destinados a outros experimentos não relatados neste trabalho.

Ao evidenciarmos o aumento de comportamento semelhante à ansiedade em juvenis, nos questionamos se seria apenas uma alteração passageira, devida às

mudanças características da fase juvenil, ou se essa alteração também estaria presente na idade adulta.

Utilizamos um modelo alternativo de avaliação do comportamento semelhante à ansiedade, visto que nosso objetivo incluía verificar também a interação entre ansiedade e aprendizado de uma tarefa envolvendo memória espacial de trabalho (ASTH *et al.*, 2012). Através desse paradigma conseguimos evidenciar que o comportamento semelhante a ansiedade está aumentado também em animais adultos.

Como discutido para os animais juvenis, os eventos perinatais têm papel importante no desenvolvimento de comportamento de ansiedade, tanto em roedores (LIPPMANN *et al.*, 2007; RANA *et al.*, 2015), quanto em humanos (HUDSON e RAPEE, 2001; MIHALOPOULOS *et al.*, 2015).

Modelos de separação maternal prolongada (180 minutos diários), no mesmo horário que utilizamos nesse trabalho para intervenção com macho intruso, levam ao aumento do comportamento semelhante a ansiedade na idade adulta (RANA *et al.*, 2015). O modelo de separação maternal também altera o padrão de cuidado maternal (VETULANI, 2013; BAILOO *et al.*, 2014). Ao ser aplicado no início do ciclo claro, priva os filhotes em um momento crítico em que a amamentação com dorso arqueado e comportamento de lambida ocorrem em maior intensidade (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013).

Como o que ocorreu para ansiedade em juvenis, a ansiedade das genitoras também está correlacionada com o comportamento semelhante à ansiedade em adultos. Tanto nas correlações envolvendo os dois grupos – Modelo 1 – quando nas

correlações apenas no grupo violência – modelo 2. Dentre as principais variáveis correlacionadas com a ansiedade em adultos, encontramos comportamento de autolimpeza da genitora. É importante notar que o momento em que o comportamento de autolimpeza é executado é de extrema importância para determinação do comportamento ansioso dos filhotes.

A autolimpeza é um comportamento mais comum no horário H2, especialmente no DPN3 (ver resultados de maternal), visto que neste horário a fêmea já não está tão conectada aos filhotes (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013). A autolimpeza durante o comportamento agressivo tem efeito protetor no que tange a ansiedade dos filhotes quando adultos, sendo o contrário do que esperaríamos. Como não temos um controle para comparar a frequência e duração do comportamento de autolimpeza durante o comportamento agressivo, seria necessário avaliar sua estrutura para evidenciar se ele deriva de um aumento de ansiedade da genitora ou não (KALUEFF e TUOHIMAA, 2005; DENMARK *et al.*, 2010).

Dentro do grupo violência uma série de relações interessantes emergem: a agressividade da fêmea contra o macho intruso aparece como um fator relacionado ao aumento de comportamento semelhante à ansiedade nos filhotes. Ainda nesse contexto, lambe os filhotes durante a intervenção com macho intruso se correlaciona com uma redução no comportamento de ansiedade. Aparentemente, o comportamento de lambida tem efeito protetor para comportamentos semelhantes a ansiedade mesmo ocorrendo em uma situação estressora (BAILLOO *et al.*, 2014).

Aumentos no comportamento semelhante a ansiedade podem ter um impacto importante sobre a capacidade cognitiva. Além disso variações do ambiente neonatal

podem acarretar em alteração cognitiva na idade adulta. Para avaliar a capacidade cognitiva dos filhotes dos grupos controle e violência quando adultos, dois testes foram realizados. O primeiro teste consiste em uma tarefa de aprendizado espacial dependente da memória de trabalho. O teste possui um componente aversivo dado pelo ambiente aberto e elevado dos braços abertos do labirinto em T-elevado.

Os animais do grupo controle aprenderam a tarefa em até três tentativas, com um número crescente de animais aprendendo a tarefa a cada nova tentativa. A distribuição do número de tentativas para aprender a tarefa no grupo violência foi significativamente diferente da distribuição dos animais controles. Inicialmente, houve uma perda de 5 animais no grupo violência por não explorarem o ambiente, permanecendo imóveis. Aproximadamente 40% dos animais do grupo violência aprenderam a tarefa em apenas uma tentativa. Possivelmente, o elevado grau de ansiedade desses animais faz com que percebam o ambiente como aversivo e evitem futuras explorações. Um número decrescente de animais aprendeu a tarefa em duas e depois três tentativas. Quase 20% dos animais não aprenderam a tarefa em sete tentativas.

Considerando que um número significativo de animais do grupo violência aprendeu a tarefa, a interpretação dos resultados não permite uma conclusão simples e abrangente. O que se pode afirmar é que o aprendizado segue um padrão diferenciado. De toda forma, cerca de 40% dos animais do grupo violência apresentaram desempenho inferior aos controles na tarefa, indicando uma perda cognitiva que afeta parte dos animais, e não todo o grupo.

Ao buscar relações com as variáveis de comportamento maternal, encontramos principalmente correlações moderadas e fracas, ambas negativas, entre o comportamento de lambida dos filhotes e o número de tentativas para aprender a tarefa. O comportamento de lambida genital tem sido amplamente explorado na literatura como sendo um comportamento que aumenta o desenvolvimento cognitivo da prole (LIU *et al.*, 2000; BREDY *et al.*, 2003; BILBO *et al.*, 2007; CHAMPAGNE *et al.*, 2008; JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013; LOMANOWSKA e MELO, 2015).

Quando buscamos correlações apenas dentro do grupo violência, não encontramos correlações significativas. Considerando a heterogeneidade do grupo, talvez seja necessário um número amostral maior para evidenciar possíveis correlações.

O segundo teste consistiu na tarefa de reconhecimento de objetos, utilizando memória de reconhecimento de curta duração. Houve uma redução significativa no número de animais que aprenderam a tarefa no grupo violência. Cerca de 69% dos animais do grupo controle aprendem a tarefa contra apenas 31% dos animais do grupo violência, reforçando o déficit cognitivo como efeito da intervenção com macho intruso. Novamente, apenas parte dos animais foi afetada, não sendo uma relação determinista. Nas variáveis relacionadas, encontramos uma correlação fraca entre amamentação com dorso arqueado no DPN3 H2 e o tempo explorando o novo objeto. A amamentação com dorso arqueado é um comportamento maternal de alta qualidade, descrito na literatura como tendo relação com desenvolvimento cognitivo (CHAMPAGNE *et al.*, 2008).

Estudos com roedores mostram um papel importante dos eventos do período perinatal no correto desenvolvimento cognitivo da prole (CANNIZZARO *et al.*, 2005; CANNIZZARO *et al.*, 2006; CHAMPAGNE *et al.*, 2008; LOMANOWSKA e MELO, 2015). Em especial, alterações do cuidado maternal (LIU *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2015) e eventos estressores (AISA *et al.*, 2009) estão relacionados com alteração de aprendizado espacial na idade juvenil, adulta e avançada (OITZL *et al.*, 2000).

Dentro das variações do comportamento maternal, os comportamentos de amamentação com dorso arqueado e, em especial, lambida, são os com maiores efeitos sobre a capacidade de aprendizado dos filhotes (LIU *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2000; CHAMPAGNE *et al.*, 2008). Dessa forma, as correlações entre comportamento maternal e aprendizado, encontradas com a intervenção com macho intruso, estão de acordo com os dados da literatura.

No modelo animal de privação maternal prolongada – 24h no DNP3 – utilizado por Oitzl e colaboradores, há um retardo no aprendizado da tarefa de labirinto aquático de Morris. É interessante notar nesse experimento que, à medida que os animais envelheciam, se evidenciou que apenas uma parcela foi afetada, sendo que o restante apresentou aprendizado ótimo. No caso dos controles, a distribuição foi normal, com a maioria apresentado resultados medianos (OITZL *et al.*, 2000). Os resultados desse experimento são semelhantes aos dados obtidos com a intervenção com macho intruso, na qual uma parcela da população é afetada e a outra permanece normal.

Um corpo crescente de evidências aponta para efeitos deletério da exposição à violência sobre o desenvolvimento cognitivo em humanos (PEEK-ASA *et al.*, 2007; JOURILES *et al.*, 2008; CARPENTER e STACKS, 2009; GUSTAFSSON *et al.*, 2013;

GUSTAFSSON *et al.*, 2015; SUOR *et al.*, 2015), com um papel determinante do cuidado maternal como efeito protetor (SAMUELSON *et al.*, 2012). Crianças vivendo em lares em que há relato de violência entre os cuidadores tem desempenho 12% menor em testes cognitivos (PEEK-ASA *et al.*, 2007). Crianças criadas em ambientes violentos tem desempenho reduzido em tarefas de memória explícita, sendo esse efeito menor quando a genitora demonstra cuidado parental de maior qualidade (JOURILES *et al.*, 2008).

Dentre os fatores de proteção para o desenvolvimento cognitivo em humanos, muito se tem discutido sobre o papel da amamentação. O aleitamento materno exclusivo nos primeiros meses de vida está diretamente relacionado com um melhor desenvolvimento cognitivo infantil (GOLDING *et al.*, 1997; DRANE e LOGEMANN, 2000; HORWOOD *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 2002; RICHARDS *et al.*, 2002; ODDY *et al.*, 2003; KAFOURI *et al.*, 2013). Repetidos estudos mostram que, em humanos, existe uma redução na iniciação e duração dos eventos de amamentação, em especial no comportamento de amamentação exclusiva, entre mulheres que vivem em lares em que há violência entre ela e o cônjuge (KENDALL-TACKETT, 2007; AVERBUCH e SPATZ, 2009; CERULLI *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2011; SIPSMA *et al.*, 2013; ZUREICK-BROWN *et al.*, 2013; MISCH e YOUNT, 2014).

De forma semelhante ao proposto para avaliação da ansiedade, optamos por verificar se a concentração de corticosterona plasmática reduzida encontrada em juvenis perdura até a idade adulta. Como nos filhotes e juvenis, os machos adultos do grupo violência apresentaram menor concentração basal de corticosterona em comparação com os controles. Para verificar o real significado dessa redução, os

animais foram submetidos ao estresse repetido por contenção e sua corticosterona foi medida 24 horas após o último evento estressor.

Não evidenciamos diferenças significativas nos níveis de corticosterona plasmática em machos do grupo controle estressado (24 horas após o último evento estressor), quando comparados com o grupo controle basal. Os animais do grupo violência estressado apresentaram níveis plasmáticos de corticosterona significativamente maiores quando comparados com o grupo violência basal.

