



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Julia Fernandez Puñal de Araújo

**Influência do cuidado materno no desenvolvimento de ratos das linhagens
isogênicas SHR e SLA16**

Florianópolis, SC
2023

Julia Fernandez Puñal de Araújo

**Influência do cuidado materno no desenvolvimento de ratos das linhagens
isogênicas SHR e SLA16**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador(a): Prof. Geison Souza Izídio, Dr.

Florianópolis, SC

2023

de Araújo, Julia Fernandez Puñal

Influência do cuidado materno no desenvolvimento de ratos das linhagens isogênicas SHR e SLA16 / Julia Fernandez Puñal de Araújo; orientador, Geison Souza Izídio, 2023.

92 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Cuidado Materno. 3. Adoção Cruzada. 4. SHR. 5. SLA16. I. Izídio, Geison Souza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Julia Fernandez Puñal de Araújo

**Influência do cuidado materno no desenvolvimento de ratos das linhagens isogênicas
SHR e SLA16**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 17 de março de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Gabriel Adan Araujo Leite, Dr.

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Virginia Meneghini Lazzari, Dr.^a

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina

Gabriela Ferreira de Medeiros, Dr.^a

Instituição: Institut Pasteur

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Geison Souza Izídio, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Geison S. Izídio, que me acolheu no Laboratório de Genética do Comportamento e aceitou me orientar em uma área nova para os dois. Por todos os bares e “rolês” que deixaram a adaptação em uma cidade nova muito mais fácil. Mas, principalmente, por me ajudar a enxergar a carreira de pesquisadora de outros ângulos e perceber que o doutorado é só o início.

À Prof.^a Dr.^a Thereza Christina Monteiro de Lima e ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez por disponibilizarem o espaço físico para as análises do cuidado materno.

À Prof.^a Dr.^a Aurea Elizabeth Linder por disponibilizar pletismógrafo para as análises de pressão dos animais.

À Luciana Honorato por todo auxílio, paciência e atenção com minhas dúvidas de experimentos e cuidados com o biotério.

Aos membros da banca Drs. Gabriel Adan Araújo Leite, Gabriela Ferreira de Medeiros e Virgínia Meneghini Lazzari por aceitarem avaliar e contribuir com esse trabalho.

Aos funcionários da UFSC (secretaria, terceirizados e técnicos) que mantém a universidade funcionando. Agradeço a Dona Maria e Sr. Sérgio pelas conversas e sorrisos de corredor. Agradeço também a Elis e a Maísa (LAMEB) pela disponibilidade e bom humor que sempre me receberam.

À CAPES, CNPq, UFSC, PPGBCD e LAMEB pelo suporte financeiro e estrutural que permitiu a conclusão desse trabalho.

À minha família que sempre me apoio nos últimos 10 anos que me dediquei a pesquisa, sempre com muita compreensão. Um agradecimento especial à minha mãe que por muitos anos me acompanhou nos finais de semana e feriados para tratar animal, além de me dar todo o tipo de suporte desde que decidi fazer o doutorado em Florianópolis.

Aos meus gatos, pode parecer bobeira, mas durante a pandemia por muitas semanas eram os únicos seres que tive interação não virtual. Eles nem tem noção do quanto foram importantes.

Aos alunos e ex-alunos do LGC que convivi nos últimos 4 anos. Em especial a Aline, Natalli e Luanna que se tornaram grandes amigas e muito queridas para mim. E principalmente a doutoranda Ariela, por sempre estar comigo nos melhores e piores momentos, pelos choros, risadas, surtos e broncas nos últimos anos.

Obrigada por sempre se preocupar e deixar os dias ruins melhores, mesmo da Suécia.

À minha amiga Janaína pela amizade, conversas, apoio e sempre me receber da melhor maneira possível em Blumenau.

Às minhas amigas do “Viver não cabe no Lattes” pelas risadas, fofocas e jogatinas (que saí de Floripa vitoriosa), foram as melhores companheiras de RD e PPGBCD. Em especial à Karynne pelos conselhos, desabafos e risadas silenciosas. Vou levar para sempre nossos momentos no espanhol. Obrigada por deixar meu último ano melhor.

Aos meus amigos Karla e Matheus que foram os melhores presentes em momentos bem conturbados. Principalmente a Karla que espero levar como parceira de “psiconversas” para a vida.

Aos meus amigos de Vitória por me fazerem me sentir querida, mesmo longe. Principalmente minha amiga Priscila, que sempre me apoia e torce pelo meu sucesso. Obrigada pelas chamadas de 3 horas de duração para colocar as fofocas em dia.

À minha namorada Maiara pelo amor, companheirismo e, principalmente, pela paciência. Mesmo passando pelos momentos mais caóticos das nossas vidas você tem sido a melhor parte e o melhor suporte. Obrigada por não me deixar desanimar nos dias difíceis.

A todos que não estão aqui citados, mas que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Bichano de Cheshire... poderia me dizer, por favor, que o caminho devo tomar para
ir embora daqui? – perguntou Alice.
Depende bastante de para onde quer ir – respondeu o Gato.
Não me importa muito para onde – disse Alice.
Então não importa qual caminho tome.”

Alice no País das Maravilhas - Lewis Carroll

RESUMO

A interação entre mãe e filhotes é muito importante pois promove estímulos para o crescimento e desenvolvimento de uma série de comportamentos em várias espécies. Uma vez interrompidos esses estímulos existem consequências negativas para o desenvolvimento das ninhadas. Assim, no primeiro capítulo da presente Tese, objetivamos avaliar os cuidados maternos e o seu impacto sobre o comportamento na vida adulta dos ratos SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) e SLA16 [SHR.Lewis-(D4Rat76–D4Mgh11)]. Estas duas linhagens isogênicas apresentam diferenças genéticas exclusivamente no cromossomo 4 e exibem atividade locomotora, emocionalidade e pressão arterial contrastantes. A avaliação do comportamento maternal e não maternal das ratas SHR e SLA16 foi realizada durante os primeiros 8 dias (4 vezes ao dia) após o nascimento dos filhotes em duas reproduções consecutivas. As mães também foram submetidas ao teste do campo aberto (CA). Quando os filhotes chegaram à idade adulta (4 meses) também foram avaliados no CA e labirinto em cruz elevado (LCE). Os resultados mostraram que mães SHR reduzem os cuidados com a prole durante a segunda reprodução, e ambas as linhagens demonstram alterações nos padrões de amamentação e lambidas. Os padrões de ansiedade/emocionalidade das linhagens se mantem, mesmo com a influência da lactação. Além disso, foi possível observar diferença de locomoção total entre os filhotes de SHR e SLA16 no CA apenas observada após a segunda reprodução, o que pode estar relacionado a alguma diferença no ambiente materno. No segundo capítulo da presente Tese foi realizado o paradigma da adoção cruzada, para avaliar a importância das mães no perfil comportamental dos animais SHR e SLA16. Mães SHR e SLA16 tiveram seus filhotes trocados entre si e, posteriormente, analisamos os impactos da adoção cruzada nas respostas ao CA e pressão arterial sistólica (PAS). Os resultados mostraram um aumento de atividade locomotora no CA, para animais SLA16 criados por SHR e animais SHR criados por mães SLA16, além de aumento na PAS no grupo adoção cruzada (ACZ), principalmente nos machos. Em conclusão, nossos dados sugerem que (i) a experiência materna é importante para a expressão do cuidado materno; (ii) o comportamento materno pode influenciar diretamente o comportamento dos filhotes; e (iii) a adoção cruzada pode alterar resposta de locomoção no CA e padrão de PAS dos animais. Assim, nós demonstramos pela primeira vez a importância do cuidado materno no perfil comportamental e fisiológico das linhagens de ratos SHR e SLA16,

sugerindo que este fator ambiental pode interagir com genes do cromossomo 4. Desta maneira, o período do cuidado materno se mostra um fator importante de investigação das influências genéticas e ambientais no surgimento de transtornos psiquiátricos na idade adulta, podendo contribuir futuramente para a prevenção e tratamentos.

Palavras-chave: SHR; SLA16; Cuidado materno; Adoção cruzada.

ABSTRACT

The interaction between mother and pups is very important, providing a series of stimuli for growth and development of a range of behaviors in various species. Once these stimuli are interrupted there are negative consequences for litter development. Thus, in the first chapter of this Thesis, we aimed to evaluate maternal care and its impact on behavior in adulthood in SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) and SLA16 [SHR.Lewis-(D4Rat76-D4Mgh11)] rats. These two isogenic strains have genetic differences exclusively on chromosome 4 and exhibit contrasting locomotor activity, emotionality, and blood pressure. Evaluation of maternal and non-maternal behavior in SHR and SLA16 rats was performed during the first 8 days (4 times a day) after pup birth in two consecutive reproductions. Mothers were also submitted to the open field (OF) test. When the pups became adults (4 months) they were also evaluated in the OF and elevated plus maze (EPM). Results showed that SHR mothers reduce care for their offspring during the second reproduction, and both strains demonstrate changes in nursing and licking behavior. The anxiety/emotionality behavior of the strains are maintained, even with the influence of lactation. Furthermore, it was possible to observe difference in total locomotion between SHR and SLA16 pups in OF, only observed after the second reproduction, which may be related to some difference in the maternal environment. In the second chapter of this Thesis, the cross-fostering paradigm was performed to evaluate the importance of mothers in the behavioral profile of SHR and SLA16 animals. SHR and SLA16 mothers had their pups exchanged with each other, and we subsequently analyzed the impacts of cross-fostering on responses to OF and systolic blood pressure. The results showed increased locomotor activity in OF for SLA16 animals bred by SHR and SHR animals bred by SLA16 mothers, and increased SBP in the cross-fostering group, especially in males. In conclusion, our data suggest that (i) maternal experience is important for the expression of maternal care; (ii) maternal behavior can directly influence pup behavior; and (iii) cross-fostering can alter locomotion response in OF and blood pressure of animals. Thus, we demonstrate for the first time the importance of maternal care in the behavioral and physiological profile of SHR and SLA16 rat strains, suggesting that this environmental factor may interact with genes on chromosome 4. Thus, the period of maternal care is shown to be an important factor in investigating genetic and environmental influences on the

onset of psychiatric disorders in adulthood and may contribute to prevention and treatments in the future.

Keywords: SHR; SLA16; Maternal care; Cross-fostering

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Construção da linhagem SLA16. Animais LEW e SHR foram cruzados gerando a F1 (N1). A prole foi retrocruzada sucessivamente com a linhagem SHR por 10 gerações. Após a introdução da região Anxrr16, os animais heterozigotos foram cruzados, para produzir animais homozigotos na região Anxrr16. Estes animais homozigotos foram selecionados e cruzados irmão com irmã para produzir a nova linhagem isogênica SLA16. Adaptado de “DE MEDEIROS *et al.*, 2013” 22
- Figura 2.** Posições de amamentação para ratas. (A) Postura não-arqueada. (B) Postura passiva – decúbito lateral. (C-E) Variações na postura arqueada com diferentes graus de cifose. Adaptado de “POPOOLA *et al.*, 2015” 26
- Figura 3.** Modelos de adoção utilizados em estudos. Adoção dentro da mesma linhagem. Adoção cruzada, podendo ser um ou poucos filhotes ou até mesmo toda a ninhada 29
- Figura 4.** Comportamentos de cuidados maternos totais das linhagens SHR e SLA16 para a primeira e segunda prole (Posturas de amamentação). (A) Frequência e média dos dias em postura não-arqueada. (B) Frequência e média dos dias em postura arqueada. (C) Frequência e média dos dias na postura passiva. ###: $p < 0,001$ para a variável “dias”. &&&: $p < 0,001$ para a variável “prole”. a: $p < 0,05$ interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA de medidas repetidas com *posthoc* de Duncan. Dados representados por média \pm EPM (n = 7 animais por linhagem)..... 40
- Figura 5.** Comportamentos de cuidados maternos totais das linhagens SHR e SLA16 para a primeira e segunda prole. (A) Frequência e média dos dias para lambidas na prole. (B) Frequência e média dos dias para construção e manutenção do ninho. (C) Frequência e média dos dias para os somatórios dos cuidados diretamente ligados a prole. *: $p < 0,01$ para a variável “linhagem”. ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$ para a variável “dias”. &&: $p < 0,01$ para a variável “prole”. aa: $p < 0,01$ interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA de medidas repetidas com *post hoc* de Duncan. Dados representados por média \pm EPM (n = 7 animais por linhagem)..... 41
- Figura 6.** Comportamentos exibidos pelas mães SHR e SLA16 não relacionados ao cuidado com a primeira e segunda prole. (A) Frequência e média dos dias para

alimentação da mãe. (B) Frequência e média dos dias para período de autolimpeza. #####: $p < 0,001$ para a variável “dias”. &&: $p < 0,01$ para a variável “prole”. ANOVA de medidas repetidas com post hoc de Duncan. Dados representados por média \pm EPM (n = 7 animais por linhagem) 43

Figura 7. Comportamentos exibidos pelas mães SHR e SLA16 não relacionados ao cuidado com a primeira e segunda prole. (A) Frequência e média dos dias para parâmetro de tempo sem os filhotes. (B) Frequência e média dos dias para períodos de exploração da caixa moradia. (E) Frequência e média dos dias para o somatório dos cuidados não ligados a prole. *: $p < 0,05$ para a variável “linhagem”. ###: $p < 0,001$ para a variável “dias”. &: $p < 0,05$ para a variável “prole”. a: $p < 0,05$ interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA de medidas repetidas com *posthoc* de Duncan. Dados representados por média \pm EPM (n = 7 animais por linhagem)..... 44

Figura 8. Representação gráfica comparativa dos cuidados maternos exibidos por SHR e SLA16 na primeira e segunda reprodução. (A) Cuidado materno de mães SHR da primeira reprodução. (B) Cuidado materno de mães SLA16 da primeira reprodução. (C) Cuidado materno de mães SHR da segunda reprodução. (D) Cuidado materno de mães SLA16 da segunda reprodução 45

Figura 9. Avaliação da emocionalidade de ratas mães SHR e SLA16 no teste de campo aberto durante os cuidados da primeira e segunda prole. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Entradas na periferia. (D) Locomoção central. (E) Entradas no centro. (F) Tempo no centro. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ para a variável “linhagem”. &: $p < 0,05$ para a variável “prole”. ANOVA de medidas repetidas. Dados representados por média \pm EPM (n = 7 animais por linhagem) 46

Figura 10. Influência dos cuidados maternos na vida adulta das fêmeas da prole no teste de campo aberto. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Locomoção central. (D) Entradas no centro. (E) Tempo no centro. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ para a variável “linhagem”. &: $p < 0,05$; &&&: $p < 0,0011$ para a variável “prole”. a: $p < 0,05$; aaa: $p < 0,001$ interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média \pm EPM (n = 14 animais por grupo) 48

Figura 11. Influência dos cuidados maternos na vida adulta dos machos da prole no teste de campo aberto. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Locomoção central. (D) Entradas no centro. (E) Tempo no centro; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ para a variável “linhagem”. &: $p < 0,05$; &&: $p < 0,01$ para a variável “prole”. a:

p<0.05; aa: p<0.01 interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média ± EPM (n = 14 animais por grupo) 49

Figura 12. Influência dos cuidados maternos na vida adulta das fêmeas da prole no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Entradas nos braços abertos. (B) Tempo nos braços abertos. (C) Entradas em braços fechados. (D) tempo nos braços fechados. **: p<0,01 para a variável “linhagem”. a: p<0,05 interação “linhagem” e “prole”. ANOVA fatorial com *posthoc* de Duncan. Dados representados com média ± EPM (n = 14 animais por grupo) 50

Figura 13. Influência dos cuidados maternos na vida adulta dos machos da prole no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Entradas nos braços abertos. (B) Tempo nos braços abertos. (C) Entradas em braços fechados. (D) tempo nos braços fechados. *: p<0,05 para a variável “linhagem”. &&&: p<0,001 para a variável “prole”. ANOVA fatorial. Dados representados com média ± EPM (n = 14 animais por grupo)..... 51

Figura 14. Distribuição das mães e filhotes entre os grupos controle, adoção e adoção cruzada 64

Figura 15. Influência da adoção e adoção cruzada em fêmeas da prole SHR e SLA16 no teste do campo aberto. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Locomoção central. (D) Número de entradas no centro. (E) Tempo no centro. CNT: controle. ADÇ: Adoção. ADZ: Adoção cruzada. **: p<0,01; ***: p<0,001 para a variável “linhagem”. b: p<0,05; bb: p<0,01 interação “linhagem” e “adoção” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média ± EPM (n = 12 animais por grupo)..... 67

Figura 16. Influência da adoção e adoção cruzada em fêmeas da prole SHR e SLA16 no teste do campo aberto. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Locomoção central. (D) número de entradas no centro. (E) Tempo no centro. CNT: controle. ADÇ: Adução. ADZ: Adoção cruzada. *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001 para a variável “linhagem”. bb: p<0,01; bbb: p<0,001 interação “linhagem” e “adoção” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média ± EPM (n = 12 animais por grupo) 68

Figura 17. Influência da adoção e adoção cruzada em fêmeas da prole SHR e SLA16 no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Entradas nos braços abertos. (B) Tempo nos braços abertos. (C) Entradas nos braços fechados. (D) Tempo nos braços fechados. CNT: controle. ADÇ: Adução. ADZ: Adoção cruzada. *: p<0,05; **:

p<0,01 para a variável “linhagem”. bb: p<0,01 interação “linhagem” e “adoção” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média ± EPM (n = 12 animais por grupo) 69

Figura 18. Influência da adoção e adoção cruzada em machos da prole SHR e SLA16 no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Entradas nos braços abertos. (B) Tempo nos braços abertos. (C) Entradas nos braços fechados. (D) Tempo nos braços fechados. CNT: controle. ADÇ: Adução. ACZ: Adoção cruzada. *: p<0,05; ***: p<0,001 para a variável “linhagem”. b: p<0,05; bb: p<0,01 interação “linhagem” e “adoção”. ANOVA fatorial. Dados representados por média ± EPM (n = 12 animais por grupo) 70

Figura 19. Influência da adoção e adoção cruzada na pressão arterial sistólica da prole SHR e SLA16. (A) Medidas de pressão arterial de fêmeas. (B) Medidas de pressão arterial de machos. CNT: controle. ADÇ: Adução. CRS: Adoção cruzada. *: p<0,05; **: p<0,01 para a variável “linhagem”. b: p<0,05 interação “linhagem” “adoção”. ANOVA de duas vias. Dados representados por média ± EPM (n = 12 animais por grupo) 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADÇ** – Adoção
- ACZ** – Adoção cruzada
- Anxrr16** – *Anxiety-related response region 16*
- CA** – Campo aberto
- CEUA** – Comissão de ética no uso de animais
- CMT** – Cuidados materno totais
- CnMT** – Cuidados não-maternos totais
- CTN** – Controle
- D** – Diestro
- D-P** – Diestro-Proestro
- DPN** – Dia pós-natal
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- E** – Estro
- EPM** – Erro padrão da média
- ER α** – Receptor de estrogênio α
- HPA** – Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
- LCE** – Labirinto em cruz elevado
- LEW** – Lewis
- LGC** – Laboratório de Genética do Comportamento
- M** – Metaestro
- OXTR** – Receptor de ocitocina
- P** – Proestro
- P-E** – Proestro-Estro
- QTL** – *Quantitative trait loci*
- RGD** – *Rat Genome Database*
- RNA** – Ácido ribonucleico
- SLA16** – SHR.LEW-(D4Rat76 – D4Mgh11)
- SHR** – *Spontaneously Hypertensive Rats*
- WKY** – *Wistar Kyoto*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
i. O rato como um modelo de estudo comportamental	19
ii. Cuidado materno e interação mãe-filhote	23
iii. Parâmetros do cuidado materno	24
iv. Paradigma da adoção materna cruzada	28
2 CAPÍTULO 1 - Caracterização do cuidado materno	31
2.1 OBJETIVOS	32
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	33
i. Animais	33
ii. Ciclo estral e acasalamento	33
iii. Avaliação do cuidado materno	34
iv. Avaliação da emocionalidade das mães	36
v. Manutenção do cuidado materno	37
vi. Avaliação da ansiedade/emocionalidade da prole	37
vii. Desenvolvimento dos filhotes	38
viii. Análises estatísticas	38
2.3 RESULTADOS	39
Avaliação dos Cuidados Maternos	39
Avaliação comportamental das mães	46
Avaliação da prole	47
2.4 DISCUSSÃO	52
Diferenças de cuidado materno entre SHR e SLA16	52
Padrão comportamental de ratas lactantes no campo aberto	55
Influência do cuidado materno no comportamento da prole adulta	56
2.5 CONCLUSÕES CAPÍTULO 1	60
3 CAPÍTULO 2 - O paradigma da adoção cruzada	61
3.1 OBJETIVOS	62
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	63
i. Animais	63
ii. Adoção cruzada	63
iii. Campo aberto	64
iv. Labirinto em cruz elevado	64

v.	Aferição da pressão arterial	65
vi.	Análises Estatísticas	65
3.3	RESULTADOS	66
	Análise do campo aberto	66
	Análise do labirinto em cruz elevado	68
	Análise de pressão arterial	70
3.4	DISCUSSÃO	72
3.5	CONCLUSÕES CAPÍTULO 2	75
4	CONCLUSÃO GERAL DA TESE	76
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	77
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
APÊNDICE 1	88
APÊNDICE 2	90
APÊNDICE 3	91
APÊNDICE 4	92

1 INTRODUÇÃO

i. O rato como um modelo de estudo comportamental

O uso de animais como modelos experimentais é citado na literatura desde aproximadamente 500 a.C., se iniciando com estudos de Hipócrates, ao relacionar órgão humanos doentes com o de animais (RAYMUNDO; GOLDIM, 2002). Comumente, um modelo deve ser idealizado e construído como a representação de uma ocorrência, para isso ele necessita de precisão adequada e demonstrações das limitações em relação à realidade que representa, objetivando ser o mais semelhante possível ao que se deseja estudar (FERREIRA; FERREIRA, 2003). Na pesquisa básica, o desenvolvimento de modelos animais permite maior compreensão de diferentes aspectos de doenças, ação de medicamentos e substâncias químicas, efeitos de intervenções cirúrgicas, além de possibilitar o esclarecimento de vários processos fisiológicos, possibilitando avanços nas mais diversas áreas da saúde (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Dentre os modelos conhecidos, podemos destacar o rato de laboratório (*Rattus norvegicus*). Originário da Ásia, acredita-se que esses animais tenham sido a primeira espécie de mamífero domesticada com finalidade científica. Devido ao seu tamanho reduzido, facilidade de manuseio, dieta e fisiologia semelhantes aos humanos, resistência a infecções, estratégia de reprodução, além do genoma sequenciado, esses animais têm sido os preferidos dentre os modelos animais (AITMAN *et al.*, 2008; GIBBS *et al.*, 2004; GRANZOTTO *et al.*, 2019; JACOB, 1999; RICHTER, 1954).

Com os avanços tecnológicos tem sido possível desenvolver animais cada vez mais específicos para o objeto estudado. Basicamente, os animais podem ser classificados por seu *status* genotípico em heterogênicos (*outbred*), obtidos por cruzamentos ao acaso e possuindo um índice de 99 % de heterozigose entre os alelos, e isogênicos (*inbred*), obtidos após 20 gerações de cruzamentos consanguíneos com índice de homozigose de 99 % entre os alelos. Os demais modelos são obtidos a partir desses animais (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005) permitindo a seleção e construção de linhagens específicas para explorar diferentes genéticas.

Podemos ressaltar aqui a importância da criação das chamadas linhagens isogênicas, animais obtidos pelo cruzamento “irmão x irmã” ao longo de várias

gerações, para selecionar a região genômica desejada e obter 99% de homozigose entre os indivíduos. Esse processo cria uma população com menor variação entre seus indivíduos, sendo uma boa opção para estudos na área do comportamento (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Esses animais possuem genomas idênticos entre indivíduos da mesma linhagem, tornando-os excelentes ferramentas para estudar as bases genéticas do comportamento. Além disso, diferentes linhagens podem apresentar comportamentos diferentes diante de um desafio, mesmo quando expostas às mesmas condições ambientais. Isso pode ser observado em trabalhos com diferentes linhagens isogênicas expostas a aparatos comportamentais, como o campo aberto (CA) e o labirinto em cruz elevado (LCE) (DE MEDEIROS *et al.*, 2013; GRANZOTTO *et al.*, 2019; MORMÈDE *et al.*, 2002; RAMOS *et al.*, 1997).

Linhagem SHR

Na década de 1960 foi desenvolvido um novo modelo experimental de hipertensão, que tornou desnecessário a indução dessa doença por recurso fisiológico, farmacológico ou cirúrgico. Os ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously hypertensive rats – SHR*) foram desenvolvidos pelo cruzamento de machos Wistar naturalmente hipertensos e fêmeas normotensas. Os indivíduos da prole, que nasceram afetados, foram selecionados a cada geração para novos acasalamentos, gerando uma linhagem isogênica, naturalmente portadora de hipertensão (OKAMOTO; AOKI, 1963; OKAMOTO *et al.*, 1966).

