

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**  
**VICE REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA  
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**O ESTRESSE MATERNO INDUZ NA PROLE DE RATOS JOVENS  
COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVO-ANSIOSO E RESILIENCIA AO  
ESTRESSE: IMPLICAÇÕES DA LIMITAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO NINHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, como requisito para obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação da Profa. Dra. Maria Martha Bernardi.

**TIBERIADE MENDES LIMA**

**SÃO PAULO**

**2020**

**UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP**  
**VICE REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA  
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**O ESTRESSE MATERNO INDUZ NA PROLE DE RATOS JOVENS  
COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVO-ANSIOSO E RESILIENCIA AO  
ESTRESSE: IMPLICAÇÕES DA LIMITAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO NINHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, como requisito para obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

**Área de concentração:**

Patologia Ambiental e Experimental

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

**TIBERIADE MENDES LIMA**

SÃO PAULO

2020

Lima, Tiberiade Mendes.

O estresse materno induz na prole de ratos jovens comportamentos tipo-depressivo-ansioso e resiliência ao estresse: implicações da limitação das condições do ninho / Tiberiade Mendes Lima. - 2020.

86 f. : il. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Comportamento maternal:



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

## CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada "ALTERAÇÃO NO AMBIENTE MATERNAL EM RATOS TRATADOS OU NÃO COM OCTOCINA: ESTUDOS COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E MORFOLÓGICOS NA ADOLESCÊNCIA", registrada com o nº 002/18, sob-responsabilidade de MARIA MARTHA BERNARDI, TIBERIADE MENDES LIMA e BEATRIZ ESPADOTO que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal ( CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animais

(CEUA) da UNIP, em reunião de 19/03/2018.

Finalidade	Ensino ()	Pesquisa Científica (x)
Vigência de autorização		01/03/2018 A 01/09/2019
Espécie / linhagem/ raça		RATO ISOGÊNICO
Nº de animais		190
Peso / idade		ADULTOS – JOVENS
Sexo		FEMININO / MASCULINO
Origem		BIOTÉRIO UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

A handwritten signature in cursive ink, reading "Juliana Guizi".

Juliana Guizi

Secretaria da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Universidade Paulista – UNIP

---

Campus: INDIANÓPOLIS

Rua: Doutor Bacelar, 1212 – Vila Clementino – São Paulo – SP – CEP: 04026-000

Fone: (11) 5586-4091 – Fax: (11) 5586-4073

E-mail: [ceua@unip.br](mailto:ceua@unip.br) – <http://www.unip.br>



Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

## TIBERIADE MENDES LIMA

### O ESTRESSE MATERNO INDUZ NA PROLE DE RATOS JOVENS COMPORTAMENTOS TIPO-DEPRESSIVO-ANSIOSO E RESILIENCIA AO ESTRESSE: IMPLICAÇÕES DA LIMITAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO NINHO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP, como requisito para obtenção do título de Doutor em Patologia Ambiental e Experimental.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

Data de aprovação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

#### Banca Examinadora

**Profa. Dra. Cideli de Paula Coelho**

Instituição: Universidade de Santo Amaro      Julgamento \_\_\_\_\_

**Profa. Dra. Esther Lopes Ricci Adari Camargo**

Instituição: Universidade Presbiterina Mackenzie      Julgamento \_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha**

Instituição: Universidade Paulista      Julgamento \_\_\_\_\_

**Profa. Dra. Ivana Barbosa Suffredini**

Instituição: Universidade Paulista      Julgamento: \_\_\_\_\_

**Profa. Dra. Maria Martha Bernardi**

Instituição: Universidade Paulista      Julgamento: \_\_\_\_\_

## RESUMO

Mendes-Lima, 2020. **O estresse materno induz na prole de ratos jovens comportamentos tipo-depressivo-ansioso e resiliência ao estresse: implicações da limitação das condições do ninho.** 86 f.. Orientação: Prof. Dra. Maria Martha Bernardi, Doutorado (Patologia Ambiental e Experimental) Universidade Paulista, São Paulo, 2020.

A diminuição ou ausência do cuidado materno é denominada negligência materna, que pode ser entendida como uma situação de constante omissão para com a criança ou adolescente que coloque em risco seu desenvolvimento. O objetivo deste trabalho foi analisar em um modelo animal de negligência materna, a limitação das condições do ninho de ratas (LCN) na lactação, no desenvolvimento, comportamento e níveis de corticosterona da prole masculina de ratas observadas na idade juvenil. Também foram investigados o desempenho reprodutivo das fêmeas e a sobrevida da prole, bem como o comportamento maternal e níveis de corticosterona. Na prole, observou-se o desenvolvimento físico, reflexológico e ponderal. Entre os dias 30-31 de vida, a prole masculina das ratas foi observada quanto à atividade geral em campo aberto, nos testes de transição em caixa-claro-escuro, natação forçada e comportamento social na infância. Após estas avaliações, os níveis de corticosterona sérica da prole foram também dosados. Os resultados mostraram que em relação ao grupo controle: 1) as fêmeas lactantes submetidas à LCN apresentaram melhores escores de qualidade do ninho, nenhuma modificação no comportamento maternal voltado aos filhotes, porém aumento no *grooming* e dos níveis séricos de corticosterona. Ainda foi verificada menor porcentagem de sobrevivência da prole exposta à LCN; 2) a prole submetida à LCN apresentou prejuízos no desenvolvimento físico e de reflexos, com adiantamento do dia de erupção dos dentes incisivos e do dia de endireitamento postura, atraso no desenvolvimento de pelos, no dia de descida dos testículos e do reflexo de preensão palmar; 3) aos 31 dias de idade, a prole exposta à LCN apresentou menor peso corporal, comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressivo e redução dos níveis séricos de corticosterona. A LCN não modificou a atividade geral observada em campo aberto e o comportamento social desta prole. Os resultados sugerem que a LCN promova o estresse materno, causando prejuízos na programação perinatal do desenvolvimento da prole e, em período precoce da vida desta prole, aumento de comportamento tipo-ansiedade e de comportamento tipo-depressivo e resiliência ao estresse.

Palavras-chave: ratos; comportamento maternal; desenvolvimento da prole; comportamento animal; idade juvenil.

## ABSTRACT

Mendes-Lima, 2020. **Maternal stress model induces in juvenile rats depressive-anxious behaviors and resilience to stress: implications of limiting nest conditions.** 86 f. Supervisor: Prof. Dra. Maria Martha Bernardi, PhD (Environmental and Experimental Pathology) Paulista University, São Paulo, 2020

The decrease or absence of maternal care is called maternal neglect, which can be understood as a situation of constant omission towards the child or adolescent that puts their development at risk. The objective of this work was to analyze, in an animal model of maternal neglect, the limitation of the nest conditions of rats (LCN) in lactation, development, behavior and corticosterone levels of male offspring of rats observed in juvenile age. The maternal reproductive performance, the offspring survival as well as the maternal behavior and the corticosterone levels investigated. In the offspring, the physical, reflexological and ponderal development was observed. Between 30-31 days of life, the male offspring of the rats were evaluated for the general activity in the open field, in the transition in light-dark box, forced swimming and social behavior tests. After these evaluations, the corticosterone serum levels in the offspring were measured. Relative to the control group the results showed that: 1) lactating females submitted to LCN had better nest quality scores, no changes in maternal behavior towards the young, but an increase in grooming and serum levels of corticosterone. There was still a lower percentage of survival of offspring exposed to LCN; 2) the offspring subjected to LCN showed impairments in physical development and reflexes with advanced in the day of the incisor teeth eruption and in the day of posture straightening as well as a delay in the development of hair, on the day of descent of the testicles and in the hand grip reflex; 3) at 31 days of age, the offspring exposed to LCN showed lower body weight, anxiety-like and depressive-like behaviors and reduced serum corticosterone levels. LCN did not modify the general activity observed in the open field and the social behavior of this offspring. Thus, it is proposed that the LCN promoted maternal stress, which produced losses in the perinatal programming of the development of the offspring and, in the early period of this offspring's life, an increase in type-anxiety and type-depressive behavior and resilience to stress.

Keywords: rats; maternal behavior; offspring development; animal behavior; juvenile age.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
1.1 Comportamento maternal .....	10
1.2 Estresse maternal .....	14
1.3 Sobre a negligencia materna .....	20
1.4 Modelo de limitação das condições do ninho.....	22
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos .....	24
<b>3 MATERIAL E METODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Animais .....	25
3.2 Delineamento Experimental.....	25
3.3 Procedimentos.....	26
3.3.1 Estudos Maternos.....	26
3.3.1.1 Qualidade do ninho e sobrevivência daprole .....	26
3.3.1.2 Comportamento maternal.....	27
3.3.1.3 Atividade geral em campo aberto .....	27
3.3.2 Estudos da prole.....	28
3.3.2.1 Desenvolvimento Fisico .....	28
3.3.2.2 Desenvolvimento Reflexológico.....	29
3.3.2.3 Atividade geral em campo aberto .....	29
3.3.2.4 Comportamento social .....	30
3.3.2.5 Teste de transição na caixa claro/escuro .....	31
3.3.2.6 Teste de natação forçada (teste de Porsolt) .....	31
3.3.3 Avaliação dos níveis de corticosterona séricos maternos e da sua prole .....	32
3.3.4 Analise estatistica.....	32
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 Estudos maternos .....	34
4.2 Estudos com a prole .....	40

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>59</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Comportamento maternal

O comportamento parental visa cuidar de jovens da mesma espécie com o objetivo de aumentar a probabilidade de sua sobrevivência. Entre ovíparos, a paternidade pode incluir comportamentos como seleção de locais para postura de construir, escavar, cuidar de ovos, chocar e carregar os filhotes; entre animais vivíparos, pode incluir aprovisionamento de alimentos, amamentação, defesa dos filhos e até ensino de habilidades. A paternidade ocorre em uma grande variedade de vertebrados e invertebrados, incluindo insetos, aracnídeos, moluscos, peixes, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos. Em mamíferos, as mães geralmente assumem a responsabilidade primária do cuidado da prole, enquanto os pais, na maior parte das vezes, ignoram ou até atacam os jovens (1).

Assim, o comportamento materno se enquadra na categoria de comportamento parental, que é definido como qualquer comportamento de um membro de uma espécie em relação a um membro reprodutivamente imaturo para garantir que esse membro sobreviva até a maturidade.(2).

Vários livros foram escritos sobre a sociobiologia e a evolução do comportamento materno. Esses comportamentos foram investigados em roedores, pela primeira vez, por Sturman-Hulbe (3), que publicou trabalhos sobre comportamento materno em ratos albinos. Outro exemplo trabalho clássico nesse campo é o de Wiesner e Sheard em 1933 (4), que mostraram que o início da resposta materna é sincronizado com o nascimento dos jovens; no parto, verificou-se que a mãe cuidava de seu próprio filho ou de adotivos, enquanto fêmeas nulíparas grávidas não apresentaram resposta materna em relação à adoção de jovens. Estes autores, então, sugeriram que “algumas mudanças internas ocorrem nos organismos na gravidez ou em parturientes que despertam os impulsos maternos” Leblond e Nelson (5) e Leblond (6) (7) mostraram que filhotes jovens de ratos e camundongos podem induzir comportamento materno em fêmeas hipofisectomizadas, e aventaram que um mecanismo nervoso parece

ser um fator essencial do instinto materno o qual seria controlado por fatores hormonais após o parto.

Mais recentemente, Rosenblatt e seus colaboradores (8) sugeriram que, em ratos, embora o início do comportamento materno no parto seja mediado hormonalmente, sua manutenção durante o período pós-parto não é hormonal. Neste sentido, Leblond e Nelson (5) observaram que camundongos lactantes hipofisectomizados apresentavam comportamento materno, embora a lactação tivesse cessado. Finalmente, Beach et al. (9) mostraram que o comportamento materno no rato estava sob controle multissensorial e que a fêmea reagiria a muitos estímulos oriundos dos filhotes.

Mães mamíferas não humanas geralmente apresentam um conjunto estereotipado de respostas comportamentais em direção aos seus recém-nascidos. Elas exibem maneiras específicas de transporte, alimentação e cuidado de seus filhotes e os protegem de predadores e outros perigos. Esses comportamentos promovem resiliência fisiológica e imunológica, maturação e desenvolvimento social e emocional típico das espécies dos jovens (10).

O comportamento maternal é um comportamento complexo que envolve (a) a detecção e o processamento de pistas dos filhos, (b) a regulação da motivação da mãe de acordo com o sexo, (c) o estado fisiológico e o ambiente do indivíduo e, finalmente, (d) a execução de comportamentos maternos específicos, como construir ninhos, recuperar, cuidar e agrupar sua prole (11).

Teodorov et al (12) descreveram as diversas etapas e parâmetros comportamentais do comportamento maternal de um roedor. Assim, os roedores nascem imaturos, essencialmente imóveis e incapazes de regular sua temperatura ao nascimento; os jovens são mantidos em um ninho que a mãe constrói antes de parto para isolá-los e para proteger os jovens de possíveis predadores durante sua ausência (por exemplo, quando ela está à procura de alimento). Quando intrusos aproximam-se do ninho, a mãe reage com agressividade, apresentando o comportamento maternal agressivo (13). Esse comportamento é importante para a prevenção do infanticídio por um indivíduo não familiar e é modulado pelo estímulo de sucção dos filhotes durante a lactação (14).

A estimulação materna, como manuseio e lambida anogenital, tem como função primordial o estímulo da micção e defecação. O fato de que é direcionada mais para machos do que fêmeas de uma ninhada. MCCARTHY et al., 1997 (16) sugere que as diferenças nesse comportamento poderiam contribuir para o desenvolvimento de diferenças no comportamento sexual masculino na idade adulta. Além disso, quando a mãe está no ninho, ela aquece os filhotes e expõe sua região mamária para amamentá-los. Se um dos filhotes for deslocado do ninho, a mãe o carrega na boca de volta ao ninho (comportamento de recuperação). Assim, o transporte de jovens, proteção do comportamento jovem, cuidados e de construção de ninhos podem ser facilmente entendidos como importantes para a sobrevivência dos filhotes (10).

Muitos estudos focam o papel da estimulação auditiva e olfativa da prole em influenciar as respostas maternas. Em ratos, as vocalizações ultrassônicas de filhotes têm a função de manter alta capacidade de resposta materna e ocorrem quando os filhotes estão fora do ninho, ou quando a temperatura do corpo diminui níveis(17). Essas vocalizações ultrassônicas resultam em atenção materna e são uma estratégia eficiente para manter importantes respostas maternas, em especial a de lamber a região anogenital (18).

Outros comportamentos associados ao estado materno são indiretamente relacionados à sobrevivência infantil. Por exemplo, ratas prenhas alteram seu padrão de *grooming* por aumento da lambida de sua região mamária; isso foi considerado importante para desenvolvimento da glândula mamária (19) (20). Nesse sentido, a experiência reprodutiva aumenta o *grooming* mamário de fêmeas lactantes (20). Além disso, as fêmeas em lactação são hiperfágicas, e mostram aumento do apetite por sal (21) e placentofagia (22).

A mãe tem um físico limitado em termos da capacidade de nutrir seus filhotes. Assim, uma vez que o número de filhotes exceda o nível físico limite da mãe, ela reduz o tamanho de sua ninhada ao rejeitar os fracos ou doentes via infanticídio seletivo. O infanticídio também está relacionado à inexperiência materna, escassez de alimentos durante a prenhe, agentes tóxicos (23), teratogênese (24) e estresse pré-natal (25).

O desenvolvimento da capacidade de expressar e modificar padrões de comportamento materno na idade adulta pode depender de mecanismos que foram ativados e, posteriormente, sintonizados pelas primeiras experiências (26) (27). A interação entre o recém-nascido e a mãe bilateralmente altera mecanismos básicos de expressão comportamental. Foi demonstrado que fêmeas adultas virgens apresentam comportamento materno quando são expostas a jovens adotivos por 5 a 6 dias consecutivos. Essas ratas nulíparas amamentam, recuperam filhotes adotivos para o ninho, agrupam esses filhotes e ficam sobre eles para fornecer uma fonte de calor e proteção (28).