O desenvolvimento do eixo de resposta ao estresse está intimamente relacionado com as experiências vividas no período perinatal, como discutido anteriormente (PERKEYBILE e BALES, 2015; WORKMAN *et al.*, 2015). O cuidado maternal tem papel chave na determinação do estado de ativação do eixo HHA em condições basais e em resposta a diferentes estressores, sendo esse papel bem caracterizado em roedores (SARRIEAU *et al.*, 1988; LIU *et al.*, 1997; WEAVER *et al.*, 2004; MEANEY e SZYF, 2005; SZYF *et al.*, 2005; CLAESSENS *et al.*, 2011), com um número crescente de trabalhos em humanos (PESONEN *et al.*, 2010; SCHMID *et al.*, 2013; HABERSAAT *et al.*, 2014; KIEL *et al.*, 2015; OUELLETTE *et al.*, 2015).

Dentro dos dois grupos, animais que tiveram genitoras mais ansiosas – construindo ninho e autolimpeza H1 nos diferentes dias correlacionados de forma moderada positiva – apresentaram maiores níveis de corticosterona pós-estresse. Como fatores protetores encontramos principalmente correlações moderadas e fracas com amamentação e presença da genitora no ninho. Em modelos animais em que ocorre aumento do comportamento de lambida e amamentação com dorso arqueado, a prole tende a apresentar reações menos intensas a estressores agudos e crônicos,

o oposto sendo verdadeiro (WEAVER *et al.*, 2004; MASIS-CALVO *et al.*, 2013; HENRIQUES *et al.*, 2014).

Considerando as correlações apenas no grupo violência, diferentes comportamentos que demonstram a agressividade da genitora contra o intruso se correlacionam de forma moderada positiva com os níveis de corticosterona pós-estresse. Quando avaliamos a relação do comportamento agressivo da genitora e os níveis basais de corticosterona em juvenis, vimos um efeito protetor. No entanto, quando consideramos o mesmo comportamento em relação aos níveis de corticosterona pós-estresse em adultos, ele parece ter um efeito deletério.

O único fator de proteção encontrado foi a presença da genitora no ninho no DPN7 H1, correlacionado de forma moderada negativa com os níveis de corticosterona pós-estresse. Em humanos, a ausência dos cuidadores (separação), programa o eixo HHA da prole de forma que adultos submetidos a estresse social apresentam ativação exacerbada desse eixo (PESONEN *et al.*, 2010).

É interessante notar que, em humanos, dois fatores importantes estão associados com menor resposta de cortisol frente a eventos estressores. Em primeiro está a quantidade de contato mãe-filho nos primeiros meses de vida e, em segundo, a duração e frequência de amamentação (BEIJERS *et al.*, 2013). Dessa forma, encontrar a presença da genitora do ninho e amamentação como fatores de proteção na ativação do eixo-HHA, aumentam o valor preditivo do modelo.

Dentro das correlações, uma informação aparentemente discrepante aparece: comportamento de lambida no DPN9 está correlacionado com os níveis de corticosterona pós-estresse de forma moderada positiva. De acordo com a literatura,

lamber os filhotes leva a uma série de alterações morfofuncionais que culminam em um aumento da retroalimentação negativa do eixo de resposta ao estresse, gerando respostas menores e menos duradouras (WEAVER *et al.*, 2004; SZYF *et al.*, 2005). No entanto, o comportamento de lambida deve apresentar um padrão adequado, sendo mais intenso nos primeiros dias pós-parto e diminuindo em direção ao desmame (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013). Dessa forma, comportamento de lambida elevado no DPN9 pode ser indicativo de uma desestruturação do comportamento maternal, com efeitos sobre a programação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Da mesma forma que as genitoras apresentaram ganho de peso reduzido durante a lactação, os filhotes machos apresentaram massa corporal reduzida ao longo de toda a vida, ficando sempre cerca de 10% abaixo do peso corporal dos controles. Um número grande de fatores se correlacionam com a massa corporal dos filhotes. Embora não tenhamos controlado a concentração plasmática de corticosterona das genitoras dos animais em que a massa corporal foi medida, de acordo com a literatura, aumentos transitórios diários nos níveis plasmáticos de corticosterona da genitora podem levar a redução de massa corporal na prole logo após o desmame, que perdura até a idade adulta (BRUMMELTE *et al.*, 2012). O estresse crônico durante gestação e amamentação tem efeito semelhante sobre o peso, afetando mais os machos do que as fêmeas (EMACK *et al.*, 2008). Os dados obtidos das genitoras do experimento 1, juntamente com os dados da literatura, indicam aumentos transitórios de corticosterona durante a intervenção, podendo este estar relacionado com a alteração de massa corporal dos filhotes machos.

Como as análises de correlação com a massa corporal envolveram um número amostral elevado, existe uma forte tendência a encontrarmos uma série de correlações fracas e moderadas, levando a um grande número de variáveis correlacionadas. Considerando os dois grupos, dentre as correlações mais fortes com efeito deletério sobre massa corporal, encontramos a ansiedade maternal – comportamento de autolimpeza – e amamentação de baixa qualidade – supino e relaxada sobre os filhotes. Como fatores protetores encontramos o tempo em que a genitora está presente no ninho e amamentando, relação amamentação de alta qualidade/amamentação total e amamentação com dorso arqueado, em especial nos primeiros dias de vida pós-natal – 3, 5 e 7.

Quando consideramos apenas o grupo violência, o tempo em que o intruso passa no ninho interagindo com os filhotes apresenta correlação forte negativa com a massa corporal. O tempo de subjugação da genitora pelo macho intruso e a ansiedade da genitora durante o agressivo também se correlacionam de forma forte negativa com a massa corporal da prole. De forma discrepante, a amamentação com dorso arqueado no DPN7, logo após o macho intruso, se correlaciona de forma forte negativa com a massa corporal dos filhotes. No entanto é importante lembrar que o comportamento maternal apresenta um padrão, com amamentação com dorso arqueado em grande quantidade nos primeiros dias pós-parto, reduzindo em direção ao desmame. Dessa forma, como discutido anteriormente, um aumento da amamentação com dorso arqueado no DPN7 pode ser um indicativo de desestruturação do comportamento maternal (JENSEN PENA e CHAMPAGNE, 2013). Uma verificação mais cuidadosa indica que amamentação com dorso arqueado

logo após o intruso tem efeito deletério sobre a massa corporal dos filhotes, enquanto que a compensação posterior, horário H2, tem efeito protetor.

O comportamento agressivo da genitora também parece influenciar negativamente a massa corporal dos filhotes, como indicado pelas correlações moderadas negativas com comportamento agressivo total, boxeando e chutando e ataques.

Como fatores de proteção para massa corporal dos filhotes, encontramos correlações fortes positivas com a genitora no ninho e amamentando, principalmente no horário H2. Dessa forma, aquelas ninhadas em que as genitoras compensam a falta de amamentação no horário H1 em um horário subsequente, têm maior massa corporal após o desmame.

A intervenção com macho intruso teve forte efeito sobre a genitora e sua prole, tanto durante a amamentação, quanto de forma duradoura. Embora os desfechos tenham sido discutidos separadamente, é importante notar a inter-relação entre as alterações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e alterações psicológicas como depressão e ansiedade (GUERRY e HASTINGS, 2011). Dessa forma, as alterações consistentes na regulação do eixo HHA nos animais do grupo violência, podem, e provavelmente estão, relacionadas com o aumento do comportamento semelhante a ansiedade e com o decréscimo cognitivo encontrado nesses animais (SUOR *et al.*, 2015) bem como com as alterações de massa corporal.

Dentro do conjunto de análises efetuadas, se destaca o papel da genitora como mediadora de muitos dos efeitos encontrados com a intervenção com macho intruso. A resposta da genitora a um evento estressor durante o período de lactação

está repetidamente associada com uma maior resiliência ou maior vulnerabilidade da prole frente a estressores futuros (LEVINE, 2001; HUOT *et al.*, 2004; MACRI *et al.*, 2004; WEAVER *et al.*, 2004; MACRI e WURBEL, 2007; MOLES *et al.*, 2008; PESONEN *et al.*, 2010; MACRI *et al.*, 2011; HABERSAAT *et al.*, 2014; GANELLA *et al.*, 2015). Dentro desse contexto, a interação genitora-filhote se torna um ponto de destaque para possíveis intervenções que visem reduzir a incidência de alterações psicológicas e melhorar o desempenho cognitivo de crianças em situações de risco.

De forma geral, um ambiente precoce em que haja um grau elevado de agressividade parece programar a prole para um conjunto de fenótipos comportamentais e fisiológicos envolvendo ansiedade, resposta aumentada ao estresse e menor desenvolvimento cognitivo. Considerando as semelhanças entre humanos e o presente modelo, a relação entre ambiente precoce e desfechos comportamentais, parece ter um mecanismo conservado em diferentes espécies, guardadas as devidas proporções.

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do protocolo de intervenção com macho intruso objetivou a criação de um modelo animal para estudo dos efeitos do ambiente violento precoce sobre o desenvolvimento da prole. Considerando as alterações encontradas e os desfechos mais comuns em humanos (ansiedade, déficit cognitivo e alterações do eixo HHA), o modelo apresenta forte validade aparente (face). Ao utilizarmos uma abordagem etologicamente relevante, ou seja, que mimetiza o contexto humano, desenvolvemos um modelo animal com validade de construto. Ao verificarmos que as variações do comportamento maternal têm efeitos protetores e deletério semelhantes ao que ocorre em humanos para os comportamentos de ansiedade, estresse e cognição, confirmamos a validade preditiva de utilizar o macho intruso para modelar a exposição precoce a um ambiente violento. Em relação aos objetivos específicos, podemos concluir que:

- A intervenção com macho intruso apresenta forte impacto agudo sobre a genitora e sua prole, sendo capaz de elicitar alterações no eixo HHA

de ambos. O impacto se assemelha ao esperado em humanos, conferindo validade aparente ao modelo animal.