No entanto, o uso desses animais demonstrou uma série de características interessantes para o estudo de transtornos de ordem psiquiátrica. Na literatura, já foi demonstrado que animais SHR são mais hiperativos do que a linhagem Wistar Kyoto (WKY) e outras linhagens de ratos em diferentes aparatos comportamentais. Além disso, os SHR possuem um prejuízo na atenção sustentada, ou seja, na capacidade de permanecer focado no desempenho de uma tarefa com uma sequência de estímulos durante o período de teste. Esses animais também demonstraram ser mais hiperativos, sendo essa hiperatividade menos comum quando expostos a situações novas, além de apresentarem comportamento impulsivo. Animais SHR também exibem pequenas corridas no CA, sem explorar verdadeiramente o ambiente (SAGVOLDEN, 2000; SAGVOLDEN *et al.*, 2005) e demonstram maior locomoção na região central do CA, uma importante medida comportamental para

mensurar a ansiedade/emocionalidade de ratos de laboratório (DE MEDEIROS *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 1999).

Linhagem SLA16

Ramos *et al.* (1997) realizaram um estudo comportamental com seis linhagens isogênicas de ratos para avaliação de parâmetros de ansiedade/emocionalidade em aparatos clássicos como o CA e o LCE. Esse estudo possibilitou a escolha de duas linhagens, que apresentaram o maior contraste para uma série de parâmetros relacionados à ansiedade, sem grandes diferenças em suas atividades motoras, sendo elas: Lewis (LEW), com menores scores, e SHR, com os maiores scores observados de ansiedade/emocionalidade. Ao realizar o cruzamento entre as duas linhagens, a prole demonstrou que essa diferença fenotípica apresentada estava diretamente ligada ao genótipo desses animais. Isso possibilitou o estudo de *locus* de traços quantitativos (*Quantitative Trait Loci* - QTL) no genoma desses animais de F2, mapeando os primeiros QTLs relacionados com comportamentos de emocionalidade em ratos (RAMOS *et al.*, 1999). Esses estudos demonstraram uma região do cromossomo 4 com influência no comportamento e locomoção no centro do campo aberto, associado à emocionalidade. Esse *locus* recebeu o nome de *Anxrr16* (*anxiety-related response region 16*) (MORMÈDE *et al.*, 2002; RAMOS *et al.*, 1999) pelo *Rat Genome Database* (RGD) (SMITH *et al.*, 2020).

Esses trabalhos possibilitaram a criação de uma nova linhagem de rato para estudar a região cromossômica *Anxrr16*, sendo ela a primeira linhagem congênica desenvolvida para estudos relacionados à emocionalidade no mundo (Figura 1). Basicamente, animais das linhagens SHR (receptora) e LEW (doadora) foram cruzados e os animais híbridos (F1) foram retrocruzados sucessivamente com animais SHR, sempre selecionando indivíduos com alelos do tipo LEW do cromossomo 4 (Figura 1). Após 10 gerações de cruzamentos a região do *Anxrr16* proveniente de LEW foi inserida no genoma do SHR. Por fim, os animais heterozigotos resultantes (N10) foram cruzados entre si gerando assim a linhagem isogênica que chamamos de *SHR.LEW-(D4Rat76-D4Mgh11)* (SLA16) (DE MEDEIROS *et al.*, 2013; SMITH *et al.*, 2020). A criação dessa linhagem possibilitou uma grande variedade de linhas de pesquisa para estudar a região *Anxrr16* e seus impactos em diferentes comportamentos.

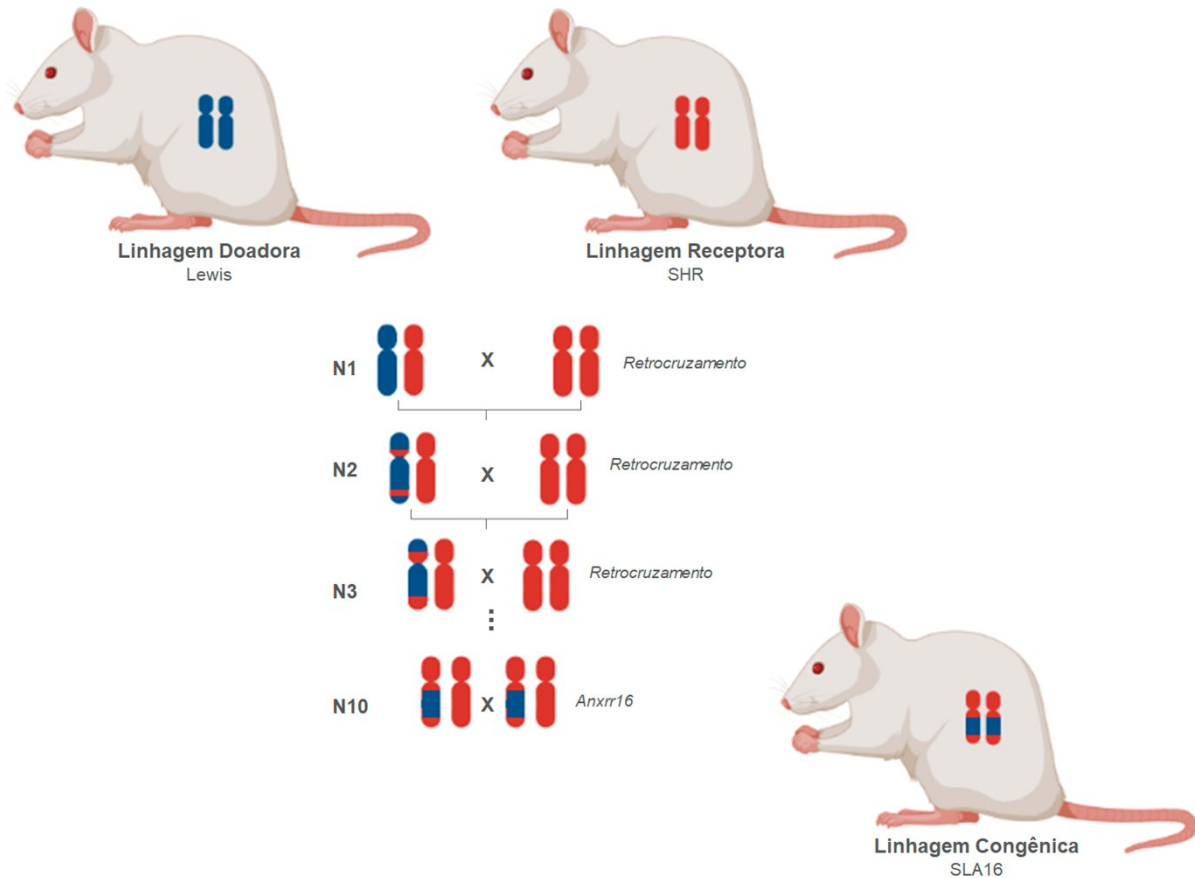


Figura 1. Construção da linhagem SLA16. Animais LEW e SHR foram cruzados gerando a F1 (N1). A prole foi retrocruzada sucessivamente com a linhagem SHR por 10 gerações. Após a introdução da região *Anxrr16*, os animais heterozigotos foram cruzados, para produzir animais homozigotos na região *Anxrr16*. Estes animais homozigotos foram selecionados e cruzados irmão com irmã para produzir a nova linhagem isogênica SLA16. Adaptado de “DE MEDEIROS *et al.*, 2013”

As linhagens SLA16 e SHR compartilham mais de 97% do genoma, sendo os alelos do tipo LEW do cromossomo 4 a principal diferença entre elas. Como estas duas linhagens são criadas exatamente no mesmo ambiente, sobre controle rigoroso no nosso laboratório, as diferenças comportamentais entre os ratos SHR e SLA16 podem ser atribuídas aos genes da região *Anxrr16*. Por exemplo, o comportamento frente a novidades é de maior exploração das áreas tidas como aversivas nos animais SLA16 (ANSELMINI *et al.*, 2016; DE MEDEIROS *et al.*, 2013). Os animais SLA16 também apresentam maior atividade locomotora no CA e possuem pressão arterial menor que a linhagem SHR sendo essa uma característica importante, uma vez que não se tem certeza da correlação entre a hipertensão espontânea e prejuízos cognitivos (GRANZOTTO *et al.*, 2023; SAGVOLDEN *et al.*, 2005).

No entanto, até o presente momento da história do nosso laboratório, as investigações têm se concentrado no comportamento dos indivíduos adultos e pouco, ou nada, se sabe a respeito da influência dos períodos iniciais no desenvolvimento da vida dos animais. Da mesma maneira, nosso foco nas variações alélicas dos genes da região *Anxrr16* precisa de trabalhos complementares com fatores ambientais, que porventura poderiam interagir com estes genes e alterar o perfil comportamental das linhagens.

ii. Cuidado materno e interação mãe-filhote

Sabe-se que a interação mãe-filhos é um indicativo importante de qualidade ambiental para o desenvolvimento, com capacidade de impactar tanto a sobrevivência, quanto o crescimento, comportamento e fisiologia dos filhotes. Dessa forma, o bom estabelecimento desse vínculo mostra-se como um fator crítico para o crescimento e o desenvolvimento de uma série de comportamentos, e a interrupção desses estímulos, promovidos pela mãe, gera consequências negativas no decorrer da vida das ninhadas (MORICEAU; SULLIVAN, 2005; PAUK *et al.*, 1986). Seja com foco no comportamento materno, ou no desenvolvimento da prole, essa relação é sempre apontada para elaborar descrições e explicações sobre mudanças no desenvolvimento pela psicologia. Por exemplo, a interrupção de estímulos da mãe para os filhotes tem consequências negativas para o desenvolvimento das ninhadas. Fica claro então, que o ambiente materno proporciona os recursos necessários para o desenvolvimento da prole. No entanto, vale observar que os estímulos oferecidos pelos filhotes também irão modular, pelo menos em parte, os comportamentos que serão exibidos pelas mães (CURLEY; CHAMPAGNE, 2016).

Variações nessa interação podem, a princípio, alterar o comportamento de maneira permanente, além de afetar a modulação neuroquímica nos filhotes. Por exemplo, já foi demonstrado que filhotes de ratos que recebem mais lambidas, na fase adulta, apresentam diferenças na resposta ao estresse, como menor secreção de ACTH e corticosterona (BREDY *et al.*, 2003; CHAMPAGNE *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 1997). Além disso, OGAWA *et al.* (1994), relataram que animais neonatos afastados da mãe mostraram menor atividade no CA, sugerindo maior ansiedade na fase adulta. Sabe-se também que algumas mudanças comportamentais, que ocorrem após o nascimento, são moduladas por alterações hormonais decorrentes do final da

gestação, início da lactação, e da própria interação mãe-filhote (GIOVENARDI *et al.*, 2005).

O repertório de cuidados apresentados pelas mães é altamente motivado e natural. As fêmeas são capazes de atravessar redes elétricas para recuperar seus filhotes, escolher os filhotes ao invés de comida, além de serem relativamente insaciáveis em aspectos específicos de alguns comportamentos, como na recuperação da ninhada (FAHRBACH; PFAFF, 1982). Sugere-se, que o controle do comportamento materno seja orquestrado por fatores neuroendócrinos, como hormônios que controlam gestação e lactação (estrogênio, progesterona, prolactina e ocitocina), e neuroanatômicos, bem como devido aos estímulos feitos pelo filhote (o ato de mamar, a movimentação e vocalização) (NUMAN; INSEL, 2003). Por exemplo, durante a lactação, o ato da sucção dos mamilos pelos filhotes se caracteriza como um importante estímulo que acarreta respostas hormonais, como a regulação da ocitocina e prolactina, além de respostas posturais, descritas adiante (STERN; YU; CROCKETT, 2002). Assim, quanto maior o contato entre mãe e filhote neonato, maior a liberação de ocitocina, hormônio importante nessa fase do desenvolvimento pós-natal por exerce efeito nos comportamentos ligados à ansiedade e estresse (INSEL; WINSLOW, 1998; PEDERSEN; BOCCIA, 2002). Alguns trabalhos vêm demonstrando que ratas lactantes apresentam comportamento ansioso diminuído, quando comparadas as não-lactantes, em testes como os do LCE e CA (FERREIRA *et al.*, 2002). Essa redução pode estar relacionada, em parte, a um aumento na secreção de prolactina e ocitocina, que já foram descritas com propriedades ansiolíticas (FLEMING; ROSENBLATT, 1974; NUMAN; INSEL, 2003; ROSENBLATT, 1980).

iii. Parâmetros do cuidado materno

Durante esse período do desenvolvimento no qual os filhotes são dependentes da mãe e de seus cuidados, as fêmeas exibem comportamentos complexos, espontâneos e instintivos, que são específicos para a espécie e se iniciam pouco antes, ou logo após o parto (NUMAN, 1994). Além de fonte do alimento para a prole, a mãe também exerce um importante papel provendo a temperatura essencial para os filhotes, bem como respostas a estímulos visuais, auditivos e olfatórios provenientes da ninhada (PRYCE; BETTSCHEN; FELDON, 2001). Apesar de ser uma fase da vida que nem todos os grupos de pesquisa

possuem a possibilidade de estudar, os padrões de cuidado materno para roedores já estão bem estabelecidos na literatura, apresentando quatro características principais: recolhimento dos filhotes, construção de ninho, amamentação e lambidas (NUMAN; INSEL, 2003). Esses cuidados são mais intensos durante o dia, sofrendo uma inversão de três em três dias, passando a ocorrer durante os períodos claros e escuros, em ambiente controlado (SCHELSTRAETE *et al.*, 1992). Ainda dentro desses parâmetros, podemos agrupar comportamentos de cuidados das mães em: comportamentos inativos de amamentação, envolvendo ajustes posturais e imobilidade postural, e comportamentos ativos, que envolvem movimentos corporais usando a boca e as patas, além de comportamentos pró-nutrição, que ajudarão essa fase a ser bem-sucedida, incluindo reparações de ninhos, lambidas na região ano-genital dos filhotes e recuperação ativa da ninhada (STERN, 1996).

Os padrões posturais se iniciam quando a rata entra no ninho, podendo ser exibidas 3 posturas de amamentação (Figura 2) com frequências diferentes entre elas. A posição arqueada (Figura 2C-E) geralmente é a mais exibida pelas lactantes e se caracteriza por uma postura imóvel, bilateralmente simétrica, com um arco da coluna vertebral (cifose) apoiado pela rigidez das patas, geralmente em resposta ao estímulo da sucção. Esta postura de cifose permite que os filhotes tenham acesso aos mamilos e espaço de respiração enquanto alcançam, sugam e engolem, e é considerada crítica durante o período mais precoce, uma vez que os filhotes são muito pequenos e com pouca capacidade de mobilidade (STERN; YU; CROCKETT, 2002; VAN VUGT *et al.*, 2014).

A posição passiva (Figura 2B), ou de repouso, ocorre quando a fêmea está amamentando em decúbito dorsal ou lateral, é geralmente uma consequência de períodos de amamentação na posição arqueada e a mãe fatigada já não sustenta a posição. Esta postura é observada mais frequentemente com ninhadas mais velhas (STERN; LONSTEIN, 1996; VAN VUGT *et al.*, 2014). Uma terceira postura, também comum, é a posição não-arqueada (Figura 2A), ou de cobertor, ocorre quando a mãe cobre toda a ninhada sem nenhuma sustentação das patas. É uma postura menos exibida por lactantes em uma condição normal, uma vez que dificulta o acesso às mamas e a respiração dos filhotes. Essas posições podem ser consideradas um estágio intermediário entre os comportamentos ativos e inativos (ORSO *et al.*, 2019; STERN; YU; CROCKETT, 2002; VAN VUGT *et al.*, 2014).

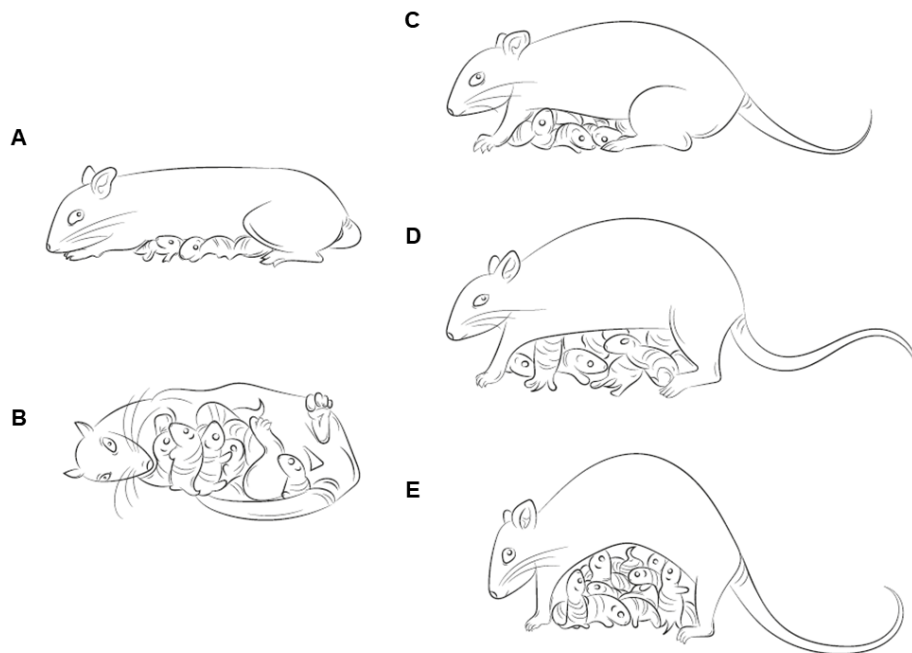


Figura 2. Posições de amamentação para ratas. (A) Postura não-arqueada. (B) Postura passiva – decúbito lateral. (C-E) Variações na postura arqueada com diferentes graus de cifose. Adaptado de “POPOOLA *et al.*, 2015”

Outros parâmetros, além da amamentação, são de extrema importância para a prole. Por exemplo, o comportamento de construção de ninho, que geralmente se inicia antes do período do parto, no qual a qualidade do ninho reflete diretamente no desenvolvimento uma vez que vai possibilitar a termorregulação da ninhada. Já o ato de lambar o corpo dos filhotes é um fator com influência direta no desenvolvimento, enquanto a lambida na região ano-genital induz os filhotes a urinar e defecar. Sabe-se também que as ratas tendem a aumentar a frequência de lambidas na região ano-genital em filhotes machos a partir da segunda semana de lactação, sendo de extrema importância para a maturação sexual desses animais. Por fim, vale ressaltar que o período nos quais a fêmea passa sem contato com os filhotes permite que ela desenvolva atividades como se alimentar, beber água, urinar e defecar, além de poder explorar a caixa de moradia, que são de extrema importância para o bem-estar da mãe (CHAMPAGNE *et al.*, 2003; ORSO *et al.*, 2019).

Como já exposto, a interação mãe-filhote é um momento crítico, tanto para as mães quanto para os filhotes, com impacto direto na vida adulta desses animais. Devido a toda a complexidade e riqueza de comportamentos exibidos, estudar esse

momento de vida é de extrema importância para a compreensão de seus impactos no desenvolvimento de comportamentos relacionados à ansiedade e emocionalidade. Assim, caracterizar o cuidado materno vai além de se estudar uma característica complexa de animal, mas é também conhecer uma parte importante da sua história.

iv. Paradigma da adoção cruzada

Como demonstrado, o cuidado materno exerce grande impacto na vida do animal adulto, e uma das formas de se estudar a influência desse período é a metodologia de adoção cruzada. O ato de remover os filhotes de uma mãe e transferi-los para outra, em período de lactação e com idade semelhante, possui diversas finalidades dentro da área da pesquisa e até mesmo conservação animal. Sabe-se que ratas geralmente são mães que aceitam bem o processo de adoção, uma vez que pequenos roedores frequentemente apresentam comportamento de nidificação comunitária, sendo frequente lactantes alimentarem filhotes de outras lactantes, e até mesmo fêmeas virgens contribuírem para o cuidado com as proles, mesmo em laboratório (GANDELMAN *et al.*, 1970). Em biotério, a adoção cruzada pode ser utilizada para melhorar a produção das colônias, ou até mesmo para salvar um filhote, ou ninhada pequena, que demonstra pouca chance de sobrevivência (LOHMILLER; SWING, 2006).

Por se tratar de uma técnica simples e altamente eficaz, tem sido utilizada há bastante tempo para estudar a interação do genoma e o ambiente materno nos fenótipos exibidos por seus descendentes, uma vez que a troca materna permite uma tentativa de separar o efeito ambiental dos efeitos genéticos que os filhotes carregam consigo. Desta maneira, os estudos de adoção são muito importantes para avaliar a transmissão não-genética de fenótipos para outras gerações (CHAMPAGNE, 2010; MCCARTY, 2017). Breed e Moore (2012) dão um exemplo utilizando andorinhas, mas podemos recriá-lo com a ideia de linhagens de ratos, foco do presente estudo. Se uma linhagem “A” cresce em um ninho bem estruturado utilizando vários materiais disponíveis (como maravalha, papel e algodão) e uma linhagem “B” cresce em um ninho pouco elaborado e com poucos materiais (apenas maravalha, por exemplo), a importância dessa experiência poderá moldar como esses animais construirão seus ninhos. Se a característica de construir ninhos for um traço totalmente genético, os descendentes construirão ninhos idênticos aos de

suas mães biológicas. No entanto, se a característica for influenciada por experiência, aprendizado e o ambiente de desenvolvimento, esses animais construirão ninhos idênticos aos de suas mães adotivas.

Ao longo dos anos, diversas outras abordagens têm sido empregadas pelos pesquisadores. McCarty (2017), em uma revisão da literatura, define que a utilização do grupo adoção dentro da mesma linhagem tem papel importante para que se possa mapear os efeitos que o evento “adoção” terá sobre as proles estudadas. Essa prole deve ser comparada com o controle (que permaneceu com sua mãe biológica) e com os animais serão criados por mães de outras linhagens. Ainda, destaca que existem diferenças consideráveis do ambiente materno quando toda a ninhada é trocada comparada com quando apenas um ou poucos filhotes são trocados, uma vez que o impacto da troca de um indivíduo é muito menor para mãe e para os demais filhotes biológicos (Figura 3).

Essa troca pode impactar os filhotes de diferentes maneiras: não modificando um ponto final no fenótipo estudado, afetando uma linhagem e não afetando outra (efeito assimétrico), afetando as duas linhagens igualmente, de maneira tal que os filhotes cruzados passam a reproduzir os fenótipos de filhotes de mães biológicas (efeito simétrico), e ainda afetando diferentemente machos e fêmeas. Dessa forma, ressaltando mais uma vez o que já foi citado no capítulo anterior, o comportamento materno vai resultar dos diferentes estímulos ambientais e estímulos trocados entre mães e seus filhotes no ninho (MCCARTY, 2017).

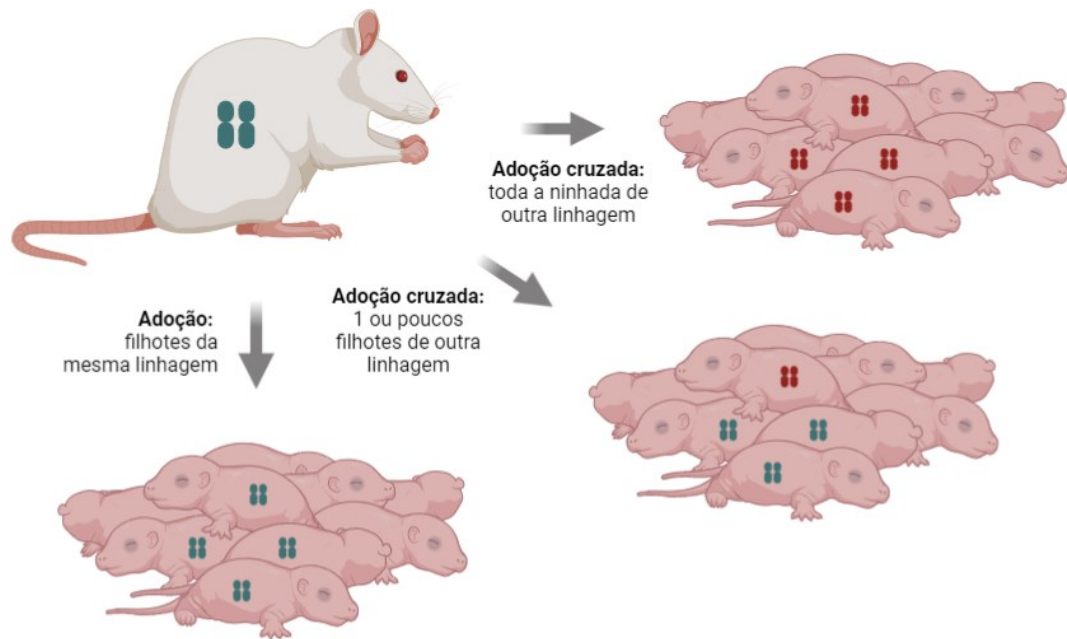


Figura 3. Modelos de adoção utilizados em estudos. Adoção dentro da mesma linhagem. Adoção cruzada, podendo ser um ou poucos filhotes ou até mesmo toda a ninhada.