O grau de desenvolvimento do filhote no nascimento influencia vários padrões de cuidados maternos entre mamíferos de maneiras crucial. Inicialmente, a mãe está em constante contato com seus filhotes que se apegam a ela para o transporte. À medida que os jovens avançam na idade, tornam-se mais independentes e esse fato coincide com a redução da capacidade de resposta materna; ambos esses processos permitem que o desmame ocorra (29).

As mudanças não comportamentais na fisiologia materna também afetam muito o sucesso e a natureza do comportamento materno. A capacidade de realizar um comportamento materno adequado é não apenas condicionada por fatores genéticos ou puramente fisiológicos associados ao parto, mas também depende das experiências individuais do sujeito (30) (20).

Ao final da gravidez, caracterizada por um período mais longo de níveis elevados de estrógeno e progesterona, o padrão de secreção hormonal é modificado. As fêmeas são especialmente sensíveis aos estrógenos durante a gravidez e lactação. Em particular, a expressão do comportamento materno durante a gravidez e nas primeiras horas após o parto depende do estradiol, que ativa os receptores de estrógeno de áreas neurais, como o hipotálamo, os quais estão criticamente envolvidos no comportamento materno. Cerca de 30 horas antes do parto, níveis circulantes de progesterona diminuem e os de estradiol aumentam rapidamente com aumento ligeiro daqueles de prolactina. Durante a transição gravidez / lactação, há uma soma entre os efeitos da estimulação do estradiol, que dá origem ao comportamento materno, e os provenientes da

estimulação de filhotes, que mantêm esse comportamento; durante a lactação (31) (12).

O cuidado materno envolve um conjunto de fatores neurais, moleculares e endócrinos, que vem se mantendo ao longo da evolução, garantindo assim as condições adequadas para a sobrevivência e perpetuação da espécie. Sob o ponto de vista da prole, o cuidado materno abrange também o ensinamento de aspectos ligados ao ambiente que permite ao filhote garantir sua sobrevivência (12). Em mamíferos, os filhotes são totalmente dependentes dos cuidados maternos até a fase que possam buscar alimento, manter a temperatura corporal e abrigo, bem como dependem do aprendizado dos ensinamentos básicos para sobrevivência oriundos da mãe durante a amamentação (32).

Ameaças à homeostase podem ocorrer muito precocemente na vida de um indivíduo, incluindo o período intraútero, e são capazes de alterar diversos aspectos do sujeito de forma duradoura ao longo de sua vida. Estas alterações na homeostase podem ser induzidas pelo estresse materno.

## 1.2 Estresse maternal

Desde o início da vida na Terra, os organismos necessitaram desenvolver estratégias eficientes para lidar com mudanças repentinas e mesmo permanentes do meio ambiente, sendo este o objetivo primordial dos organismos a fim de garantir sua sobrevivência e, assim, perpetuar as espécies. Neste sentido, a evolução selecionou células e organismos com mecanismos adaptativos, denominado “homeostase”, os quais procuram manter a condição interna dentro de limites toleráveis frente às mudanças em seu ambiente. Desta forma, em uma interação dinâmica permanente com o meio ambiente, os metazoários ajustam continuamente sua fisiologia a essas condições. Independentemente da complexidade do organismo, tais modificações constantes requerem um alto nível de plasticidade promovido por meio de diversos ajustes dinâmicos de equilíbrio que são controlados por mecanismos de regulação fortemente inter-relacionados (33)(34).

Assim, a sobrevivência dos indivíduos depende de um repertório aparentemente interminável de respostas neurais (35), endócrinas (36) e imunológicas(37), que lhes permite lidar com distúrbios físicos, químicos e biológicos. Durante essas mudanças adaptativas fisiológicas e/ou comportamentais, há um período de transição bem equilibrado denominado de “alostase”, que ocorre antes de o organismo retornar ao estado de homeostase. Esse termo significa "manter a estabilidade por meio da mudança", e foi introduzido por Sterling e Eyer (38) para descrever mudanças fisiológicas que ocorrem em organismos que enfrentam estressores físicos, fisiológicos ou psicológicos.

Estas adaptações são o resultado de uma interação entre genes e o ambiente intrínseco ou extrínseco. De fato, os genes contêm informações específicas sobre as quais o ambiente pode exercer pressão para permitir o surgimento de um fenótipo específico ou de outro (39). Essa chamada plasticidade fenotípica é observada ao longo da filogênese (40) (41) e surgiu há centenas de milhões de anos de evolução dos vertebrados. Desta forma, todo vertebrado responde a situações estressantes pela ativação do ramo simpático de seu sistema nervoso autônomo, denominada “resposta de luta ou fuga”, seguida por secreções de hormônios do seu eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)(42).

Entre os hormônios secretados, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), um dos principais neurohormônios hipotalâmicos, controla a liberação de corticosteróides pelo córtex adrenal por ativação de células adrenocorticótropicas hipofisárias (43). Este sistema CRH também ocorre em invertebrados e, provavelmente, evoluiu de espécies ancestrais existentes antes da explosão pré-cambriana, como mostrado por Lovejoy e Jahan(44)(45). Assim, esses mecanismos de sobrevivência foram selecionados por meio de processos evolutivos complexos que surgiram há milhões de anos para permitir a mobilização do sistema neuroendócrino dos indivíduos e elevar seu nível de energia basal para que eles possam enfrentar com precisão situações estressantes e manter seu equilíbrio interno.

Esse equilíbrio interno depende de três sistemas fisiológicos inter-relacionados: os sistemas nervoso, imunológico e endócrino, os quais se

relacionam por meio de moléculas especializadas: neurotransmissores, citocinas e hormônios ou neuro-hormônios (46) (47). Esta teoria da comunicação entre estes sistemas foi proposta na década de 1980 pelo Dr. Robert Ader e colaboradores (48). Este grupo propôs os princípios da Imunologia Psico-Neuro-Endócrina (PNEI), cujo campo de estudo científico investiga a ligação entre comunicações bidirecionais entre o sistema nervoso, o sistema endócrino e sistema imunológico e as correlações dessa conversa cruzada com a saúde (48) (49) (50). O elemento chave da PNEI tem como base a inter-relação entre os três sistemas, ou seja no “*cross-talk*” bidirecional entre os sistemas psiconeuroendócrinos e sistema imunológico (51). Desta forma, um organismo submetido ao estresse passa a responder a ele como um todo, o que leva a lembrança do que foi dito por Hipócrates: “O grande erro em nossos dias é que os médicos separam a alma do corpo”. Neste sentido, atualmente, é quase impossível pensar no estresse sem a participação do sistema nervoso central e autônomo, o sistema imune e o endócrino.

Alterações devido a eventos ambientais pré-natais, tais como crescimento fetal alterado (52) e o desenvolvimento de fisiopatologia a longo prazo (53), são denominadas alterações na programação fetal. Os nutrientes e hormônios, especialmente os hormônios esteroides, são considerados poderosos mediadores da organização fetal, uma vez que atravessam prontamente a barreira placentária e são fatores importantes na ocorrência de uma programação deletéria (54). No entanto, muitas vezes, esta programação não acontece adequadamente, resultando em uma adaptação ineficiente e aumentando a suscetibilidade de um indivíduo para doenças da idade adulta, como doença cardiovascular, síndrome metabólica, deficiências cognitivas e desordens afetivas (55). A ideia de que a vulnerabilidade de adultos à doença pode ser programada ou impressa durante o período fetal (isto é, programação fetal) foi proposta pela primeira vez por Barker et al. (56) (57) e é agora amplamente aceita. Em momento posterior, esta ideia foi expandida para incluir também o período pós-natal precoce, denominado "programação perinatal", em que fatores não genéticos agem no início da vida (pré ou pós-natal) (58). Sabe-se que variações nos glicocorticoides maternos circulantes impactam fortemente essa programação, em especial quando surtos hormonais ocorrem durante

períodos sensíveis de desenvolvimento, as chamadas janelas de vulnerabilidade do desenvolvimento (59). Eventos estressantes que ocorrem durante o período perinatal podem afetar vários aspectos da programação neuroendócrina, alterando, subsequentemente, o crescimento, o metabolismo, a maturação sexual, as respostas ao estresse e o sistema imunológico da prole (60) (61). Tais modificações pré-natais induzidas pelo estresse da plasticidade fenotípica da progênie podem resultar em desenvolvimento de doenças a longo prazo, de síndromes metabólicas a distúrbios psiquiátricos (62), e alterações na orientação sexual (63).

Em termos de comportamento, vários dados experimentais mostram que, em roedores, a exposição materna pré-natal a diferentes estressores podem replicar algumas das anormalidades no comportamento da prole observadas em humanos. Estas anormalidades incluem ansiedade, em ratos e camundongos jovens e adultos, avaliados nos testes de labirinto elevado e em campo aberto (64) (65) (66); depressão observada nos testes de natação forçada (67), de preferência a sacarose (68); déficits na interação social (69), ligada à esquizofrenia (70); na aprendizagem espacial e memória em ratos adultos observadas, respectivamente, no teste do labirinto aquático de Morris (71) e de reconhecimento de objeto novo (72). Assim, os dados obtidos até o momento em experimentos com roedores dão suporte a uma base fisiológica para a hipótese do neurodesenvolvimento de esquizofrenia e depressão (73).

Também durante a lactação, o estresse materno promove inúmeras alterações, em geral ligadas a prejuízos, que podem ter consequências a longo prazo e alterando a programação da prole, pois ela ainda está em desenvolvimento.

O estresse pós-natal não só afeta a prole mas, também, o comportamento da mãe resultando em alterações na interação mãe-filhote. A análise do relacionamento entre mãe e filhotes durante as primeiras semanas de desenvolvimento pós-natal é constantemente empregada como preditor de diferenças na prole em períodos mais tardios da vida (74). Para tanto é necessária a análise de comportamentos maternos básicos, como a frequência da amamentação, de lamber os filhotes e do tempo junto a prole. Estes comportamentos podem ser observados nos dias de pico do comportamento

maternal (75) ou por vários dias em diferentes períodos, incluindo manhã, tarde e noite (76). Em geral, o estresse pós-natal é oriundo de manipulações na mãe, nas condições e na organização social da gaiola.

Uma série de trabalhos mostram que filhotes com baixos níveis de cuidado materno apresentam problemas estruturais, funcionais, bioquímicos, alterações moleculares e na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA)(77) (78) (76). Além disso, esses filhotes demonstram níveis mais altos de consumo de cocaína/álcool, bem como ansiedade e depressão de modo similar àqueles observados em humanos (79) (80). É importante salientar que redução do cuidado materno também afeta processos epigenéticos, como metilação do DNA, modificação de histonas e a expressão de microRNAs que são associados a prejuízos comportamentais a longo prazo (81).

Em geral, o estresse pós-natal é oriundo de manipulações na mãe, nas condições e na organização social da gaiola. Orso et al. (82) classificaram os diversos eventos estressantes que afetam de diferentes formas no desenvolvimento a curto e longo prazo a prole. São eles: i) manipulação precoce da prole (83), em que se separa brevemente a prole da mãe e expõe esta prole a um novo ambiente por até 15 minutos; ii) separação materna (84), quando se separam os filhotes das mães e os expõe a um novo ambiente por 15 min a 8 h; iii) privação materna (85), quando os filhotes são separados da mãe e expostos a um novo ambiente por um longo período; 8-24 h; iv) limitação da cama da gaiola (86), quando a prole e a mãe são expostos a um ambiente empobrecido durante desenvolvimento precoce; v) privação de irmãos (87), em que apenas um filhote permanece com a mãe, enquanto os demais filhotes são sacrificados; vi) separação entre irmãos (88), em que metade da prole permanece com a mãe, enquanto a outra metade é separada e exposta a um novo ambiente); vii) privação nutricional (89), em que os filhotes são deixados por um período com uma mães com tetas cauterizadas, impossibilitando a alimentação da prole; viii) maus-tratos maternos (90), quando a prole é exposta a uma mãe estressada fora da gaiola); viii) troca de mães repetida (91), em que os filhotes mudam de mães durante o desenvolvimento inicial; ix) introdução de um macho intruso (92), em que a mãe e os filhotes são mantidos em sua gaiola moradia e, por um breve período, é introduzido um macho desconhecido nesta gaiola; x) separação

materna imprevisível com mães expostas ao estresse imprevisível (93), quando os filhotes são separados das mães e expostos a um novo ambiente, enquanto as mães são expostas ao estresse de restrição ou ao estresse de natação forçada); e xi) adoção (94), em que os filhotes são expostos a uma mãe substituta e, também, a uma quantidade limitada da cama da gaiola período curto.

Olsen(82), em sua revisão, descreveram o impacto da exposição em período precoce da vida na interação mãe-filhote. Relataram, então, que, em muitos casos, ocorria aumento no lamber/*grooming* dos filhotes, enquanto em outros modelos de estresse maternal não foram observadas alterações no parâmetro. Quanto ao comportamento arqueado de amamentar, o mais importante componente do cuidado maternal, este não estava presente na maior parte dos trabalhos, bem como a busca dos filhotes.

Um parâmetro do comportamento materno que expressa aumento do estresse materno é a exacerbção do *grooming* materno durante a observação do comportamento maternal.

O *grooming* em animais é um comportamento inato envolvido na manutenção da higiene e outros processos fisiologicamente importantes, incluindo a termorregulação, comunicação social e excitação (95) (96). É um dos comportamentos mais frequentemente observados em roedores e apresentam padrões de organização sequencial céfalocaudal característico (97). Seres humanos também apresentam este comportamento de forma similar a outros animais, porém seu excesso é associado a condições patológicas como estresse e em alguns transtornos psiquiátricos, como no autismo (97) (98) e na síndrome obsessiva-compulsiva (99).

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) modula a expressão do auto-*grooming*, e vários hormônios hipotalâmicos e hipofisários, em especial os hormônios relacionados ao estresse como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e o hormônio adrenocorticotrófico, potencializam o auto-*grooming* (100) (101)(102) e ativam este comportamento.

### 1.3 Sobre a negligência materna

A negligência é definida como a falta de cuidado, de interesse ou de atenção. Envolve também o desmazelo, desleixo no fazer ao que lhe foi atribuído, sendo este intencional ou não (98). Como diz o ditado atribuído a Confúcio, “*não são as ervas más que afogam a boa semente, e sim a negligência do lavrador*”.

A diminuição ou ausência do cuidado materno é denominada negligência materna, que pode ser entendida como uma situação de constante omissão para com a criança ou adolescente que coloque em risco seu desenvolvimento (103)(104)(105). Em humanos, é uma relação entre adultos e crianças baseada na omissão, rejeição e descompromisso do cuidado e do afeto. Esta condição é vista em situações de abuso físico, sexual e psicológico durante a infância, e em ambientes não apropriados para o desenvolvimento, tais como instituições para crianças abandonadas ou em risco (106) (107). As deficiências devido à redução do cuidado maternal na infância ocorrem entre 10% e 15% dos casos, nas sociedades ocidentais (105) (108).

Mesmo a negligência materna sendo a forma de maus-tratos e violência mais comum e frequente contra crianças e adolescentes, devido a sua subjetividade e a conotações culturais, é a causa de maus-tratos maternos menos investigada. Devido ao aumento do número de casos e denúncias de maus-tratos nestas idades observados nas últimas décadas, atualmente, um novo olhar para o problema passou a ser adotado pela classe científica. Dentre as formas de negligência registradas nas denúncias aos conselhos tutelares são citadas: evasão da escola, falta de acompanhamento médico ou ausência e/ou regularidade na vacinação, acidentes domésticos ocorridos por falta de supervisão (109) (110) (111).

A negligência é a forma mais frequente de maus-tratos contra crianças e adolescentes, e a mais denunciada. Desde 2012, a negligência é responsável por quase metade dos casos, segundo o Sistema de Informação para Infância e Adolescência (Sipia), que recebe todas as notificações sobre violência dos conselhos tutelares do Brasil. Como exemplo da alta incidência de negligência materna, cita-se o trabalho de Rates et al (107) que, utilizando dados de notificações do Sistema da Vigilância de Violências e Acidentes (Viva/SINAN)

(112) sobre violências contra crianças entre 0 e 9 anos, mostraram a ocorrência de 17.900 casos. Dos tipos de violência, os predominantes foram a negligência ( $n = 7.716$ ; 47,5%), as violências física ( $n = 5.969$ , 38,5%), as de ordem sexual ( $n = 5.675$ , 37%) e as de ordem psicológica/moral ( $n = 3.772$ ; 25,2%), segundo Nunes et al (113).