- Submeter uma fêmea lactante a presença repetida de um macho intruso altera o comportamento maternal para com a prole de forma transitória, passando de um perfil acolhedor para um perfil agressivo de defesa, retornado ao normal de duas a três horas após cada evento.
- A intervenção acarreta em alterações do eixo HHA e de comportamento semelhante a ansiedade na prole a médio prazo (idade juvenil) consistente com que é encontrado em humanos criados em ambiente violento, reforçando a validade aparente.
- A intervenção também gera alterações a longo prazo sobre o eixo HHA, comportamento semelhante a ansiedade, capacidade cognitiva e desenvolvimento corporal da prole, semelhante ao que se esperaria de humanos criados em ambiente violento, reforçando mais uma vez a validade aparente do modelo.
- Os comportamentos maternos acolhedores estão repetidamente associados com proteção contra os efeitos do ambiente violento para todos os desfechos avaliados, semelhando ao esperado em humanos. A proteção pela qualidade do comportamento maternal confere forte validade preditiva ao modelo animal proposto.

Ao avaliarmos o conjunto de resultados obtidos, concluímos que a intervenção com macho intruso durante a lactação é um modelo animal de ambiente violento, com validade de construto, validade de face e validade preditiva. Experimentos buscando entender os mecanismos que levam ao desenvolvimento de diferentes

psicopatologias, déficit cognitivo e problemas de desenvolvimento causados pela exposição a um ambiente violento durante a infância, encontrarão no protocolo proposto uma ferramenta de apoio com grandes possibilidades.

7. PERSPECTIVAS

O processo de desenvolvimento e validação de um novo modelo animal desvenda um mundo de perspectivas assim que é concluído. Dessa forma, é um tanto desafiador delinear as perspectivas para o prosseguimento de tal trabalho.

Um dos objetivos iniciais deste trabalho de doutorado envolvia testar a hipótese de que as alterações cognitivas, de resposta ao estresse e ansiedade, comumente encontradas em crianças expostas ao ambiente violento, poderiam ser mediadas por alterações neuroendócrinas diretamente relacionadas com alterações neuroimunológicas. O que impedia o teste da hipótese era a falta de um modelo animal adequado. Se torna claro que agora, em posse de um modelo promissor, testar essa hipótese passa a ser o próximo passo lógico.

Assim sendo, propomos a avaliação de diferentes parâmetros que possam testar a hipótese anterior. A expressão de marcadores imunológicos no hipocampo, córtex frontal e hipotálamo, como citocinas pró-inflamatórias (IL-1, fator de necrose

tumoral – TNF-, IL-6), citocinas da resposta celular (IL-2, IL-4, IL-10 e Interferon-gama), ativação microglial (MHC de classe II, Toll-like receptor 4 - TLR4).

Dentre os desfechos encontrados, as alterações de massa corporal foram um resultado inesperado. Uma linha totalmente diferente de pesquisa pode ser desenvolvida apenas estudando as possíveis alterações metabólicas encontradas nesses animais. Para esclarecer o impacto do ambiente violento sobre o desenvolvimento corporal dos filhotes, propomos duas abordagens: a primeira consiste em avaliar o perfil metabólico basal desses animais; a segunda consiste em submetê-los a uma dieta hipercalórica, hiperlipídica e hiperpalatável, como a dieta de cafeteria, e então testar seu estado metabólico.

O efeito da intervenção sobre o sistema ocitocinérgico da genitora não ficou claro. A investigação mais detalhada da expressão central de ocitocina no núcleo supra óptico bem como seus receptores e sua associação da ocitocina quando hormônio é essencial para a consolidação do protocolo.

Ainda podemos explorar a morfologia e densidade e ativação neuronal em áreas relacionadas com o comportamento maternal na genitora, como NSO, relacionadas a cognição nos filhotes, como córtex e hipocampo, comportamento semelhante à ansiedade, como amígdala, e de regulação da resposta ao estresse, como hipocampo, NPV e LC.

Considerando que o presente trabalho foi apenas o desenvolvimento e validação do modelo animal, as perspectivas são muitas.

REFERÊNCIAS

AISA, B.; ELIZALDE, N.; TORDERA, R.; LASHERAS, B.; DEL RIO, J.; RAMIREZ, M. J. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. **Hippocampus**, v. 19, n. 12, p. 1222-31, 2009.

ALLOY, L. B.; ABRAMSON, L. Y.; SMITH, J. M.; GIBB, B. E.; NEEREN, A. M. Role of parenting and maltreatment histories in unipolar and bipolar mood disorders: mediation by cognitive vulnerability to depression. **Clin Child Fam Psychol Rev**, v. 9, n. 1, p. 23-64, 2006.

ALLOY, L. B.; ABRAMSON, L. Y.; WHITEHOUSE, W. G.; HOGAN, M. E.; TASHMAN, N. A.; STEINBERG, D. L.; ROSE, D. T.; DONOVAN, P. Depressogenic cognitive styles: predictive validity, information processing and personality characteristics, and developmental origins. **Behav Res Ther**, v. 37, n. 6, p. 503-31, 1999.

ALONSO-ALVAREZ, C.; VELANDO, A. Benefits and costs of parental care. In: ROYLE, N. J.; SMISETH, P. T., *et al.* (Ed.). **The evolution of parental care**. Oxford: Oxford University Press, 2012. p.40-61.

ANACKER, C.; O'DONNELL, K. J.; MEANEY, M. J. Early life adversity and the epigenetic programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 16, n. 3, p. 321-33, 2014.

ARGIOLAS, A.; GESSA, G. L. Central functions of oxytocin. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 15, n. 2, p. 217-31, 1991.

ASTH, L.; LOBAO-SOARES, B.; ANDRE, E.; SOARES VDE, P.; GAVIOLI, E. C. The elevated T-maze task as an animal model to simultaneously investigate the effects of drugs on long-term memory and anxiety in mice. **Brain Res Bull**, v. 87, n. 6, p. 526-33, 2012.

AVERBUCH, T.; SPATZ, D. Breastfeeding mothers and violence: what nurses need to know. **MCN Am J Matern Child Nurs**, v. 34, n. 5, p. 284-9, 2009.

BAILOO, J. D.; JORDAN, R. L.; GARZA, X. J.; TYLER, A. N. Brief and long periods of maternal separation affect maternal behavior and offspring behavioral development in C57BL/6 mice. **Dev Psychobiol**, v. 56, n. 4, p. 674-85, 2014.

BARKER, G. R.; WARBURTON, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? **J Neurosci**, v. 31, n. 29, p. 10721-31, 2011.

BARTA, R. A., JR.; SMITH, N. J. Willful Trauma to Young Children: A Challenge to the Physician. **Clin Pediatr (Phila)**, v. 2, p. 545-54, 1963.

BEIJERS, R.; RIKSEN-WALRAVEN, J. M.; DE WEERTH, C. Cortisol regulation in 12-month-old human infants: associations with the infants' early history of breastfeeding and co-sleeping. **Stress**, v. 16, n. 3, p. 267-77, 2013.

BENETTI, F.; MELLO, P. B.; BONINI, J. S.; MONTEIRO, S.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. **Int J Dev Neurosci**, v. 27, n. 1, p. 59-64, 2009.

BENJET, C.; BORGES, G.; MEDINA-MORA, M. E. Chronic childhood adversity and onset of psychopathology during three life stages: childhood, adolescence and adulthood. **J Psychiatr Res**, v. 44, n. 11, p. 732-40, 2010.

BERNARD, K.; ZWERLING, J.; DOZIER, M. Effects of early adversity on young children's diurnal cortisol rhythms and externalizing behavior. **Dev Psychobiol**, 2015.

BILBO, S. D.; NEWSUM, N. J.; SPRUNGER, D. B.; WATKINS, L. R.; RUDY, J. W.; MAIER, S. F. Differential effects of neonatal handling on early life infection-induced alterations in cognition in adulthood. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 3, p. 332-42, 2007.

BLANCHARD, D.; BLANCHARD, R. Affect and aggression: an animal model applied to human behavior. In: BLANCHARD, D. e BLANCHARD, R. (Ed.). **Advanced Studies in Aggression**. Orlando, USA: Academic Press Inc, 1984.

BLOOM, M. The Abused Child, Parents, and the Law. **R I Med J**, v. 47, p. 89-90, 1964.

BOSCH, O. J.; MEDDLE, S. L.; BEIDERBECK, D. I.; DOUGLAS, A. J.; NEUMANN, I. D. Brain oxytocin correlates with maternal aggression: link to anxiety. **J Neurosci**, v. 25, n. 29, p. 6807-15, 2005.

BOSCH, O. J.; NEUMANN, I. D. Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. **Horm Behav**, v. 61, n. 3, p. 293-303, 2012.

BREDY, T. W.; GRANT, R. J.; CHAMPAGNE, D. L.; MEANEY, M. J. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 10, p. 2903-9, 2003.

BRUCE, J.; FISHER, P. A.; PEARS, K. C.; LEVINE, S. Morning cortisol Levels in preschool-aged foster children: differential effects of maltreatment type. **Dev Psychobiol**, v. 51, n. 1, p. 14-23, 2009.

BRUMMELTE, S.; LIEBLICH, S. E.; GALEA, L. A. Gestational and postpartum corticosterone exposure to the dam affects behavioral and endocrine outcome of the offspring in a sexually-dimorphic manner. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 406-18, 2012.

BRUMMELTE, S.; SCHMIDT, K. L.; TAVES, M. D.; SOMA, K. K.; GALEA, L. A. Elevated corticosterone levels in stomach milk, serum, and brain of male and female offspring after maternal corticosterone treatment in the rat. **Dev Neurobiol**, v. 70, n. 10, p. 714-25, 2010.

BRYER, J. B.; NELSON, B. A.; MILLER, J. B.; KROL, P. A. Childhood sexual and physical abuse as factors in adult psychiatric illness. **American Journal of Psychiatry**, v. 144, n. 11, p. 1426-1430, 1987.

BUCHBINDER, E. Motherhood of Battered Women: The Struggle for Repairing the Past. **Clinical Social Work Journal**, v. 32, n. 3, p. 307-326, 2004.

CAMPBELL, J.; EHLERT, U. Acute psychosocial stress: does the emotional stress response correspond with physiological responses? **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 8, p. 1111-34, 2012.

CANNIZZARO, C.; PLESCIA, F.; MARTIRE, M.; GAGLIANO, M.; CANNIZZARO, G.; MANTIA, G.; CANNIZZARO, E. Single, intense prenatal stress decreases emotionality and enhances learning performance in the adolescent rat offspring: interaction with a brief, daily maternal separation. **Behav Brain Res**, v. 169, n. 1, p. 128-36, 2006.