Um dos primeiros estudos que de fato relacionaram a adoção cruzada e o cuidado materno foi realizado por Van Der Veen e colegas em (2008). Nesse trabalho foram trocadas ninhadas de duas linhagens diferentes de camundongos e foram gravados os cuidados maternos por 23 horas. Nesses vídeos foram avaliados os períodos de lambidas, posturas de amamentação, manutenção do ninho, autolimpeza e presença passiva no ninho. Com isso, foi possível observar que mães biológicas e mães adotivas exibiam os mesmos padrões de cuidados maternos, demonstrando que o a troca de ninhadas entre linhagens distintas não altera o comportamento de cuidado materno. No entanto, filhotes adotivos de outras linhagens podem exigir níveis de cuidados diferentes de filhotes biológicos, ressaltando que tanto a mãe quanto os filhotes são determinantes para o cuidado materno.

Além dos comportamentos maternos em si, os filhotes envolvidos nas trocas são expostos a todo um ambiente materno diferente, que pode variar desde a composição do leite até exposição as diferentes microbiotas da mãe adotiva. Esse conjunto de elementos do ambiente materno pode influenciar em características complexas da prole, como alteração de pressão arterial e respostas a testes de

emocionalidade (CIERPIAL *et al.*, 1989; GOMEZ-SERRANO *et al.*, 2001), que serão o foco desse capítulo. Dessa forma, depois de caracterizado o comportamento materno para as linhagens, a troca de mães entre as ninhadas se apresenta como um passo importante para de fato observarmos como esse momento inicial do desenvolvimento vai ser impactado pelo ambiente que as mães proporcionam.

Desta maneira, a presente Tese objetivou caracterizar e avaliar os efeitos do período mais inicial de desenvolvimento mais inicial do período neonatal nos comportamentos dos animais SHR e SLA16. Para isto, ela estará dividida em 2 capítulos, que versam sobre o impacto do ambiente materno no desenvolvimento dos ratos SHR e SLA16. No primeiro, buscou-se avaliar e caracterizar do cuidado materno nos primeiros dias de desenvolvimento e o seu possível impacto no comportamento dos filhotes. No segundo, objetivou-se avaliar da adoção materna cruzada no estabelecimento das características comportamentais atribuídas as duas linhagens.

CAPÍTULO 1

Caracterização do cuidado materno

A caracterização do cuidado materno é um passo importante para conhecermos a história de vida e desenvolvimento do nosso modelo de estudo, principalmente em relação às características comportamentais na fase adulta.

2.1 OBJETIVO

Objetivo Geral

Caracterizar os padrões de cuidado materno das fêmeas SHR e SLA16 e sua importância no estabelecimento das características comportamentais observadas em indivíduos adultos dessas duas linhagens.

Objetivos Específicos

- Comparar os cuidados maternos entre as mães das linhagens SHR e SLA16;
- Avaliar o perfil emocional das mães SHR e SLA16 durante os primeiros dias de cuidado com os filhotes;
- Avaliar se a experiência materna altera o padrão de cuidado maternal das linhagens SHR e SLA16;
- Investigar a relação do comportamento materno com os comportamentos exibidos pelos filhotes na idade adulta;

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

i. Animais

Os ratos isogênicos SHR (SHR/NCrlAnra) eram originários da *Harvard University* (Boston, MA), quando foram trazidos e criados na UNESP (Botucatu, SP), e uma sublinhagem foi mantida no Laboratório de Genética do Comportamento (LGC). A linhagem congênica SLA16, como demonstrado, foi desenvolvida no LGC, contendo parte do cromossomo 4 da linhagem LEW (doadora) em um *background* genético de SHR (receptora). Ambas as linhagens foram mantidas sob um sistema de acasalamento irmão-irmã e estão descritas no RGD (SMITH *et al.*, 2019).

Dessa forma, no presente estudo foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) das linhagens SHR e SLA16 de ambos os sexos, criados no LGC. Para as matrizes utilizadas no cuidado materno, com aproximadamente 15 semanas de idade, as fêmeas foram mantidas em grupos de 5 indivíduos por gaiola e os machos em grupos de 3 ou 4 por gaiola, até a fase do acasalamento. Já a prole foi mantida em nosso biotério desde o 28º dia pós-natal (DPN) até 16ª semana de vida. Essas matrizes foram utilizadas e selecionadas de maneira espaçada ao longo de diferentes meses, englobando diferentes gerações de animais. Utilizamos animais SLA16 das gerações N10F26 até a N10F29, paralelamente com SHR das gerações G50 até G54, como demonstrado no Apêndice 1. Durante todo o período experimental a temperatura do biotério se manteve entre 20°C e 24°C com ciclo claro/escuro de 12/12h com as luzes acesas às 7h. Água e comida *ad libitum*.

Ao final dos experimentos obtivemos um número amostral de 7 mães que foram bem-sucedidas nas duas reproduções. Dessa forma, o número de mães analisadas nos experimentos a seguir é de 7 mães por linhagem.

Todos os protocolos experimentais descritos a seguir foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, com número de protocolo 5863250220 (Apêndice 2).

ii. Ciclo estral e acasalamento

A análise da regularidade do ciclo estral foi realizada previamente ao acasalamento para determinar se as fêmeas estavam ciclando normalmente. Para isso, a secreção vaginal das fêmeas foi coletada diariamente entre 9:00 e 10:00 horas da manhã, sendo obtida após aplicação intravaginal de 10µL de solução salina (NaCl 0,9 %) durante duas semanas consecutivas. O lavado coletado foi depositado

em lâmina limpa e seca e coberto com lamínula, geralmente 2 ou 3 lavados por lâmina, sendo posteriormente analisado a fresco em microscopia de luz. O ciclo regular de ratos tem duração de 4 a 5 dias, e a análise é feita pela correlação dos tipos celulares observados com a fase pré-determinada na literatura (Nelson *et al.*, 1982; Marcondes *et al.*, 2002), sendo elas:

- Diestro-Proestro (DP) – fase de transição. São observados leucócitos e poucas células epiteliais nucleadas bem formadas;
- Proestro (P) - predominância de células nucleadas, de nenhum a poucos leucócitos degenerando e poucas a nenhuma células cornificadas;
- Proestro-Estro (PE) – fase de transição. Não são observados leucócitos, presença de células nucleadas, predominância de células cornificadas;
- Estro (E) – são observadas apenas células cornificadas;
- Metaestro (M) – são observados leucócitos, células nucleadas e cornificadas, nem sempre existindo uma predominância entre algum tipo celular;
- Diestro (D) – é observada uma predominância de leucócitos e pouquíssimas células nucleadas, muitas vezes irregulares.

A frequência total de cada fase observada neste período, para cada animal, foi utilizada para a duração de proestro, estro, metaestro e diestro (em dias), bem como a duração total do ciclo estral (PODRATZ *et al.*, 2015). O resultado da avaliação da ciclicidade estral está demonstrado no Apêndice 3.

Após a determinação da regularidade do ciclo, as fêmeas foram colocadas para acasalar na proporção de 2 fêmeas para 1 macho. Os casais foram mantidos por 10 dias e durante o período de acasalamento o lavado vaginal foi coletado pela manhã para verificação da presença de espermatozoides. Quando verificada a presença de espermatozoides, considerávamos aquele dia como o dia 0 da gestação.

iii. Avaliação do cuidado materno

No 17º dia de gestação, as fêmeas foram alocadas, individualmente, em caixas de acrílico transparente (40x33x25 cm²) com maravalha servindo de substrato para o ninho. As caixas foram acondicionadas em gabinetes ventilados até o nascimento.

O dia do nascimento dos filhotes foi considerado o 1º dia pós-natal (DPN). As mães foram avaliadas diariamente, do 2º ao 9º dia de lactação. Essa análise do comportamento materno foi feita por amostragem em 4 períodos, com duração de 75 minutos cada, sendo 3 observações realizadas no período claro (8h, 12h e 16h) e uma no escuro (20h). Basicamente, em cada período, de 3 em 3 minutos as fêmeas eram observadas e foram registrados comportamentos específicos, descritos a seguir, que estavam sendo realizados, totalizando 100 observações diárias para cada fêmea (baseado em CHAMPAGNE *et al.*, 2003). É importante ressaltar, que em um determinado ponto de observação (ponto de amostragem) a fêmea pudesse estar exibindo mais do que um comportamento ao mesmo tempo.

Para realizar as avaliações comportamentais foi elaborada uma tabela contendo os 09 parâmetros comportamentais observados nesse estudo:

Cuidado materno total (CMT) - somatório dos comportamentos diretamente relacionados com a ninhada:

- *Lambendo os filhotes*: comportamento de lambar a ninhada, principalmente a região ano-genital;
- *Posição não arqueada*: postura de amamentação de “cobertor”, na qual a fêmea cobre totalmente a ninhada;
- *Posição arqueada*: posição de amamentação caracterizada por cifose fisiológica, podendo exibir diferentes graus de cifose.;
- *Posição passiva*: posição de amamentação em que a fêmea se encontra em decúbito dorsal ou lateral;
- *Construção de ninho*: comportamento de recolher maravalha com a boca ou empurrar para a manutenção do ninho;

Cuidado não materno total (CnMT) - somatórios dos comportamentos que não estão diretamente relacionados com a prole:

- *Se alimentando*: período em que a fêmea está se alimentando;
- *Sem filhotes*: período que a fêmea passa fora do ninho e/ou sem contato com a ninhada;
- *Autolimpeza (Self-grooming)*.
- *Explorando a caixa de moradia*;

No final dos oito dias de observação, os dados dos comportamentos analisados foram transformados em porcentagem de frequência. Ou seja, para cada comportamento em cada dia de cuidado materno, calculamos: (quantidade de comportamento específico observado/soma de todos os comportamentos observados) x 100. Além disso, a média dos dias de observação (somatório de todas as frequências de cada comportamento/8 dias) foi realizada para cada parâmetro de cuidado materno com o software *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc., EUA). Nós também criamos duas medidas chamadas CMT e CnMT, onde basicamente somamos as % de frequência obtidas, de acordo com a divisão demonstrada anteriormente – CMT (*Lambendo os filhotes, Posição não-arqueada, Posição arqueada, Posição passiva, Construção de ninho*) e CnMT (*Se alimentando, Sem filhotes, Autolimpeza, Explorando a caixa de moradia*).

iv. Avaliação da emocionalidade das mães

No 10º DPN, as mães foram submetidas a testes comportamentais de ansiedade/emocionalidade (descritos abaixo). O teste foi conduzido o mais rápido possível para evitar um longo período de separação dos filhotes.

Campo Aberto

O teste de CA foi proposto por Calvin Hall em 1932, sendo um teste clássico para avaliar a emocionalidade e/ou traços de locomoção em roedores. Roedores no geral tendem a evitar locais abertos e muito iluminados, sendo a região central do aparato um local aversivo para esses animais e podendo ser relacionado com parâmetros de ansiedade. Além disso, a atividade locomotora e exploratória no aparato também pode ser correlacionada com parâmetros mais ou menos ansiosos. Roedores no geral tendem a preferir a região periférica do aparato.

O aparato utilizado no nosso laboratório consiste numa arena de 1m² com paredes de 40cm de altura, feita de fórmica branca com o chão coberto por adesivo de contacto de plástico preto. Os animais foram colocados na zona central e puderam explorar livremente o CA ao longo de 5 minutos sob intensidade luminosa controlada (12 lux), durante o ciclo claro do biotério (GRANZOTTO *et al.*, 2023). O comportamento foi registado por uma câmara posicionada acima do CA e posteriormente analisado pelo software *Any-maze* (Stoelting Co., Illinois, EUA). Os

parâmetros quantificados foram: locomoção total, locomoção periférica, tempo na periferia, locomoção central, entradas no centro e tempo no centro.

v. Manutenção do cuidado materno

Um mês após o desmame da prole, as fêmeas foram submetidas a uma nova reprodução e monitoramento dos cuidados maternos. A segunda prenhez seguiu os mesmos protocolos descritos acima nos itens ii, iii e iv.

vi. Avaliação da ansiedade/emocionalidade da prole

Após o desmame, os filhotes foram mantidos e acompanhados no biotério até os 4 meses de idade. Neste momento, foram avaliados 14 fêmeas e 14 machos por linhagem, nos testes comportamentais descritos abaixo, sendo uma média de 2 animais por sexo para cada mãe analisada no cuidado materno.

Campo Aberto

A análise do CA seguiu o mesmo protocolo descrito anteriormente para as mães. Os animais exploravam livremente o aparato por 5 minutos à 12 lux.

Labirinto em Cruz Elevado

O teste do LCE foi validado por Handley e Mithani em 1984 e é um teste amplamente utilizado para medidas relacionadas com a ansiedade. O animal é avaliado diante de um contexto desconhecido juntamente com regiões abertas que geram aversão, sendo causada pelo mecanismo de tigmotaxia (impossibilitado pela ausência de paredes) ou por diversos outros fatores sensoriais, como a visão (PINTO *et al.*, 2012). O aparato utilizado no nosso laboratório foi produzido em fórmica preta, tendo uma forma de cruz com dois braços abertos (50cm x 15cm) e dois braços fechados (50cm x 15cm x 40cm) que cruzam perpendicularmente, suspensos do chão 50cm. Os animais foram colocados na região central do LCE, podendo explorar livremente o aparato ao longo de 5 minutos, sob iluminação controlada (12 lux), durante o ciclo claro do biotério (GRANZOTTO *et al.*, 2023). A análise foi realizada manualmente, observando-se o número de entradas no braço aberto, o número de entradas no braço fechado, o tempo no braço aberto e o tempo no braço fechado. A entrada na região foi considerada quando todo o corpo do

animal estava dentro e os períodos na região central do aparato foram desconsiderados.

vii. Desenvolvimento filhotes

Após o nascimento e período de cuidado materno, os animais foram desmamados no 28º DPN. A partir desse momento começamos a avaliar o peso e a maturação sexual de fêmeas e machos (Apêndice 3). Para essa avaliação foram usadas 8 fêmeas e 8 machos por linhagem. Os animais foram escolhidos aleatoriamente entre as mães da primeira reprodução. Não sendo os mesmos utilizados nos experimentos comportamentais (descritos no Item V Avaliação da ansiedade/emocionalidade da prole), para evitar interferência da manipulação excessiva pelo experimentador.

Abertura vaginal e primeiro estro

A abertura vaginal das ratas passou a ser verificada todas as manhãs, por volta das 9h. Após a constatação desse evento, foi iniciada a coleta do lavado vaginal durante todas as manhãs para a determinação do primeiro estro, marcando o início da maturação sexual dessas ratas (NAH; PARK; GYE, 2011).

Separação prepucial

A separação prepucial foi determinada através do exame do pênis, retraindo suavemente o prepúcio para expor a glândula. A aparência frontal da superfície da glândula do pênis muda com a idade e progride em três formas: uma estrutura peniana saliente, uma forma W, e uma superfície achatada, de acordo com Yamazaki *et al.* (YAMASAKI *et al.*, 2001).

viii. Análises estatísticas

Os dados com distribuição normal foram examinados com estatísticas paramétricas e apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações foram realizadas pelo teste t de *Student*, ANOVA de duas vias ou ANOVA de medidas repetidas. Quando necessário, foi realizado o teste *posthoc* de Duncan. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistica 10* (Statsoft, Tulsa, OK, EUA) e os gráficos foram produzidos no *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc., EUA).

2.3 RESULTADOS

Avaliação dos Cuidados Maternos

Durante 8 dias após o nascimento, os cuidados maternos na 1ª e 2ª reprodução de mães SHR e SLA16 foram caracterizados. Os resultados estão apresentados a seguir na forma de figuras de cuidado materno total (CMT; Figura 4 e 5) e cuidado não-materno total (CnMT; Figura 6 e 7), eles também foram sumarizados na Figura 8.

Cuidados maternos totais (CMT)

Para os CMT, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito significativo de:

Linhagem na porcentagem de tempo gasto na construção do ninho (Figura 5B – $F(1, 96) = 7,75$; $p \leq 0,01$; SLA16 > SHR);

Prole na postura arqueada (Figura 4B; $F(1, 96) = 54,94$; $p \leq 0,001$; 1ª reprodução > 2ª reprodução) e frequência de lambidas (Figura 5A – $F(1, 95) = 4,99$; $p \leq 0,05$; 1ª reprodução > 2ª reprodução);

Dias na postura arqueada (Figura 4B – $F(7, 96) = 9,05$; $p \leq 0,001$) e CMT (Figura 5C – $F(7, 96) = 5,15$; $p < 0,01$). O teste *posthoc* de Duncan mostra que as mães fazem mais postura arqueada no segundo DPN, e todos os grupos apresentam maiores valores de CMT no segundo e terceiro DPN, quando comparados com todos os outros dias avaliados;

Interação de linhagem e prole para a postura não-arqueada (Figura 4A - $F(1, 96) = 4,17$; $p \leq 0,05$) e CMT (Figura 5C - $F(1, 96) = 30,06$; $p \leq 0,001$; SLA16 2ª reprodução > SLA16 1ª reprodução e SHR 2ª reprodução). O teste *posthoc* de Duncan mostra que as mães SLA16 apresentam maiores valores para postura não-arqueada somente na 2ª reprodução; e que os animais SHR fazem mais CMT do que as SLA16, somente na 1ª reprodução.

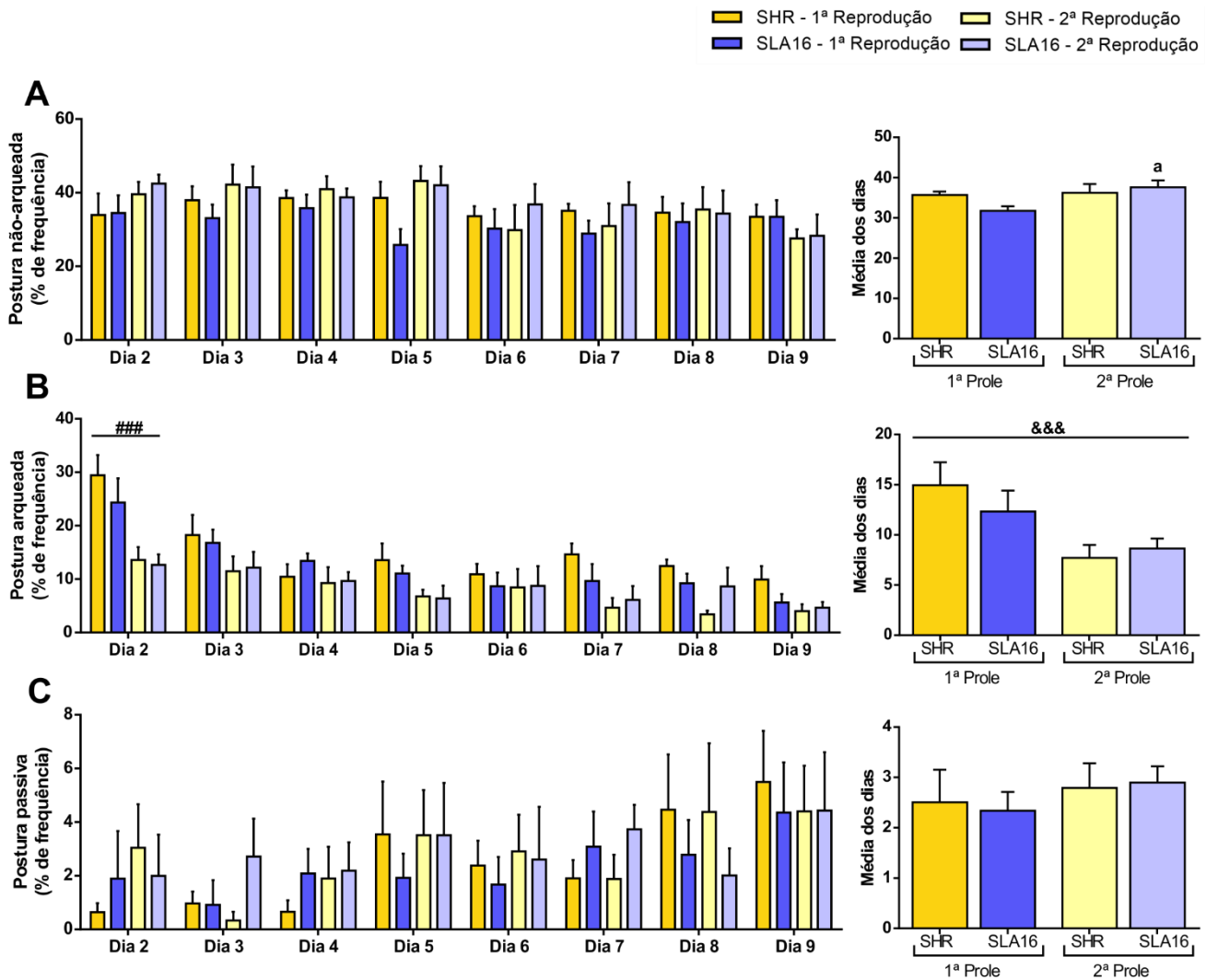


Figura 4. Comportamentos de cuidados maternos totais das linhagens SHR e SLA16 para a primeira e segunda prole (Posturas de amamentação). (A) Frequência e média dos dias em postura não-arqueada. (B) Frequência e média dos dias em postura arqueada. (C) Frequência e média dos dias na postura passiva. ###: $p < 0,001$ para a variável “dias”. &&&: $p < 0,001$ para a variável “prole”. a: $p < 0,05$ interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA de medidas repetidas com *posthoc* de Duncan. Dados representados por média \pm EPM ($n = 7$ animais por linhagem).

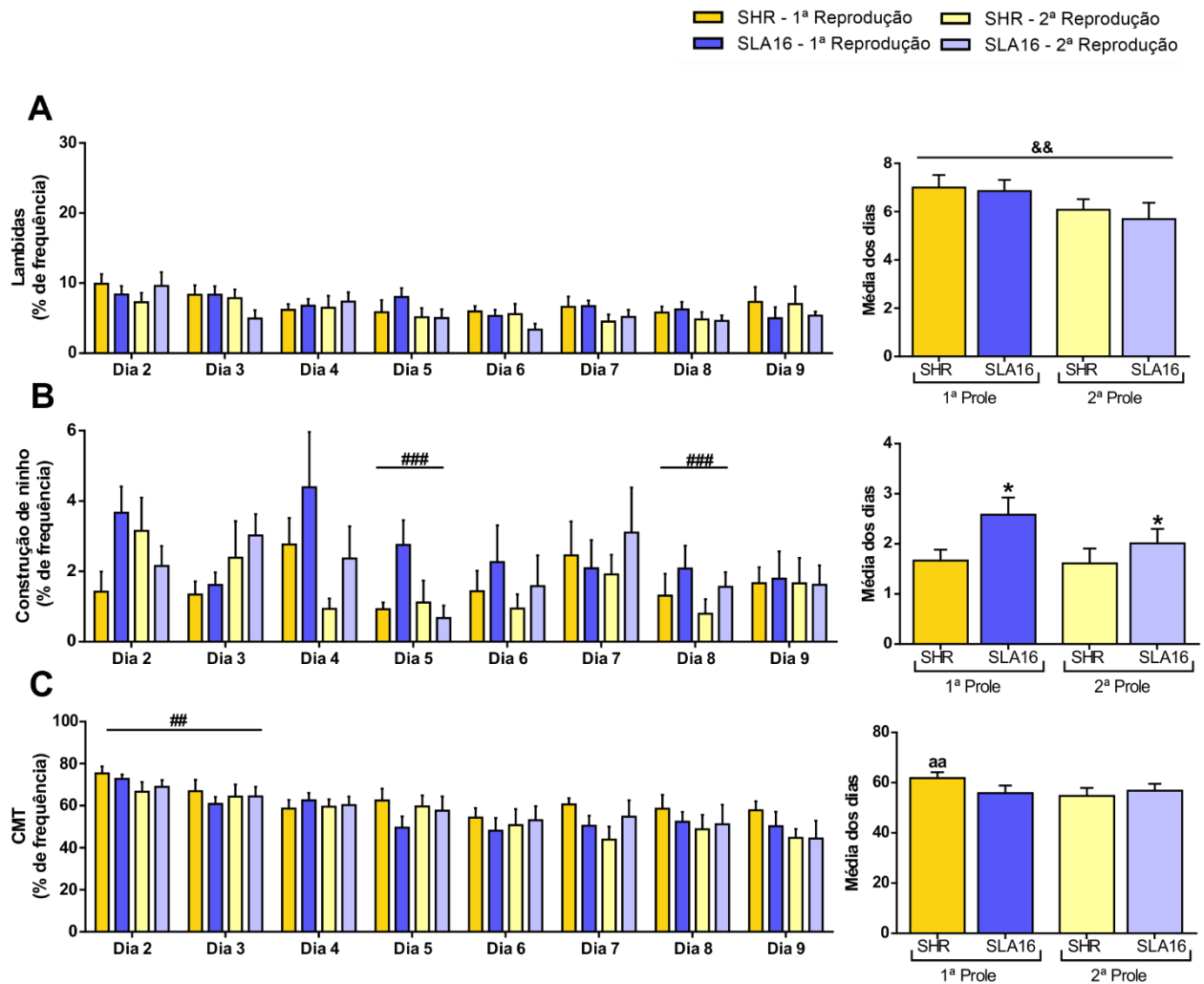


Figura 5. Comportamentos de cuidados maternos totais das linhagens SHR e SLA16 para a primeira e segunda prole. (A) Frequência e média dos dias para lambidas na prole. (B) Frequência e média dos dias para construção e manutenção do ninho. (C) Frequência e média dos dias para os somatórios dos cuidados diretamente ligados a prole. *: $p < 0,01$ para a variável “linhagem”. ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$ para a variável “dias”. &&: $p < 0,01$ para a variável “prole”. aa: $p < 0,01$ interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA de medidas repetidas com post hoc de Duncan. Dados representados por média \pm EPM ($n = 7$ animais por linhagem).