Em 2018, o Disque Direitos Humanos (Disque 100) obteve 152.178 registros de violações, com 76.216 vítimas. Destes, 72,66% foram referentes à negligência, à violência psicológica (48,76%), à violência física (40,62%) e à violência sexual (22,40%). Ressalta-se que, em uma única denúncia, pode haver duas ou mais violações. Entre as vítimas, 48,16% são do sexo feminino, 40,24% masculino e 11,60% não informados. Sobre a faixa etária, temos vítimas de 0 a 3 anos (17,84%), 4 a 7 anos (21,48%), 8 a 11 anos (20,10%), 12 a 14 anos (17,44%), 15 a 17 anos (11,93%), nascituro (0,24%), recém-nascido (0,83%), e idades não informadas (11,93%). As mães são as principais denunciadas no que se refere às violações: elas representam 37,64%, em seguida os pais (18,47%), padrastos (5,32%), tios/as (3,53%) e as avós (3,59%). Agressores de identidade não informada somaram 18,77% (99).

Dentre os estudos e dados baseados nos perfis dos grupos das denúncias de negligência, há registros de negligência em todos os níveis socioeconômicos; porém nota-se maior prevalência dos casos em níveis socioeconômicos mais baixos. Nos perfis das mães negligentes, verificou-se menor interação com o filho e um maior número de gestações, em geral não planejadas. Quanto às condições de moradia, notou-se que as famílias apresentavam insatisfação com as condições de moradia, comumente localizadas em aglomerações e em locais inadequados, fato que gerava estresse no grupo (110) (114). Portanto, o fator socioeconômico é um dos fatores que deve ser considerado, provavelmente em função das desvantagens criadas por tais condições concretas serem menos favoráveis ao desenvolvimento humano; no entanto, este não pode ser considerado como fator definidor.

A experiência de maus-tratos crônicos na infância, sob a forma de abuso ou negligência, está associada a uma série de problemas que podem ocorrer ao longo da vida, sendo um fator de risco para déficits emocionais subsequentes e uma série de outros problemas interpessoais, como a desconfiança, o receio de

estabelecer relações íntimas, os vieses do processamento de informação social e outros (106) (108).

Durante o período pré e pós-natal, o indivíduo tem sua neuroplasticidade aumentada; nesta fase, ele está em constante desenvolvimento e adaptação a todos os fatores expostos, sendo que suas interações com o ambiente e seus comportamentos adaptativos a ele irão definir um conjunto de programação tanto comportamental quanto genética, que ele irá carregar e expressar no decorrer da vida (115) (116).

Adversidades e intercorrências durante o período pré e pós-natal, podem desenvolver alterações comportamentais e metabólicas, que podem ser carregadas ao longo da vida do indivíduo, ou até mesmo alterações transgeracionais (117)(118) (119).

Os efeitos dos abusos da infância podem muito precocemente promover aumento no medo e ansiedade, agressão e distúrbios de humor, e podem desencadear um programa desadaptativo que altera mecanismos de resiliência ao estresse (120) (121) (122)(93). São também observados déficits cognitivos particularmente ligados a memória emocional (123). Além disto, adultos que sofreram redução de cuidados na infância mostram aumento na incidência de obesidade (124) (125). Estudos também mostraram alterações na expressão gênica envolvida na regulação do DNA, levando a alterações epigenéticas devido aos maus tratos na infância (104) (105).

#### **1.4   Modelo de limitação das condições do ninho.**

O puerpério é um momento crucial para iniciar e estabelecer a qualidade do vínculo mãe-filho, e neste a mãe irá suprir todas as necessidades do bebê, tais como segurança, alimentação, proteção, controle térmico e afeto. Neste período, é importante um ambiente adequado para estas necessidades para o binômio mãe-filho.(110) (126). Em humanos, o puerpério é dividido didaticamente em três fases: fase imediata (compreende o período entre uma e duas horas após a saída da placenta até o 10º dia pós-natal), fase tardia (que ocorre entre os 11º e 45º dias pós-natais) e remoto (a partir do 45º dia, com seu término imprevisto, pois enquanto a mulher amamentar ela estará sofrendo

modificações da gestação, como a lactânci). Alterações de humor e psíquicas da puérpera são corriqueiras neste período (127) (126). Assim, o ambiente maternal e os cuidados maternais neste primeiro momento da vida são essenciais para a qualidade deste vínculo,, devendo ser construído um ambiente seguro e apropriado, para que a mãe possa expressar o comportamento maternal de forma adequada, fornecendo o amparo, a atenção e o afeto ao bebê neste momento (114).

Um paradigma naturalístico para induzir estresse materno e redução no cuidado maternal é a limitação da construção do ninho (LCN). Ivy et al (128) reduziram as condições do ninho entre os dias 2-9 pós-natais. Esses autores verificaram redução no *grooming* dos filhotes, redução da presença da mãe no ninho ou em contato com sua prole, além de aumento nas mães dos níveis plasmáticos de corticosterona e do peso das adrenais, concomitantemente com aumento da liberação hipofisária do hormônio adrenocorticotrófico.

Moussaoui et al (129) reduziram as condições do ninho entre os dias pós-natais 2-10 da lactação e verificaram prejuízos no comportamento maternal e, na prole masculina, aumento na permeabilidade da barreira intestinal.

Rincón-Cortés & Sullivan(108) reduziram as condições do ninho entre os dias pós-natais 8 –12 e verificaram que o comportamento social da prole ao desmame não foi modificado, porém entre os dias 20-22 e na adolescência (dias 42-48) houve redução na sociabilidade dos animais. Observaram redução na atividade da amigdala, no córtex medial pré-frontal e no núcleo *accumbens*, áreas importantes no comportamento emocional. Ainda, esses autores verificaram a presença de comportamento tipo- depressivo na idade adulta.

Yan et al (130) mostraram que, nesta condição, pode ocorrer redução do tempo que a mãe dedica à prole, já que ela precisa intervir de forma mais constante no reparo do ninho; tal situação acarreta menos tempo de contato com os filhotes, manuseio brusco e pisoteamento dos filhotes, o que reduz o cuidado maternal. Sob esta condição, os filhotes se alimentam menos e têm aumento dos níveis de corticosterona, embora o ganho de peso seja normal (131) (132) (133) (134) (135). Segundo Yan et al (130), este modelo resultou em um fenótipo depressivo na vida adulta produzido pelo trauma no início da vida. Os dados

deste autor mostraram, ainda, convergência com dados humanos de crianças criadas em orfanatos, mas também com aqueles de primatas não humanos.

Tendo em vista os efeitos da limitação das condições do ninho (LCN) como modelo de negligência maternal e da ausência na literatura das consequências em idade precoce da LCN, este projeto investigou, inicialmente, as possíveis alterações reprodutivas na interação materno-filhote para, então, estudar os possíveis prejuízos na prole masculina destas ratas. Escolheu-se analisar apenas a prole masculina, uma vez que filhotes machos necessitam de maiores cuidados maternos (136) (15) (134).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar as consequências da LCN durante todo o período de lactação de ratas (infância aos 31 dias de idade), da avaliação de parâmetros de comportamento materno, desenvolvimento físico e comportamental da prole masculina.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar se a LCN altera:

- ✓ o comportamento materno;
- ✓ os níveis de corticosterona sérica materna;
- ✓ o desenvolvimento físico e reflexológico da prole masculina de ratas;
- ✓ aos 30 dias de idade, o comportamento social da prole masculina;
- ✓ aos 31 dias de idade, a expressão da atividade motora/ansiosa observada em campo aberto da prole masculina;
- ✓ aos 31 dias de idade, as respostas tipo-depressiva no teste de natação forçada da prole masculina;
- ✓ aos 31 dias de idade, as respostas tipo-ansiosa no teste de transição na caixa claro escuro da prole masculina;

- ✓ aos 31 dias de idade, os níveis de corticosterona sérica da prole masculina.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizadas 12 ratas e 6 ratos Wistar adultos, entre 15 e 17 semanas de idade, pesando 220-275 g, adquiridas do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil. Estes animais foram trazidos ao Biotério de Experimentação da Universidade Paulista alojados em gaiolas de polipropileno (45.5 X 34.5 X 20 cm; máximo 4 ratas /gaiola) com sistema de microisoladores (Tecniplast, Buguggiate, Italy), em temperatura controlada ( $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade (55 – 65%) com iluminação artificial (12-hr luz/12-hr escuro ciclo, luz às 7:00 da manhã). Os animais tiveram acesso à vontade à ração irradiada para roedores (Bio Base, Águas Frias, Brasil) e beberam água estéril (autoclavada). Além disso, maravalha esterilizada e livre de resíduos foi usada como cama para os animais. Após 10 dias de habituação, as fêmeas foram cruzadas com ratos de mesma linhagem, experientes sexualmente, para obtenção de suas proles. Após 18 dias da confirmação da gestação pela observação da presença de espermatozoides no lavado vaginal, as ratas foram alojadas, individualmente, com comida e água *ad libitum*. A manutenção dos animais, condições nutricionais, o manuseio e cuidado das ninhadas foram as mesmas descritas anteriormente pelo nosso grupo Joaquim et al.(137). Foi permitida a gestação ir a termo. O parto foi considerado o dia 1 pós-natal (DPN1) e nenhum manuseio foi realizado neste dia.

#### **3.2 Delineamento experimental**

As ninhadas foram pesadas no DPN2, e padronizadas em 8 filhotes (4 machos/4 fêmeas), quando possível. As 12 ratas foram divididas em 2 grupos iguais. Assim, neste dia, para efeito de indução, somente as ratas do grupo experimental tiveram redução de 50% na quantidade de maravalha de sua gaiola. Já as ratas do grupo controle permaneceram com 100% da maravalha

em sua gaiola. Foram atribuídos escores à qualidade do ninho a cada 7 dias da lactação, conforme descrito a seguir.

Foi observado o comportamento maternal e mensurado entre os DPNs 5 e 6 da lactação. O desenvolvimento físico e o reflexológico da prole masculina das ratas foram realizados do DPN 2 ao 24, período subsequente à descida dos testículos. No DPN 21, ocorreu o desmame da ninhada, com a separação dos machos e fêmeas. Nesse dia, as mães foram submetidas a eutanásia por decapitação e seu sangue foi coletado para avaliação dos níveis séricos de corticosterona.

No desmame, os filhotes machos foram observados quanto à atividade geral em campo aberto; em seguida, procedeu-se ao isolamento de um filhote, sendo os outros agrupados até o DPN30. No DPN30, foi observado e mensurado o comportamento social dos filhotes. No DPN31, foram executados os testes da atividade geral, o teste de natação forçada, da caixa de transição claro/escuro com um filhote/teste dos respectivos grupos experimental e controle. Após a observação comportamental, esses filhotes foram submetidos à eutanásia, e o sangue coletado para análise dos níveis séricos de corticosterona. Em cada experimento, foram utilizados no máximo 2 animais/ninhada para evitar o efeito de ninhada (138). As fêmeas que nasceram das gestantes oriundas deste projeto foram utilizadas em outro projeto de pesquisa experimental.

### **3.3 Procedimentos**

#### **3.3.1. Estudos maternos**

##### *3.3.1.1. Qualidade do ninho e sobrevivência da prole*

O número de filhotes vivos/mortos foi anotado durante todos dias da lactação. A partir destes dados, foram construídas curvas de sobrevivência da prole e calculada a porcentagem de animais vivos/mortos de cada grupo. Para avaliação do comportamento materno no ninho, foram atribuídos escores ao comportamento das ratas antes de qualquer manipulação (Tabela 1).

Tabela 1. Escores do comportamento materno das ratas no ninho.

Escores	
1	Rata distante dos filhotes, explorando ou não a gaiola
2	Filhotes agrupados com a mãe sobre os filhotes
3	Mães amamentando os filhotes

### 3.3.1.2. Comportamento maternal

Para o teste de comportamento maternal da ninhada, cada rata foi colocada em outra gaiola com maravalha em uma sala distante da mãe, e os filhotes foram mantidos aquecidos por uma manta. A rata mãe permaneceu na gaiola moradia e o ninho desta caixa foi desfeito. Sessenta minutos mais tarde, os filhotes foram colocados de volta na caixa moradia, espalhados dentro da gaiola no lado oposto o qual estava o ninho, e em seguida foi observado o comportamento materno por 30 minutos. Este procedimento foi gravado e os seguintes parâmetros avaliados: latência para recolhimento de 4 filhotes em segundos, tempo total de comportamento maternal (tempo em segundos que a rata permaneceu sobre os filhotes, amamentando ou não), frequência e tempo em segundos que a rata fez *grooming* nos filhotes (sendo *grooming* considerado quando a mãe lambia o filhote). A partir destes dados, foram calculados os tempos máximos de comportamento maternal e de *grooming* nos filhotes. Observou-se também o comportamento maternal voltado a ela mesma: frequência, tempo total e tempo máximo de auto-*grooming*.

### 3.3.1.3. Atividade geral em campo aberto

O teste de campo aberto visou avaliar da atividade motora/exploratória e comportamento tipo-ansiedade das ratas, uma vez que interferências nestes aspectos poderiam prejudicar a expressão do comportamento maternal. Cada rata foi observada no período da tarde nos mesmos dias da observação do comportamento maternal. Para isso, as ratas foram colocadas individualmente

no centro do aparelho de campo aberto. O teste foi gravado por 5 minutos para posterior avaliação dos parâmetros. Os seguintes parâmetros foram anotados: (1) frequência, tempo total e tempo máximo de *grooming*; (2) frequência, tempo total e tempo máximo de exploração vertical; (3) frequência, tempo total e tempo máximo de imobilidade; (4) tempo total de locomoção na periferia e (5) tempo na zona central do campo aberto. O aparelho foi limpo com solução de álcool a 5% no intervalo entre a observação de cada rata, para evitar a interferência de odores deixados por outra rata.

### 3.3.2. Estudos da prole

#### 3.3.2.1. Desenvolvimento Físico

Para avaliação do peso corporal, os ratos foram pesados nos DPN 4, 9, 21 e 31.

Na avaliação do desenvolvimento físico dos animais, foram observados os dias de ocorrência dos seguintes parâmetros: desdobramento das orelhas, abertura dos olhos, erupção dos dentes incisivos, nascimento de pelos e descida dos testículos. Estas observações foram realizadas diretamente em cada filhote:

- a) desdobramento de orelha: os filhotes escolhidos de cada ninhada foram observados entre o 1º e o 5º dia de lactação, quanto à ocorrência ou não deste parâmetro;
- b) erupção dos dentes incisivos: observada pela abertura da boca dos filhotes escolhidos, entre o 6º e o 12º dia de lactação, sendo registrado o dia exato do aparecimento do esmalte dos dentes superiores e inferiores;
- c) abertura dos olhos: registrado o dia da ocorrência da primeira fresta da abertura dos dois olhos. Esta observação foi realizada entre o 10º ao 15º dia da lactação;
- d) aparecimento de pelos: registrado entre os dias 5º aos 8º dias de vida. Diferem-se da penugem, que aparece logo no 1º ou 2º dia após o nascimento pelo comprimento.

### 3.3.2.2. Desenvolvimento reflexológico

Os parâmetros do desenvolvimento reflexológico observados foram:

- a) Reflexo de preensão palmar: o animal foi contido em uma das mãos do (a) pesquisador (a), e uma das patas do filhote foi tocada com a ponta de um clipe para avaliação da ocorrência do reflexo. O critério para ocorrência foi o de que o animal fechasse a pata ao contato físico com o clipe. Este teste foi realizado no 2°, 4°, 6°, 8° e 10° dia da lactação, sendo que este é o único teste em que o reflexo desaparece ao longo do tempo.
- b) Reflexo de endireitamento de postura: o animal foi colocado em decúbito dorsal, sendo medida a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição de decúbito ventral. O critério para o registro desse reflexo foi o de que, ao se virar, o animal ficasse com as quatro patas espalmadas na superfície. O período de latência máximo para este teste foi de 30 segundos. Este reflexo foi observado do 5° ao 10° dia de lactação.
- c) Reflexo de geotaxia negativa: o animal foi colocado em uma rampa de aproximadamente 45° de inclinação, a 5 cm do final inferior dessa superfície, com a cabeça direcionada para baixo. Anotou-se a latência (não superior a 30 segundos), para os animais voltarem à posição oposta, ou seja, com a cabeça para cima. Quando os animais não apresentaram o reflexo na 1° tentativa, eles foram testados mais 2 vezes com a mesma latência. A ocorrência na 1°, 2° ou 3° tentativa também foi registrada. Este reflexo foi observado no 5°, 7°, 9°, 11° e 13° dia de lactação. A latência máxima foi de 1 minuto.
- d) Dia de andar adulto: os animais foram colocados em uma superfície plana e observou-se se estes apoiavam sobre as quatro patas sem encostar o ventre na superfície plana. Quando isto foi observado, anotou-se, então, o dia de andar adulto. Este parâmetro foi observado do 10° ao 18° dia de lactação ou até o dia em que os animais apresentaram o comportamento.