CANNIZZARO, E.; MARTIRE, M.; GAGLIANO, M.; PLESCIA, F.; LA BARBERA, M.; MANTIA, G.; MINEO, A.; CANNIZZARO, G.; CANNIZZARO, C. Reversal of prenatal diazepam-induced deficit in a spatial-object learning task by brief, periodic maternal separation in adult rats. **Behav Brain Res**, v. 161, n. 2, p. 320-30, 2005.

CARINI, L. M.; MURGATROYD, C. A.; NEPHEW, B. C. Using chronic social stress to model postpartum depression in lactating rodents. **J Vis Exp**, n. 76, p. e50324, 2013.

CARPENTER, G. L.; STACKS, A. M. Developmental effects of exposure to Intimate Partner Violence in early childhood: A review of the literature. **Children and Youth Services Review**, v. 31, n. 8, p. 831-839, 2009.

CERULLI, C.; CHIN, N.; TALBOT, N.; CHAUDRON, L. Exploring the impact of intimate partner violence on breastfeeding initiation: does it matter? **Breastfeed Med**, v. 5, n. 5, p. 225-6, 2010.

CHAMPAGNE, D. L.; BAGOT, R. C.; VAN HASSELT, F.; RAMAKERS, G.; MEANEY, M. J.; DE KLOET, E. R.; JOELS, M.; KRUGERS, H. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. **J Neurosci**, v. 28, n. 23, p. 6037-45, 2008.

CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. **Fisiologia Humana de Huoussay**. 7^a. Porto Alegre: Artmed, 2004.

CIRULLI, F.; FRANCIA, N.; BERRY, A.; ALOE, L.; ALLEVA, E.; SUOMI, S. J. Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 33, n. 4, p. 573-85, 2009.

CIVIDANES, G. C.; MELLO, A. F.; SALLUM, J. M.; FOSSALUZA, V.; MEDEIROS, M.; MACIEL, M. R.; CAVALCANTE-NOBREGA, L. P.; MARI, J. J.; MELLO, M. F.; VALENTTE, N. L. Lack of association between the 5-HTTLPR and positive screening for mental disorders among children exposed to urban violence and maltreatment. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 36, n. 4, p. 277-84, 2014.

CLAESSENS, S. E.; DASKALAKIS, N. P.; VAN DER VEEN, R.; OITZL, M. S.; DE KLOET, E. R.; CHAMPAGNE, D. L. Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 214, n. 1, p. 141-54, 2011.

CLINTON, S. M.; BEDROSIAN, T. A.; ABRAHAM, A. D.; WATSON, S. J.; AKIL, H. Neural and environmental factors impacting maternal behavior differences in high-versus low-novelty-seeking rats. **Horm Behav**, v. 57, n. 4-5, p. 463-73, 2010.

CONNELLY, C. D.; HAZEN, A. L.; COBEN, J. H.; KELLEHER, K. J.; BARTH, R. P.; LANDSVERK, J. A. Persistence of intimate partner violence among families referred to child welfare. **J Interpers Violence**, v. 21, n. 6, p. 774-97, 2006.

CUNNINGHAM, A.; BAKER, L. **What about me! Seeking to understand a child's view of violence in the family.** Centre for Children & Families in the Justice System. LONDON ON. 2004

CURLEY, J. P.; JENSEN, C. L.; FRANKS, B.; CHAMPAGNE, F. A. Variation in maternal and anxiety-like behavior associated with discrete patterns of oxytocin and vasopressin 1a receptor density in the lateral septum. **Horm Behav**, v. 61, n. 3, p. 454-61, 2012.

CURTIS, G. C. Violence Breeds Violence - Perhaps? **Am J Psychiatry**, v. 120, p. 386-7, 1963.

DA SILVA BENETTI, C.; SILVEIRA, P. P.; WYSE, A. T.; SCHERER, E. B.; FERREIRA, A. G.; DALMAZ, C.; GOLDANI, M. Z. Neonatal environmental intervention alters the vulnerability to the metabolic effects of chronic palatable diet exposure in adulthood. **Nutr Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 127-37, 2014.

DA VEIGA, C. P.; MICZEK, K. A.; LUCION, A. B.; ALMEIDA, R. M. M. D. Effect of 5-HT1B receptor agonists injected into the prefrontal cortex on maternal aggression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 6, p. 825-830, 2007.

DA VEIGA, C. P.; MICZEK, K. A.; LUCION, A. B.; DE ALMEIDA, R. M. Social instigation and aggression in postpartum female rats: role of 5-Ht1A and 5-Ht1B receptors in the dorsal raphe nucleus and prefrontal cortex. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 213, n. 2-3, p. 475-87, 2011.

DE ALMEIDA, R. M.; FERREIRA, A.; AGRATI, D. Sensory, hormonal, and neural basis of maternal aggression in rodents. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 17, p. 111-30, 2014.

DENMARK, A.; TIEN, D.; WONG, K.; CHUNG, A.; CACHAT, J.; GOODSPEED, J.; GRIMES, C.; ELEGANTE, M.; SUCIU, C.; ELKHAYAT, S.; BARTELS, B.; JACKSON, A.; ROSENBERG, M.; CHUNG, K. M.; BADANI, H.; KADRI, F.; ROY, S.; TAN, J.; GAIKWAD, S.; STEWART, A.; ZAPOLSKY, I.; GILDER, T.; KALUEFF, A. V. The effects of chronic social defeat stress on mouse self-grooming behavior and its patterning. **Behav Brain Res**, v. 208, n. 2, p. 553-9, 2010.

DESCHAMPS, S.; WOODSIDE, B.; WALKER, C. D. Pups presence eliminates the stress hyporesponsiveness of early lactating females to a psychological stress representing a threat to the pups. **J Neuroendocrinol**, v. 15, n. 5, p. 486-97, 2003.

DRANE, D. L.; LOGEMANN, J. A. A critical evaluation of the evidence on the association between type of infant feeding and cognitive development. **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 14, n. 4, p. 349-56, 2000.

DULAC, C.; O'CONNELL, L. A.; WU, Z. Neural control of maternal and paternal behaviors. **Science**, v. 345, n. 6198, p. 765-70, 2014.

EDLESON, J. L. CHILDREN'S WITNESSING OF ADULT DOMESTIC VIOLENCE. **Journal of Interpersonal Violence**, v. 14, n. 8, p. 31, 1999.

_____. Should childhood exposure to adult domestic violence be defined as child maltreatment under the law? In: JAFFE, P. G.; BAKER, L., *et al.* (Ed.). **Protecting Children from Domestic Violence: Strategies for Community Intervention**. 1. New York, NY: The Guilford Press, 2004. p.8-28.

EDLESON, J. L.; ELLERTON, A. L.; SEAGREN, E. A.; KIRCHBERG, S. L.; SCHMIDT, S. O.; AMBROSE, A. T. Assessing child exposure to adult domestic violence. **Children and Youth Services Review**, v. 29, n. 7, p. 961-971, 2007.

EDLESON, J. L.; SHIN, N.; JOHNSON ARMENDARIZ, K. K. Measuring children's exposure to domestic violence: The development and testing of the Child Exposure to Domestic Violence (CEDV) Scale. **Children and Youth Services Review**, v. 30, n. 5, p. 502-521, 2008.

EMACK, J.; KOSTAKI, A.; WALKER, C. D.; MATTHEWS, S. G. Chronic maternal stress affects growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal function in juvenile offspring. **Horm Behav**, v. 54, n. 4, p. 514-20, 2008.

ERSKINE, M. S.; BARFIELD, R. J.; GOLDMAN, B. D. Postpartum aggression in rats: I. Effects of hypophysectomy. **J Comp Physiol Psychol**, v. 94, n. 3, p. 484-94, 1980.

ERSKINE, M. S.; DENENBERG, V. H.; GOLDMAN, B. D. Aggression in the lactating rat: effects of intruder age and test arena. **Behav Biol**, v. 23, n. 1, p. 52-66, 1978.

EVANS, S. E.; DAVIES, C.; DILILLO, D. Exposure to domestic violence: A meta-analysis of child and adolescent outcomes. **Aggression and Violent Behavior**, v. 13, n. 2, p. 131-140, 2008.

FERREIRA, A.; HANSEN, S. Sensory control of maternal aggression in *Rattus norvegicus*. **J Comp Psychol**, v. 100, n. 2, p. 173-7, 1986.

FERREIRA, A.; PEREIRA, M.; AGRATI, D.; URIARTE, N.; FERNANDEZ-GUASTI, A. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiol Behav**, v. 77, n. 2-3, p. 197-204, 2002.

FERREIRA, D. J.; LIU, Y.; FERNANDES, M. P.; LAGRANHA, C. J. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutr Neurosci**, 2015.

FODOR, A.; ZELENA, D. The effect of maternal stress activation on the offspring during lactation in light of vasopressin. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 265394, 2014.

FONTANA, V. J. The Neglect and Abuse of Children. **N Y State J Med**, v. 64, p. 215-24, 1964.

FONTANA, V. J.; DONOVAN, D.; WONG, R. J. The "Maltreatment Syndrome" in Children. **N Engl J Med**, v. 269, p. 1389-94, 1963.

FREUD, S. **From the History of an Infantile Neurosis**. London: Hogarth Press, 1918.

GALDSTON, R. Observations on children who have been physically abused and their parents. **Am J Psychiatry**, v. 122, n. 4, p. 440-3, 1965.

GANELLA, D. E.; ALLEN, N. B.; SIMMONS, J. G.; SCHWARTZ, O.; KIM, J. H.; SHEEBER, L.; WHITTLE, S. Early life stress alters pituitary growth during adolescence-a longitudinal study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 53, p. 185-94, 2015.

GERLSMA, C.; EMMELKAMP, P. M. G.; ARRINDELL, W. A. Anxiety, depression, and perception of early parenting: a meta-analysis. **Clin Psychol Rev**, v. 10, n. 3, p. 251-277, 1990.

GILBERT, L. K.; BREIDING, M. J.; MERRICK, M. T.; THOMPSON, W. W.; FORD, D. C.; DHINGRA, S. S.; PARKS, S. E. Childhood adversity and adult chronic disease: an update from ten states and the District of Columbia, 2010. **Am J Prev Med**, v. 48, n. 3, p. 345-9, 2015.

GODFREY, J. D. Trauma in Children. **J Bone Joint Surg Am**, v. 46, p. 422-47, 1964.

GOLDING, J.; ROGERS, I. S.; EMMETT, P. M. Association between breast feeding, child development and behaviour. **Early Hum Dev**, v. 49 Suppl, p. S175-84, 1997.