Dessa forma, mostramos que as mães SHR e SLA16 apresentam comportamentos maternos diferentes. No geral, mães SHR demonstraram maiores somatórios de cuidados relacionados aos filhotes na 1ª reprodução. Ambas as linhagens apresentaram redução nas frequências de lambidas e amamentação na postura arqueada durante a 2ª reprodução, ao passo que mães SLA16 aumentaram a postura de amamentação não-arqueada nesse período.

Cuidados não Maternos Totais (CnMT)

Para as análises dos CnMT, a ANOVA de medidas repetidas mostrou um efeito de:

Linhagem para exploração da caixa de moradia (Figura 7B - $F(1,96) = 6,59$; $p \leq 0,05$; SLA16 > SHR);

Prole para alimentando (Figura 6A - $F(1, 96) = 10,83$; $p \leq 0,01$; 1ª reprodução > 2ª reprodução) e exploração da caixa de moradia (Figura 7B - $F(1,96) = 5,88$; $p \leq 0,05$; 1ª reprodução > 2ª reprodução);

Dias para alimentando (Figura 6A- $F(7, 96) = 6,82$; $p < 0,001$) e CnMT (Figura 7C - $F(7, 96) = 4,82$; $p < 0,001$). O teste *posthoc* de Duncan mostra que as mães de todos os grupos se alimentam menos no segundo DPN do que nos outros; e que as mães de todos os grupos fazem menos CnMT nos dois primeiros dias, em comparações com os outros;

Interação de linhagem e prole para o período que as mães ficaram sem filhotes (Figura 7A - $F(7, 96) = 4,21$; $p \leq 0,05$) e para CnMT (Figura 7C - $F(1, 96) = 6,12$; $p \leq 0,05$). O teste *posthoc* de Duncan mostra que as mães SLA16 ficam mais longe dos filhotes e fazem mais CnMT do que as SHR, somente na primeira reprodução.

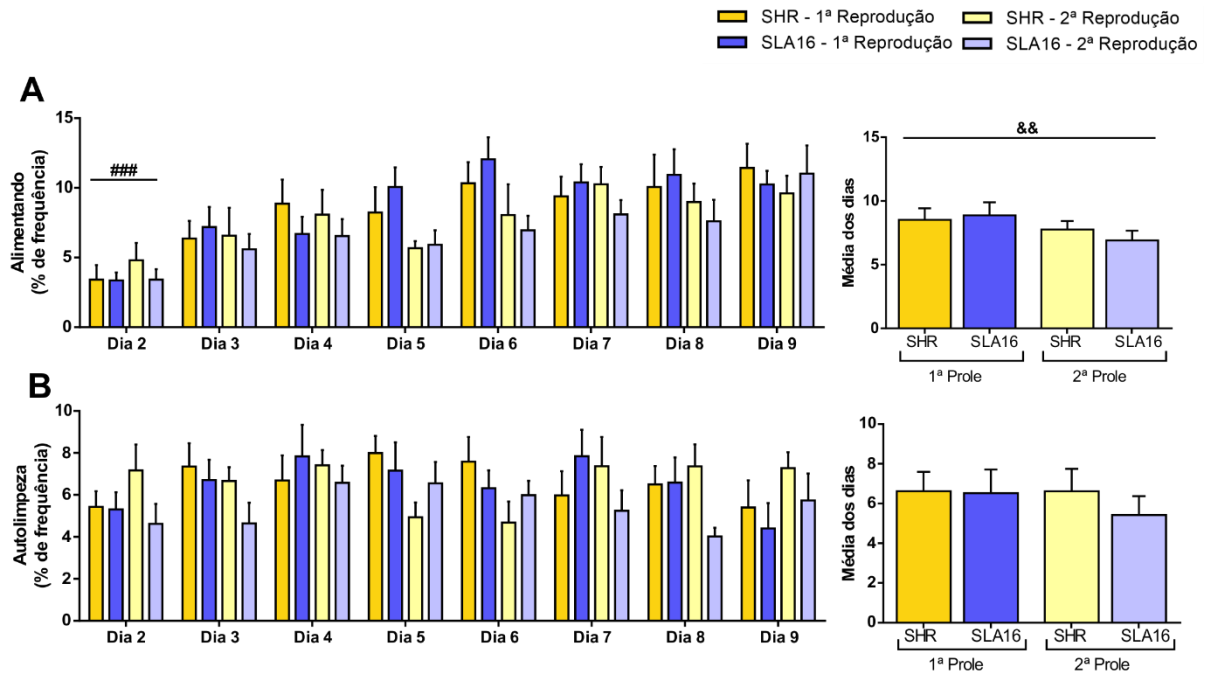


Figura 6. Comportamentos exibidos pelas mães SHR e SLA16 não relacionados ao cuidado com a primeira e segunda prole. (A) Frequência e média dos dias para alimentação da mãe. (B) Frequência e média dos dias para período de autolimpeza. #####: $p < 0,001$ para a variável “dias”. &&: $p < 0,01$ para a variável “prole”. ANOVA de medidas repetidas com post hoc de Duncan. Dados representados por média \pm EPM ($n = 7$ animais por linhagem).

Em resumo, mostramos que as mães SLA16 exploram mais a caixa moradia durante os períodos de observação, independente da experiência com a reprodução. Além disso, mães de ambas as linhagens reduzem o período de alimentação durante a segunda reprodução. Por fim, a experiência de cuidar de uma primeira ninhada parece fazer com que mães SHR aumentem seu período longe dos filhotes, bem como exibam mais comportamentos não relacionados diretamente à prole.

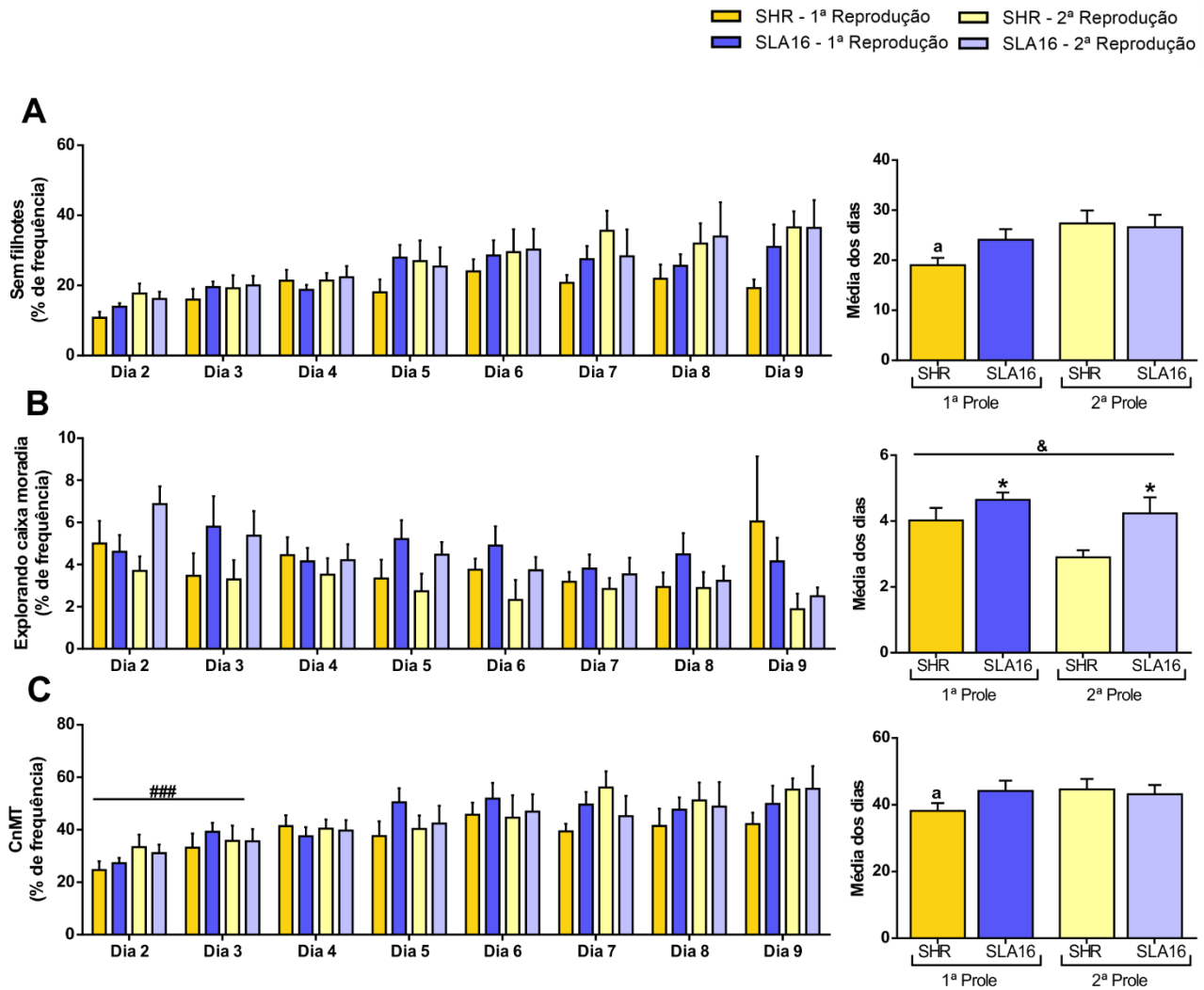


Figura 7. Comportamentos exibidos pelas mães SHR e SLA16 não relacionados ao cuidado com a primeira e segunda prole. (A) Frequência e média dos dias para parâmetro de tempo sem os filhotes. (B) Frequência e média dos dias para períodos de exploração da caixa moradia. (E) Frequência e média dos dias para o somatório dos cuidados não ligados a prole. *: $p < 0,05$ para a variável “linhagem”. ####: $p < 0,001$ para a variável “dias”. &: $p < 0,05$ para a variável “prole”. a: $p < 0,05$ interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA de medidas repetidas com *posthoc* de Duncan. Dados representados por média \pm EPM ($n = 7$ animais por linhagem).

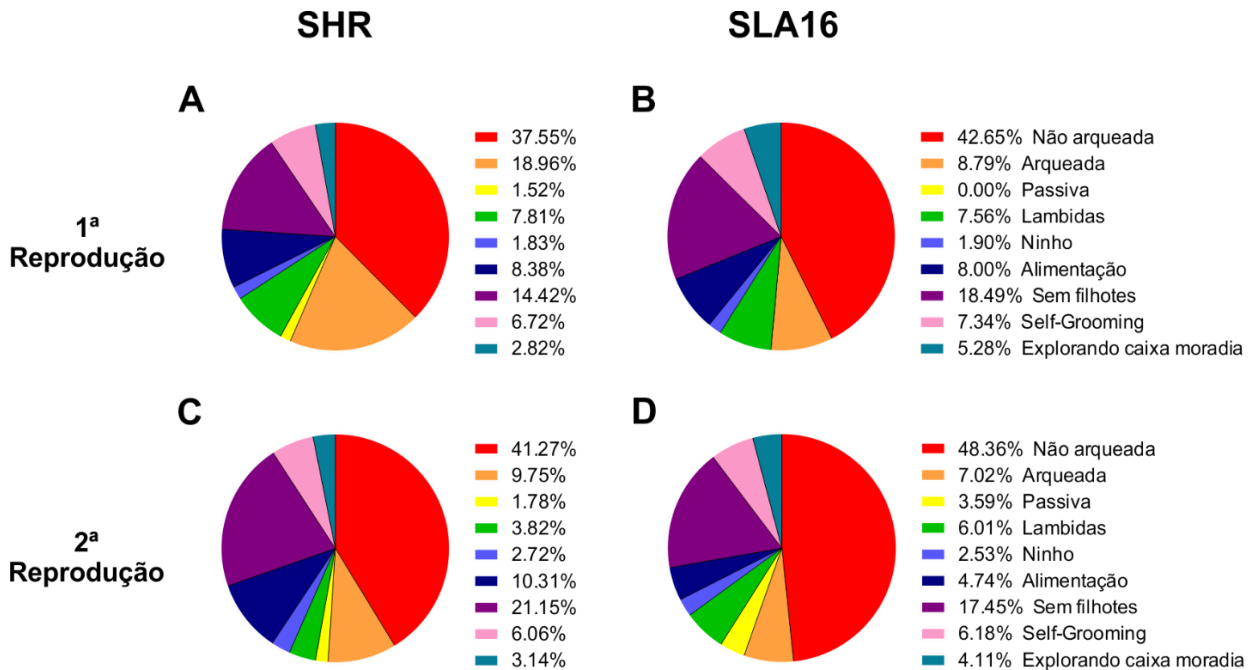


Figura 8. Representação gráfica comparativa dos cuidados maternos exibidos por SHR e SLA16 na primeira e segunda reprodução. (A) Cuidado materno de mães SHR da primeira reprodução. (B) Cuidado materno de mães SLA16 da primeira reprodução. (C) Cuidado materno de mães SHR da segunda reprodução. (D) Cuidado materno de mães SLA16 da segunda reprodução.

Ao analisarmos a Figura 8, fica nítido que ocorre uma mudança no repertório comportamental de mães entre a primeira e a segunda reprodução. Ambas as linhagens aumentam o tempo de amamentação em postura não-arqueada e reduzem o tempo na postura arqueada durante a segunda reprodução, sendo os principais responsáveis pela redução do CMT apresentada por SHR. Além disso, na representação dos dados no gráfico de setores, podemos notar que mães SHR tendem a reduzir o tempo gasto com os filhotes, enquanto mães SLA16 mantêm, priorizando outras posturas de amamentação, como não-arqueada e passiva.

Avaliação comportamental das mães

No décimo dia após o parto, as mães foram submetidas ao CA e a partir daqui comparamos as mães da primeira e da segunda gestação. Na análise do campo aberto (CA) das mães (Figura 9), a ANOVA mostrou um efeito significativo de **linhagem** para a locomoção total (Figura 9A - $F(1, 12) = 24,78$; $p \leq 0,05$; SLA16 > SHR); locomoção periférica (Figura 9B - $F(1, 12) = 28,48$; $p \leq 0,001$; SLA16 > SHR); entradas na região periférica (Figura 9C - $F(1, 12) = 5,03$; $p \leq 0,05$; SLA16 > SHR); locomoção central (Figura 9D - $F(1,12) = 10,46$; $p \leq 0,01$; SLA16 > SHR); entradas no centro (Figura 9E - $F(1, 12) = 4,80$; $p \leq 0,05$; SLA16 > SHR); e tempo no centro (Figura 9F - $F(1, 12) = 5,34$; $p \leq 0,05$; SLA16 > SHR).

A ANOVA também mostrou um efeito significativo de **prole** para entradas na periferia (Figura 9C - $F(1, 12) = 6,01$; $p \leq 0,05$; 1ª reprodução < 2ª reprodução); entradas no centro (Figura 9E - $F(1, 12) = 6,07$; $p \leq 0,05$; 1ª reprodução < 2ª reprodução); e tempo no centro (Figura 9F - $F(1, 12) = 5,15$; $p \leq 0,05$; 1ª reprodução < 2ª reprodução).

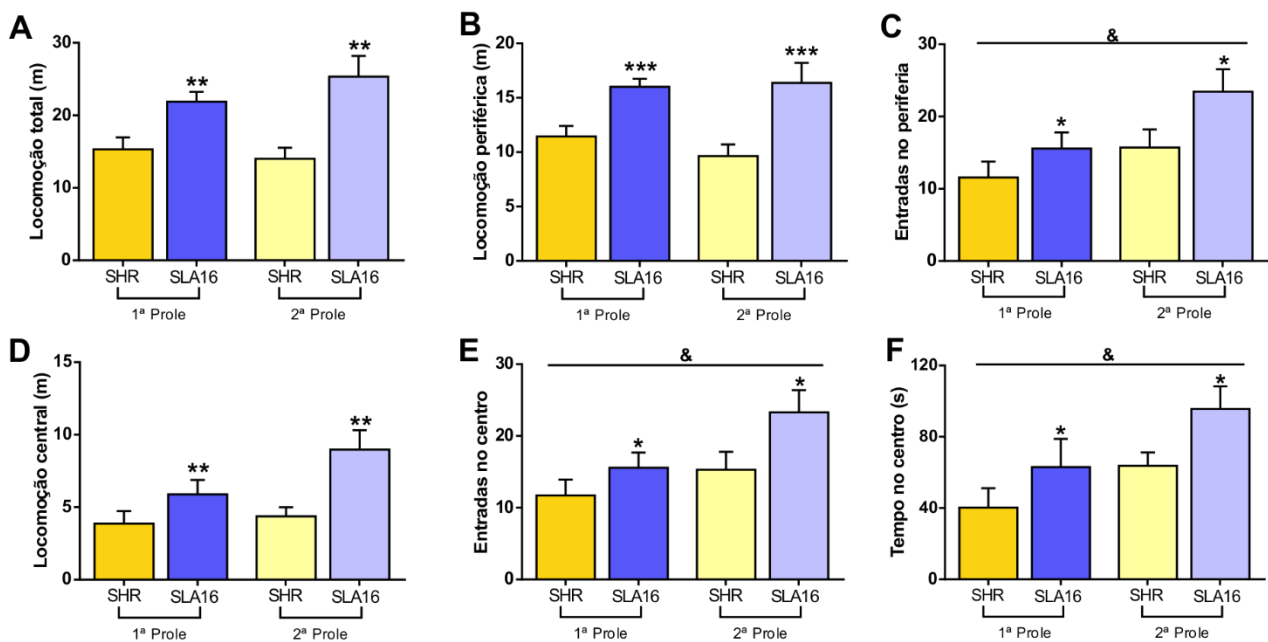


Figura 9. Avaliação da emocionalidade de ratas mães SHR e SLA16 no teste de campo aberto durante os cuidados da primeira e segunda prole. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Entradas na periferia. (D) Locomoção central. (E) Entradas no centro. (F) Tempo no centro. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ para a variável “linhagem”. &: $p < 0,05$ para a variável “prole”. ANOVA de medidas repetidas. Dados representados por média \pm EPM (n = 7 animais por linhagem).

Dessa forma, mostramos que os comportamentos locomotores e de emocionalidade se mantêm aumentados em mães SLA16, durante a lactação, independentemente da gestação. No entanto, alguns parâmetros comportamentais locomotores e de emocionalidade tendem a aumentar significativamente, nas duas linhagens, quando essas mães passam por uma segunda reprodução.

Avaliação da prole

Análise do campo aberto

Após o período do desmame, uma parcela dos filhotes teve o desenvolvimento acompanhado pela maturação sexual e ao longo de algumas semanas (Apêndice 2). A prole, de ambas as reproduções, foi mantida no biotério do LGC até a fase adulta e tiveram o comportamento analisado no CA (Figura 10 e 11) e LCE (Figura 12 e 13), aos 4 meses de idade.

Para as fêmeas, a ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo de:

Linhagem na locomoção total (Figura 10A - $F(1, 52) = 10,49$; $p \leq 0,01$; SLA16>SHR); locomoção periférica (Figura 10B - $F(1, 52) = 8,87$; $p \leq 0,01$; SLA16>SHR), locomoção central (Figura 10C - $F(1, 52) = 7,60$; $p \leq 0,01$; SLA16>SHR), entradas no centro (Figura 10D - $F(1, 52) = 11,27$; $p \leq 0,01$; SLA16>SHR), além do tempo no centro (Figura 10E - $F(1, 52) = 6,50$; $p \leq 0,05$; SLA16>SHR);

Prole para a locomoção total (Figura 10A - $F(1, 52) = 12,59$; $p \leq 0,001$; 1ª reprodução < 2ª reprodução) e locomoção periférica (Figura 10B - $F(1, 52) = 7,09$; $p \leq 0,05$; 1ª reprodução < 2ª reprodução). É interessante observar que ocorreu um aumento de locomoção total de fêmeas SLA16 de segunda reprodução em cerca de 32,15%, sendo acompanhado pela locomoção periférica;

e **Interação entre linhagem e prole** para locomoção total (Figura 10A - $F(1, 52) = 21,00$; $p \leq 0,001$); locomoção periférica (Figura 10B - $F(1, 52) = 27,16$; $p \leq 0,001$) e tempo no centro (Figura 10E - $F(1, 52) = 5,06$; $p \leq 0,05$). O teste *posthoc* de Duncan mostra que as fêmeas SLA16 da 2ª reprodução se locomovem mais que todos os outros grupos e que as fêmeas SLA16 da 1ª reprodução gastam mais tempo no centro que todos os outros grupos.

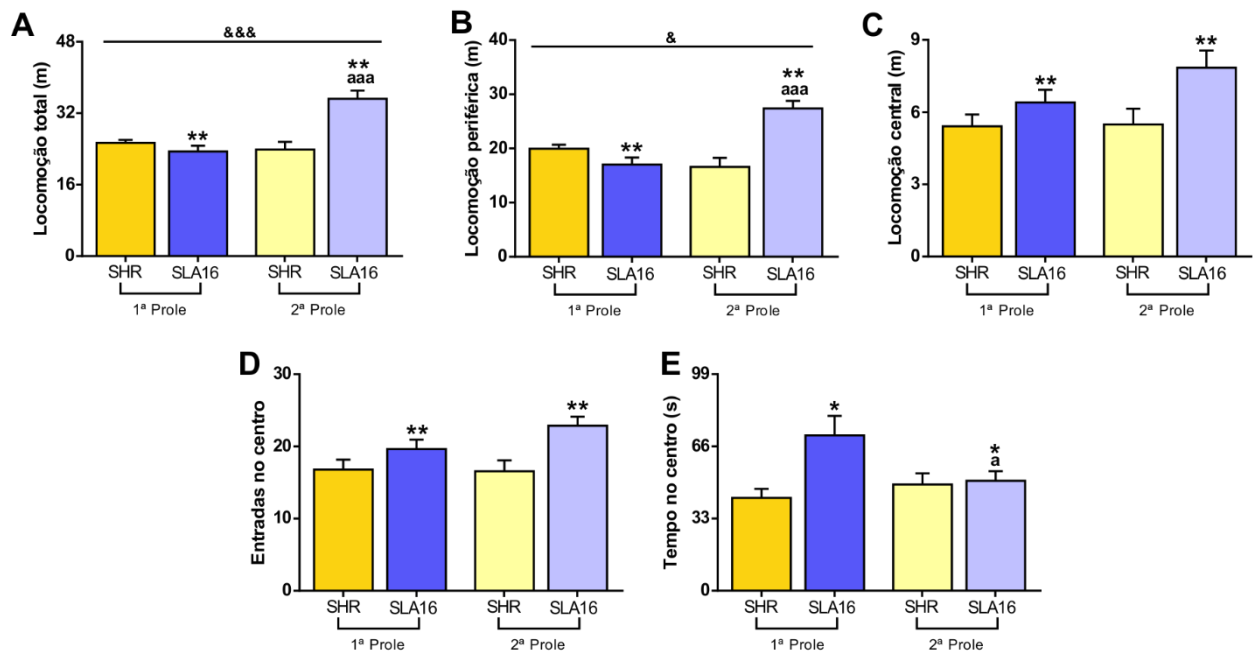


Figura 10. Influência dos cuidados maternos na vida adulta das fêmeas da prole no teste de campo aberto. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Locomoção central. (D) Entradas no centro. (E) Tempo no centro. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ para a variável “linhagem”. &: $p < 0.05$; &&&: $p < 0.0011$ para a variável “prole”. a: $p < 0.05$; aaa: $p < 0.001$ interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média \pm EPM ($n = 14$ animais por grupo).