### 3.3.2.3. Atividade geral em campo aberto

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliação da atividade motora/exploratória e comportamento tipo-ansiedade da prole das ratas de forma similar ao descrito no item 4.4.1.2; o campo aberto empregado, porém, foi

adaptado ao tamanho da prole (40 cm de diâmetro e parede com 50 cm de altura). O teste foi gravado por 5 minutos para análise posterior. Os parâmetros avaliados foram: duração em minutos da locomoção, imobilidade e tempo no centro; anotou-se também a frequência de cruzamentos no centro do campo aberto e a frequência de levantar.

### 3.3.2.4. Comportamento social

O comportamento social na infância é uma das primeiras formas de comportamento social não direcionado à mãe que ocorre na ontogenia em espécies de mamíferos(139). Tem importância em estabelecer padrões de comportamento na idade adulta, por exemplo, para comportamento sexuais e agressivos(140). Neste trabalho, o comportamento de interação social foi avaliado segundo Kirsten et al.(141). Resumidamente, no DPN 21, 18 filhotes dos grupos controle e experimentais foram separados em uma das duas seguintes condições para a análise do comportamento de brincar: 1) acondicionamento individualmente (filhotes controle isolados, n = 6; filhotes experimentais isolados, n = 6) e 2) acondicionamento agrupado, consistindo de dois filhotes por gaiola (filhotes controle agrupados, n = 6, sendo 1 só utilizado para o comportamento de brincar; filhotes tratados agrupados, n = 6, sendo 1 só utilizado para o comportamento de brincar). O motivo do isolamento social foi aumentar a motivação em iniciar o comportamento de brincar(142). Os animais permaneceram nessas condições nas gaiolas-moradia (38 x 32 x 16 cm) até o DPN 30. O comportamento de brincar foi avaliado no DPN 30, pois esse comportamento apresenta pico nesse período (143). No DPN 30, um filhote submetido a LC foi confrontado com um filhote do mesmo grupo que foi agrupado e com diferença no peso entre eles menor que 10 g. O mesmo procedimento foi feito com os filhotes do grupo controle. Os comportamentos foram gravados por 10 min na gaiola no filhote isolado. Antes do teste, os animais permaneceram por 5 min na sala teste para adaptação. Os seguintes parâmetros foram avaliados: frequência de *pinning* (comportamento de brincar propriamente dito, isto é, o número de vezes que o animal deita de costas com seu parceiro em cima; esse comportamento foi avaliado para os dois animais, pois ambos são participantes ativos), tempo gasto em farejar o parceiro (tempo, s), frequência de

passar sobre ou sob o outro animal, frequência de montas no parceiro, duração do tempo gasto perseguido o parceiro (tempo, s), e locomoção (tempo, s). Todos os parâmetros do comportamento de brincar, exceto o *pinning*, foram observados individualmente nos animais isolados.

### 3.3.2.5. Teste de transição na caixa claro/escuro

O modelo da transição claro-escuro constitui-se de uma caixa contendo dois compartimentos, um escuro e um iluminado, interligados por uma abertura divisória. O paradigma claro-escuro é baseado em uma situação de conflito, sem que haja a presença de um estímulo punitivo. O conflito se dá entre a tendência natural dos animais de explorar um ambiente novo e a tendência inicial de se esquivar do que não é familiar (neofobia). O comportamento aversivo dos animais é produzido neste modelo pelos estímulos estressores moderados, ou seja, um ambiente novo e iluminação excessiva (144). O procedimento no teste da transição claro-escuro consistiu em colocar o animal, individualmente, com a cabeça voltada para a porta divisória e, por 5 minutos, no lado claro da caixa o qual era intensamente iluminado. Após a primeira entrada do animal no compartimento escuro, foram registrados os seguintes parâmetros: tempo total de permanência em cada um dos compartimentos (claro e escuro), número total de transições entre os dois compartimentos e o tempo que o animal levou para entrar pela primeira vez no lado escuro do modelo

### 3.3.2.6. Teste de natação forçada (teste de Porsolt)

Este teste foi proposto por Porsolt et al (145), sendo um modelo experimental para o estudo da depressão. Os ratos, ao serem introduzidos na cuba com água, apresentam um comportamento de luta, caracterizado por vigorosa atividade. Após alguns minutos, essa atividade diminui, até que os animais passam a fazer somente os movimentos necessários para manter a cabeça fora da água, o que foi denominado de imobilidade (145) (146). No presente trabalho, os ratos foram submetidos ao teste em cilindros de acrílico (50 cm de altura e 22 cm de diâmetro), por 5 minutos, com água na profundidade de 30 cm e temperatura média de  $28 \pm 1^\circ$  C. Ao término do teste, cada animal

foi retirado do cilindro e seco com toalha. Os testes foram feitos individualmente, e, entre cada teste, a água foi trocada. Foram mensurados: 1) tempo de latência para primeira flutuação em segundos, ou seja, o tempo que cada animal permanece em completa imobilidade antes de começar a se movimentar; 2) tempo de flutuação em segundos, ou seja, o tempo em que, após a latência para flutuação, cada animal deixa de se movimentar dentro do cilindro; e 3) quantidade de tentativas de escape, ou seja, movimentos vigorosos em tentativa de fuga, com as patas dianteiras acima da superfície da água ou contra a parede do cilindro.

### 3.3.3. Avaliação dos níveis de corticosterona séricos maternos e da sua prole

Após a observação da atividade geral das ratas-mães, e imediatamente após o teste de natação forçada da prole, os animais foram submetidos à eutanásia e o sangue coletado para avaliação dos níveis séricos de corticosterona. Na prole, o sangue utilizado foi de todos animais, exceto daqueles que foram isolados. A análise dos níveis de corticosterona foi feita pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (cat. no. K014-H, Ann Arbor, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

## 3.4 Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk (147) ou ao teste de Bartlet (148) para verificar, respectivamente, a normalidade e homocedasticidade das informações coletadas. Dados paramétricos com 2 variáveis foram analisados pelo teste *t* de Student e, os não paramétricos, pelo teste U de Mann-Whitney. Dados com mais de um fator foram analisados pela ANOVA de 2 vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak, ou pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Para a avaliação da curva de sobrevivência da prole, foi empregado o teste de regressão linear e, para as porcentagens, empregou-se o teste de Fisher. O nível de significância de 5% ( $\alpha < 0,05$ ) foi considerado suficiente para mostrar diferenças significantes em todos

os dados analisados. Os dados foram expressos, conforme o caso, como média  $\pm$  erro padrão da média, mediana e seus limites ou porcentagens. O *software* GraphPad Prism 8.0 e o *software* GraphPad Instat foram utilizados para a análise estatística.

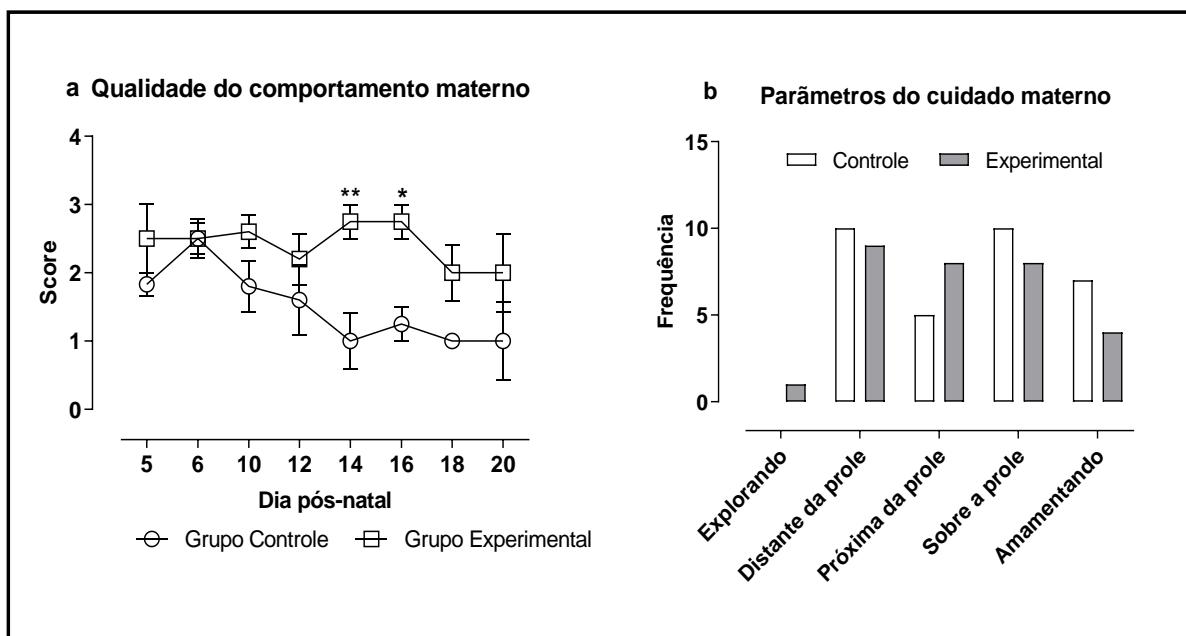
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estudos maternos

A Figura1 ilustra os escores da qualidade do comportamento maternal no ninho e a frequência dos parâmetros do comportamento materno observado durante 30 minutos.

Os escores da qualidade do comportamento materno no ninho (Fig.1a) foram modificados pelo tratamento mas não pelo tempo de observação, não havendo interação entre os fatores (ANOVA de duas vias - tempo -  $F_{7,52} = 0,60$ ,  $p = 0,75$ ; tratamento -  $F_{7,52} = 48,71$ ,  $p < 0,0001$ , interação entre os fatores -  $F_{7,52} = 0,72$ ,  $p = 0,66$ ). O teste de comparações múltiplas de Sidak mostrou que os escores do grupo experimental foram maiores nos dias 14 e 16 da lactação quando comparados aos dos animais do grupo controle.

Figura1. Qualidade do comportamento materno no ninho (a) e frequência dos parâmetros do comportamento maternal (b).

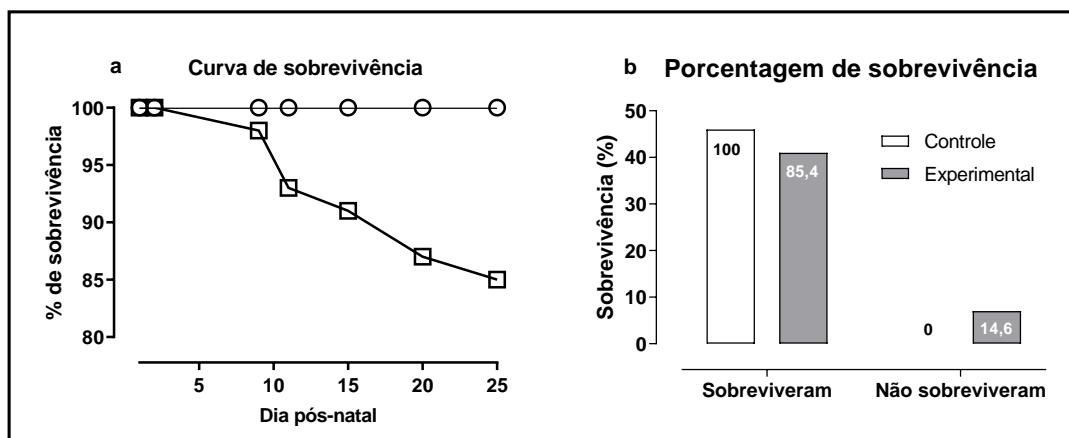


Legenda: As ratas dos grupos experimental e controle foram submetidas ou não à redução da maravalha do ninho, respectivamente, observadas durante 30 minutos. O comportamento materno foi observado entre os DPN5-6. n= 6/grupo. Os escores de qualidade do ninho foram analisados pela ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de comparações de Sidak. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Fonte: Mendes -Lima, 2020.

A Figura 2 ilustra a sobrevivência da prole de ratas do grupo experimental ou do grupo controle durante a lactação, e o índice de sobrevivência dessa prole. A regressão linear aplicada à curva de sobrevivência da prole (Fig.1a) apresentou inclinação diferente de zero ( $F = 110,9$ ,  $Df = 1$ ,  $Df = 5$ ,  $p = 0,0001$ ) em que houve menor sobrevida dos animais do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle.

A porcentagem de sobrevivência da prole (Fig.1b) dos animais do grupo experimental foi menor nos animais do daqueles do grupo controle (teste exato de Fisher -  $p = 0,01$ ).

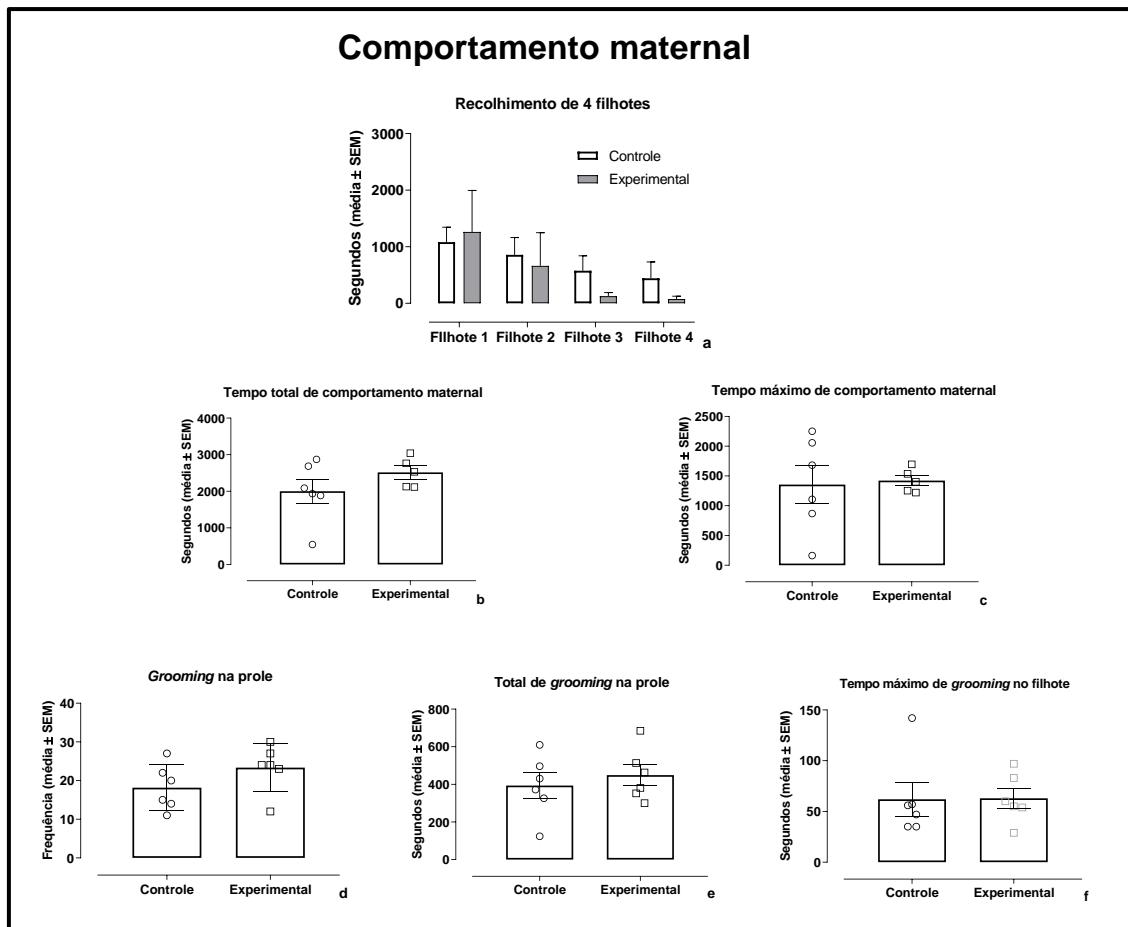
Figura 2. Curva de sobrevivência da prole (a) e índice em porcentagem da sobrevivência da prole (b).