GOLDSTEIN, D. S. Adrenal responses to stress. **Cell Mol Neurobiol**, v. 30, n. 8, p. 1433-40, 2010.

GOLDSTEIN, D. S.; KOPIN, I. J. Evolution of concepts of stress. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 109-20, 2007.

GONZALEZ, A. The impact of childhood maltreatment on biological systems: Implications for clinical interventions. **Paediatr Child Health**, v. 18, n. 8, p. 415-8, 2013.

GOSHEN, I.; YIRMIYA, R. Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. **Front Neuroendocrinol**, v. 30, n. 1, p. 30-45, 2009.

GROOTHUIS, T. G.; CARERE, C. Avian personalities: characterization and epigenesis. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 1, p. 137-50, 2005.

GUERRY, J. D.; HASTINGS, P. D. In search of HPA axis dysregulation in child and adolescent depression. **Clin Child Fam Psychol Rev**, v. 14, n. 2, p. 135-60, 2011.

GUILLE, L. Men who batter and their children: an integrated review. **Aggression and Violent Behavior**, v. 9, n. 2, p. 129-163, 2004.

GUSTAFSSON, H. C.; COFFMAN, J. L.; COX, M. J. Intimate Partner Violence, Maternal Sensitive Parenting Behaviors, and Children's Executive Functioning. **Psychol Violence**, v. 5, n. 3, p. 266-274, 2015.

GUSTAFSSON, H. C.; COFFMAN, J. L.; HARRIS, L. S.; LANGLEY, H. A.; ORNSTEIN, P. A.; COX, M. J. Intimate partner violence and children's memory. **J Fam Psychol**, v. 27, n. 6, p. 937-44, 2013.

HABERSAAT, S.; BORGHINI, A.; NESSI, J.; FORCADA-GUEX, M.; MULLER-NIX, C.; PIERREHUMBERT, B.; ANSERMET, F. Effects of perinatal stress and maternal traumatic stress on the cortisol regulation of preterm infants. **J Trauma Stress**, v. 27, n. 4, p. 488-91, 2014.

HENNESSY, M. B.; HORNSCHUH, G.; KAISER, S.; SACHSER, N. Cortisol responses and social buffering: a study throughout the life span. **Horm Behav**, v. 49, n. 3, p. 383-90, 2006.

HENRIQUES, T. P. **Provocação Social na Díade Mãe-Filhote - Efeito na Ontogenia do Comportamento Social na Prole**. 2014. (PhD). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Lume - UFRGS.

HENRIQUES, T. P.; SZAWKA, R. E.; DIEHL, L. A.; DE SOUZA, M. A.; CORREA, C. N.; ARANDA, B. C.; SEBEN, V.; FRANCI, C. R.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; SILVEIRA, P. P.; DE ALMEIDA, R. M. Stress in neonatal rats with different maternal care backgrounds: monoaminergic and hormonal responses. **Neurochem Res**, v. 39, n. 12, p. 2351-9, 2014.

HOLT, S.; BUCKLEY, H.; WHELAN, S. The impact of exposure to domestic violence on children and young people: a review of the literature. **Child Abuse Negl**, v. 32, n. 8, p. 797-810, 2008.

HORWOOD, L. J.; DARLOW, B. A.; MOGRIDGE, N. Breast milk feeding and cognitive ability at 7-8 years. **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v. 84, n. 1, p. F23-7, 2001.

HUDSON, J. L.; RAPEE, R. M. Parent-child interactions and anxiety disorders: an observational study. **Behav Res Ther**, v. 39, n. 12, p. 1411-27, 2001.

HUOT, R. L.; GONZALEZ, M. E.; LADD, C. O.; THRIVIKRAMAN, K. V.; PLOTSKY, P. M. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 279-89, 2004.

HUOT, R. L.; PLOTSKY, P. M.; LENOX, R. H.; MCNAMARA, R. K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Res**, v. 950, n. 1-2, p. 52-63, 2002.

JAIN, A.; CONCATO, J.; LEVENTHAL, J. M. How good is the evidence linking breastfeeding and intelligence? **Pediatrics**, v. 109, n. 6, p. 1044-53, 2002.

JENSEN PENA, C.; CHAMPAGNE, F. A. Implications of temporal variation in maternal care for the prediction of neurobiological and behavioral outcomes in offspring. **Behav Neurosci**, v. 127, n. 1, p. 33-46, 2013.

JOURILES, E. N.; BROWN, A. S.; MCDONALD, R.; ROSENFELD, D.; LEAHY, M. M.; SILVER, C. Intimate partner violence and preschoolers' explicit memory functioning. **J Fam Psychol**, v. 22, n. 3, p. 420-8, 2008.

KAFOURI, S.; KRAMER, M.; LEONARD, G.; PERRON, M.; PIKE, B.; RICHER, L.; TORO, R.; VEILLETTE, S.; PAUSOVA, Z.; PAUS, T. Breastfeeding and brain structure in adolescence. **Int J Epidemiol**, v. 42, n. 1, p. 150-9, 2013.

KALUEFF, A. V.; TUOHIMAA, P. Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. **Eur J Pharmacol**, v. 508, n. 1-3, p. 147-53, 2005.

KELLOGG, N. D.; MENARD, S. W. Violence among family members of children and adolescents evaluated for sexual abuse. **Child Abuse Negl**, v. 27, n. 12, p. 1367-1376, 2003.

KEMPE, C. H.; SILVERMAN, F. N.; STEELE, B. F.; DROEGEMUELLER, W.; SILVER, H. K. The battered-child syndrome. **JAMA**, v. 181, p. 17-24, 1962.

KENDALL-TACKETT, K. A. Violence against women and the perinatal period: the impact of lifetime violence and abuse on pregnancy, postpartum, and breastfeeding. **Trauma Violence Abuse**, v. 8, n. 3, p. 344-53, 2007.

KERNIC, M. A.; WOLF, M. E.; HOLT, V. L.; MCKNIGHT, B.; HUEBNER, C. E.; RIVARA, F. P. Behavioral problems among children whose mothers are abused by an intimate partner. **Child Abuse Negl**, v. 27, n. 11, p. 1231-46, 2003.

KESSLER, R. C.; DAVIS, C. G.; KENDLER, K. S. Childhood adversity and adult psychiatric disorder in the US National Comorbidity Survey. **Psychol Med**, v. 27, n. 5, p. 1101-19, 1997.

KIEL, E. J.; HUMMEL, A. C.; LUEBBE, A. M. Cortisol secretion and change in sleep problems in early childhood: Moderation by maternal overcontrol. **Biol Psychol**, v. 107, p. 52-60, 2015.

KLUG, H.; BONSALL, M. B. What are the benefits of parental care? The importance of parental effects on developmental rate. **Ecol Evol**, v. 4, n. 12, p. 2330-51, 2014.

LEE, J.-H.; KIM, H. J.; KIM, J. G.; RYU, V.; KIM, B.-T.; KANG, D.-W.; JAHNG, J. W. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. **Neuroscience Research**, v. 58, n. 1, p. 32-39, 2007.

LEIKIN, S. L.; GUIN, G. H. Clinical Pathological Conference: The Battered Child Syndrome. **Clin Proc Child Hosp Dist Columbia**, v. 19, p. 301-6, 1963.

LEVENDOSKY, A. A.; GRAHAM-BERMANN, S. A. Parenting in Battered Women: The Effects of Domestic Violence on Women and Their Children. **Journal of Family Violence**, v. 16, n. 2, p. 171-192, 2001.

LEVINE, S. Infantile experience and resistance to physiological stress. **Science**, v. 126, n. 3270, p. 405, 1957.

LEVINE, S. Plasma-free corticosterone response to electric shock in rats stimulated in infancy. **Science**, n. 135, p. 2, 1962.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. **Physiol Behav**, v. 73, n. 3, p. 255-60, 2001.

LEVINE, S.; ALPERT, M.; LEWIS, G. W. Infantile experience and the maturation of the pituitary adrenal axis. **Science**, v. 126, n. 3287, p. 1347, 1957.

LIGHTMAN, S. L.; YOUNG, W. S., 3RD. Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone and oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotropin-releasing factor and enkephalin messenger ribonucleic acids. **Endocrinology**, v. 124, n. 5, p. 2358-64, 1989.

LIPPMANN, M.; BRESS, A.; NEMEROFF, C. B.; PLOTSKY, P. M.; MONTEGGIA, L. M. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. **Eur J Neurosci**, v. 25, n. 10, p. 3091-8, 2007.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J. C.; FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 8, p. 799-806, 2000.

LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D.; FREEDMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659-62, 1997.

LOMANOWSKA, A. M.; MELO, A. I. Deconstructing the function of maternal stimulation in offspring development: Insights from the artificial rearing model in rats. **Horm Behav**, 2015.

LUCION, A. B.; PEREIRA, F. M.; WINKELMAN, E. C.; SANVITTO, G. L.; ANSELMO-FRANCI, J. A. Neonatal handling reduces the number of cells in the locus coeruleus of rats. **Behav Neurosci**, v. 117, n. 5, p. 894-903, 2003.

LUKAS, M.; NEUMANN, I. D. Social preference and maternal defeat-induced social avoidance in virgin female rats: sex differences in involvement of brain oxytocin and vasopressin. **J Neurosci Methods**, v. 234, p. 101-7, 2014.

MACRI, S.; LAVIOLA, G. Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. **Behav Brain Res**, v. 154, n. 1, p. 231-8, 2004.

MACRI, S.; MASON, G. J.; WURBEL, H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. **Eur J Neurosci**, v. 20, n. 4, p. 1017-24, 2004.

MACRI, S.; WURBEL, H. Effects of variation in postnatal maternal environment on maternal behaviour and fear and stress responses in rats. **Animal Behaviour**, v. 73, n. 1, p. 171-184, 2007.

MACRI, S.; ZORATTO, F.; LAVIOLA, G. Early-stress regulates resilience, vulnerability and experimental validity in laboratory rodents through mother-offspring hormonal transfer. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 7, p. 1534-43, 2011.

MARCO, E. M.; LLORENTE, R.; LOPEZ-GALLARDO, M.; MELA, V.; LLORENTE-BERZAL, A.; PRADA, C.; VIVEROS, M. P. The maternal deprivation animal model revisited. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 51, p. 151-63, 2015.

MASIS-CALVO, M.; SEQUEIRA-CORDERO, A.; MORA-GALLEGOS, A.; FORNAGUERA-TRIAS, J. Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague-Dawley rats. **Physiol Behav**, v. 118, p. 212-7, 2013.