Para os machos, o padrão no CA foi bem parecido com o das fêmeas, salvo as proporções relacionadas às medidas de cada sexo. A ANOVA demonstrou um efeito significativo de:

Linhagem na locomoção total (Figura 11A – $F(1, 52) = 5,06$; $p \leq 0,05$; SLA16>SHR); locomoção central (Figura 11C - $F(1, 52) = 5,95$; $p \leq 0,05$; SLA16>SHR) e entradas no centro (Figura 11D - $F(1, 52) = 8,57$; $p \leq 0,01$; SLA16>SHR);

Prole para a locomoção total (Figura 11A - $F(1, 52) = 5,44$; $p \leq 0,05$; 1ª reprodução < 2ª reprodução); locomoção periférica (Figura 11B - $F(1, 52) = 5,31$; $p \leq 0,05$; 1ª reprodução < 2ª reprodução); e tempo no centro (Figura 11E - $F(1, 52) = 9,15$; $p \leq 0,01$; 1ª reprodução > 2ª reprodução). É interessante observar que, assim como em fêmeas, ocorreu um aumento de locomoção total de machos SLA16 de segunda reprodução em cerca de 28,91%. Estes dados experimentais sugerem que pode existir uma relação entre os padrões de cuidados maternos recebidos pelos filhotes e o perfil de atividade locomotora destes animais na idade adulta;

Interação linhagem e prole para a locomoção total (Figura 11A – $F(1, 52) = 5,47$; $p \leq 0,01$; SLA16 2ª reprodução > SLA16 1ª reprodução, SHR 1ª reprodução, SHR 2ª reprodução), locomoção periférica (Figura 11B – $F(1, 52) = 7,52$; $p \leq 0,01$; SLA16 2ª reprodução > SLA16 1ª reprodução, SHR 1ª reprodução, SHR 2ª reprodução) e tempo no centro (Figura 11E – $F(1, 52) = 11,43$; $p \leq 0,05$; SLA16 1ª reprodução > SLA16 2ª reprodução, SHR 1ª reprodução, SHR 2ª reprodução).

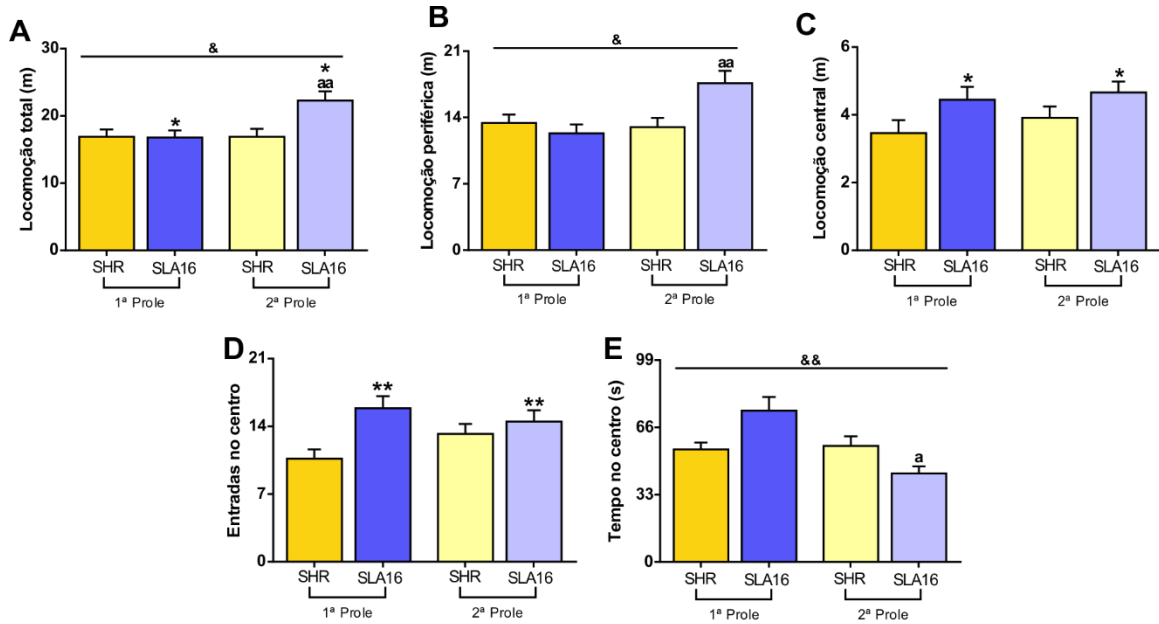


Figura 11. Influência dos cuidados maternos na vida adulta dos machos da prole no teste de campo aberto. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Locomoção central. (D) Entradas no centro. (E) Tempo no centro; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ para a variável “linhagem”. &: $p < 0,05$; &&: $p < 0,01$ para a variável “prole”. a: $p < 0,05$; aa: $p < 0,01$ interação “linhagem” e “prole” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média \pm EPM ($n = 14$ animais por grupo).

Análise do labirinto em cruz elevado

Na análise do LCE de fêmeas, a ANOVA mostrou um efeito de **linhagem** para as entradas nos braços abertos (Figura 12A - $F(1, 52) = 8,22$; $p \leq 0,01$; $SLA16 < SHR$); e **interação linhagem e prole** para tempo nos braços abertos (Figura 12B - $F(1, 52) = 5,06$; $p \leq 0,05$). O teste *posthoc* de Duncan mostrou que SLA16 da segunda reprodução passa mais tempo nos braços abertos que os demais.

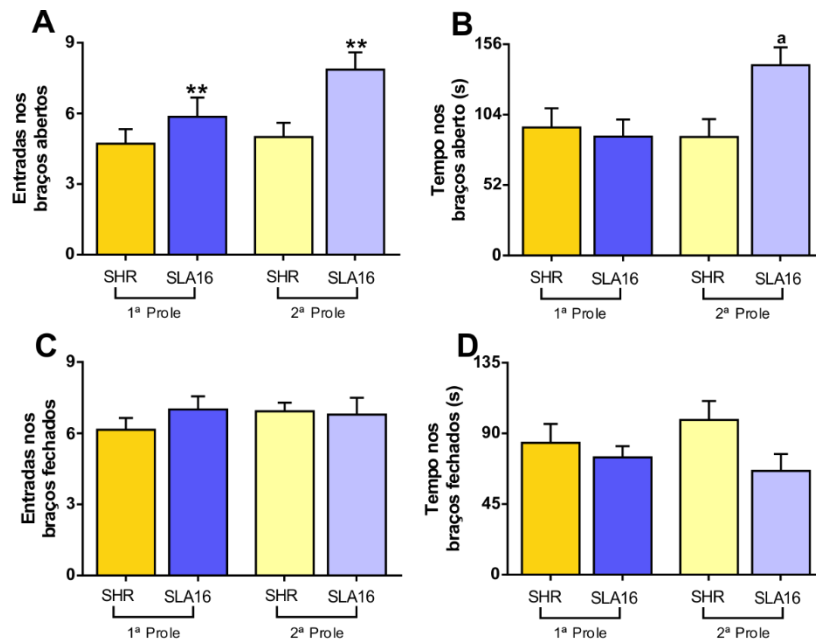


Figura 12. Influência dos cuidados maternos na vida adulta das fêmeas da prole no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Entradas nos braços abertos. (B) Tempo nos braços abertos. (C) Entradas em braços fechados. (D) tempo nos braços fechados. **: $p < 0,01$ para a variável “linhagem”. a: $p < 0,05$ interação “linhagem” e “prole”. ANOVA fatorial com *posthoc* de Duncan. Dados representados com média \pm EPM ($n = 14$ animais por grupo).

Enquanto que para os machos, a ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos de **linhagem** nas entradas nos braços abertos (Figura 13A - $F(1, 52) = 6,21$; $p \leq 0,05$; $SLA16 > SHR$); tempo nos braços abertos (Figura 13B - $F(1, 52) = 5,294$; $p \leq 0,05$; $SLA16 > SHR$); e tempo nos braços fechados (Figura 13D - $F(1, 52) = 6,01$; $p \leq 0,05$; $SLA16 < SHR$).

A ANOVA de duas vias também mostrou o efeito de **prole** no número de entradas no braços fechados (Figura 13C - $F(1, 52) = 19,09$; $p \leq 0,001$; 1ª reprodução < 2ª reprodução).

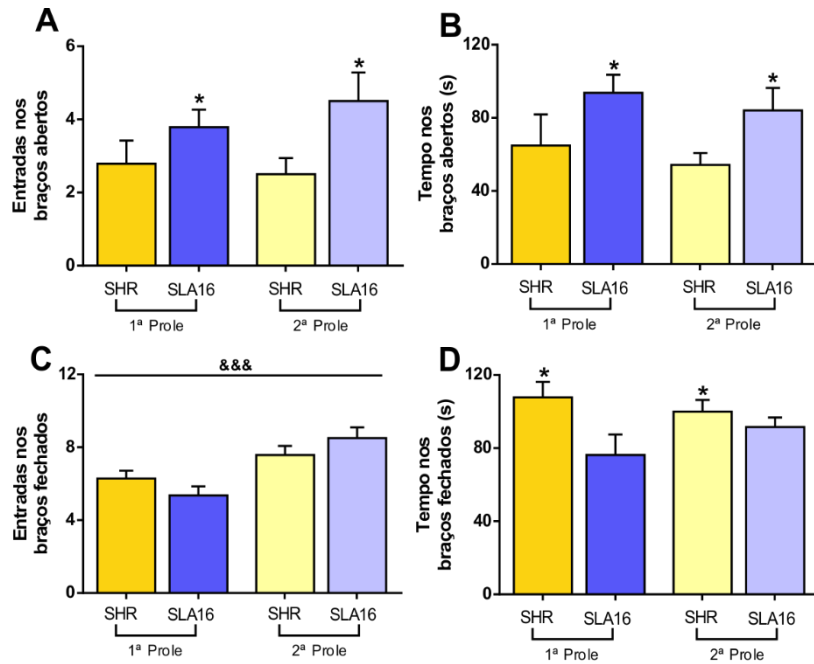


Figura 13. Influência dos cuidados maternos na vida adulta dos machos da prole no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Entradas nos braços abertos. (B) Tempo nos braços abertos. (C) Entradas em braços fechados. (D) tempo nos braços fechados. *: $p < 0,05$ para a variável “linhagem”. &&&: $p < 0,001$ para a variável “prole”. ANOVA fatorial. Dados representados com média \pm EPM ($n = 14$ animais por grupo).

Em resumo, mostramos que os filhotes da primeira, ou segunda reprodução podem apresentar comportamentos diferentes. Mais especificamente, as crias de mães experientes (2ª reprodução) tendem a permanecer mais nos braços fechados da LCE, enquanto SLA16 frequenta mais os braços abertos. De um modo geral, machos e fêmeas SLA16 tenderam a apresentar maiores valores para as medidas do CA. Curiosamente, a diferença de linhagem esperada para a locomoção total somente aparece na segunda reprodução, tanto para fêmeas quanto para machos, sugerindo uma relação entre as diferenças locomotoras das duas linhagens e ambiente proporcionado pelas mães.

2.4 DISCUSSÃO

No primeiro capítulo desta Tese, nós demonstramos que mães SHR e SLA16 apresentam comportamentos maternos diferentes. Durante a segunda reprodução, as mães SHR tendem a reduzir o tempo que passam cuidando da prole. Ambas as linhagens reduzem a frequência de lambidas e postura de amamentação arqueada durante a segunda reprodução, enquanto as mães SLA16 aumentam o tempo em postura não-arqueada e passiva.

Já para os cuidados não relacionados aos filhotes, as linhagens reduzem o período de alimentação durante a segunda reprodução. Para os comportamentos locomotores e de emocionalidade, observamos que se mantem maiores em SLA16, não sendo afetados pelos primeiros dias da lactação. No entanto, ao analisarmos os resultados de CA da prole, observamos que a diferença de linhagem esperada para a locomoção total somente aparece na segunda reprodução, tanto para fêmeas quanto para machos.

Diferenças de cuidado materno entre SHR e SLA16

Para a avaliação do cuidado materno, nossos dados sugerem que a experiência de uma primeira reprodução altera os padrões comportamentais exibidos pela mãe na segunda reprodução. Já se sabe que nos mamíferos, as experiências que as mães adquirem reforçam, e podem até mesmo ultrapassar os efeitos que os hormônios deste período da vida irão exercer sobre este cuidado (HARLOW, 1963). Isto é importante porque a aptidão materna irá interferir diretamente com a sobrevivência dos filhotes, uma vez que as experiências positivas aumentam os comportamentos de cuidado e as negativas podem ter efeitos opostos. O ato de aprender a cuidar da prole começa quando a fêmea filhote está a sendo cuidada e esta experiência irá refletir sobre a sua própria maternidade. Quando as fêmeas jovens são incluídas no contexto de cuidar dos descendentes que não são seus, tornam-se experientes e aplicam o que aprenderam aos seus próprios descendentes. Esta familiarização com o contexto dos cuidados maternos promove que estas ratas tenham maior reconhecimento dos seus próprios filhotes (FLEMING; MORGAN; WALSH, 1996; FLEMING; ROSENBLATT, 1974; HARLOW, 1963; HOLMES, 1990).

Conseqüentemente, podemos inferir que estas mães têm a capacidade de aprender a cuidar de suas crias e essa aprendizagem é muito reforçada pela

experiência com movimentos e contato com os filhotes, sendo ainda intensificada pelos hormônios envolvidos no pós-parto (FLEMING; MORGAN; WALSH, 1996; ROSENBLATT, 1983). Variações nestas respostas influenciarão a sobrevivência da prole, uma vez que estes fatores motivam o cuidado das mães com os seus filhotes, o que pode resultar em casos de negligência ou mesmo de agressão e canibalismo (FLEMING; MORGAN; WALSH, 1996). Esta aprendizagem através da experiência, pode ajudar a explicar os dados que observamos no segundo período de reprodução, à medida que as mães intensificam alguns cuidados e relaxam noutros.

Seguindo nessa linha, observamos algumas diferenças de linhagem e/ou reprodução nas frequências de comportamentos exibidas pelas lactantes. Mães SHR tendem a reduzir os comportamentos ligados a prole e exibir mais comportamentos não ligados diretamente a prole durante a segunda reprodução, como aumento do período sem contato com filhotes. Trabalhos mostram que durante a lactação as mães passam cerca de 85% do dia em contato com os seus descendentes, principalmente na amamentação (GROTA; ADER, 1974). Consequentemente, a redução desse contato por longos períodos, pode desencadear um aumento dos comportamentos de medo, além de comportamento social excessivamente agressivo, bem como um desenvolvimento cognitivo prejudicado (CIERPIAL; SHASBY; MCCARTY, 1987; CHAMPAGNE *et al.*, 2003). Na literatura, as mães SHR tendem a procurar mais seus filhotes, ao mesmo tempo que cuidam mais de seus ninhos e de si próprias, com aumento no período de alimentação, quando comparadas com WKY. Além disso, as mães de SHR são mais hiperativas, mesmo quando exploram a caixa de moradia (CIERPIAL; SHASBY; MCCARTY, 1987; MYERS *et al.*, 1989a).

Ao analisarmos os cuidados diretamente ligados a prole, encontramos variações nas posturas de amamentação exibidas pelas lactantes. Mães SLA16 tendem a permanecer por um período maior na posição não-arqueada cuidando da segunda prole do que na primeira experiência de lactação, enquanto as SHR não demonstram uma diferença significativa. Devemos considerar que a fêmea pode amamentar a prole na posição não-arqueada, apesar de ser um pouco menos comum (VAN VUGT *et al.*, 2014). Myers *et al.* (1989a) demonstraram que as mães SHR expunham mais frequentemente essa postura de amamentação e eram vistas durante um período mais curto na postura passiva ou em repouso. Como exposto, a posição passiva ou de repouso ocorre quando a fêmea amamenta em decúbito

dorsal ou lateral, é geralmente uma consequência de períodos de amamentação na posição arqueada e a mãe fatigada já não sustenta a posição, sendo uma postura que favorece filhotes mais velhos e com maior mobilidade (STERN; LONSTEIN, 1996; VAN VUGT *et al.*, 2014). Não observamos grandes períodos na posição passiva e nem diferença entre as linhagens, já que os 9 primeiros dias pós-natal os filhotes ainda não apresentam grande desenvolvimento e mobilidade.

Ao analisarmos a postura arqueada, notamos que as mães SHR tendem a permanecer mais tempo nessa posição durante a primeira reprodução, no entanto apresentam uma redução considerável na segunda, juntamente com as SLA16. Esse parâmetro é frequentemente analisado em conjunto com a frequência de lambidas, uma vez que são comportamentos com grande influência no desenvolvimento dos filhotes, além de serem considerados indicativos de mães mais ou menos cuidadoras (CHAMPAGNE *et al.*, 2003; MYERS *et al.*, 1989a). Para esse parâmetro, tanto mães SHR quanto SLA16, demonstraram uma redução na frequência de lambidas durante a segunda reprodução. Demonstra-se na literatura, que as mães SHR passam mais tempo lambendo ou cuidando ativamente de seus filhotes do que as mães WKY (CIERPIAL; SHASBY; MCCARTY, 1987; MYERS *et al.*, 1989a). Francis e colaboradores (1999) observaram que alterações nesses comportamentos ocorrem naturalmente e vão impactar nos filhotes, podendo ser transmitido para os descendentes. Mães com padrões mais altos de lambida e postura arqueada tendem a ter filhas que exibirão o mesmo comportamento, sendo uma via não-genética diretamente ligada ao cuidado materno.

Variações nesses comportamentos de posturas de amamentação e frequência de lambidas, parecem estar associadas a interações entre estrogênio e ocitocina em regiões cerebrais no início da lactação (NUMAN; SHEEHAN, 1997; PEDERSEN *et al.*, 1994). Já foi demonstrado que o estrogênio exerce influência na expressão do comportamento das lactantes e uma das regulações desse efeito é via sistema ocitocinérgico (CHAMPAGNE *et al.*, 2001; PEDERSEN, 1997; ROSENBLATT, 1994). Foi demonstrado que o estrogênio é capaz de aumentar as ligações dos receptores de ocitocina, enquanto a administração de ocitocina central em ratas virgens estimula o aparecimento de comportamentos maternos, no entanto esse efeito não ocorre em ratas ovariectomizadas (PEDERSEN; PRANGE, 1979; PEDERSEN *et al.*, 1982, 1985). Nos mamíferos em geral, a ocitocina está envolvida desde o controle da amamentação até à modulação dos comportamentos de

cuidados maternos, ligação mãe-bebê, plasticidade neuronal materna, proteção da ninhada entre tantos outros comportamentos (KIM; STRATHEARN, 2016; MEYZA; KNAPSKA, 2017; RICKENBACHER *et al.*, 2017; ROBINSON *et al.*, 2015). Aparentemente, a ocitocina tem grande influência sobre comportamentos de amamentação e lambida, no entanto pouco interfere no período que a mãe passa em contato com o filhote. Sendo um hormônio importante para o início dos comportamentos de cuidado, mas sozinho não é capaz de manter (FAHRBACH; MORRELL; PFAFF, 1985).

Quando o trazemos para o contexto das nossas linhagens, é importante salientar que os animais SLA16 são congênicos e geneticamente muito próximos de SHR. Por tanto podemos apresentar a região de alelos LEW do cromossomo 4 como uma explicação plausível, podendo até mesmo ser mais sensível às mudanças observadas entre as duas reproduções. Esta região chamada de Anxrr16, o primeiro QTL relacionado com a ansiedade identificada por Ramos *et al.* (1999), contém cerca de 86 Mpb e mais de 950 genes (DE MEDEIROS *et al.*, 2013, 2014). Nesta região também encontramos o gene para o receptor de ocitocina (*Oxtr*) que, como demonstrado, é de vital importância para esse período do desenvolvimento, sendo um gene potencialmente interessante para novos estudos do nosso grupo. Ou seja, devido à construção genética, os animais SHR e SLA16 podem apresentar polimorfismos neste gene, podendo os alelos LEW deixarem os animais mais sensíveis as influências estudadas, podendo afetar o sistema ocitocinérgico. Por exemplo, um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene do receptor de ocitocina de ratos demonstrou afetar o padrão de lambidas no início da vida e na vida adulta (LAUBY *et al.*, 2021) . Para humanos, variações genéticas no *Oxtr* podem afetar o apego infantil (CHEN *et al.*, 2011), desordens psiquiátricas (COSTA *et al.*, 2009; MONTAG *et al.*, 2013), distúrbios alimentares (ÇATLI *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2015), entre outros.

Padrão comportamental de ratas lactantes no campo aberto

Para avaliar a influência do período de lactação na emocionalidade das mães, realizamos o teste do CA. Desde a criação da linhagem, trabalhos do nosso grupo vem demonstrando que animais da linhagem SLA16 tendem a apresentar maior locomoção, bem como maior exploração da região central do aparato (DE MEDEIROS *et al.*, 2013; GRANZOTTO *et al.*, 2023). Essa característica de SLA16

não se altera no período de lactação. As mães SLA16 apresentaram valores elevados para todas as medidas avaliadas no CA, quando comparadas com SHR. No entanto, a experiência de uma segunda reprodução parece ter uma influência nas entradas na região periférica e central, além do tempo que os animais passam explorando o centro do aparato. Talvez a experiência da primeira reprodução pode tornar esses animais mais sensíveis aos efeitos aos hormônios da lactação. Já foi demonstrado que animais Wistar apresentam uma redução do comportamento de ansiedade/emocionalidade durante a lactação, quando comparados com os animais não lactantes, uma vez que o aumento da secreção de hormônios do parto e hormônios do período de lactação, tais como prolactina e ocitocina, já foram descritas com propriedades ansiolíticas (FERREIRA *et al.*, 2002; FLEMING; ROSENBLATT, 1974; ROSENBLATT, 1980). Em estudos com fêmeas virgens, ou ovariectomizadas, expostas à adoção de ninhadas e sensibilizadas com estrogênio, simulando o início da lactação, os ratos mostraram maior agressividade e menos medo, como lactantes verdadeiras, o que pode inferir que tanto os cuidados maternos como o sistema endócrino serão responsáveis pela modulação destas respostas de ansiedade (HANSEN; FERREIRA, 1986; MAYER; AHDIEH; ROSENBLATT, 1990).

Vale ressaltar que apesar da grande importância do fator experiência, não podemos deixar de citar o fator idade materna como algo a ser pensado nessas variações comportamentais, uma vez que essas fêmeas de segunda reprodução já estão próximas aos seis meses de idade e matrizes de nosso laboratório geralmente reproduzem até completarem um ano. Já foi demonstrado que a idade pode afetar o comportamento de exploração de ratas no LCE (IMHOF *et al.*, 1993). Além disso, um trabalho do nosso grupo demonstrou que fêmeas SHR e SLA16 tendem a flutuar os padrões de locomoção ao longo de suas vidas no CA, com reduções consideráveis na locomoção total próximo a um ano de idade (GRANZOTTO *et al.*, 2023).

Influências do cuidado materno no comportamento da prole adulta

Ao avaliarmos os filhotes dessas lactantes, já na fase adulta, podemos perceber que esses padrões de cuidado apresentados pelas mães parecem ser de grande relevância para o aparecimento do fenótipo de locomoção diferencial em nossas linhagens. Quando avaliamos o padrão de gráfico exibido para locomoção total e locomoção periférica de machos e fêmeas observamos que o efeito de maior

locomoção característico da linhagem SLA16 não aparece em filhotes de primeira prole, mas é observado na segunda prole. Como exposto, esse efeito pode estar relacionado as mudanças de posturas de amamentação e lambidas observadas durante a segunda reprodução e talvez uma maior sensibilização da região diferencial do cromossomo 4. Em contrapartida, os padrões descritos na literatura para os demais parâmetros do CA aparecem logo na primeira prole.

Champagne *et al.* (2003) pontua que as variações de cuidados maternos não devem ser utilizadas para dizer se a rata é uma mãe “boa” ou “ruim”. No entanto, aqui devemos mencionar que a redução nas lambidas e postura arqueada na segunda reprodução pode ajudar a entender o efeito observado. Já foi demonstrado que os descendentes criados por mães que têm níveis mais baixos de lambidas e posição arqueada apresentam taxas mais elevadas de ansiedade (KAN; CALLAGHAN; RICHARDSON, 2016) . Além disso, estas mudanças nos cuidados maternos podem influenciar os sistemas neuroendócrinos. Liu *et al.* (1997) demonstraram que os machos tratados por mães com baixa frequência de lambidas apresentam alterações na expressão genética e proteínas relacionadas com o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) na região hipocampo e hipotálamo, com redução da liberação de corticotrofina e redução dos receptores glicocorticoides.