Legenda: As ratas dos grupos experimental e controle foram submetidas ou não à limitação das condições do ninho durante a lactação, respectivamente. A curva de sobrevivência foi analisada pelo teste de regressão linear e Índice de sobrevivência em porcentagem da prole pelo teste exato de Fisher - \* $p = 0,01$ . N = 6/grupo. Fonte: Mendes -Lima, 2020

A Fig. 3 ilustra o comportamento maternal voltado aos filhotes de ratas dos grupos controle e experimental. Não foram observadas diferenças estatísticas entre todos os parâmetros do comportamento maternal voltado aos filhotes dos dois grupos. Os resultados da análise estatísticas são apresentadas na Tabela 2.

Figura 3. Comportamento maternal voltado aos filhotes.



Legenda: As ratas dos grupos experimental e controle foram submetidas ou não à limitação das condições do ninho durante a lactação, respectivamente. São apresentados as médias e os respectivos erros-padrão, bem como os valores individuais. Os parâmetros são designados pelas letras de a-f. (a) recolhimento de 4 filhotes; (b) tempo total de comportamento maternal; (c) tempo máximo de comportamento maternal; (d) *grooming* da prole; (e) total de *grooming* materno; (f) tempo máximo de *grooming* nos filhotes. n=6/grupo. Teste t de Student. Fonte: Mendes-Lima, 2020

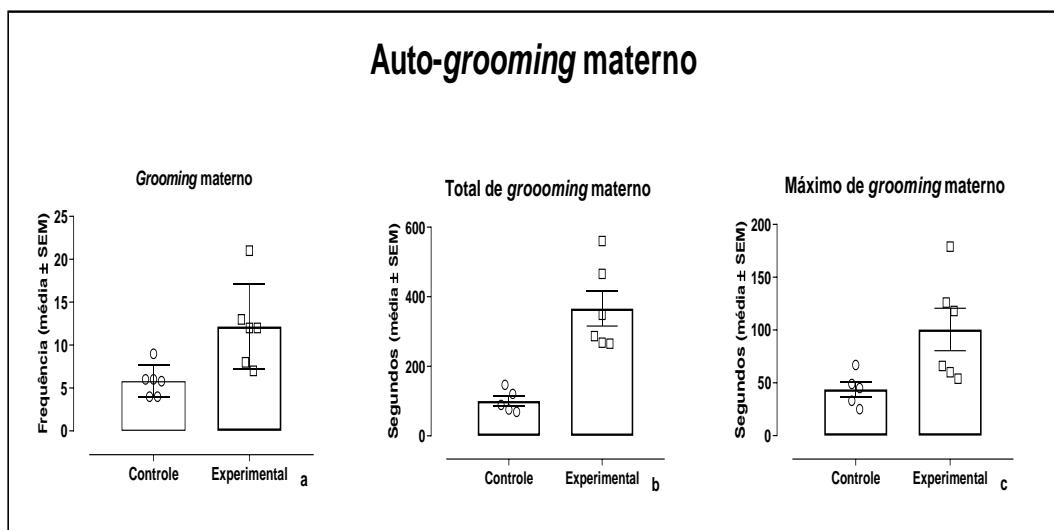
Tabela 2. Comportamento maternal voltado aos filhotes.

Parâmetro	t	df	p
Latência para o recolhimento dos filhotes	1,49	10	0,17
Tempo total de comportamento maternal	1,27	10	0,23
Tempo máximo de comportamento maternal	0,18	10	0,80
Frequência de <i>grooming</i> na prole	1,47	10	0,17
Tempo total de <i>grooming</i> na prole	0,03	10	0,54
Tempo máximo de <i>grooming</i> na prole	0,05	10	0,95

Legenda: As ratas dos grupos experimental e controle foram submetidas à limitação das condições do ninho. Teste t de Student. Df- graus de liberdade, p = valores da probabilidade.  
Fonte: Mendes-Lima, 2020

A Fig.4 ilustra o comportamento de ratas do grupo controle e experimental voltado para a própria rata durante a observação do comportamento maternal. Observou-se aumento significante na frequência de auto-grooming ( $t = 2,95$ ,  $df = 6,34$ ,  $p = 0,02$ , Fig.3 a), no tempo total de auto-grooming ( $t = 5,12$ ,  $df = 5,85$ ,  $p = 0,002$ , Fig.3b) e na duração máxima de auto-grooming ( $t = 2,66$ ,  $df = 6,24$ ,  $p = 0,04$ , Fig. 3c) nas fêmeas do grupo experimental em relação àquelas do grupo controle.

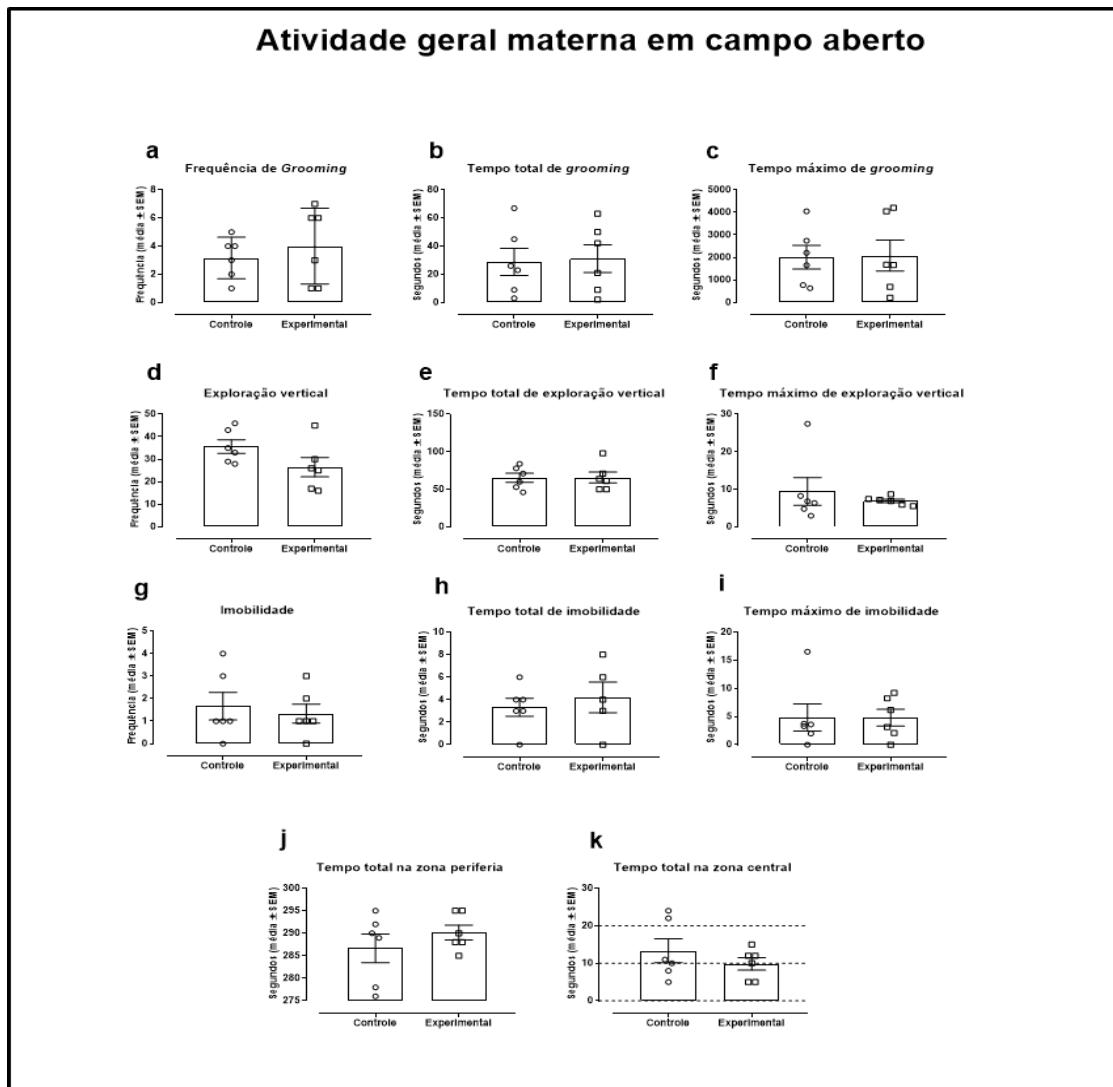
Figura 4. Comportamento de auto-grooming de ratas submetidas ou não à limitação das condições do ninho.



Legenda: (a) Frequência de auto-grooming materno; (b) tempo total de auto-grooming materno; (c) tempo máximo de auto-grooming materno. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão, bem como os valores individuais. N=6/grupo. Teste t não pareado com correção de Welch. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . Fonte: Mendes-Lima, 2020

A Fig.5 ilustra a atividade geral de ratas do grupo controle e experimental observadas em campo aberto. O teste t de Student não mostrou diferenças significantes entre os dois grupos entre todos parâmetros observados. Os resultados da análise estatística são mostrados na Tabela 3.

Fig.5. Atividade geral materna dos grupos experimental e controle submetidas ou não à limitação das condições do ninho, respectivamente.



Legenda: Foi observada a atividade em campo aberto de ratas do grupo experimental e controle, N=6/grupo. (a) frequência de *grooming*; (b) tempo total de *grooming*; (c) tempo máximo de *grooming*; (d) exploração vertical; (e) tempo total de exploração vertical; (f) tempo máximo de exploração vertical; (g) tempo de imobilidade; (h) tempo total de imobilidade; (i) tempo máximo de imobilidade; (j) tempo total na zona periférica; (k) tempo total na zona central. São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, bem como os valores individuais. Teste de Student. Fonte: Mendes-Lima, 2020

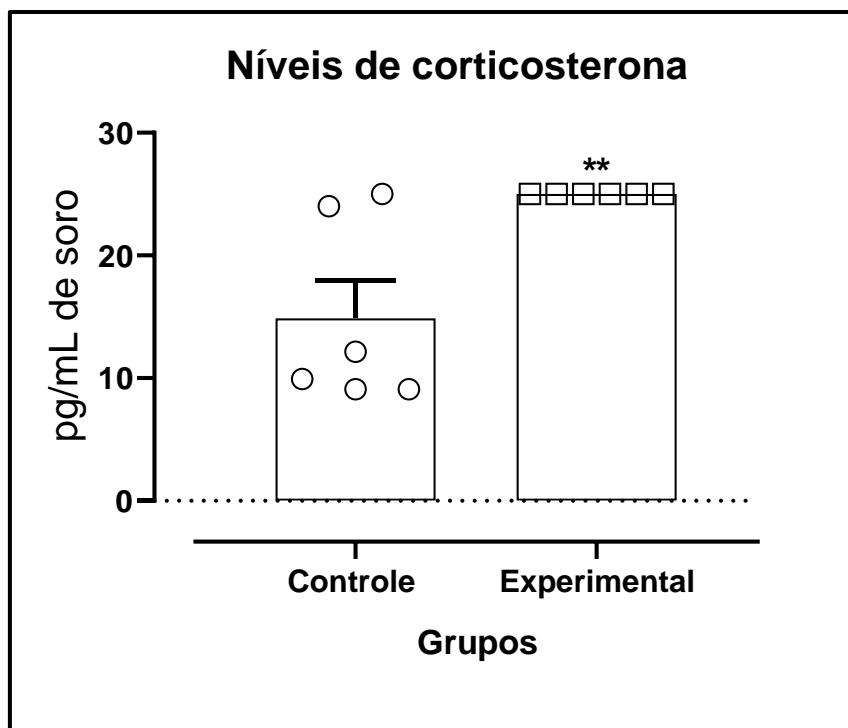
Tabela 3. Resultados da análise estatística da atividade geral de ratas dos grupos experimental e controle observadas em campo aberto.

Parâmetro	t	df	p
Frequência de <i>grooming</i>	0,67	10	0,52
Tempo total de <i>grooming</i>	0,17	10	0,87
Tempo máximo de <i>grooming</i>	0,08	10	0,94
Frequência de exploração vertical	1,74	10	0,11
Tempo total de exploração vertical	0,04	10	0,97
Tempo máximo de exploração vertical	0,68	10	0,51
Frequência de imobilidade	0,44	10	0,66
Tempo total de imobilidade	0,57	10	0,58
Tempo máximo de imobilidade	0,02	10	0,99
Tempo total na periferia	0,96	10	0,36
Tempo total no centro	0,98	10	0,35

Legenda: As ratas do grupo experimental foram submetidas à limitação das condições do ninho. Teste t de Student. Df- graus de liberdade, p = valores da probabilidade. Fonte: Mendes -Lima, 2020

A Fig. 6 ilustra os níveis séricos de corticosterona materna dos grupos controle e experimental. O teste de Shapiro-Wilk indicou que a distribuição não seguiu a normalidade (grupo controle= 0,0060; grupo experimental =0,0003). Foi retirado um dado *outlier* do grupo controle. O teste U de Mann-Whitney mostrou que os níveis séricos desse hormônio foram maiores no grupo experimental com relação ao grupo controle ( $U = 0,02$ ).

Figura 6. Níveis maternos de corticosterona séricos ( $\mu\text{g/g}$  de tecido) de ratas dos grupos controle e experimental, submetidas ou não à limitação das condições do ninho, respectivamente.



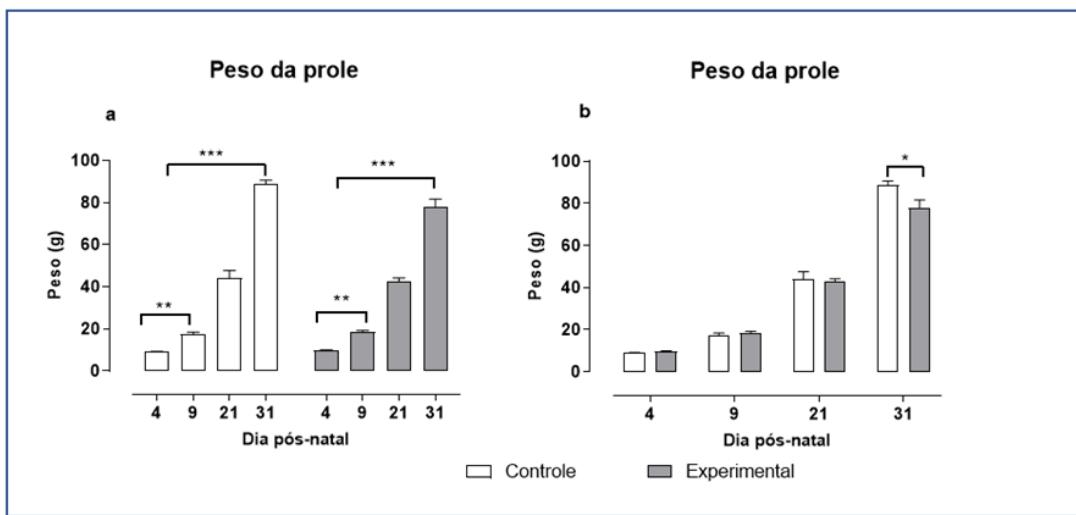
Legenda: São apresentadas as medianas e os respectivos limites, bem como os valores individuais. \*\*  $p < 0,01$ . Teste U de Mann-Whitney.  $n = 6/\text{grupo}$ . Fonte: Mendes-Lima, 2020

#### 4.2. Estudos com a prole

A Figura 7 ilustra o peso corporal da prole de ratas dos grupos controle e experimental durante a lactação até o DPN31. A ANOVA de duas vias indicou a existência de diferenças em relação aos dias de observação ( $F(3,10) = 382,3$ ,  $P < 0,0001$ ) e interação entre os fatores ( $F(3, 104) = 2,95$ ,  $P=0,04$ ). O teste de comparações múltiplas de Tukey indicou diferenças significantes entre todos os dias de observação.