MCEWEN, B. S.; EILAND, L.; HUNTER, R. G.; MILLER, M. M. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 3-12, 2012.

MCEWEN, B. S.; GRAY, J. D.; NASCA, C. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. **J Endocrinol**, v. 226, n. 2, p. T67-83, 2015.

MCINTOSH, J. E. Thought in the face of violence: a child's need. **Child Abuse Negl**, v. 26, n. 3, p. 229-41, 2002.

MEANEY, M. J.; SZYF, M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 7, n. 2, p. 103-23, 2005.

MENNELLA, J. A.; MOLTZ, H. Infanticide in rats: male strategy and female counter-strategy. **Physiol Behav**, v. 42, n. 1, p. 19-28, 1988.

MEZULIS, A. H.; HYDE, J. S.; ABRAMSON, L. Y. The developmental origins of cognitive vulnerability to depression: temperament, parenting, and negative life events in childhood as contributors to negative cognitive style. **Dev Psychol**, v. 42, n. 6, p. 1012-25, 2006.

MIHALOPOULOS, C.; VOS, T.; RAPEE, R. M.; PIRKIS, J.; CHATTERTON, M. L.; LEE, Y. C.; CARTER, R. The population cost-effectiveness of a parenting intervention designed to prevent anxiety disorders in children. **J Child Psychol Psychiatry**, v. 56, n. 9, p. 1026-33, 2015.

MISCH, E. S.; YOUNT, K. M. Intimate partner violence and breastfeeding in Africa. **Matern Child Health J**, v. 18, n. 3, p. 688-97, 2014.

MOLES, A.; SARLI, C.; BARTOLOMUCCI, A.; D'AMATO, F. R. Interaction with stressed mothers affects corticosterone levels in pups after reunion and impairs the response to dexamethasone in adult mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 33, n. 4, p. 462-70, 2008.

MOLINA, P. E. Hipotálamo e Neuro-hipófise. In: RAFF, H. e LEVITZKY, M. (Ed.). **Fisiologia Médica: Uma abordagem integrada**. São Paulo: Artmed, 2012. cap. 61, p.613-21.

MORAES, C. L.; DE OLIVEIRA, A. S.; REICHENHEIM, M. E.; LOBATO, G. Severe physical violence between intimate partners during pregnancy: a risk factor for early cessation of exclusive breast-feeding. **Public Health Nutr**, v. 14, n. 12, p. 2148-55, 2011.

MORICEAU, S.; ROTH, T. L.; OKOTOGHAIDE, T.; SULLIVAN, R. M. Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. **Int J Dev Neurosci**, v. 22, n. 5-6, p. 415-22, 2004.

NATHANS, L. L.; OSWALD, F. L.; NIMON, K. Interpreting Multiple Linear Regression: A Guidebook of Variable Importance. **Practical Assessment, Research & Evaluation**, v. 17, n. 9, p. 19, 2012.

NEUMANN, I. D.; TORNER, L.; WIGGER, A. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behaviour in virgin, pregnant and lactating rats. **Neuroscience**, v. 95, n. 2, p. 567-575, 1999.

NUNES, M. T. O Hipotálamo Endócrino. In: AIRES, M. D. M. (Ed.). **Fisiologia**. 3ª. São Paulo: Guanabara Koogan, 2008. p.930-51.

ODDY, W. H.; KENDALL, G. E.; BLAIR, E.; DE KLERK, N. H.; STANLEY, F. J.; LANDAU, L. I.; SILBURN, S.; ZUBRICK, S. Breast feeding and cognitive development in childhood: a prospective birth cohort study. **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 17, n. 1, p. 81-90, 2003.

OITZL, M. S.; WORKEL, J. O.; FLUTTERT, M.; FROSCH, F.; DE KLOET, E. R. Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 10, p. 3771-80, 2000.

OLSSON, K.; HOGBERG, M. Plasma vasopressin and oxytocin concentrations increase simultaneously during suckling in goats. **J Dairy Res**, v. 76, n. 1, p. 15-9, 2009.

OMS. **World report on violence and health**. Organização Mundial de Saúde. Geneva. 2002

_____. **GLOBAL STATUS REPORT ON VIOLENCE PREVENTION 2014**. Organização Mundial de Saúde. Geneva. 2014

_____. Child Maltreatment. USA, 2015. Acesso em: 05-06-2015.

ONAKA, T. Neural pathways controlling central and peripheral oxytocin release during stress. **J Neuroendocrinol**, v. 16, n. 4, p. 308-12, 2004.

OUELLETTE, S. J.; RUSSELL, E.; KRYSKI, K. R.; SHEIKH, H. I.; SINGH, S. M.; KOREN, G.; HAYDEN, E. P. Hair cortisol concentrations in higher- and lower-stress mother-daughter dyads: A pilot study of associations and moderators. **Dev Psychobiol**, v. 57, n. 5, p. 519-34, 2015.

PADOIN, M.; CADORE, L.; GOMES, C.; BARROS, H.; LUCION, A. Long-lasting effects of Neonatal Stimulation on the Behaviour of Rats. **Behav Neurosci**, v. 115, n. 6, p. 1332-1340, 2001.

PEEK-ASA, C.; MAXWELL, L.; STROMQUIST, A.; WHITTEN, P.; LIMBOS, M. A.; MERCHANT, J. Does parental physical violence reduce children's standardized test score performance? **Ann Epidemiol**, v. 17, n. 11, p. 847-53, 2007.

PERKEYBILE, A. M.; BALES, K. L. Early rearing experience is associated with vasopressin immunoreactivity but not reactivity to an acute non-social stressor in the prairie vole. **Physiol Behav**, v. 147, p. 149-56, 2015.

PESONEN, A. K.; RAIKKONEN, K.; FELDT, K.; HEINONEN, K.; OSMOND, C.; PHILLIPS, D. I.; BARKER, D. J.; ERIKSSON, J. G.; KAJANTIE, E. Childhood separation experience predicts HPA axis hormonal responses in late adulthood: a natural experiment of World War II. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 5, p. 758-67, 2010.

QIAN, X.; DROSTE, S. K.; GUTIERREZ-MECINAS, M.; COLLINS, A.; KERSANTE, F.; REUL, J. M.; LINTHORST, A. C. A rapid release of corticosteroid-binding globulin from the liver restrains the glucocorticoid hormone response to acute stress. **Endocrinology**, v. 152, n. 10, p. 3738-48, 2011.

RAINEKI, C.; DE SOUZA, M. A.; SZAWKA, R. E.; LUTZ, M. L.; DE VASCONCELLOS, L. F.; SANVITTO, G. L.; IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R.; CAMMAROTA, M.; LUCION, A. B. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 159, n. 1, p. 31-8, 2009.

RANA, S.; PUGH, P. C.; JACKSON, N.; CLINTON, S. M.; KERMAN, I. A. Inborn stress reactivity shapes adult behavioral consequences of early-life maternal separation stress. **Neurosci Lett**, v. 584, p. 146-50, 2015.

RAPAPORT, M. H.; CLARY, C.; FAYYAD, R.; ENDICOTT, J. Quality-of-life impairment in depressive and anxiety disorders. **Am J Psychiatry**, v. 162, n. 6, p. 1171-8, 2005.

RAPEE, R. M. Potential role of childrearing practices in the development of anxiety and depression. **Clin Psychol Rev**, v. 17, n. 1, p. 47-67, 1997.

REIS, A. R.; DE AZEVEDO, M. S.; DE SOUZA, M. A.; LUTZ, M. L.; ALVES, M. B.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; SILVEIRA, P. P.; LUCION, A. B. Neonatal handling alters the structure of maternal behavior and affects mother-pup bonding. **Behav Brain Res**, v. 265, p. 216-28, 2014.

RICHARDS, M.; HARDY, R.; WADSWORTH, M. E. Long-term effects of breastfeeding in a national birth cohort: educational attainment and midlife cognitive function. **Public Health Nutr**, v. 5, n. 5, p. 631-5, 2002.

RILLING, J. K.; YOUNG, L. J. The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. **Science**, v. 345, n. 6198, p. 771-6, 2014.

RODRIGUES, J. A.; MOREIRA, A. C.; ELIAS, L. L. K.; CASTRO, M. **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005. 611

RUEDI-BETTSCHE, D.; FELDON, J.; PRYCE, C. R. Circadian- and temperature-specific effects of early deprivation on rat maternal care and pup development: short-term markers for long-term effects? **Dev Psychobiol**, v. 45, n. 2, p. 59-71, 2004.

SAMUELSON, K. W.; KRUEGER, C. E.; WILSON, C. Relationships between maternal emotion regulation, parenting, and children's executive functioning in families exposed to intimate partner violence. **J Interpers Violence**, v. 27, n. 17, p. 3532-50, 2012.

SARRIEAU, A.; SHARMA, S.; MEANEY, M. J. Postnatal development and environmental regulation of hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. **Brain Res**, v. 471, n. 1, p. 158-62, 1988.

SCHMAUSS, C.; LEE-MCDERMOTT, Z.; MEDINA, L. R. Trans-generational effects of early life stress: the role of maternal behavior. **Sci Rep**, v. 4, p. 4873, 2014.

SCHMID, B.; BUCHMANN, A. F.; TRAUTMANN-VILLALBA, P.; BLOMEYER, D.; ZIMMERMANN, U. S.; SCHMIDT, M. H.; ESSER, G.; BANASCHEWSKI, T.; LAUCHT, M. Maternal stimulation in infancy predicts hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity in young men. **J Neural Transm**, v. 120, n. 8, p. 1247-57, 2013.

SIPSMA, H. L.; DIVNEY, A. A.; MAGRIPLES, U.; HANSEN, N.; GORDON, D.; KERSHAW, T. Breastfeeding intentions among pregnant adolescents and young adults and their partners. **Breastfeed Med**, v. 8, n. 4, p. 374-80, 2013.

SPINHOVEN, P.; ELZINGA, B. M.; HOVENS, J. G.; ROELOFS, K.; ZITMAN, F. G.; VAN OPPEN, P.; PENNINX, B. W. The specificity of childhood adversities and negative life events across the life span to anxiety and depressive disorders. **J Affect Disord**, v. 126, n. 1-2, p. 103-12, 2010.

SUOR, J. H.; STURGE-APPLE, M. L.; DAVIES, P. T.; CICCHETTI, D.; MANNING, L. G. Tracing Differential Pathways of Risk: Associations Among Family Adversity, Cortisol, and Cognitive Functioning in Childhood. **Child Dev**, 2015.

SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; OLSSON, K. Endocrinology of milk production. **Domest Anim Endocrinol**, v. 29, n. 2, p. 241-58, 2005.

SZYF, M.; WEAVER, I. C.; CHAMPAGNE, F. A.; DIORIO, J.; MEANEY, M. J. Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat. **Front Neuroendocrinol**, v. 26, n. 3-4, p. 139-62, 2005.

TAKAHASHI, L. K. Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male conspecifics in preweanling rats. **Physiol Behav**, v. 52, n. 3, p. 493-8, 1992.

TELFER, A. B.; MACDONALD, D. J.; DINWOODIE, A. J. Cruelty to Children. **Br Med J**, v. 2, n. 5372, p. 1544-5, 1963.

TENBENSEL, R. W. The Battered Child Syndrome. **Minn Med**, v. 46, p. 977-82, 1963.

TEODOROV, E.; FELICIO, L. F.; BERNARDI, M. M. Maternal Behavior. In: ANDERSEN, M. L. e TUFIK, S. (Ed.). **Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research**. São Paulo: FAPESP, 2010. p.149-165.

TINNIKOV, A. A. Responses of serum corticosterone and corticosteroid-binding globulin to acute and prolonged stress in the rat. **Endocrine**, v. 11, n. 2, p. 145-50, 1999.

VAN VUGT, R. W.; MEYER, F.; VAN HULTEN, J. A.; VERNOOIJ, J.; COOLS, A. R.; VERHEIJ, M. M.; MARTENS, G. J. Maternal care affects the phenotype of a rat model for schizophrenia. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 268, 2014.

VARGA, J.; FERENCZI, S.; KOVACS, K. J.; GARAFOVA, A.; JEZOVA, D.; ZELENÁ, D. Comparison of stress-induced changes in adults and pups: is aldosterone the main adrenocortical stress hormone during the perinatal period in rats? **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e72313, 2013.

VETULANI, J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 6, p. 1451-61, 2013.

VICTORIA, N. C.; KAROM, M. C.; EICHENBAUM, H.; MURPHY, A. Z. Neonatal injury rapidly alters markers of pain and stress in rat pups. **Dev Neurobiol**, v. 74, n. 1, p. 42-51, 2014.

VILELA, F. C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L. L.; GIUSTI-PAIVA, A. Corticosterone synthesis inhibitor metyrapone preserves changes in maternal behavior and neuroendocrine responses during immunological challenge in lactating rats. **Neuroendocrinology**, v. 97, n. 4, p. 322-30, 2013.

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.

WALKER, C. D.; DESCHAMPS, S.; PROULX, K.; TU, M.; SALZMAN, C.; WOODSIDE, B.; LUPIEN, S.; GALLO-PAYET, N.; RICHARD, D. Mother to infant or infant to mother?

Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **J Psychiatry Neurosci**, v. 29, n. 5, p. 364-82, 2004.

WALKER, C. D.; LIGHTMAN, S. L.; STEELE, M. K.; DALLMAN, M. F. Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. **Endocrinology**, v. 130, n. 1, p. 115-25, 1992.

WANG, Q.; LI, M.; DU, W.; SHAO, F.; WANG, W. The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats. **Behav Brain Res**, v. 280, p. 16-23, 2015.

WARD, G.; XING, H. C.; CARNIDE, N.; SLIVCHAK, J.; WAINWRIGHT, P. Adrenocortical response to stress in fasted and unfasted artificially reared 12-day-old rat pups. **Dev Psychobiol**, v. 45, n. 4, p. 245-50, 2004.

WEAVER, I. C.; CERVONI, N.; CHAMPAGNE, F. A.; D'ALESSIO, A. C.; SHARMA, S.; SECKL, J. R.; DYMOV, S.; SZYF, M.; MEANEY, M. J. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 8, p. 847-54, 2004.

WEININGER, O. Physiological damage under emotional stress as a function of early experience. **Science**, n. 119, p. 285-286, 1954.

WIEDENMAYER, C. P.; BARR, G. A. Developmental changes in c-fos expression to an age-specific social stressor in infant rats. **Behav Brain Res**, v. 126, n. 1-2, p. 147-57, 2001.

WIEDENMAYER, C. P.; MAGARINOS, A. M.; MCEWEN, B. S.; BARR, G. Mother lowers glucocorticoid levels of preweaning rats after acute threat. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1008, n. 1, p. 304-7, 2003.

WINDLE, R. J.; WOOD, S.; SHANKS, N.; PERKS, P.; CONDE, G. L.; DA COSTA, A. P.; INGRAM, C. D.; LIGHTMAN, S. L. Endocrine and behavioural responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity. **J Neuroendocrinol**, v. 9, n. 6, p. 407-14, 1997.

WORKMAN, J. L.; RAINEKI, C.; WEINBERG, J.; GALEA, L. A. Alcohol and pregnancy: Effects on maternal care, HPA axis function, and hippocampal neurogenesis in adult females. **Psychoneuroendocrinology**, v. 57, p. 37-50, 2015.

WURBEL, H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 4, p. 207-11, 2001.

YEH, K. Y. Corticosterone concentrations in the serum and milk of lactating rats: parallel changes after induced stress. **Endocrinology**, v. 115, n. 4, p. 1364-70, 1984.

YORTY, J. L.; SCHULTZ, S. A.; BONNEAU, R. H. Postpartum maternal corticosterone decreases maternal and neonatal antibody levels and increases the susceptibility of newborn mice to herpes simplex virus-associated mortality. **J Neuroimmunol**, v. 150, n. 1-2, p. 48-58, 2004.

ZUREICK-BROWN, S.; LAVILLA, K.; YOUNT, K. M. Intimate partner violence and infant feeding practices in India: a cross-sectional study. **Matern Child Nutr**, 2013.

ANEXO A

Obtenção de recursos físicos e financeiros e adequação do ambiente de
experimentação.

A-1 RECURSOS FINANCEIROS

PROPOSTA DE FOMENTO – EDITAL CNPQ UNIVERSAL 14/201

A formação de um pesquisador competente passa por compreender as formas de obtenção e gerenciamento de capital para financiamento da sua linha de pesquisa. Dentro dessa linha de pensamento e como parte da formação do aluno, foi solicitado ao mesmo que buscasse formas de financiar a execução do projeto de doutorado.

Imediatamente após a defesa do projeto, parte da seleção para aceite no programa de pós-graduação, se deu início a confecção de proposta de fomento que seria enviada ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Para tal, o projeto de doutorado apresentado ao Programa foi adequado às normas do Edital CNPq Universal 14/2011, na faixa de 50 a 150 mil reais, descrevendo todos os custos em reagentes e equipamentos para execução do projeto. Em

dezembro de 2011 foi publicado o resultado do presente edital, no qual o projeto havia sido contemplado com o valor de R\$ 82.589,00 e deste total R\$10.949,00 disponíveis para compra de equipamentos.

Para melhor utilização dos valores, a maior parte dos recursos foi empregada via compra de reagentes e materiais por importação direta. O aluno ficou responsável por organizar uma lista com os reagentes a serem adquiridos e encaminhar o processo junto ao departamento de importação. Estimamos um poder de compra duas vezes maior ao utilizarmos importação direta.

Ao final do projeto, o aluno redigiu um relatório de prestação de contas e procedeu ao cadastro de notas fiscais e orçamentos juntamente com o professor orientador.

A-2 ADEQUAÇÃO DO AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

ADEQUAÇÃO DO RATÁRIO

Com o objetivo de adequar o local de manutenção de animais do laboratório de neuroendocrinologia do comportamento, foi divisado um plano de readequação da sala de animais bem como da sala de acesso ao ratário.

O primeiro passo foi a execução de um vazão sanitário. O ratário permaneceu sem animais por 2 semanas. Durante esse período o ambiente foi desinfetado com produtos próprios para esse fim. O sistema de exaustão foi completamente revisado e teve seu sistema elétrico refeito de acordo com as normas de segurança da Universidade. Todas as estantes de suporte a caixa de animais foram limpas e aquelas que não eram estantes próprias para o ambiente foram retiradas do local e substituídas por novas.

Para garantir a estabilidade térmica do ambiente durante os dias de muito calor ou muito frio, o isolamento da janela de acesso a sacada foi refeito em um sistema duplo, evitando entrada de luz ou ar diretamente da rua. Para atender a demanda de arrefecimento, o condicionador de ar existente no local foi encaminhado para revisão e um segundo equipamento foi instalado, de acordo com as instruções do departamento de engenharia da Universidade – de acordo com laudo emitido pelo departamento de engenharia, seriam necessários 2 equipamentos com 24 mil BTUS cada para garantir a estabilidade térmica do ambiente mesmo com sua lotação máxima. As instalações elétricas de todos os condicionadores de ar foram refeitas para atender as especificações de segurança e potência fornecidas pelo fabricante.

O sistema de iluminação foi substituído. As antigas lâmpadas fluorescentes foram substituídas por lâmpadas eletrônicas distribuídas pelo teto de forma a fornecer uma iluminação equilibrada e sem sombras. Um sistema de iluminação vermelha foi instalado para facilitar o acompanhamento dos animais durante o ciclo escuro. O sistema de iluminação com temporizador foi acoplado a um sistema de baterias para evitar variações de luminosidade durante quedas de abastecimento de energia elétrica.

Na nova planta do ratário, todos os materiais exceto estantes de biotério, uma mesa de trabalho, desumidificador e uma balança foram retirados e ficou estabelecido que nenhum material exceto os anteriormente citados poderia ficar dentro do ratário.

A sala de apoio ao biotério foi reformulada. Áreas específicas para armazenamento, lavagem e secagem das caixas foram estipuladas. Todos os materiais que não tivessem ligação direta com o biotério foram retirados. Apenas caixas moradia em uso, grades, maravalha e ração permaneceram na sala. O sistema de refrigeração da sala foi revisado e sua instalação elétrica foi refeita. A temperatura e o ciclo claro e escuro da sala de apoio foi adequado ao mesmo padrão do ratário.

Um conjunto de novas regras para uso do ratário foi estabelecido pelos alunos. Apenas projetos aprovados no comitê de ética poderiam utilizar o espaço. Passou a ser exigido a solicitação de espaço juntamente com um cronograma de uso com seis meses de antecedência ao recebimento dos animais.

O acesso ao ratário passou a ser restrito a quem estava em experimento, sendo a porta de acesso chaveada e a distribuição de chaves controlado pelos

professores. O acesso também passou a depender do uso de equipamentos de proteção individual descartáveis: jaleco, propé, touca e máscara.