Majdak *et al.* (2016) ao trabalhar com animais de “alta-atividade” (*High-Active*), um modelo genético para hiperatividade, demonstrou um alto padrão de negligência e injúria por parte dessas mães. Essas mães hiperativas exibiam menores valores para lambidas e postura arqueada, gerando um ambiente que variava desde estressor até mortal quando cuidavam de uma ninhada de animais controle. Somado a isso, filhotes de alta-atividade cuidados por mães controle reproduziam o padrão de comportamento hiperativo, reforçando a ideia da hiperatividade como um fator fortemente genético. No entanto, apesar da hiperatividade dos nossos animais, essa explicação reforçando o fator genético não é o que observamos para SLA16. Independentemente da importância do aporte genético para o desenvolvimento dessa característica da nossa linhagem, o fenótipo conhecido só passou a ser observado com as alterações de cuidados demonstradas pelas mães. Vale salientar que mesmo com reduções nas características de lambida e postura arqueada, não podemos considerar mães SLA16 como negligentes uma vez que aumentam outras formas de cuidados. Seria mais plausível propor uma

modulação desses genes relacionados à hiperatividade pelo ambiente materno, sendo influenciado pela experiência de ser mãe.

Existe uma vasta literatura demonstrando que diferentes fatores ambientais possuem influências nas respostas comportamentais de ratos a diferentes aparatos, mesmo para animais com mesmo *background* genético. Um trabalho recente demonstrou que o sexo do experimentador pode influenciar nas respostas ao campo aberto. Ratas demonstraram um comportamento mais ansioso quando manipuladas por um experimentador masculino, sendo resultados de estímulos olfatórios e visuais ocasionando maiores valores de corticosterona e menores níveis de ocitocina circulantes (FARAJI *et al.*, 2022). Em outro trabalho, Izídio *et al.* (2005) estudou a influência de algumas variáveis ambientais laboratoriais nos fenótipos comportamentais de LEW e SHR, e não foram observadas alterações na resposta ao CA com relação a familiaridade com o experimentador. Mas esse trabalho mostrou que a posição da gaiola na estante do biotério influencia nessa resposta, pois animais criados em prateleiras superiores demonstraram ser menos ansiosos. Essas alterações têm sido estudadas por grupos de pesquisa e incorporadas nas rotinas de laboratório, demonstrando cada vez mais que além das questões genéticas as relações com diferentes situações ambientais devem ser levadas em consideração, e a avaliação do ambiente materno demonstrou ser um fator de grande relevância para as influências causadas pelo cromossomo 4.

Depois do exposto, é importante ressaltar o papel da epigenética na modulação genética as respostas ambientais. Essas respostas podem ser causadas por uma série de mecanismos que acarretam alterações “extra-gene” observadas, como processos de metilação da fita do ácido desoxirribonucleico (DNA - o inglês *deoxyribonucleic acid*), ácidos ribonucleicos (RNA - do inglês *ribonucleic acid*) de interferência, alterações de histonas e na compactação da fita de DNA, alterando a cromatina (TURNER, 2001). Uns dos primeiros trabalhos relacionando epigenética e cuidado materno, demonstrou que taxas aumentadas de lambidas e amamentação em postura arqueada acarreta redução da metilação no gene promotor do receptor de glicocorticoide na região do hipocampo, aumentando os níveis do receptor, que pode ser revertida quando ocorre a adoção cruzada entre mães muito lambedoras e pouco lambedoras (WEAVER *et al.*, 2004). Champagne e colaboradores (2006), demonstraram que baixos níveis de lambidas maternas estão associadas a altos níveis de metilação do promotor do receptor de estrogênio α (ER α) de descendentes

fêmeas. Essa metilação pode interferir na região de ligação do transdutor de sinal e ativador da Stat-5, importante para a transcrição do receptor. Os autores demonstram que essa alteração pode ser manter na fase adulta, e que diferenças nos padrões de cuidado materno podem estar associadas a efeitos epigenéticos, na prole feminina, causando mudanças a longo prazo em genes relacionados ao próprio cuidado materno e podendo influenciar outras gerações.

Após o exposto no decorrer deste capítulo, podemos dizer que as particularidades no cuidado materno de cada linhagem têm papel importante no desenvolvimento da prole, que se reflete na fase adulta. Dessa forma, é necessário entender como se dão os fatores “ambiente materno” versus “genética da linhagem” no desenvolvimento dessas características.

2.5 CONCLUSÕES CAPÍTULO 1

O presente capítulo caracterizou, pela primeira vez, os parâmetros de cuidados maternos das linhagens SHR e SLA16. Demonstramos que as duas linhagens apresentam padrões de cuidados diferentes, os quais sofrem alterações com a experiência de uma segunda reprodução. Os dados demonstram que a experiência materna leva mães SHR a reduzirem os cuidados e tempo despendidos com a prole. Já mães SLA16 mantêm a frequências de cuidados, no entanto, sofrem uma alteração principalmente nas posturas de amamentação, o que parece refletir nos dados de locomoção dos seus filhotes no teste do campo aberto. Essas alterações que ocorrem entre a primeira e a segunda reprodução podem refletir, ao menos em parte, nas diferenças de locomoção no CA e LCE. Por fim, o presente capítulo abre um leque de possibilidades de investigação da influência desse momento mais inicial de desenvolvimento pós-natal na região diferencial do cromossomo 4.

CAPÍTULO 2

O paradigma da adoção cruzada

O Paradigma da adoção cruzada é uma técnica utilizada com diferentes finalidades, sendo considerada muito eficaz para estudar separadamente o efeito do ambiente promovido pela mãe das influências genéticas que os filhotes trazem ao nascer.

3.1 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar o efeito da adoção cruzada em fenótipos importantes de animais adultos SHR e SLA16.

Objetivos Específicos

- Realizar o paradigma da adoção cruzada entre as linhagens SHR e SLA16;
- Investigar a influência da adoção cruzada no estabelecimento da pressão arterial;
- Investigar a influência da adoção cruzada no perfil locomotor e emocional das linhagens SHR e SLA16.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

i. Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) das linhagens SHR e SLA16 de ambos os sexos, criados no LGC (como descritos anteriormente), a partir das 15 semanas de vida. As fêmeas foram mantidas em grupos de 5 indivíduos por gaiola e os machos em grupos de 3 ou 4 por gaiola, até os 4 meses de idade. A temperatura do biotério se manteve entre 20°C e 24°C com ciclo claro/escuro de 12/12h com as luzes acesas às 7h.

Todos os protocolos descritos a seguir foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) da UFSC, com número de protocolo 5863250220.

ii. Adoção cruzada

Aos 4 meses, fêmeas e machos, de ambas as linhagens, foram colocados para acasalar na proporção de 2 fêmeas para 1 macho por um período de 10 dias. As matrizes foram organizadas em blocos experimentais distribuídos por períodos diferentes ao longo da análise, variando os meses do ano e as gerações dos animais. Para esse capítulo, utilizamos animais SHR das gerações G54 até G56, e SLA16 das gerações N10F29 até N10F31.

Após o acasalamento, as fêmeas foram separadas e o nascimento dos filhotes foi monitorado. Ao constatar o nascimento, ao final do dia as mães foram alocadas em um dos 3 grupos (6 mães por linhagem): controle, adoção e adoção cruzada (Figura 12).

No **grupo controle (CNT)**, as mães foram deixadas com suas próprias ninhadas. No entanto, fizemos a padronização no número de filhotes, deixando no máximo 3 fêmeas e 3 machos por ninhada, quando possível.

No grupo **adoção (ADÇ)** foram trocadas as mães de mesma linhagem, logo mães SLA16 cuidavam de filhotes de outras SLA16 e mães SHR cuidavam de filhotes de outras SHR. No grupo **adoção cruzada (ACZ)** ninhadas de uma mãe SLA16 foram criadas por uma mãe adotiva SHR e ninhadas SHR criadas por uma mãe adotiva SLA16 (OLEJNÍKOVÁ *et al.*, 2018).

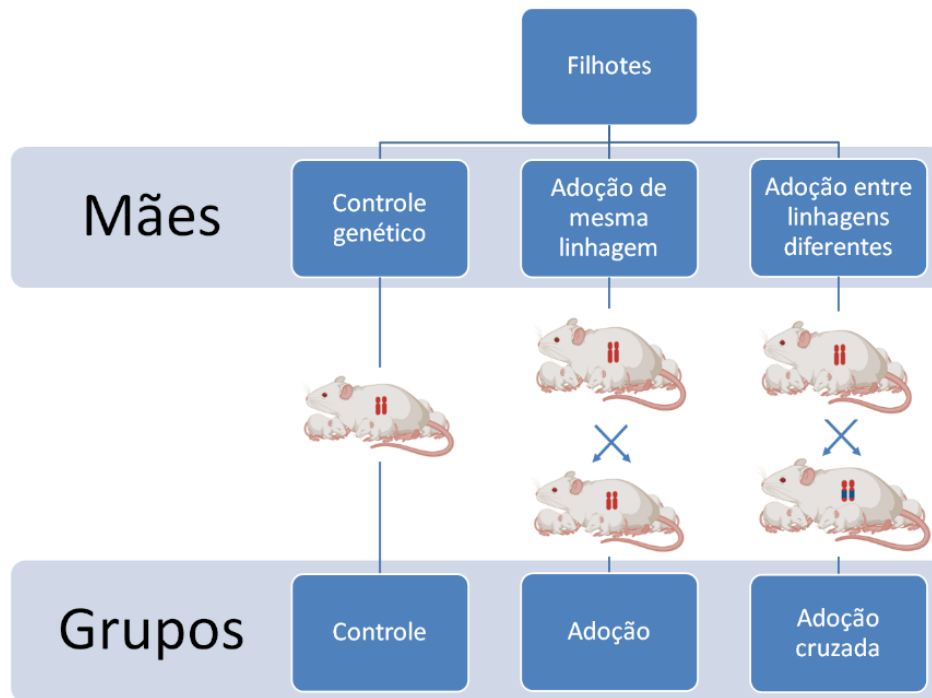


Figura 14. Distribuição das mães e filhotes entre os grupos controle, adoção e adoção cruzada.

Para os grupos que passaram pelo processo de adoção, os filhotes também foram padronizados na proporção 3 machos e 3 fêmeas. Esses filhotes foram então retirados das suas mães biológicas, passados na maravalha suja da nova caixa e na barriga e região ano-genital da mãe adotiva, por fim alocados no ninho da mãe adotiva. Entre as trocas de ninhadas as luvas eram higienizadas com álcool 70°.

iii. Campo aberto

Aos 4 meses de idade, os filhotes foram analisados no CA sob as mesmas condições já descritas no capítulo anterior. Os animais foram posicionados no centro do aparato e filmados durante 5 minutos com iluminação de 12 lux.

iv. Labirinto em cruz elevado

Aos 4 meses de idade, os filhotes foram analisados no LCE sob as mesmas condições já descritas no capítulo anterior. Os animais foram posicionados no centro do aparato e filmados durante 5 minutos com iluminação de 12 lux.

v. Aferição da pressão arterial

Os filhotes, ao completarem 4 meses de idade, passaram pela avaliação da Pressão Arterial Sistólica (PAS), medida por método não invasivo de pletismografia de cauda em todos os filhotes, com duração de 10 a 15 min. Os animais foram habituados previamente ao aparelho no dia anterior ao dia da aferição. Posteriormente, foram submetidos a duas medidas de pressão arterial, sendo a média desses valores utilizada como a pressão do animal.

Todas as análises foram realizadas em sala com temperatura controlada (30°C), na qual os animais eram habituados por 30 minutos antes de serem avaliados. As medidas foram obtidas através de esfignomamômetro de cauda, desse modo o animal foi imobilizado dentro de um contensor apropriado para o seu tamanho, juntamente com uma manta de aquecimento que auxilia na vasodilatação na cauda. O esfignomamômetro foi então insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal e, em seguida o aparato foi esvaziado lentamente até obtenção dos picos de pressão, registrados em um sistema de aquisição de dados (Programa LabChart, versão 7.0).

vi. Análises Estatísticas

Os dados foram examinados com estatísticas paramétricas e apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações foram realizadas pelo ANOVA duas vias. Quando necessário, foi realizado o pós-teste de Duncan. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises foram feitas utilizando o software *Statistica* 10 (Statsoft, Tulsa, OK, EUA) e os gráficos foram construídos em *GraphPad Prism* 5 (GraphPad Software Inc., EUA).

3.3 RESULTADOS

Aos 4 meses, a prole foi submetida ao CA, LCE e análise de PAS, para identificarmos a influência da criação das mães no estabelecimento das características de indivíduos adultos das linhagens SHR e SLA16.

Análise do campo aberto

No CA das fêmeas, a ANOVA de duas vias demonstrou um efeito de **linhagem** para os parâmetro de locomoção total (Figura 15A – $F(1, 66) = 12,62$; $p \leq 0,001$; SLA16 > SHR), locomoção periférica (Figura 15B – $F(1, 66) = 11,71$; $p \leq 0,01$; SLA16 > SHR), locomoção central (Figura 15C – $F(1, 66) = 9,50$; $p \leq 0,01$; SLA16 > SHR) e número de entradas no centro (Figura 15D – $F(1, 66) = 16,27$; $p \leq 0,001$; SLA16 > SHR).

A ANOVA também demonstrou efeito da **adoção** para a locomoção total (Figura 15A – $F(2, 66) = 4,82$; $p \leq 0,01$); locomoção periférica (Figura 13B – $F(2, 66) = 4,51$; $p \leq 0,05$); locomoção central (Figura 15C – $F(2, 66) = 9,50$; $p \leq 0,01$); e número de entradas no centro (Figura 15D – $F(2, 66) = 5,92$; $p \leq 0,01$). O *posthoc* de Duncan demonstrou que a adoção cruzada (ACZ) aumentou as locomoções e entradas no centro das duas linhagens.

Por fim, a ANOVA demonstrou **interação linhagem e adoção** para entradas no centro (Figura 15D – $F(2,66) = 3,32$; $p \leq 0,001$). O *posthoc* de Duncan demonstrou que a adoção (ADÇ) diminuiu as entradas no centro especificamente nos animais SHR.

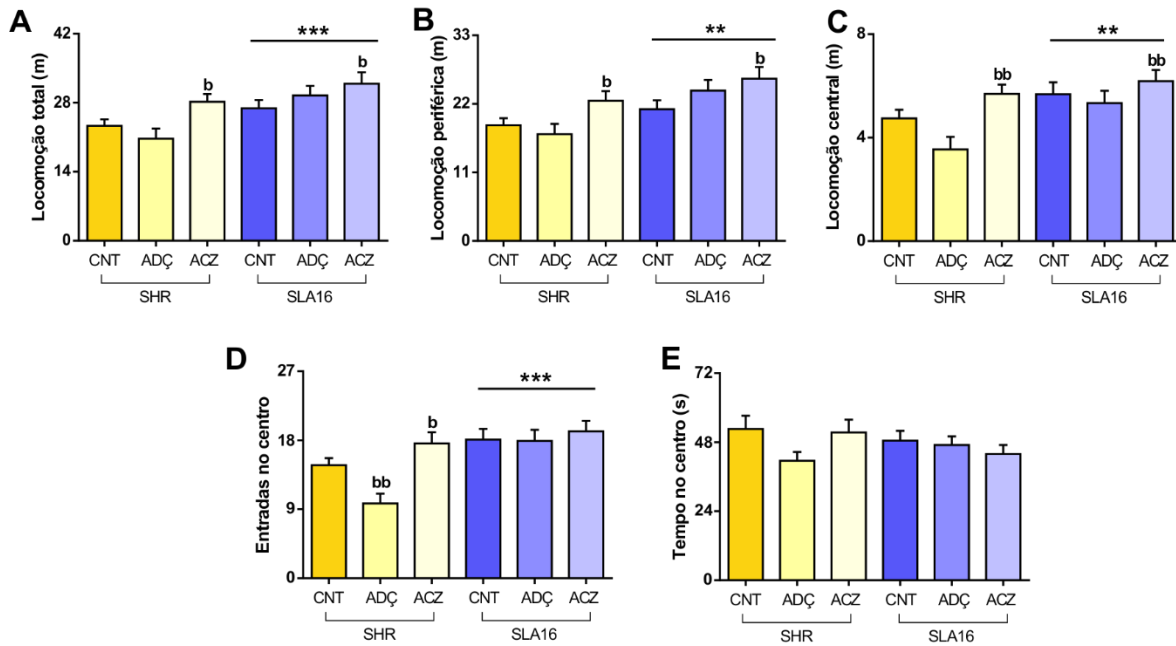


Figura 15. Influência da adoção e adoção cruzada em fêmeas da prole SHR e SLA16 no teste do campo aberto. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Locomoção central. (D) Número de entradas no centro. (E) Tempo no centro. CNT: controle. ADÇ: Adoção. ADZ: Adoção cruzada. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ para a variável “linhagem”. b: $p < 0,05$; bb: $p < 0,01$ interação “linhagem” e “adoção” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média \pm EPM ($n = 12$ animais por grupo).

No CA dos machos, a ANOVA de duas vias demonstrou um efeito de **linhagem** para os parâmetro de locomoção total (Figura 16A – $F(1, 65) = 14,14$; $p \leq 0,001$; SLA16 > SHR), locomoção periférica (Figura 16B – $F(1, 66) = 9,25$; $p \leq 0,01$; SLA16 > SHR), locomoção central (Figura 16C – $F(1, 66) = 13,19$; $p \leq 0,001$; SLA16 > SHR) e número de entradas no centro (Figura 16D – $F(1, 66) = 5,62$; $p \leq 0,05$; SLA16 > SHR).

A ANOVA demonstrou também efeito de **adoção** para locomoção total (Figura 16A – $F(2, 65) = 11,94$; $p \leq 0,001$), locomoção periférica (Figura 16B – $F(2, 66) = 11,22$; $p \leq 0,001$) e locomoção central (Figura 16C – $F(2, 66) = 5,48$; $p \leq 0,01$). O *posthoc* de Duncan demonstrou que a adoção cruzada (ACZ) aumentou as locomoções das duas linhagens.

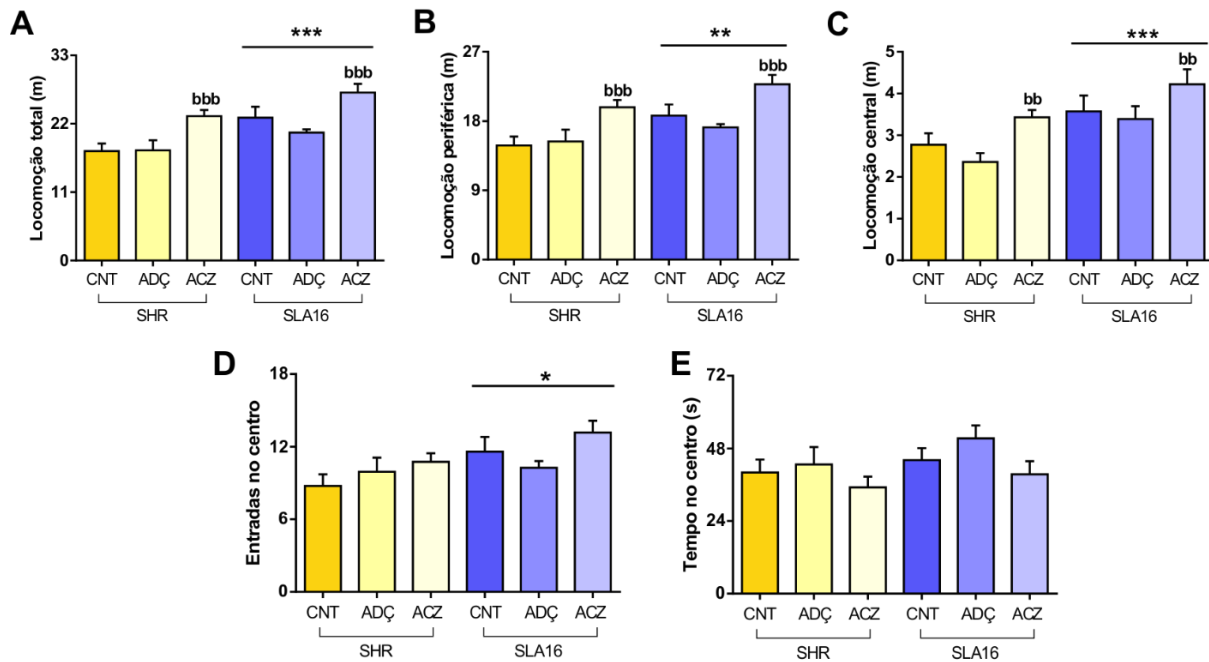


Figura 16. Influência da adoção e adoção cruzada em fêmeas da prole SHR e SLA16 no teste do campo aberto. (A) Locomoção total. (B) Locomoção periférica. (C) Locomoção central. (D) número de entradas no centro. (E) Tempo no centro. CNT: controle. ADÇ: Adução. ADZ: Adoção cruzada. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ para a variável “linhagem”. bb: $p < 0,01$; bbb: $p < 0,001$ interação “linhagem” e “adoção” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média \pm EPM ($n = 12$ animais por grupo).

De maneira geral, estes dados sugerem que a ACZ é capaz de exacerbar ainda mais a atividade locomotora geral e a locomoção no centro de fêmeas e machos das duas linhagens, que já são consideradas hiperativas e de baixa emocionalidade.

Análise do labirinto em cruz elevado

Na análise do LCE de fêmeas, a ANOVA mostrou um efeito de **linhagem** para as entradas nos braços abertos (Figura 17A - $F(1, 66) = 9,76$; $p \leq 0,01$; SLA16 > SHR); tempo nos braços abertos (Figura 17B - $F(1, 66) = 4,57$; $p \leq 0,05$; SLA16 > SHR) e tempo nos braços fechados (Figura 17D - $F(1, 66) = 6,04$; $p \leq 0,05$; SLA16 < SHR). Além disso, foi observada **interação linhagem e adoção** para entradas nos braços abertos (Figura 17A - $F(2, 66) = 6,26$; $p \leq 0,01$). O *posthoc* de Duncan mostrou que os animais do grupo adoção cruzada apresentaram diferenças nos

valores de entradas nos braços abertos. Sendo aumentados para SHR e reduzidos para SLA16 em comparação com os grupos controle e adoção.

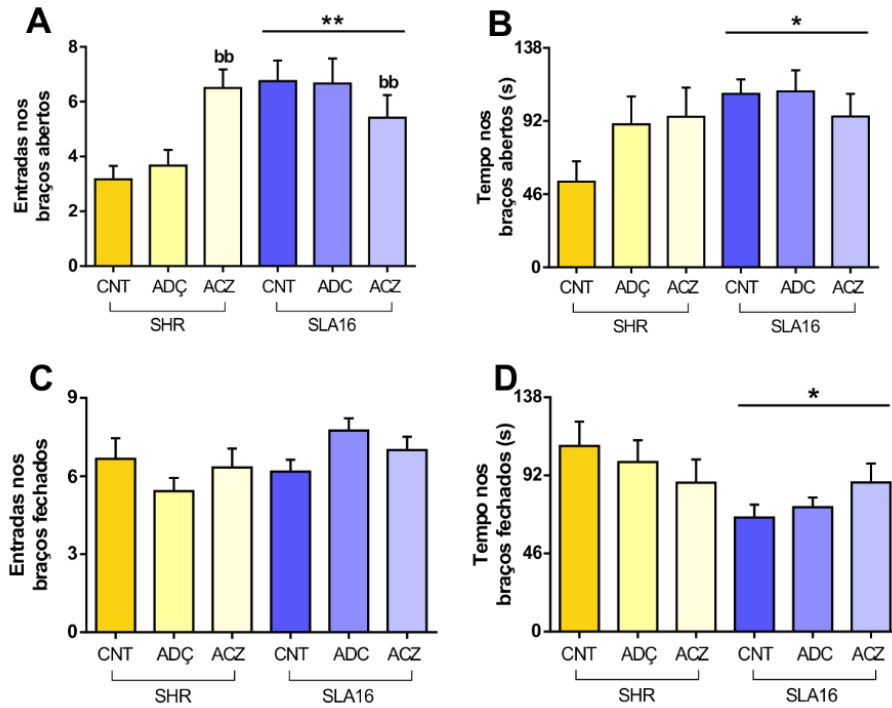


Figura 17. Influência da adoção e adoção cruzada em fêmeas da prole SHR e SLA16 no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Entradas nos braços abertos. (B) Tempo nos braços abertos. (C) Entradas nos braços fechados. (D) Tempo nos braços fechados. CNT: controle. ADÇ: Adução. ADZ: Adoção cruzada. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ para a variável “linhagem”. bb: $p < 0,01$ interação “linhagem” e “adoção” (*posthoc*). ANOVA fatorial. Dados representados por média \pm EPM (n = 12 animais por grupo).