Na análise de diferenças entre os grupos, a ANOVA não mostrou diferenças entre os grupos ( $F(1, 104) = 2,56$ ,  $P=0,11$ ). O teste de Sidak mostrou que a interação foi significante entre os grupos controle e experimental no DPN 31, com redução no peso da prole experimental em relação ao grupo controle.

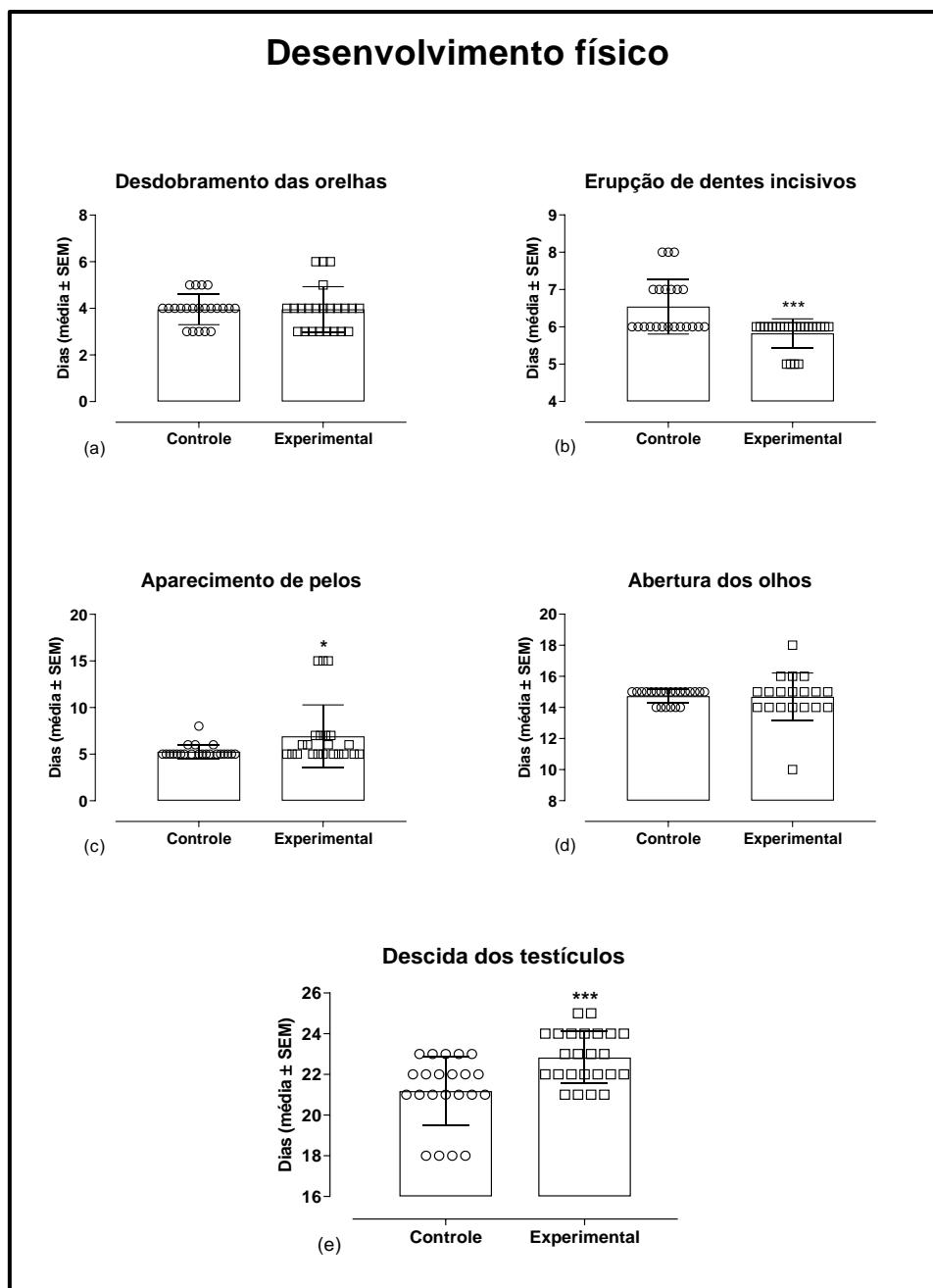
Figura 7. Peso corporal da prole de ratas submetida (grupo experimental) ou não (grupo controle) à limitação das condições do ninho durante a lactação até o DPN31.



Legenda: (a) Comparação entre os dias de observação; (b) comparação entre os grupos. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para análise entre os dias de observação (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) e pelo teste de comparações múltiplas de Sidak para comparação entre os grupos \*  $p < 0,05$ ). N = 12/grupo.

A Fig. 8 ilustra o desenvolvimento físico da prole masculina de ratas dos grupos controle e experimental. O dia médio de erupção dos dentes incisivos dos animais do grupo experimental adiantou ( $t = 4,05$ ,  $df = 31,44$ ,  $p = 0,0003$ , Fig.6b), enquanto o aparecimento de pelos retardou ( $t = 2,22$ ,  $df = 2281$ ,  $p = 0,04$ , Fig. 6c) em relação ao grupo controle. Ainda, observou-se retardo no dia médio de descida dos testículos dos animais do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle ( $t = 3,69$ ,  $df = 36,69$ ,  $p = 0,0007$ ). Não houve diferenças significantes nos dias médios de desdobramento de orelhas ( $t = 0,008$ ,  $df = 43$ ,  $p = 0,99$ , Fig. 6a) e de abertura dos olhos ( $t = 0,13$ ,  $df = 39$ ,  $p = 0,90$ , Fig.6d).

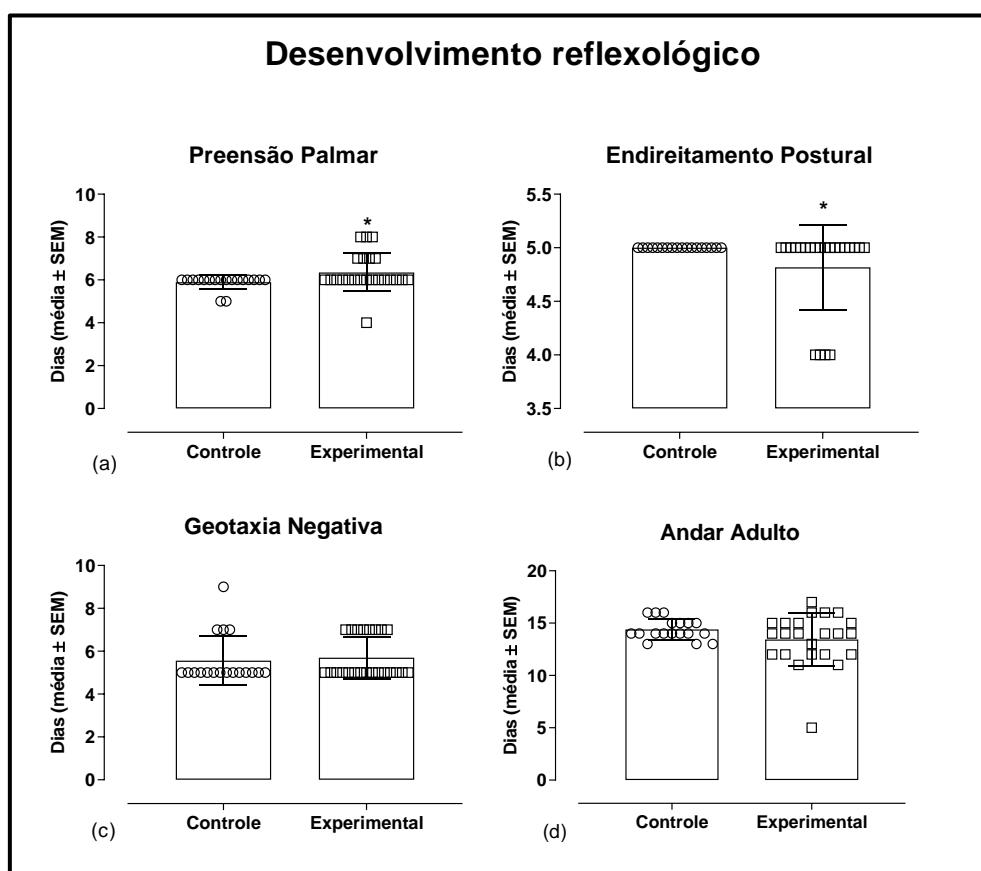
Figura 8. Desenvolvimento físico da prole masculina de ratos dos grupos controle e do grupo experimental.



Legenda: ratos do grupo controle (ratos com a quantidade padrão de maravilha do ninho) e do grupo experimental (ratos com redução da maravilha do ninho). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, bem como os valores individuais. Os parâmetros representados pelas letras são: (a) desdobramento das orelhas; (b) erupção de dentes incisivos; (c) aparecimento de pelos; (d) abertura dos olhos; e (e) descida dos testículos. N = 26/23/grupo. Teste t não pareado com correção de Welch. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ . Fonte: Mendes-Lima, 2020

A Fig. 9 ilustra os parâmetros do desenvolvimento reflexológico e o dia de andar adulto da prole masculina de ratas dos grupos controle e experimental. Nota-se que o dia médio para o desenvolvimento do reflexo de preensão palmar foi maior nos animais do grupo experimental em relação àqueles do grupo controle ( $t = 2,30$ ,  $df = 29,06$ ,  $p = 0,03$ ); no entanto, o dia médio para o desenvolvimento do reflexo de endireitamento foi adiantado ( $t = 2,16$ ,  $df = 21$ ,  $p = 0,04$ ) no grupo experimental em relação ao grupo controle. Tanto no desenvolvimento do reflexo de geotaxia ( $t = 0,42$ ,  $df = 39$ ,  $p = 0,69$ ), bem como no dia de andar adulto, não foram observadas diferenças entre os grupos ( $t = 1,67$ ,  $df = 29,96$ ,  $p = 0,11$ ).

Figura 9. Desenvolvimento reflexológico da prole masculina de ratos dos grupos controle e experimental.

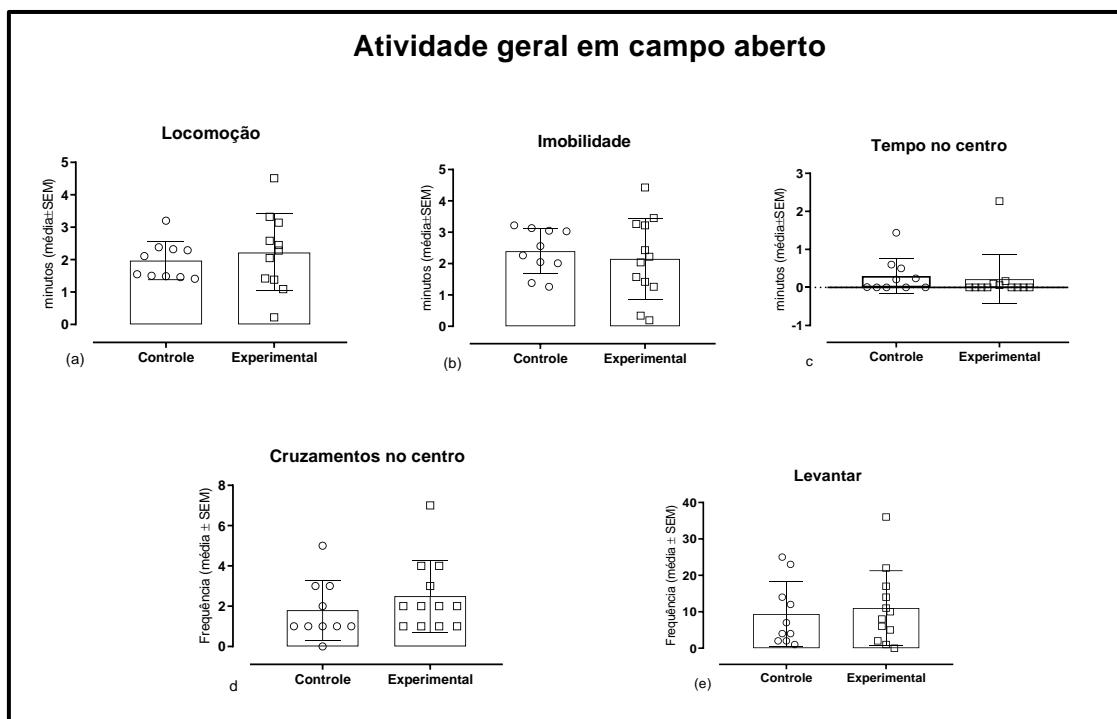


Legenda: ratos do grupo controle (em gaiolas com a quantidade padrão de maravalha do ninho) e do grupo experimental em gaiolas com redução da maravalha do ninho). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, bem como os valores individuais. (a) preensão palmar; (b) endireitamento postural; (c) geotaxia negativa; e (d) dia de andar adulto. N = 22/23 grupo. Teste t não pareado com correção de Welch. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Fonte: Mendes-Lima, 2020.

A Fig.10 ilustra a atividade geral da prole masculina de ratas dos grupos controle e experimental. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos. Os resultados da análise estatística estão mostrados na Tabela 4.

Um dado interessante foi a variabilidade observada no comportamento dos animais no campo aberto. Assim, uma análise de pontos fora da curva mostrou que, no tempo e frequência de centro, os dados de 2 animais do grupo experimental estavam fora da curva. Nos demais parâmetros observados no campo aberto não foram identificados pontos fora da curva. Sendo assim, procedemos em todos os parâmetros a retirada dos dados de 2 animais do grupo experimental de forma a manter a coerência dos dados. No entanto, mesmo assim, a análise estatística não mostrou diferenças entre os grupos em todos os parâmetros do campo aberto, sendo apresentados todos os dados obtidos na figura abaixo.

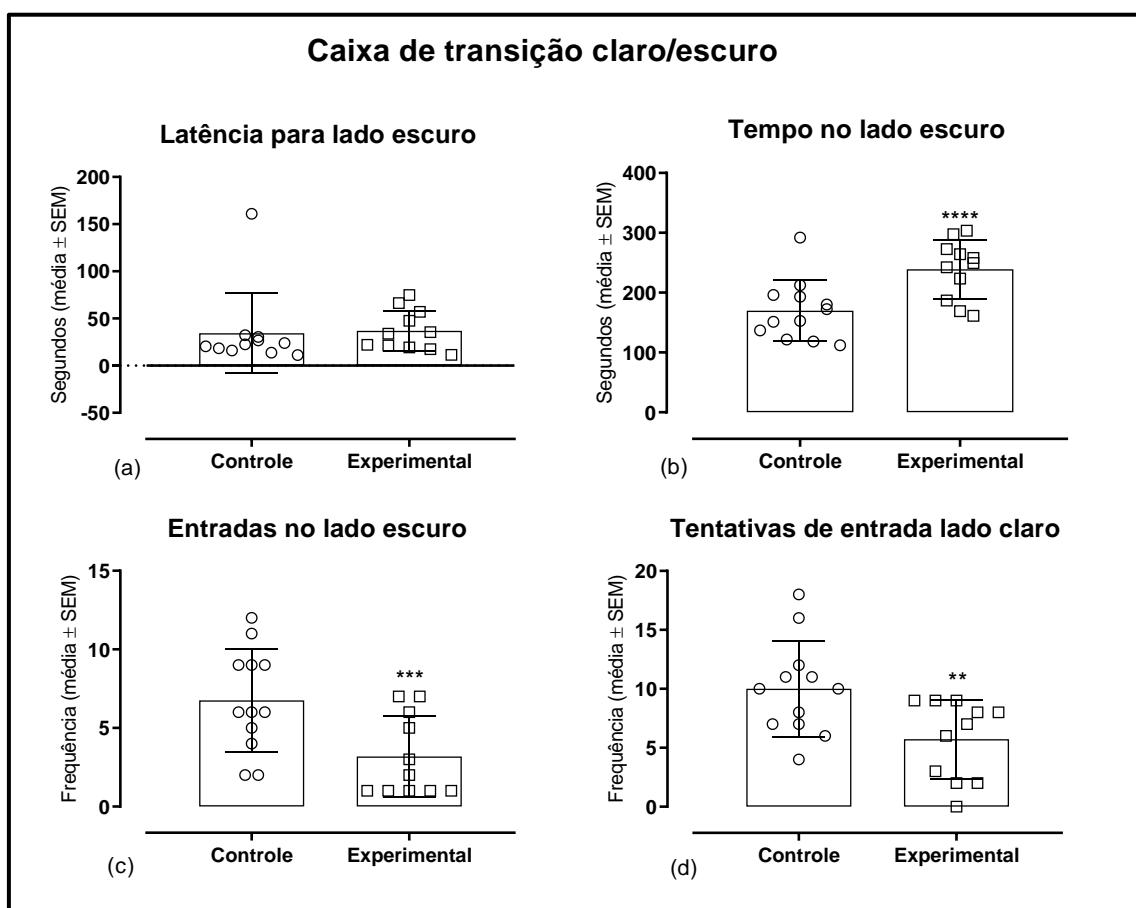
Figura 10. Atividade geral observada em campo aberto da prole masculina de ratos dos grupos controle e experimental.