Passou a ser responsabilidade do pesquisador a troca de maravalha das caixas de seus animais, aproveitando o momento para verificar o estado de saúde geral de cada animal do seu experimento. Comida e água poderiam ser fornecidos pelos bioteristas, mas o pesquisador ficou responsável em garantir que nada falte.

Para garantir a execução da nova proposta de uso, uma comissão de acompanhamento do uso do ratário foi formada, com as atribuições de fiscalizar o uso e avaliar e liberar as solicitações de espaço de acordo com as regras e disponibilidade.

ADEQUAÇÃO DO LABORATÓRIO

As atividades de coleta de amostras e seu posterior processamento eram todas executadas na mesma sala. Além disso, o laboratório era utilizado como sala de estudo e sala de reuniões, interferindo com andamento dos experimentos. Como o laboratório dispunha de algumas outras salas, um processo de redistribuição de sala por tipo de atividade teve início. A sala principal do laboratório foi destinada apenas a coleta e processamento inicial das amostras, bem como armazenamento de soluções e equipamentos necessários para essa função. Foram criadas as salas de reunião e estudos e de bioquímica e as salas de histologia e criostato foram reestruturadas. A sala de comportamento foi transferida, como explicado abaixo.

ADEQUAÇÃO DA SALA DE REGISTROS COMPORTAMENTAIS

Inicialmente a sala de registros comportamentais ficava distante do ratário, exigindo o transporte dos animais. Para o início dos experimentos, longos períodos

de adaptação ao novo ambiente eram necessários. Com o objetivo de sanar o problema, uma sala adjacente ao laboratório, utilizada previamente como sala de computadores, foi convertida em sala de comportamento. A sala apresentava condições estruturais ideais, por não possuía janelas, evitando entrada de luz e ruído da rua. Um aparelho de ar condicionado com exaustão foi instalado para controle de temperatura.

A sala foi dimensionada para o uso simultâneo de diferentes equipamentos para análise de comportamentos, permitindo o teste sequencial de animais, essencial nos casos de labirinto em cruz elevado seguido de campo aberto. Suportes fixos para colocação de câmeras para registro de comportamento foram instalados. Um sistema de iluminação difusa foi colocado juntamente com um sistema de iluminação vermelha.

Para o melhor funcionamento da sala, novos equipamentos de avaliação de comportamento foram adquiridos, todos em acrílico e com medidas adequadas, seguindo as orientações da literatura especializada.

Um sistema de indicação de uso foi instalado, utilizando-se uma lâmpada externa para sinalizar ocupação, orientando os vizinhos a manterem silêncio enquanto experimentos são executados.

CRIAÇÃO DA SALA DE ESTUDOS E REUNIÕES

A antiga sala de comportamentos foi convertida em sala de estudos e reuniões. Com tal objetivo, um mutirão foi organizado pelos alunos do laboratório com o objetivo de limpar, repintar, forrar o piso e mobiliar a sala.

Móveis adequados ao espaço foram solicitados junto à secretaria do instituto. Computadores adequados a atividade de análise de vídeos de comportamento foram adquiridos e instalados no local. Todas as atividades de estudo, reuniões e análise de vídeos foram transferidas para essa sala.

CRIAÇÃO DA SALA DE ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Com o objetivo de ampliar e melhorar as análises que poderiam ser feitas no laboratório de neuroendocrinologia do comportamento, uma sala para análises bioquímicas e imunológicas foi planejada. Reestruturando uma antiga sala utilizada como depósito, criamos uma sala para tal fim.

Nessa sala foram instalados um sistema de filtragem e deionização de água com um filtro de partículas seguido por dois filtros de carvão ativado e um deionizador, gerando água adequada para análises bioquímicas e imunológicas.

Um jogo de pipetas novas foi adquirido para uso na sala, bem como um repipetador automático e pipetas multicanal. Um leitor de placas foi instalado no local, permitindo a execução de diversos ensaios colorimétricos. Novos refrigeradores foram adquiridos para guardar kits e reagentes, bem como soluções. Banhos térmicos e bombas de sucção a vácuo foram disponibilizadas para experimentos de extração a base de solventes e incubação com temperatura controlada.

Vidraria específica para uso na sala foi comprada. Um protocolo de limpeza de vidrarias foi estabelecido com base na literatura, associado a secagem em estufa disponibilizada no local.

ADEQUAÇÃO DA SALA FRIA

A sala previamente utilizada para cortes em criostato foi redesignada como sala fria. O ultrafreezer que estava em local inadequado no corredor do instituto foi movido para a nova sala que passou a ter temperatura controlada 24h. A temperatura da sala é mantida em 18 graus centígrados. Dessa forma a temperatura média do ultrafreezer passou de 60 graus negativos para 80 graus negativos, como esperado.

Durante o processo de realocação do ultrafreezer, ele foi descongelado, limpo e reorganizado. Um conjunto de regras para uso do freezer e um sistema de localização de amostras foi aplicado. Todos os dias, o primeiro aluno a chegar no laboratório conferia a temperatura da sala e do ultrafreezer.

ADEQUAÇÃO DA SALA DE HISTOLOGIA

A sala de histologia foi reestruturada e reorganizada de forma a permitir a execução de diversos procedimentos histológicos como fixação e inclusão de tecidos em parafina, diferentes colorações e imunoistoquímica. O sistema de captura de imagens foi atualizado para facilitar a aquisição, avaliação e armazenamento de imagens.

As regras para uso da sala foram estabelecidas, bem como os protocolos experimentais e de descarte de resíduos.

DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE REGISTRO DE COMPORTAMENTO

Quando se trabalha com comportamento animal, um grande problema a ser levado em consideração é a forma como os comportamentos serão registrados e avaliados. O registro pontual dos comportamentos é uma técnica amplamente

utilizada, na qual os comportamentos são visualizados por poucos segundos e anotados em uma planilha em intervalos regulares de tempo. Embora seja uma técnica válida, a continuidade do comportamento se perde.

Uma segunda opção é o registro em vídeo. Essa forma de registro tem a limitação de permitir o registro de poucos animais por vez e da instalação das câmeras em tripés dentro do biotério sempre que o registro for necessário.

Com o objetivo de otimizar os registros sem perder a continuidade do comportamento, o aluno se propôs a desenvolver um sistema de registro de comportamentos automatizado que conseguisse acompanhar múltiplas caixas-moradia simultaneamente.

Um sistema baseado em 16 câmeras IP fixadas na parede do biotério foi desenvolvido. As 16 câmeras foram acopladas a um computador de registro que pode ser programado para iniciar e finalizar as filmagens em horários específicos. Um sistema de iluminação utilizando diodos emissores de luz (LED) vermelhos de alta potência acoplados a um timer foi criado para uso em filmagens noturnas.

O sistema completo permitiu o registro de comportamento maternal (Figura 21), sexual no ciclo escuro (Figura 22), brincadeira, agressivo dentre outros.

O sistema todo foi acoplado a um banco de energia que permite a filmagem contínua por até 2 horas na ausência de alimentação elétrica.

Todo o projeto foi planejado e executado pelo aluno utilizando o financiamento obtido através do edital Universal previamente citado.



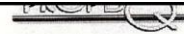
Figura 24 – Registro de comportamento maternal em ciclo claro – registro simultâneo de nove caixas moradia utilizando o sistema desenvolvido no laboratório.



Figura 25 – Registro de comportamento sexual regulado pela fêmea em ciclo escuro - registro simultâneo de quatro arenas de comportamento sexual utilizando o sistema desenvolvido no laboratório.

ANEXO B

Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 21887

Título: CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE AMBIENTE NEONATAL AVERSIVO E PERDA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ALDO BOLTEN LUCION - coordenador de 01/03/2012 até 01/12/2014

CLÁUDIO FELIPE KOLLING DA ROCHA - Aluno de Doutorado de 01/03/2012 até 01/12/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 17/01/2012 - sala 01 de reuniões do Gabinete do Reitor, 6º andar do prédio da Reitoria, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 280 ratos Wistar (230 fêmeas e 50 machos), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 6 de Fevereiro de 2012

STELA MARIS KUZE RATES
Vice Coordenador da comissão de ética

ANEXO C

Artigo submetido ao periódico Hormones and Behavior com confirmação de
submissão

To
Editor-in-Chief

Hormones & Behavior

October 18th, 2015

Dear Editor,

We are pleased to submit for publication the manuscript entitled: **Social stress during lactation shifts maternal corticosterone from free to bound fraction decreasing male pups corticosterone** to the Editorial Board of **Hormones and Behavior**.

The study analyzes the effects of a social stress paradigm during lactation in rats (presence a male intruder in the female's home-cage). We described changes in plasma hormones in the dams and pups. Moreover, maternal behavior was altered by the intruder. The manuscript is an original work not previously published or submitted elsewhere. Each person listed as authors participated in the study to a significant extent, working on the conception, design, gathering, analysis and/or interpretation of data and to the writing and intellectual content of the article. We declare no conflict of interest with respect to manuscript.

Looking forward to hearing from you soon

Yours Sincerely, Aldo B. Lucion
Corresponding author

Title: Social stress during lactation shifts maternal corticosterone from free to bound fraction decreasing male pups corticosterone

Highlights

- Male intruder paradigm shifts dams corticosterone to bound fraction.
- The capacity of the dam to cope with a male intruder seems to prevent corticosterone fraction shifting.
- Plasma corticosterone in the pups is inversely correlated with the dams bound/total corticosterone

18/10/2015

Gmail - Fwd: Submission HB_2015_64 received by Hormones and Behavior



Felipe Rocha <felipekr@gmail.com>

Fwd: Submission HB_2015_64 received by Hormones and Behavior

Aldo Bolten Lucion <alucion@ufrgs.br>
To: Cláudio Felipe <felipekr@gmail.com>

Sun, Oct 18, 2015 at 5:50 PM

Copia da carta de submissão

----- Mensagem original -----

Assunto:Submission HB_2015_64 received by Hormones and Behavior
Data:18-10-2015 17:45
Remetente:Evise <EviseSupport@elsevier.com>
Para:alucion@ufrgs.br

Dear Prof. LUCION,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Hormones and Behavior. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE@ http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=HB and go to 'My Submissions'.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Hormones and Behavior

This message was sent automatically. Please do not reply.

--
Aldo Bolten Lucion
Departamento de Fisiologia
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre RS 90050-170
Fone: 51 33083359
Endereço eletrônico: alucion@ufrgs.br