Enquanto que para os machos, a ANOVA de duas vias mostrou efeitos significativos de **linhagem** nas entradas nos braços abertos (Figura 18A - $F(1, 66) = 22,50$; $p \leq 0,001$; SLA16>SHR); tempo nos braços abertos (Figura 18B - $F(1, 66) = 15,89$; $p \leq 0,001$; SLA16>SHR); entradas nos braços fechados (Figura 18C - $F(1, 66) = 4,10$; $p \leq 0,05$; SLA16>SHR) e tempo nos braços fechados (Figura 18D - $F(1, 66) = 5,59$; $p \leq 0,05$; SLA16>SHR). Além disso, foi observada **interação linhagem e adoção** para tempo nos braços abertos (Figura 18B - $F(2, 66) = 5,40$; $p \leq 0,01$) e tempo nos braços fechados (Figura 18D - $F(2, 66) = 3,98$; $p \leq 0,05$). O *posthoc* de Duncan mostrou que os animais do grupo adoção cruzada apresentaram aumento

nos tempos nos braços abertos e redução nos tempos nos braços fechados, quando comparados com os grupos controle e adoção.

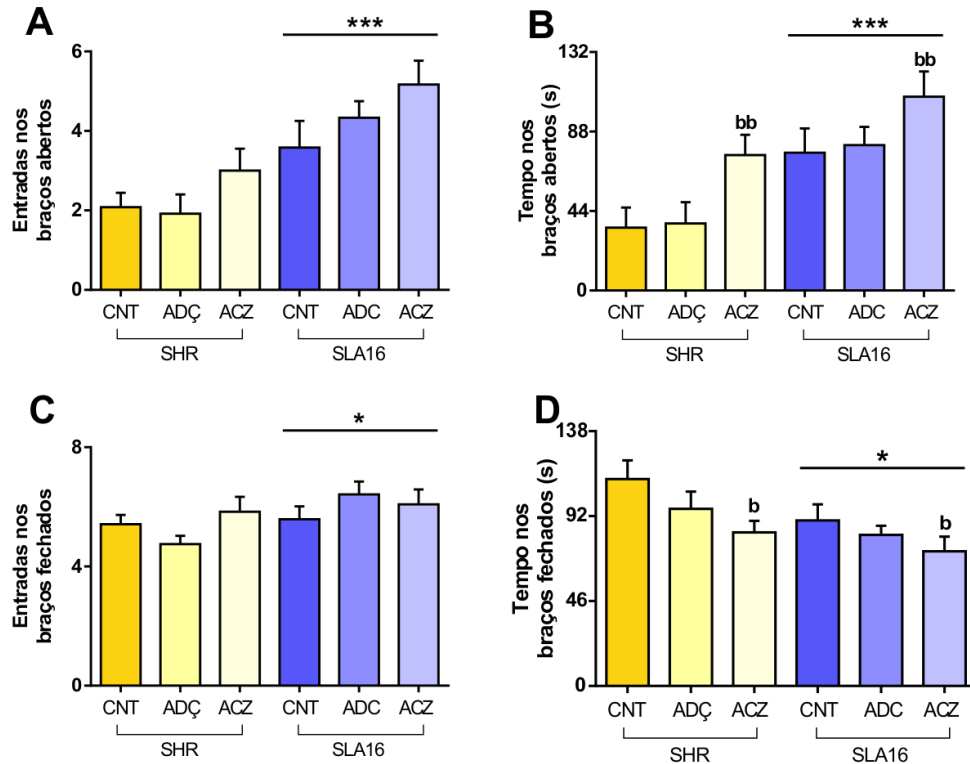


Figura 18. Influência da adoção e adoção cruzada em machos da prole SHR e SLA16 no teste do labirinto em cruz elevado. (A) Entradas nos braços abertos. (B) Tempo nos braços abertos. (C) Entradas nos braços fechados. (D) Tempo nos braços fechados. CNT: controle. ADÇ: Adução. ACZ: Adoção cruzada. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$ para a variável “linhagem”. b: $p < 0,05$; bb: $p < 0,01$ interação “linhagem” e “adoção”. ANOVA fatorial. Dados representados por média \pm EPM (n = 12 animais por grupo).

De maneira geral, estes dados sugerem que a ACZ é capaz de influenciar a exploração de áreas abertas, consideradas aversivas, do aparato para fêmeas e machos. Principalmente para machos, que aumentaram o tempo de exploração dessa região em comparação com os demais grupos.

Análise de pressão arterial

Para a análise PAS de fêmeas, a ANOVA de duas vias demonstrou efeito de **linhagem** (Figura 19A – $F(1, 65) = 4,94$; $p \leq 0,001$; SHR > SLA16); e também uma **interação entre linhagem e adoção** (Figura 19A – $F(1, 65) = 3,23$; $p \leq 0,05$). O

teste *posthoc* de Duncan demonstrou que a adoção (ADÇ) e adoção cruzada (ACZ) aumentam a pressão arterial das fêmeas SLA16.

Para a análise de PAS de machos, a ANOVA de duas vias demonstrou efeito de **linhagem** (Figura 19B – $F(1, 65) = 14, 28$; $p \leq 0,01$; SHR > SLA16); e também uma **interação entre linhagem e adoção** (Figura 19B – $F(1, 65) = 6,70$; $p \leq 0,05$). O teste *posthoc* de Duncan demonstrou que a adoção cruzada (ACZ) diminui a pressão arterial dos machos SHR e aumenta a pressão dos machos SLA16.

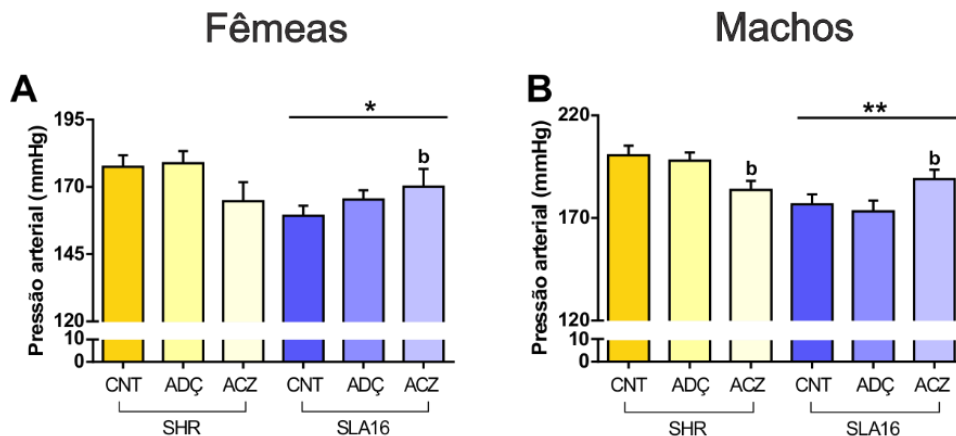


Figura 19. Influência da adoção e adoção cruzada na pressão arterial sistólica da prole SHR e SLA16. (A) Medidas de pressão arterial de fêmeas. (B) Medidas de pressão arterial de machos. CNT: controle. ADÇ: Adução. CRS: Adoção cruzada. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ para a variável “linhagem”. b: $p < 0,05$ interação “linhagem” “adoção”. ANOVA de duas vias. Dados representados por média \pm EPM ($n = 12$ animais por grupo).

Em resumo, o protocolo de adoção cruzada alterou os parâmetros de pressão dos grupos ACZ, tornando os níveis de PAS, principalmente de machos, mais próximos ao conhecido de suas mães biológicas e seus respectivos controles.

3.4 DISCUSSÃO

Como observado, a troca de ninhadas entre as linhagens foi capaz de exacerbar a atividade locomotora geral e central no CA, tanto para fêmeas quanto para machos das duas linhagens. Além disso, o protocolo demonstrou resultados interessantes, principalmente para machos do grupo adoção cruzada, que apresentaram alterações de pressão que os aproximam do esperado para suas linhagens adotivas.

Os dados do presente capítulo sugerem que o grupo adoção cruzada (ACZ) elevou a locomoção geral e diminuiu a emocionalidade de animais fêmeas e machos das duas linhagens. Para os demais parâmetros analisados, observamos um efeito predominante de linhagem, com SLA16 exibindo maiores taxas de locomoção nas duas áreas do aparato. Como já foi demonstrado na literatura do nosso grupo, os animais da linhagem SLA16 tende a apresentar maiores locomoções no CA (DE MEDEIROS *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2022).

A resposta da adoção cruzada ao teste do CA é controversa. Alguns estudos demonstram que o cruzamento das ninhadas não altera o comportamento dos indivíduos nesse teste (HOWELLS; BINDEWALD; RUSSELL, 2009; YAMAMURO, 2008). Entretanto, outros autores demonstram diferenças nas respostas ao aparato por vezes relacionado ao sexo do animal ou a linhagem específica (GOMEZ-SERRANO *et al.*, 2001; SIVIY *et al.*, 2017). Nossos dados demonstram maiores locomoções para animais SLA16, no entanto é possível notar que os animais SHR criados por mães SLA16 tendem a apresentar valores parecidos aos do SLA16 controle. Outros trabalhos já demonstraram que ratos SHR quando criados por mães WKY demonstram uma atividade consideravelmente mais alta no CA, quando comparados com SHR dos grupos controle e adoção, e na maioria dos casos os grupo controle e adoção não foram significativamente diferentes entre eles (CIERPIAL *et al.*, 1989). Contudo, Howells *et al.* (2009) demonstram que essa maior locomoção de SHR independe da troca de linhagem materna, uma vez que SHR é mais hiperativo quando comparados a WKY. No entanto, nosso trabalho demonstra que animais SHR respondem ao paradigma da adoção cruzada quando comparados com SLA16.

Nossos dados demonstram que a troca da linhagem das proles exerce efeito nas respostas dos indivíduos adultos. Apesar das diferenças de locomoção no CA entre as linhagens serem mantidas, é possível observar que a adoção cruzada eleva

ainda mais essas respostas para animais SLA16 criados por mães SHR. É interessante notar que animais SHR criados por mães SLA16 chegam a apresentar taxas de locomoção total, periférica e central muito parecidas com os controles de SLA16. O processo de adoção gera estresse para mães e filhotes, como já descrito anteriormente, no entanto não observamos diferenças significativas entre os grupo controle e adoção de ambas as linhagens. Dessa forma, podemos sugerir que o procedimento de adoção cruzada, juntamente com o ambiente materno, propicia essas alterações observadas no grupo ADZ.

Apesar do cuidado materno não ter sido exatamente o foco desse capítulo, ele possui relação com as características analisadas. Já foi demonstrado que o somatório de 3 comportamentos maternos - contato com os filhotes, postura de amamentação arqueada e a frequência de lambidas – foram positivamente correlacionados com o desenvolvimento do aumento de pressão arterial em animais SHR. Esse mesmo grupo, realizou o cruzamento de SHR e WKY, gerando uma ninhada com fenótipos intermediários entre as duas linhagens, seguido da adoção cruzada entre F1. Nesse contexto as mães SHR e WKY não diferiram em nenhuma das variáveis analisadas de cuidado materno quando criavam animais F1, com exceção da postura de amamentação passiva maior para mães SHR. No entanto, não foram observadas diferenças na pressão arterial desses animais, ainda que o valor apresentando não era o mesmo intermediário demonstrado por animais que não tiveram as mães trocadas (MYERS *et al.*, 1989b, 1989a).

A análise da pressão arterial, demonstrou que a troca de mães de outra linhagem, altera significativamente a pressão arterial aproximando com os valores apresentados pelos animais de seus respectivos controles, principalmente para machos. Essa diferença de pressão entre SHR e SLA16 já é estabelecida em nosso grupo, uma vez que animais SHR possuem uma pressão arterial elevada, quando comparados com animais SLA16, enquanto animais SLA16 são um pouco mais próximos do normotenso (GRANZOTTO *et al.*, 2023; Fadanni *et al.*, in print). Além disso, um efeito semelhante de alteração de pressão arterial foi observado em nosso grupo ao trocar a microbiota de ambas as linhagens (BOEDER, 2019). Essa linha de investigação relacionando microbiota e adoção cruzada tem crescido bastante, uma vez que os filhotes trocados são expostos a microbiota da nova mãe, trabalhos mais recentes vêm demonstrando a importância materna para a colonização de microbiota nos filhotes, sendo a troca de mães uma metodologia para esses

estudos, controlar a microbiota materna permite controlar diferentes aspectos genéticos de um mesmo *background* genético (ABBOUD *et al.*, 2021; DAFT *et al.*, 2015). Alguns estudos com SHR sugerem que esses animais apresentam alterações de microbiota quando comparados com WKY, essas disbioses se estabelecem paralelamente ao desenvolvimento da hipertensão por esses animais e já foi demonstrado que está relacionada com o desenvolvimento da hipertensão nessa linhagem (ADNAN *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2015). O tratamento de ratos SHR com antibiótico ou transplante fecal demonstrou redução nos níveis de pressão arterial desses animais (GALLA *et al.*, 2018). Além disso, Cierpial e McCarty (1987), demonstraram que filhotes SHR apresentavam menores níveis de pressão quando criados por mães WKY (normotensas), atribuindo essa mudança as alterações no cuidado materno que ambas as linhagens apresentam. Trabalhos mais recentes questionam o resultado e atribuem a troca de microbiota neonatal entre mães adotivas e prole adotada, que resultaria em alterações significativas no sistema imune juntamente com a redução da pressão (ABBOUD *et al.*, 2021).

Somado a isso, podemos ressaltar ainda que além do cuidado materno, a troca de ninhadas também proporciona um ambiente diferente para as ninhadas. Alguns fatores têm sido relacionados com o desenvolvimento da hipertensão no âmbito nutricional. Além das posturas de amamentação que possibilitam mais ou menos acessos as mamas, a própria composição do leite pode ser diferente entre linhagens, incluindo eletrólitos e moléculas biologicamente ativas (MCCARTY; FIELDS-OKOTCHA, 1994; MYERS *et al.*, 1989b; STERN; YU; CROCKETT, 2002).

Por fim, vale destacar que o ambiente materno ao qual os animais foram expostos nesse segundo bloco experimental é completamente diferente do ambiente ao qual foram expostos no bloco experimental anterior. Todos os grupos sofreram manipulação, troca de ninho ou simulação da troca e redução de ninhada, gerando um ambiente consideravelmente estressor para mães e filhotes. Já foi demonstrado que a redução da ninhada poder alterar o ambiente nutricional e gerar alterações no cuidado materno, modificando as respostas a estímulos estressores que irão impactar em comportamentos relacionados a ansiedade (ENES-MARQUES; GIUSTI-PAIVA, 2018). Esses fatos devem ser levados em consideração para evitar interpretações errôneas na comparação entre os capítulos.

3.5 CONCLUSÕES CAPÍTULO 2

O paradigma da adoção cruzada reforça a ideia de que o ambiente materno tem grande importância no desenvolvimento de padrões observados no CA tanto para SHR, quanto para SLA16. Quando expostos a adoção cruzada, animais SLA16 aumentam sua locomoção no CA e animais SHR tendem a igualar sua locomoção a animais controle de SLA16. Além do mais, a troca de ninhada demonstrou alteração interessante na pressão arterial dos animais, principalmente machos, que passaram a apresentar níveis pressóricos parecidos aos dos controles de mesma linhagem de suas mães adotivas.

4 CONCLUSÃO GERAL DA TESE

Em conclusão, mostramos que as mães SHR e SLA16 apresentam comportamentos maternos distintos. Mães SHR apresentaram maiores níveis de cuidados relacionados aos filhotes na 1ª reprodução, no entanto a experiência materna acarretou aumento dos períodos relacionados aos cuidados não ligados aos filhotes. Ambas as linhagens apresentaram redução nas frequências de lambidas e amamentação na postura arqueada durante a 2ª reprodução, ao passo que mães SLA16 aumentaram a postura de amamentação não-arqueada nesse período. É nítido que a experiência altera o repertório comportamental das mães entre as reproduções e que esse cenário, principalmente para SLA16, parece interferir nos padrões de locomoção total no campo aberto (CA) dos filhotes de segunda reprodução. Algo no ambiente proporcionado pelas mães nessa fase parece influenciar no surgimento destas características.

Ao realizarmos o paradigma da adoção cruzada, temos um reforço da importância do ambiente materno para o desenvolvimento, ou exacerbação, de padrões observados para as duas linhagens. Uma vez que a troca da linhagem materna aumentou o padrão de locomoção total no CA de SHR, sendo ainda maior em SLA16. Por fim, a troca da linhagem materna também levou ao aumento da pressão arterial em machos SLA16 e reduziu a pressão arterial em machos SHR, valores próximos ao controle. Esses fatores reforçam a ideia de que as características já estabelecidas em nossas linhagens não são resultado apenas do fator genético, mas o ambiente de desenvolvimento pode contribuir para a modulação dessa região cromossômica.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse trabalho foi idealizado e realizado em cenários bastante distintos. Infelizmente no percurso passamos por momentos extremamente complicados para a vida e a ciência brasileira. A pandemia nos trouxe uma série de limitações de deslocamento e psicológicas, deixando marcas que levaremos pra sempre. Somados a isso passamos por um dos momentos de altas taxas de negacionismo científico, descredibilização e desvalorização dos profissionais brasileiros que produzem a ciência, além de uma grande falta de investimento, impossibilitando até mesmo compras de insumos básicos para laboratórios.

Esses fatores acarretaram alterações significativas de algumas ideias iniciais. Apesar disso, acredito que pudemos entregar um trabalho que atendeu ao seu propósito. A ideia principal era caracterizar um momento importante do desenvolvimento nos nossos animais. Ao fazermos isso abrimos uma série de novos questionamentos para os futuros pesquisadores do LGC, com isso saio com senso de dever cumprido. Para trabalhos futuros seguem algumas ideias:

- Avaliar alterações no cuidado materno quando as fêmeas são submetidas ao paradigma da adoção cruzada;
- Avaliar o impacto de F1 híbrida de SHR e SLA16 na resposta dessas mães;
- Estudar os tipos de vocalização emitidas pelos filhotes, afinal o comportamento materno é uma resposta direta as necessidades da ninhada;
- Avaliar a composição do leite de SHR e SLA16 e se isso teria algum impacto nutricional importante;
- Avaliar a possível troca importante de microbiota entre os animais de adoção cruzada;
- Avaliar o efeito da separação materna para o desenvolvimento pós-natal de SHR e SLA16;
- Investigar o papel do receptor de ocitocina nesses animais. Por estar na região diferencial seria interessante dosar a expressão em diferentes regiões cerebrais;
- Investigar a relação do Oxtr com o cuidado materno nas duas linhagens. Identificar possíveis polimorfismos;

- Investigar possíveis relações dessa fase inicial do desenvolvimento pós-natal com algum outro gene importante para o cuidado materno na região diferencial do cromossomo 4.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, F. M. *et al.* Altering Early Life Gut Microbiota Has Long-Term Effect on Immune System and Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Frontiers in physiology**, v. 12, p. 752924, 29 Oct. 2021.

ADNAN, S. *et al.* Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats. **Physiological Genomics**, v. 49, n. 2, p. 96–104, 1 Feb. 2017.

AITMAN, T. J. *et al.* Progress and prospects in rat genetics: a community view. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 516–522, 1 May 2008.

ANSELMINI, M. *et al.* Genetic evidence for chromosome 4 loci influencing learning and memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 131, p. 182–191, May 2016.

BOEDER, A. M. **A relação da microbiota com a pressão arterial e parâmetros comportamentais de duas linhagens isogênicas de ratos**. Master thesis—[s.l.: s.n.].

BREDY, T. W. *et al.* Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. **The European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 2903–2909, Nov. 2003.

BREED, M. D.; MOORE, J. Behavioral Genetics. In: **Animal Behavior**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 67–98.

ÇATLI, G. *et al.* Oxytocin receptor gene polymorphism and low serum oxytocin level are associated with hyperphagia and obesity in adolescents. **International Journal of Obesity**, v. 45, n. 9, p. 2064–2073, Sep. 2021.

CHAMPAGNE, F. *et al.* Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 22, p. 12736–12741, 23 Oct. 2001.

CHAMPAGNE, F. A. *et al.* Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359–371, Aug. 2003.

CHAMPAGNE, F. A. *et al.* Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor-alpha1b promoter and estrogen receptor-alpha expression in the medial preoptic area of female offspring. **Endocrinology**, v. 147, n. 6, p. 2909–2915, Jun. 2006.

CHAMPAGNE, F. A. Epigenetic influence of social experiences across the lifespan. **Developmental Psychobiology**, v. 52, n. 4, p. 299–311, May 2010.

CHEN, F. S. *et al.* Oxytocin receptor (OXTR) polymorphisms and attachment in human infants. **Frontiers in Psychology**, v. 2, p. 200, 25 Aug. 2011.

CIERPIAL, M. A.; SHASBY, D. E.; MCCARTY, R. Patterns of maternal behavior in the spontaneously hypertensive rat. **Physiology & Behavior**, v. 39, n. 5, p. 633–637, 1987.

CIERPIAL, M. A. *et al.* Open-field behavior of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats: effects of reciprocal cross-fostering. **Behavioral and Neural Biology**, v. 51, n. 2, p. 203–210, Mar. 1989.

COSTA, B. *et al.* Oxytocin receptor polymorphisms and adult attachment style in patients with depression. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 10, p. 1506–1514, Nov. 2009.

CURLEY, J. P.; CHAMPAGNE, F. A. Influence of maternal care on the developing brain: Mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 40, p. 52–66, Jan. 2016.

DAFT, J. G. *et al.* Cross-fostering immediately after birth induces a permanent microbiota shift that is shaped by the nursing mother. **Microbiome**, v. 3, p. 17, 25 Apr. 2015.

DE MEDEIROS, G. F. *et al.* Low-anxiety rat phenotypes can be further reduced through genetic intervention. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. e83666, 30 Dec. 2013.

DE MEDEIROS, G. F. *et al.* The long way from complex phenotypes to genes: The story of rat chromosome 4 and its behavioral effects. **World journal of neuroscience**, v. 04, n. 03, p. 203–215, 2014.

ENES-MARQUES, S.; GIUSTI-PAIVA, A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 68, n. 6, p. 789–798, Nov. 2018.

FAHRBACH, S. E.; MORRELL, J. I.; PFAFF, D. W. Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. **Neuroendocrinology**, v. 40, n. 6, p. 526–532, Jun. 1985.

FAHRBACH, S. E.; PFAFF, D. W. Hormonal and neural mechanisms underlying maternal behavior in the rat. In: PFAFF, D. W. (Ed.). . **The physiological mechanisms of motivation**. New York, NY: Springer New York, 1982. p. 253–285.

FARAJI, J. *et al.* Sex-specific stress and biobehavioral responses to human experimenters in rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 965500, 22 Jul. 2022.

FERREIRA, A. *et al.* Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 77, n. 2–3, p. 197–204, Nov. 2002.

FERREIRA, L. M.; FERREIRA, L. R. K. Experimental model: historic and conceptual revision. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. spe, p. 01–03, 2003.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. Experimental models in research. **Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia**, v. 20 Suppl 2, p. 28–34, 4 Nov. 2005.

FLEMING, A. S.; MORGAN, H. D.; WALSH, C. Experiential factors in postpartum regulation of maternal care. In: **Parental care: evolution, mechanisms, and adaptive significance**. Advances in the study of behavior. [s.l.] Elsevier, 1996. v. 25p. 295–332.

FLEMING, A. S.; ROSENBLATT, J. S. Olfactory regulation of maternal behavior in rats. I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 86, n. 2, p. 221–232, Feb. 1974.

FRANCIS, D. *et al.* Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, v. 286, n. 5442, p. 1155–1158, 5 Nov. 1999.

GALLA, S. *et al.* Disparate effects of antibiotics on hypertension. **Physiological Genomics**, v. 50, n. 10, p. 837–845, 1 Oct. 2018.

GANDELMAN, R. *et al.* Care of young under communal conditions in the mouse (*Mus musculus*). **Developmental Psychobiology**, v. 3, n. 4, p. 245–250, 1970.

GIBBS, R. A. *et al.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 493–521, 1 Apr. 2004.

GIOVENARDI, M. *et al.* Neonatal handling increases fear and aggression in lactating rats. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 1–2, p. 209–217, 15 Sep. 2005.

GOMEZ-SERRANO, M. *et al.* Effects of cross fostering on open-field behavior, acoustic startle, lipopolysaccharide-induced corticosterone release, and body weight in Lewis and Fischer rats. **Behavior Genetics**, v. 31, n. 5, p. 427–436, Sep. 2001.

GRANZOTTO, N. *et al.* A IMPORTÂNCIA HISTÓRICA DOS RATOS NO AVANÇO DA COMPREENSÃO DA BIOLOGIA HUMANA. In: **Comportamento animal**. [s.l.] Antonella Carvalho de Oliveira, 2019. p. 1–17.

GRANZOTTO, N. *et al.* Sustained hyperactivity and lower blood pressure are influenced by the ANXRR16 chromosomal region in rats. **Journal of Clinical Case Reports, Medical Images and Health Sciences**, v. 3, n. 2, p. 1–9, 18 Jan. 2023.