Legenda: ratos do grupo controle (em gaiolas com a quantidade padrão de maravalha do ninho) e do grupo experimental (em gaiolas com redução da maravalha do ninho). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, bem como os valores individuais. (a) tempo de locomoção; (b) tempo de imobilidade; (c) tempo no centro; (d) cruzamentos no centro; e (e) freqüência de levantar. N = 10-11/grupo. Teste t de Student não pareado. Fonte: Mendes-Lima, 2020

Na caixa de transição claro/escuro (Fig.11) observou-se, no grupo experimental, aumento no tempo de permanência no compartimento escuro e redução na frequência de entradas no compartimento escuro, bem como nas tentativas de entrar no compartimento claro, quando ao grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os dois grupos na latência para entrada no compartimento escuro. Os resultados da análise estatística estão mostrados na Tabela 4.

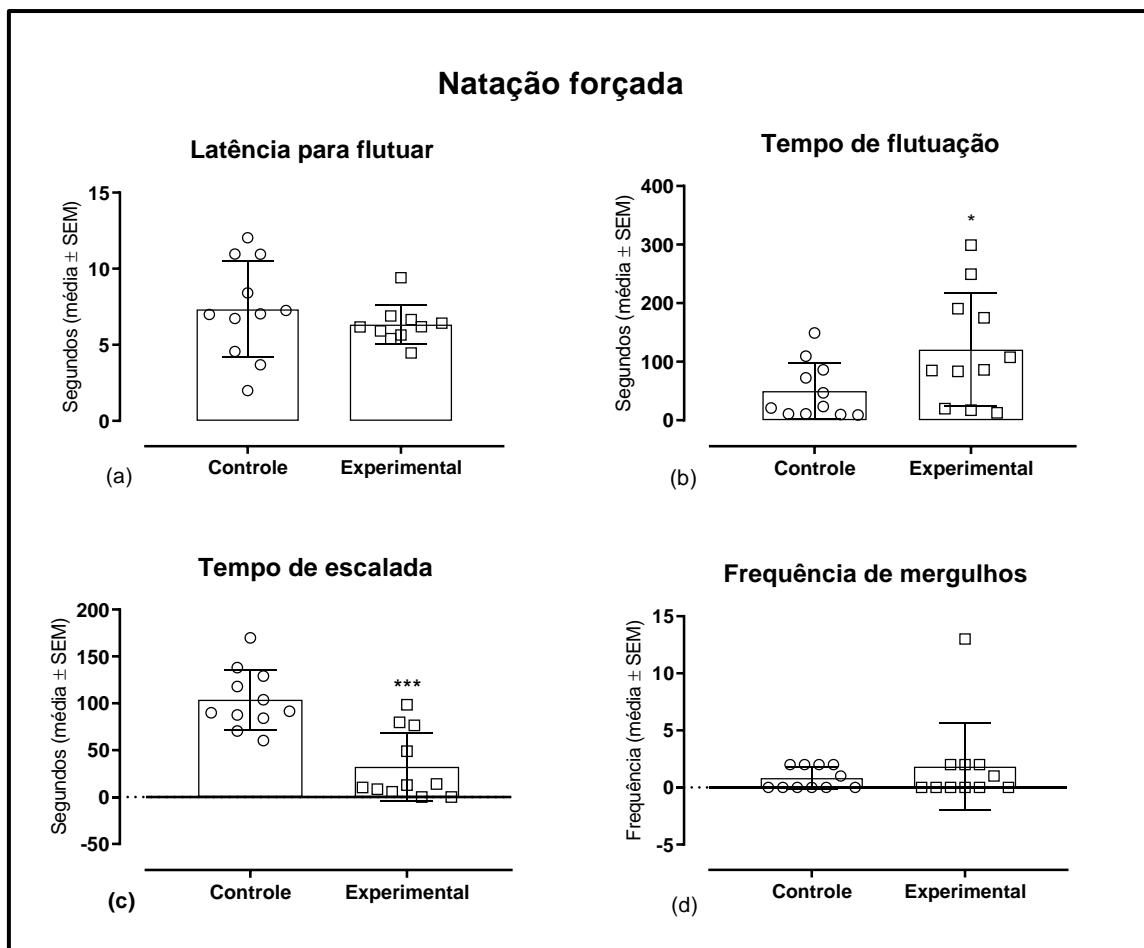
Figura.11. Comportamento em caixa de transição claro/escuro da prole masculina de ratos dos grupos controle e experimental.



Legenda: ratos do grupo controle (ratos com a quantidade padrão de maravilha do ninho) e do grupo experimental (ratos com redução da maravilha do ninho). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão bem como os valores individuais. (a) latência para entrada no lado escuro; (b) tempo no lado escuro; (c) frequência de entradas no lado escuro; e (d) frequência de tentativas de entradas no lado claro. N = 10-12/grupo. Teste t de Student não pareado, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001. Fonte: Mendes-Lima, 2020

No teste de natação forçada (Fig.12) verificou-se que houve aumento significante no tempo de flutuação e redução no tempo de escalada dos animais do grupo experimental em relação aqueles do grupo controle. Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos na latência para flutuar e na frequência de mergulhos. Os resultados da análise estatística estão mostrados na Tabela 4.

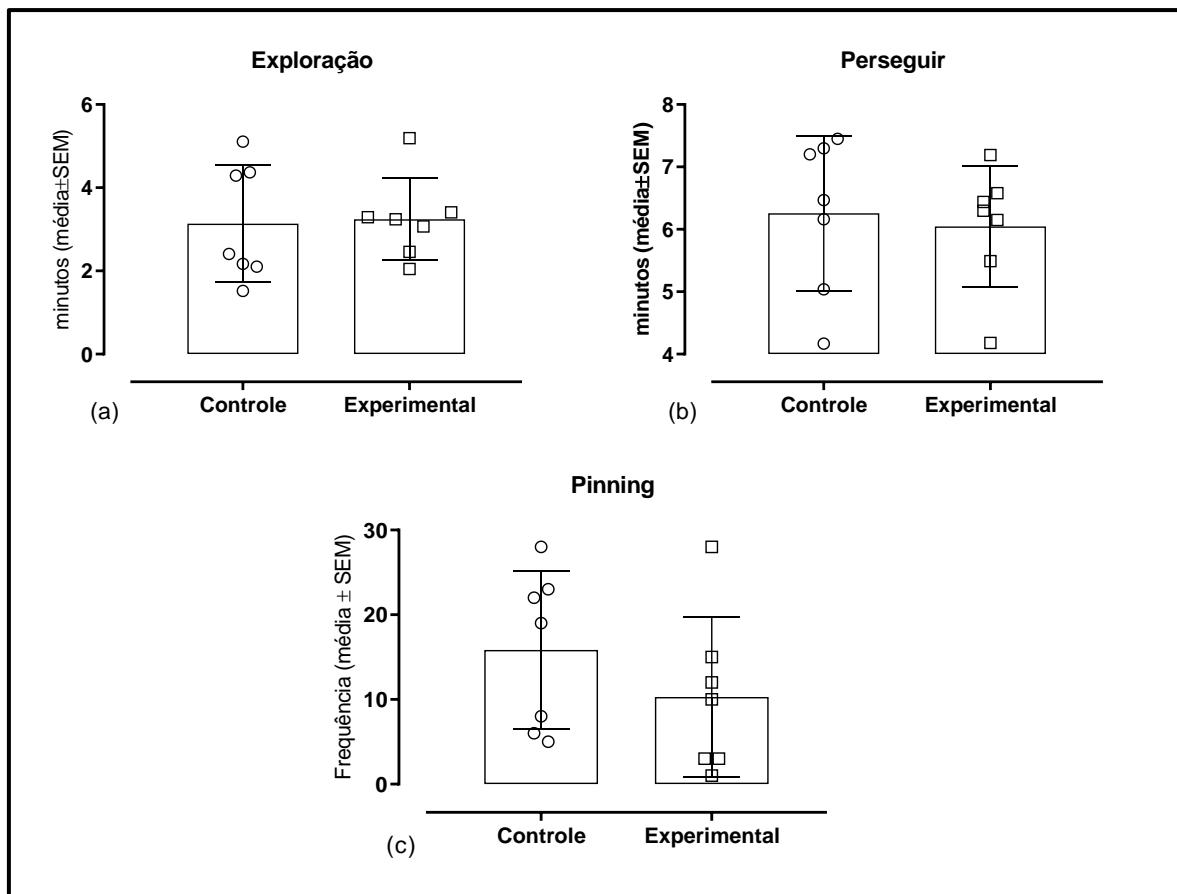
Fig.12.Comportamento da prole no teste de natação forçada.



Legenda: ratos do grupo controle (gaiolas com a quantidade padrão de maravalha do ninho) e do grupo experimental (gaiolas com redução da maravalha do ninho) São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, bem como os valores individuais. (a) latência para flutuar; (b) tempo de flutuação; (c) tempo de escalada; e (d) frequência de mergulhos. N =10-11/grupo. Teste t não pareado, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0,001. Fonte: Mendes-Lima, 2020

No comportamento social (Fig.13) não foram observadas diferenças significantes entre os parâmetros dos grupos experimental e controle. Os resultados da análise estatística estão mostrados na Tabela 4.

Figura 13. Comportamento social da prole masculina de ratas dos grupos controle e experimental.



Legenda: ratos do grupo controle (gaiolas com a quantidade padrão de maravalha do ninho) e do grupo experimental gaiolas com redução da maravalha do ninho). São apresentadas as médias e os respectivos erros-padrão, bem como os dados individuais. (a) tempo de exploração; (b) tempo de perseguir; e (c) frequência de *pinning*. N =7/grupo. Teste t não pareado. Fonte: Mendes-Lima.

Tabela 4. Resultados da análise estatística dos comportamentos na idade juvenil. Teste t de Student.

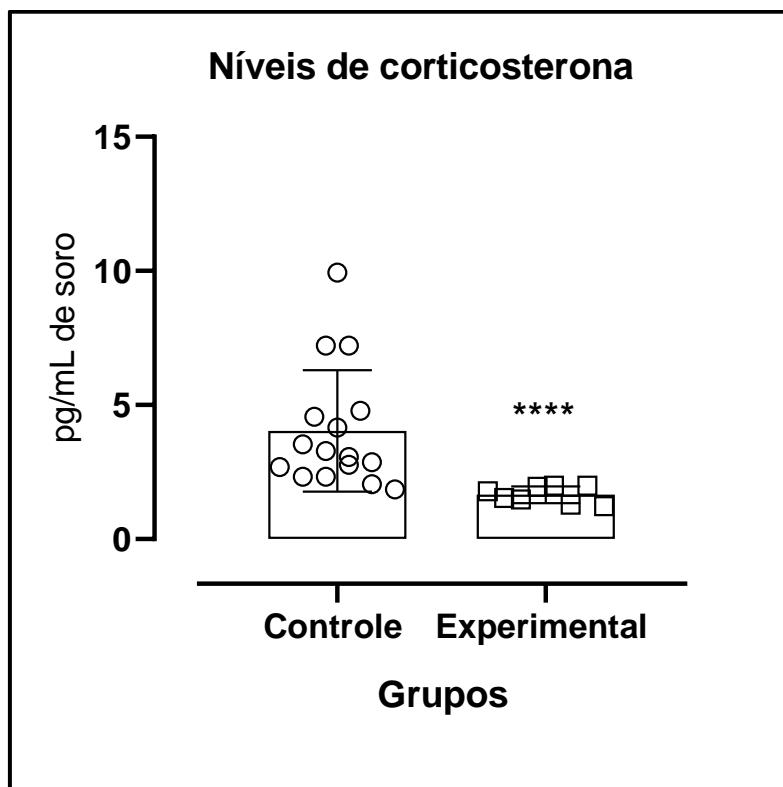
<b>Atividade geral em campo aberto</b>					
	Locomoção (min)	Imobilidade (min)	Tempo ne centro (min)	Nº de cruzamentos no centro	Frequência de levantar
t	0,60	0,53	0,34	0,99	0,39
df	19	20	20	20	20
p	0,55	0,60	0,74	0,33	0,70
<b>Natação forçada</b>					
	Latência para flutuar (seg)	Tempo de flutuação (seg)	Tempo de escalada(seg)	Frequência de mergulhos*	
t	0,94	2,18	4,87	0,84	
df	19	20	20	11,32	
p	0,36	0,04	< 0,0001	0,41	
<b>Caixa de transição claro/escuro</b>					
	Latência para compartimento escuro (seg)	Tempo no compartimento escuro (seg)	Frequência de entradas no compartimento escuro	Freq.. tentativas de entradas no compartimento claro	
t	0,07	3,33	2,89	2,74	
df	20	20	20	20	
p	0,94	0,003	0,009	0,01	
<b>Comportamento social</b>					
	Tempo de Exploração (min)	Tempo de perseguir (min)	Frequência de <i>Pinning</i>		
t	0,16	0,35	1,11		
df	12	12	12		
p	0,87	0,73	0,29		

- Teste t com correção de Welch. Df- graus de liberdade; p= valores da probabilidade.

Fonte: Mendes -lima, 2020

A fig. 14 ilustra os níveis de corticosterona da prole de ratos do grupo controle e experimental. O teste U de Mann-Whitney mostrou que os níveis de corticosterona séricos dos animais do grupo experimental foram menores do que daqueles do grupo controle ( $U < 0,0001$ ).

Fig. 14. Níveis de corticosterona sérica da prole de ratas dos grupos controle e experimental.



Legenda: ratas do grupo controle (ratas com a quantidade padrão de maravilha do ninho) e do grupo experimental (ratas com redução da maravilha do ninho). Teste U de Mann-Whitney. São apresentadas as medianas e respectivos limites bem como os valores individuais. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Fonte: Mendes-Lima, 2020

## 5. DISCUSSÃO

O modelo de LCN foi estabelecido uma vez que recapitula elementos das condições pós-natais humanas em que a mãe está presente, mas fornece cuidados maternais reduzidos à prole em um ambiente empobrecido (149) (150). Neste modelo, observou-se que a limitação das mães em construir um ninho para seus filhotes levou a um repertório anormal de comportamentos nutricionais (129), possivelmente como resultado do estresse crônico e da leve ansiedade das mães (150). Assim, é relatado que o prejuízo do comportamento materno promovido pela LCN produz estresse crônico nos filhotes, tornando-se ferramenta útil para estudar os mecanismos e as consequências da experiência de estresse na primeira infância da prole (150).

Os presentes resultados mostram que a LCN durante a lactação reduziu a viabilidade da prole de ratas, melhorou a qualidade do comportamento materno no ninho e não afetou o comportamento maternal voltado aos filhotes. No entanto, as fêmeas lactantes apresentaram aumento tanto na frequência como no tempo total de *auto-grooming*, sendo que sua atividade geral observada em campo aberto não foi modificada.

Os presentes resultados mostram que os escores da mãe em relação ao ninho aumentaram no grupo experimental durante toda a lactação e, por meio da observação direta, notou-se que as fêmeas acumulavam toda a maravilha sobre os filhotes, provavelmente para manter a temperatura deles. No entanto, com a progressão da lactação, notou-se que, embora os escores das mães do ninho fossem altos, as fêmeas deixavam de cuidar de alguns filhotes e, com isto, estes não sobreviveram.