GROTA, L. J.; ADER, R. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. **Hormones and Behavior**, v. 5, n. 4, p. 275–282, Dec. 1974.

HALL, C.; BALLACHEY, E. L. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, v. 6, p. 1–12, 1932.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1–5, Aug. 1984.

HANSEN, S.; FERREIRA, A. Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. **Behavioral Neuroscience**, v. 100, n. 1, p. 64–70, Feb. 1986.

HARLOW, H. F. The maternal affectional system of rhesus monkeys. In: RHEINGOLD, H. L. (Ed.). . **Maternal Behavior in Mammals**. New York: John Wiley & Sons, 1963. p. 254–281.

HOLMES, W. G. Parent-offspring recognition in mammals: Approximate and ultimate perspective. In: KRASNEGOR, N. A.; BRIDGES, R. S. (Eds.). . **Mammalian Parenting: Biochemical, Neurobiological, and Behavioral Determinants**. New York: Oxford University Press, 1990. p. 441–460.

HOWELLS, F. M.; BINDEWALD, L.; RUSSELL, V. A. Cross-fostering does not alter the neurochemistry or behavior of spontaneously hypertensive rats. **Behavioral and Brain Functions**, v. 5, p. 24, 23 Jun. 2009.

IMHOF, J. T. *et al.* Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural Brain Research**, v. 56, n. 2, p. 177–180, 30 Sep. 1993.

INSEL, T. R.; WINSLOW, J. T. Serotonin and neuropeptides in affiliative behaviors. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 3, p. 207–219, 1 Aug. 1998.

IZÍDIO, G. S. *et al.* Common variations in the pretest environment influence genotypic comparisons in models of anxiety. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 4, n. 7, p. 412–419, Oct. 2005.

JACOB, H. J. Functional genomics and rat models. **Genome Research**, v. 9, n. 11, p. 1013–1016, Nov. 1999.

KAN, J. M.; CALLAGHAN, B. L.; RICHARDSON, R. A mother's past can predict her offspring's future: Previous maternal separation leads to the early emergence of adult-like fear behavior in subsequent male infant rat offspring. **Behavioral Neuroscience**, v. 130, n. 5, p. 511–520, Oct. 2016.

KIM, S.; STRATHEARN, L. Oxytocin and maternal brain plasticity. **New directions for child and adolescent development**, v. 2016, n. 153, p. 59–72, Sep. 2016.

KIM, Y.-R. *et al.* Association between the oxytocin receptor gene polymorphism (rs53576) and bulimia nervosa. **European Eating Disorders Review**, v. 23, n. 3, p. 171–178, May 2015.

LAUBY, S. C. *et al.* The role of interindividual licking received and dopamine genotype on later-life licking provisioning in female rat offspring. **Brain and behavior**, v. 11, n. 4, p. e02069, Apr. 2021.

LIU, D. *et al.* Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1659–1662, 12 Sep. 1997.

LOHMILLER, J. J.; SWING, S. P. Reproduction and Breeding. In: **The Laboratory Rat**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 147–164.

MAJDAK, P. *et al.* The impact of maternal neglect on genetic hyperactivity. **Behavioural Brain Research**, v. 313, p. 282–292, 15 Oct. 2016.

MAYER, A. D.; AHDIEH, H. B.; ROSENBLATT, J. S. Effects of prolonged estrogen-progesterone treatment and hypophysectomy on the stimulation of short-latency maternal behavior and aggression in female rats. **Hormones and Behavior**, v. 24, n. 2, p. 152–173, Jun. 1990.

MCCARTY, R.; FIELDS-OKOTCHA, C. Timing of preweanling maternal effects on development of hypertension in SHR rats. **Physiology & Behavior**, v. 55, n. 5, p. 839–844, May 1994.

MCCARTY, R. Cross-fostering: Elucidating the effects of gene×environment interactions on phenotypic development. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 73, p. 219–254, Feb. 2017.

MEYZA, K. Z.; KNAPSKA, E. Why mother rats protect their children. **eLife**, v. 6, 13 Jun. 2017.

MONTAG, C. *et al.* Oxytocin and oxytocin receptor gene polymorphisms and risk for schizophrenia: a case-control study. **The World Journal of Biological Psychiatry**, v. 14, n. 7, p. 500–508, Sep. 2013.

MORICEAU, S.; SULLIVAN, R. M. Neurobiology of infant attachment. **Developmental Psychobiology**, v. 47, n. 3, p. 230–242, Nov. 2005.

MORMÈDE, P. *et al.* Marker-assisted selection of a neuro-behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 1, n. 2, p. 111–116, May 2002.

MYERS, M. M. *et al.* Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. **Developmental Psychobiology**, v. 22, n. 1, p. 29–53, Jan. 1989a.

MYERS, M. M. *et al.* Relationships between maternal behavior of SHR and WKY dams and adult blood pressures of cross-fostered F1 pups. **Developmental Psychobiology**, v. 22, n. 1, p. 55–67, Jan. 1989b.

NAH, W. H.; PARK, M. J.; GYE, M. C. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. **Clinical and experimental reproductive medicine**, v. 38, n. 2, p. 75–81, 30 Jun. 2011.

NUMAN, M.; INSEL, T. R. **The Neurobiology of Parental Behavior (Hormones, Brain, and Behavior, 1)**. 2003rd edition ed. New York: Springer, 2003. v. 1p. 470

NUMAN, M.; SHEEHAN, T. P. Neuroanatomical circuitry for mammalian maternal behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 807, p. 101–125, 15 Jan. 1997.

NUMAN, M. The physiology of reproduction. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Eds.). **Maternal behavior**. 2nd. ed. New York: Raven Press: [s.n.]. p. 221–302.

OGAWA, T. *et al.* Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 49, n. 4, p. 961–967, Dec. 1994.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, p. 282–293, Mar. 1963.

OKAMOTO, K. *et al.* Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 30, n. 6, p. 703–716, Jun. 1966.

OLEJNÍKOVÁ, L. *et al.* Circadian alignment in a foster mother improves the offspring's pathological phenotype. **The Journal of Physiology**, v. 596, n. 23, p. 5757–5775, Dec. 2018.

ORSO, R. *et al.* How early life stress impact maternal care: A systematic review of rodent studies. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 13, p. 197, 28 Aug. 2019.

PAUK, J. *et al.* Positive effects of tactile versus kinesthetic or vestibular stimulation on neuroendocrine and ODC activity in maternally-deprived rat pups. **Life Sciences**, v. 39, n. 22, p. 2081–2087, 1 Dec. 1986.

PEDERSEN, C. A.; BOCCIA, M. L. Oxytocin links mothering received, mothering bestowed and adult stress responses. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 5, n. 4, p. 269–276, Dec. 2002.

PEDERSEN, C. A.; PRANGE, A. J. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 12, p. 6661–6665, Dec. 1979.

PEDERSEN, C. A. *et al.* Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. **Science**, v. 216, n. 4546, p. 648–650, 7 May 1982.

PEDERSEN, C. A. *et al.* Oxytocin antiserum delays onset of ovarian steroid-induced maternal behavior. **Neuropeptides**, v. 6, n. 2, p. 175–182, Apr. 1985.

PEDERSEN, C. A. *et al.* Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, n. 6, p. 1163–1171, Dec. 1994.

PEDERSEN, C. A. Oxytocin control of maternal behavior. Regulation by sex steroids and offspring stimuli. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 807, p. 126–145, 15 Jan. 1997.

PINTO, W. B. V. DE R. *et al.* Teste de labirinto em cruz elevado: aplicações e contribuições no estudo de doenças neuropsiquiátricas em modelos animais. **Periódicos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 1, n. 1, p. 102–120, 2012.

PODRATZ, P. L. *et al.* Accumulation of organotins in seafood leads to reproductive tract abnormalities in female rats. **Reproductive Toxicology**, v. 57, p. 29–42, Nov. 2015.

PRYCE, C. R.; BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 38, n. 4, p. 239–251, May 2001.

RAMOS, A. *et al.* A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 57–69, Apr. 1997.

RAMOS, A. *et al.* Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. **Molecular Psychiatry**, v. 4, n. 5, p. 453–462, Sep. 1999.

RAMOS, A. *et al.* Hunting for genes underlying emotionality in the laboratory rat: maps, tools and traps. **Current neuropharmacology**, 1 Sep. 2022.

RAYMUNDO, M. M.; GOLDIM, J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Revista Bioética**, v. 10, n. 1, p. 31–44, 2002.

RICHTER, C. P. The effects of domestication and selection on the behavior of the Norway rat. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 15, n. 3, p. 727–738, Dec. 1954.

RICKENBACHER, E. *et al.* Freezing suppression by oxytocin in central amygdala allows alternate defensive behaviours and mother-pup interactions. **eLife**, v. 6, 13 Jun. 2017.

ROBINSON, K. J. *et al.* Maternal Oxytocin Is Linked to Close Mother-Infant Proximity in Grey Seals (*Halichoerus grypus*). **Plos One**, v. 10, n. 12, p. e0144577, 23 Dec. 2015.

ROSENBLATT, J. S. Hormonal and nonhormonal regulation of maternal behavior: a theoretical survey. **Reproduction, nutrition, development**, v. 20, n. 3B, p. 791–800, 1980.

ROSENBLATT, J. S. Olfaction mediated developmental transition in the altricial newborn of selected species of mammals. **Developmental Psychobiology**, v. 16, n. 5, p. 347–375, Sep. 1983.

ROSENBLATT, J. S. Psychobiology of maternal behavior: contribution to the clinical understanding of maternal behavior among humans. **Acta Paediatrica. Supplement**, v. 397, p. 3–8, Jun. 1994.

SAGVOLDEN, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 31–39, Jan. 2000.

SAGVOLDEN, T. *et al.* Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1239–1247, 1 Jun. 2005.

SCHELSTRAETE, I. *et al.* Maternal behaviour in the Wistar rat under atypical Zeitgeber. **Physiology & Behavior**, v. 52, n. 1, p. 189–193, Jul. 1992.

SIVIY, S. M. *et al.* Effects of cross-fostering on play and anxiety in juvenile Fischer 344 and Lewis rats. **Physiology & Behavior**, v. 169, p. 147–154, 1 Feb. 2017.

SMITH, J. R. *et al.* **The Year of the Rat: The Rat Genome Database at 20: a multi-species knowledgebase and analysis platform**. Disponível em: <<https://rgd.mcw.edu/>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

SMITH, J. R. *et al.* The Year of the Rat: The Rat Genome Database at 20: a multi-species knowledgebase and analysis platform. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D731–D742, 8 Jan. 2020.

STERN, J. M.; LONSTEIN, J. S. Nursing behavior in rats is impaired in a small nestbox and with hyperthermic pups. **Developmental Psychobiology**, v. 29, n. 2, p. 101–122, Mar. 1996.

STERN, J. M.; YU, Y. L.; CROCKETT, D. P. Dorsolateral columns of the spinal cord are necessary for both suckling-induced neuroendocrine reflexes and the kyphotic nursing posture in lactating rats. **Brain Research**, v. 947, n. 1, p. 110–121, 23 Aug. 2002.

STERN, J. M. Somatosensation and maternal care in norway rats. In: **Parental care: evolution, mechanisms, and adaptive significance**. Advances in the study of behavior. [s.l.] Elsevier, 1996. v. 25p. 243–294.

TURNER, B. M. (ED.). **Chromatin and gene regulation**. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, 2001.

VAN DER VEEN, R. *et al.* Impact of intra- and interstrain cross-fostering on mouse maternal care. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 7, n. 2, p. 184–192, Mar. 2008.

VAN VUGT, R. W. M. *et al.* Maternal care affects the phenotype of a rat model for schizophrenia. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, p. 268, 11 Aug. 2014.

WEAVER, I. C. G. *et al.* Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847–854, Aug. 2004.

YAMAMURO, Y. Maternal environment alters social interactive traits but not open-field behavior in Fischer 344 rats. **Experimental Animals**, v. 57, n. 5, p. 439–446, Oct. 2008.

YAMASAKI, K. *et al.* Preputial separation and glans penis changes in normal growing Crj: CD (SD) IGS rats. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 533–536, Sep. 2001.

YANG, T. *et al.* Gut dysbiosis is linked to hypertension. **Hypertension**, v. 65, n. 6, p. 1331–1340, Jun. 2015.

APÊNDICE 1

Apêndice 1: Organização e identificação das fêmeas utilizadas como matrizes, avaliação das primeiras e segundas proles ao longo dos experimentos do cuidado materno.

Grupo experimental	Linhagem	Mães		Avaliação da prole	
		Geração	Animal	1ª Prole	2ª Prole
1º	SHR	G51	SHR1	Peso, separação prepucial, abertura vaginal e 1º estro CA e LCE	CA e LCE
			SHR2	Peso, separação prepucial, abertura vaginal e 1º estro CA e LCE	CA e LCE
			SHR3	CA e LCE	CA e LCE
			SHR4	CA e LCE	CA e LCE
	SLA16	N10F27	SLA1	Peso, separação prepucial, abertura vaginal e 1º estro CA e LCE	CA e LCE
			SLA2	Peso, separação prepucial, abertura vaginal e 1º estro CA e LCE	CA e LCE
			SLA3	CA e LCE	CA e LCE
			SLA4	Filhotes não sobreviveram após o 3º dia	Matriz não passou pela segunda reprodução
2º	SHR	G52	SHR5	CA e LCE	Devido aos primeiros meses de pandemia e protocolos de segurança adotados pelo LGC e UFSC, a experimentação dos animais desse grupo foi interrompida, não sendo possível realizar a segunda reprodução dessas matrizes.
			SHR6	Não nasceram	
			SHR7	Filhotes não sobreviveram após o 3º dia	
			SHR8	Filhotes não sobreviveram após o 2º dia	
	SLA16	N10F28	SLA1	CA e LCE	
			SLA2	CA e LCE	

			SLA3	CA e LCE	
			SLA4	CA e LCE	
3°	SHR	G52	SHR5	CA e LCE	CA e LCE
			SHR6	CA e LCE	CA e LCE
			SHR7	Filhotes não sobreviveram após o 3° dia	Matriz não passou pela segunda reprodução
			SHR8	CA e LCE	CA e LCE
	SLA16	N10F29	SLA5	CA e LCE	CA e LCE
			SLA6	CA e LCE	CA e LCE
			SLA7	CA e LCE	CA e LCE
			SLA8	CA e LCE	CA e LCE

Abreviações: SLA16 - SHR.LEW-(D4Rat76 – D4Mgh11); SHR - *Spontaneously Hypertensive Rats*; G_ e N10F_ - denominação das gerações me cada linhagem; CA – teste do campo aberto; LCE – teste do labirinto em cruz elevado; LGC – Laboratório de Genética do Comportamento; UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

APÊNDICE 2



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do cuidado materno sobre as diferenças comportamentais de ratos SHR e SLA16", protocolada sob o CEUA nº 5863250220 (ID 001670), sob a responsabilidade de **Geison de Souza Izidio** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 17/07/2020.

We certify that the proposal "Effects of maternal care on behavioral differences in SHR and SLA16 rats", utilizing 352 Isogenic rats (males and females), protocol number CEUA 5863250220 (ID 001670), under the responsibility of **Geison de Souza Izidio** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 07/17/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 04/2020 a 06/2022

Área: **Beg (Biologia Celular, Embriologia E Genética)**

Origem: **CCB - Biotério do Laboratório de Genética do Comportamento**

Espécie: **Ratos isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **3 a 7 meses**

N: **176**

Linhagem: **SHR**

Peso: **180 a 250 g**

Origem: **CCB - Biotério do Laboratório de Genética do Comportamento**

Espécie: **Ratos isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **3 a 7 meses**

N: **176**

Linhagem: **SLA 16**

Peso: **180 a 250 g**

Local do experimento: **Laboratório de Genética do Comportamento**

Florianópolis, 22 de julho de 2020

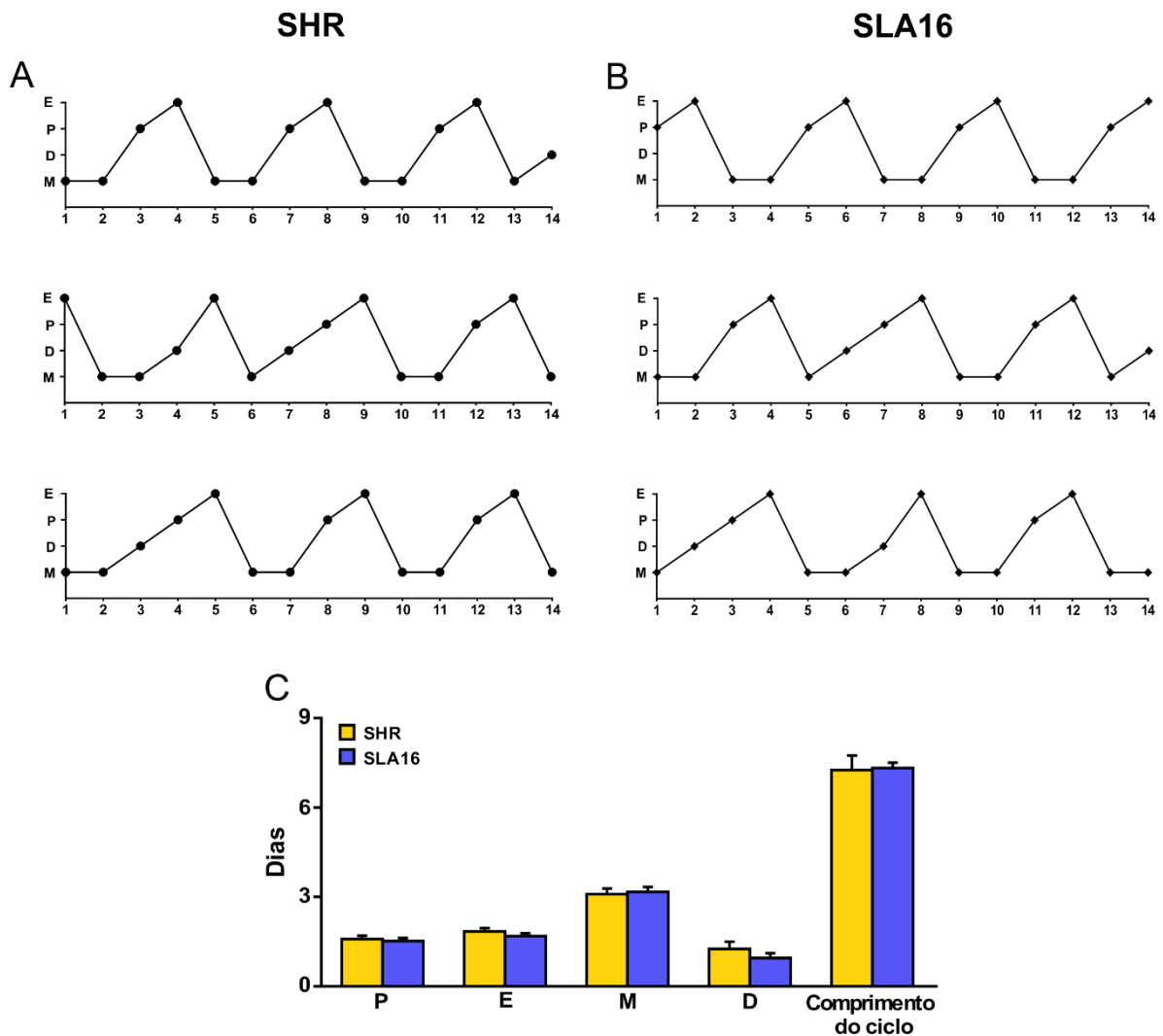
Prof. Dr. Maurício Laterça Martins

Maurício Laterça Martins

Presidente pro tempore da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

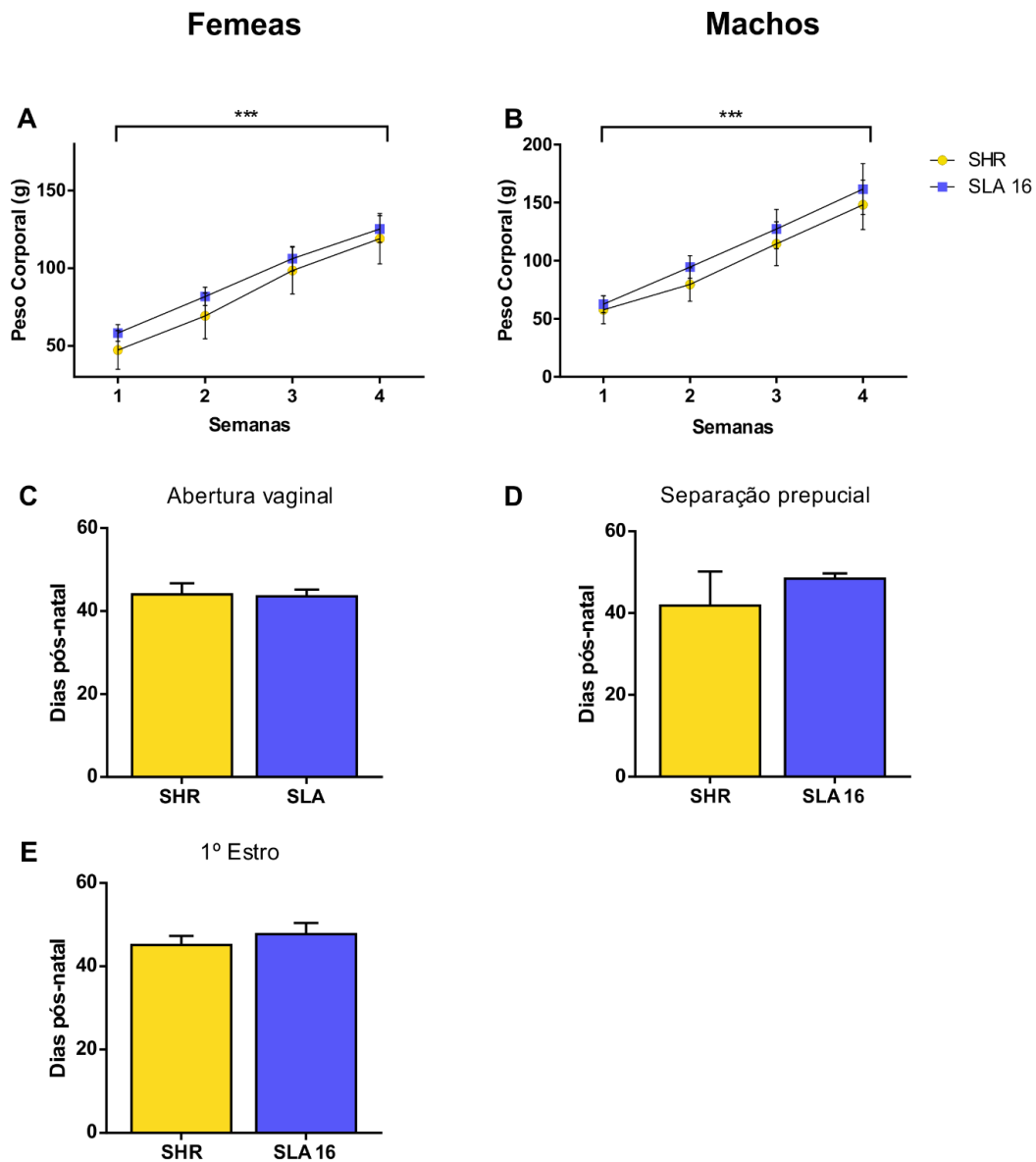
APÊNDICE 3



Apêndice 3. Avaliação do ciclo estral de ratas SHR e SLA16. (A) Gráficos de ciclo individuais de ratas SHR fase/dia. (B) Gráficos de ciclo individuais de ratas SLA16 fase/dia. (C) Média das fases e comprimento total do ciclo estral. P: proestro. E: estro. M: metaestro. D: diestro. *Test t Student*. Dados representados por média \pm EPM (n = 12 animais por linhagem).

A análise do ciclo estral demonstrou que as fêmeas estavam ciclando corretamente antes de serem colocadas para acasalar. Além disso, não observamos diferenças nos padrões de ciclicidade entre as linhagens.

APÊNDICE 4



Apêndice 4. Acompanhamento do desenvolvimento da ninhada após o desmame. (A) Acompanhamento do peso das fêmeas ao longo de 4 semanas. (B) Acompanhamento do peso dos machos ao longo de 4 semanas. (C) Média de dias para a abertura vaginal das fêmeas. (D) Média de dias para a separação prepucial dos machos. (E) Média de dias para o aparecimento do primeiro estro das fêmeas. ***: $p < 0,001$. *Test t Student*. Dados representados por média \pm EPM ($n = 8$ animais por sexo e linhagem).

O acompanhamento dos filhotes não demonstrou diferenças significativas entre as duas linhagens. Foi possível observar apenas um aumento de peso de machos e fêmeas, já esperado para esse período de desenvolvimento.