Por outro lado, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos controle e experimental no comportamento maternal voltado aos filhotes, mostrando que, apesar da redução das condições do ambiente na gaiola, as fêmeas cuidaram apropriadamente da prole. Os resultados concordam ainda com a ausência de modificações no comportamento maternal das ratas do grupo experimental, e com o fato de que não houve alterações no peso dos animais durante a lactação: somente foi observada redução no peso corporal após o desmame, mostrando que as fêmeas amamentaram sua prole de maneira a prover seu desenvolvimento ponderal normal. No entanto, as ratas do grupo

experimental apresentaram maior frequência e tempo de auto-*grooming*, além de aumento dos níveis séricos de corticosterona.

MOUSSAQUI et al. ((129) apresentaram resultados similares em que a exposição à LCN do DPN2 ao DPN10 aumentou o tempo gasto na construção do ninho e o tempo que os filhotes ficaram no ninho e do auto-*grooming* das mães. Por outro lado, Ivy et. al (150) observaram que a exposição à LCN do DPN2 ao DPN 9 modificou tanto a quantidade como a qualidade do cuidado maternal, sendo sua prole profundamente influenciada pela restrição da maravalha. Assim, ocorreu redução significante no lamber/limpar os filhotes pelas mães e menor frequência em recolher os filhotes. Estas ratas apresentaram aumento da ansiedade em campo aberto, além de maiores níveis de corticosterona plasmática e do peso das adrenais materna, sugerindo estresse crônico materno. Estas diferenças entre os presentes resultados e os destes autores, provavelmente, devem-se aos períodos de exposição à LCN, uma vez que, no nosso experimento, ele foi feito durante toda a lactação e destes autores até o DPN9.

As fêmeas submetidas à LCN apresentaram aumento do auto-*grooming*. Uma vez que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal modula a expressão do auto-*grooming*, em especial pelos hormônios relacionados ao estresse e, que se verificou aumento dos níveis de corticosterona materno, no presente trabalho pode-se inferir que as fêmeas do grupo experimental, devido à LCN, estivessem sob estresse. Portanto, no presente trabalho, a prole das ratas submetidas à LCN estava sob uma condição de estresse pós-natal.

A observação dos parâmetros do desenvolvimento da prole mostrou que a LCN promoveu alterações tanto nos dias de ocorrência dos parâmetros físicos como de reflexos. Assim, nos parâmetros de desenvolvimento físico houve adiantamento no dia de erupção dos dentes incisivos e retardos nos dias de aparecimento de pelos e descida dos testículos.

Stanley Cohen e seu grupo, na década de 1960, identificaram um componente ativo na glândula submandibular de camundongos machos, o fator de crescimento epidérmico (EGF) que, ao ser injetado em filhotes de camundongos, produzia adiantamento da abertura dos olhos e da erupção dos dentes incisivos (151). Posteriormente, o EGF foi identificado em outros tecidos (glândulas de Brune do duodeno e nos túbulos contorcidos distais do rim) e em

fluidos corporais (saliva, líquido amniótico e leite). Nos dentes incisivos e molares de camundongos também foi detectada a presença de EGF expressa na papila dental e células epiteliais dos órgãos do esmalte no 17º dia da gestação, que corresponde ao estágio pré-eruptivo (152).

O EGF, por meio de seu receptor, estimula a proliferação de células epiteliais e mesenquimais e a diferenciação celular *in vivo* e *in vitro* ((153). Além disto, o EGF afeta as funções celulares, como a síntese de macromoléculas e a reabsorção óssea (154) (155). Um dado intrigante acerca dos efeitos em tecidos e células que apresentam redução da atividade do receptor de EGF é que a resposta eliciada por vários tratamentos são muito similares ao excesso de EGF (156) (157) (158).

Calamandrei e Alleva, em 1989 (159) estudaram as propriedades do fator de crescimento EGF comparados ao fator de crescimento nervoso (NGF) no desenvolvimento neonatal de camundongos. Os autores verificaram que a administração do EGF acelerava o desenvolvimento da abertura dos olhos e da erupção dos dentes incisivos. O EGF é produzido localmente na hipófise anterior e hipotálamo e estimularia estas áreas *in vivo* e *in vitro* (160) (161) (162). Aumento dos níveis de corticosterona, por *feedback*, reduzem a produção hipofisária do EGF na dependência do tipo de estresse (163). Um fato importante neste trabalho é que o EGF, bem como outros fatores bioativos (164) são liberados pelo leite materno (165). Uma vez que as fêmeas do grupo experimental submetidas à LCN apresentaram aumento dos níveis de corticosterona, é possível sugerir que o adiantamento do dia da erupção dos dentes incisivos e retardo no desenvolvimento de pelos possam ser resultado tanto da redução quanto do aumento no leite materno dos níveis de EGF. Para confirmar esta hipótese serão necessários estudos complementares.

A descida dos testículos depende de fatores hormonais e de fatores do crescimento, em particular do EGF. Já foram sugeridos vários fatores na modulação da descida dos testículos como, por exemplo, o EGF, calcitonina, o gene relacionado a peptídeos (CGRP), o gene Hoxa-10 e hormônios, especialmente andrógenos, e o fator 3- de insulina (166).

O estresse materno pré-natal retarda a descida dos testículos associado à redução dos níveis de testosterona (167) (168) (169). Ainda, a administração na lactação de dexametasona retarda a puberdade e prejudica as funções

reprodutivas por alterar a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG), reduzindo os níveis séricos dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) (170).

Alterações no EGF materno podem estar também envolvidas com o retardo da descida dos testículos e desenvolvimento do epidídimos (171) e revertendo os efeitos de anti-andrógenos (172).

Os presentes resultados mostrando retardo no dia de descida dos testículos dos ratos do grupo experimental sugerem que o estresse materno induzido pela LCN possa ter reduzido tanto fatores hormonais como o EGF. Ainda, reforça a premissa de que o adiantamento do dia de erupção dos dentes incisivos e o retardo do dia de desenvolvimento dos pelos possam também ser consequência da redução do EGF no leite materno induzido pelo estresse pós-natal.

Para avaliação adequada da interferência de fatores exógenos no desenvolvimento, além dos aspectos físicos, devem ser consideradas possíveis alterações fisiológicas em um sistema específico, ou em um organismo como um todo. Desse modo, o tempo de aparecimento das respostas reflexológicas é um parâmetro empregado para detectar os efeitos de fatores ambientais na maturação do sistema nervoso (173).

Na análise do desenvolvimento dos reflexos, os filhotes de mães submetidas à LCN mostram atraso no teste de preensão palmar quando comparados àqueles do grupo controle. Este reflexo corresponde ao observado em humanos, denominado Reflexo de Babinsky, ou sinal de Babinsky, um reflexo primitivo utilizado para a detecção precoce de bebês humanos com anormalidades no neurodesenvolvimento. Este reflexo é considerado um sinal indicativo de encefalopatia grave quando está presente após o sexto mês de vida de um bebê, quando há ainda oponência de polegar ou ainda se está ausente desde o nascimento (174). Este reflexo ocorre em recém-nascidos e lactentes prematuros devido ao controle insuficiente do mecanismo espinhal pelo cérebro imaturo, mas os reflexos gradualmente desaparecem com a idade devido ao aumento da inibição que acompanha o cérebro maturação (175). Portanto, os presentes resultados mostrando retardo do reflexo de preensão palmar dos filhotes do grupo experimental sugere que a LCN promoveu retardo na maturação cerebral destes animais.

Observou-se, ainda, adiantamento do reflexo de endireitamento dos filhotes do grupo experimental. O reflexo de endireitamento, conhecido como reflexo de endireitamento labiríntico, é um reflexo que corrige a orientação do corpo quando não está na sua posição vertical normal. O sistema vestibular é responsável pela detecção quando o corpo não está ereto e faz com que a cabeça volte a se posicionar à medida que o resto do corpo o segue. O reflexo usa uma combinação de entradas do sistema visual, entradas vestibulares e entradas somatossensoriais para fazer ajustes posturais quando o corpo se desloca de sua posição vertical normal. Além disto, Secher et al. (176) descrevem que este teste é importante para avaliar a capacidade sensório-motora-cerebelar e o adiantamento, aqui observado, pode indicar um maturação mais rápida desse órgão.

Há ainda evidências de que o cerebelo está envolvido na cognição e emoção. Neste sentido, Miki et al.(177) mostraram que a privação materna repetida, um potente estressor para ratos recém-nascidos antes do desmame, produziu na prole aumento transitório do sistema neurotrófico e a expressão de moléculas associadas à mielina no cerebelo. Estas alterações poderiam levar à mielinização precoce com consequentes déficits funcionais e cognitivos em períodos mais tardios da vida do animal. É, pois, possível, que os animais do grupo experimental possam ter dificuldades em termos de ajustes posturais e cognitivos, sendo necessários estudos complementares para investigar este aspecto.

A atividade geral observada em campo aberto não foi modificada pela exposição à LCN durante a lactação. Este modelo foi inicialmente desenvolvido para a avaliação da emocionalidade por Calvin Hall, em 1934, frente a um ambiente novo(178). A exposição ao campo aberto para medida de emocionalidade é feita em condições de alta intensidade de luz e, por vezes, de altos níveis de som tendo, portanto, conotações aversivas. Modificações na contingência experimental foram propostas, em 1981, por Bernardi e colaboradores (179), retirando-se o estímulo sonoro e reduzindo a luminosidade ambiental, fato que permitiu que os ratos emitissem comportamento exploratório/motor em detrimento àqueles de natureza emocional. Desta forma, os filhotes das ratas que foram observados neste aparelho, nesta última condição, passaram a expressar outros tipos de comportamento, quais sejam, o

exploratório e o motor (179) (180). Desta forma, pode-se inferir que, quando da exposição durante a lactação, a LCN não modificou a atividade exploratória/motora dos animais, o que corrobora com a ausência de alterações no dia de andar adulto. No entanto, foi observada alta variabilidade nos resultados referentes ao tempo e à frequência de centro, parâmetros relacionados à ansiedade. É possível que os animais cujos valores estavam fora da curva apresentassem sensibilidade diferenciada às condições em que foram cuidados.

Os resultados no teste de transição em caixa claro/escuro revelaram que a exposição à LCN durante a lactação promoveu comportamento tipo-ansiedade nos animais do grupo experimental. De fato, esses animais ficaram mais tempo no compartimento escuro da caixa e, em consequência, entraram menos neste compartimento. Ainda, observou-se menor número de tentativas de entrar no compartimento claro. Este cenário reflete a ocorrência de comportamento tipo-ansioso nos animais do grupo experimental.

No teste de natação forçada, o tempo de flutuação corresponde ao tempo de duração de imobilidade dos animais, sendo esse parâmetro denominado de *behavioral despair*, ou desespero comportamental, e pode ser considerado como uma resposta depressiva à impossibilidade de escapar (181). Neste sentido, a administração de antidepressivos reduz a latência para flutuar, bem como o tempo de flutuação (182). Os ratos do grupo experimental apresentaram maior tempo de flutuação e redução no tempo de escalada em relação àqueles do grupo controle. Desta forma, a exposição à LCN durante a lactação promoveu comportamento tipo-depressivo nos animais do grupo experimental.

É amplamente conhecido que as características fisiológicas e comportamentais de um indivíduo são determinadas por interações complexas entre seus genes ("nature") e suas experiências/ambiente ("nurture"). O período perinatal, infância e puberdade são períodos de grande neuroplasticidade e, portanto, o cérebro é particularmente sensível à remodelação por fatores ambientais (58). A exposição à adversidades como estresse ou privação materna no início da vida pode "programar" ou "imprimir" alterações neuroendócrinas persistentes, alterações comportamentais e metabólicas (183) (184)(185). Esta programação pode ser considerada adaptativa, permitindo que um organismo se adapte e lide com condições desfavoráveis (186) (58).

Neste trabalho, é importante lembrar que o rato nasce imaturo quando comparado ao ser humano, particularmente com relação ao sistema nervoso central, cuja maturação ocorre pós-natalmente (187)(188). Portanto, a exposição ao estresse materno pós-natal à LCN, neste trabalho, pode ter alterado a programação perinatal do desenvolvimento do sistema nervoso central e levado aos prejuízos comportamentais observados.

Embora não se tenha observado alterações no cuidado materno com a exposição à LCN, como já discutido, as fêmeas apresentaram sinais de aumento de estresse. Neste sentido, a presença da mãe durante o período pós-natal é crucial para manter a atividade normal do eixo hipotálamo-hipófise adrenal (eixo HPA) (189) (190). Em geral, a presença da mãe resulta em menores níveis de atividade do eixo HPA de sua descendência (191) (192) (193).

Durante as primeiras 2 semanas de vida, os filhotes apresentam redução da reatividade do eixo HPA em resposta a estressores, denominado período hiporresponsivo ao estresse (194). Ambientes desfavoráveis na primeira infância neste período, por exemplo quando separados os filhotes de suas mães, promovem consequências neuroendócrinas e comportamentais duradouras similares àquelas observadas na prole exposta ao estresse pré-natal (195) (196).

Assim, roedores expostos tanto pré como pós-natalmente ao estresse por privação materna mostraram aumento de respostas neuroendócrinas ao estresse, aumento dos níveis de ansiedade e comportamentos tipo depressivo (58). Ainda, Machado et al. (197) observaram que a LCN entre os dias 2 e 9 da lactação promoveu aumento da comportamento tipo ansiedade na idade adulta. Os presentes resultados corroboram com estes achados, porém, mostram que tanto o aumento da ansiedade como do comportamento tipo depressivo já ocorrem em período muito mais precoce da vida dos animais, ou seja, aos 31 dias de idade.

Por outro lado, os níveis de corticosterona sérica dos animais do grupo experimental foram menores de forma significante quando comparados aos daqueles do grupo controle.

Estes últimos resultados podem ser atribuídos ao fato de que os filhotes do grupo experimental seriam resilientes em suas respostas ao estresse quando comparados ao grupo controle. Segundo Muresan;Georgescu(198) resiliência seria um processo de boa adaptação em face de adversidades, traumas,

tragédias, ameaças ou motivos significativos de estresse. Pessoas resilientes apresentam respostas adaptativas aos agentes estressores e, dificilmente, desenvolvem doenças associadas ao estresse crônico. Os fatores determinantes para a expressão da resiliência ao estresse são, na atualidade, foco de interesse da literatura, pois significam um efeito protetor e de estratégia eficiente de enfrentamento do estresse (199). Uma resposta apropriada ao estresse envolve a coordenação da atividade do sistema nervoso autônomo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, bem como dos circuitos neurais no hipotálamo, tronco cerebral e cérebro anterior que controlam sua atividade (200). Transtornos relacionados ao estresse e reatividade/respostas de resiliência podem ser consideradas produtos da atividade coordenada do cérebro e inúmeros sistemas corporais (201).

Estudos em animais investigando o mecanismo e os fundamentos da resiliência relacionados ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal têm focado em modelos de estresse no desenvolvimento (202) (203).

O eixo HPA passa por grandes mudanças na sua capacidade secretora e ativação por estressores durante toda a vida útil de muitas espécies animais. Em ratos e camundongos, a maturação do eixo HPA e a conclusão do processo de maturação do eixo HPA em ratos e camundongos ocorrem durante o período pós-natal (204). A exposição ao estresse durante a lactação pode, então, ter interferido com esta maturação ((205), desregulando o eixo HPA. Assim, os filhotes de ratas expostas à LCN podem ter se tornado resilientes ao estresse durante a lactação.

A depressão e ansiedade são comorbidades que ocorrem em 25% de pacientes com depressão (206). Em ratos também são observadas estas comorbidades (207). É bastante frequente que, em modelos animais de depressão, ocorram também ansiedade e aumento dos níveis de corticosterona (208) (209)(210) (211).

No presente trabalho, foi observado que a exposição à LCN da prole de ratas promove comportamento tipo-depressivo e aumento do comportamento tipo- ansiedade, porém os níveis de corticosterona sérica mostram-se reduzidos.

A depressão e ansiedade são doenças produzidas por diferentes alterações no sistema nervoso central, em particular na serotonina. Esse

neurotransmissor é reduzido tanto na depressão como na ansiedade (212) (213) (214).

Embora no presente trabalho não tenham sido avaliados os níveis de neurotransmissores centrais, em particular da serotonina em áreas relacionadas ao estresse e depressão, pode-se especular que a exposição à LCN possa ter reduzido os níveis de serotonina nos animais do grupo experimental. Essas reduções podem ter resultado em comportamentos tipo-depressivo e aumento do tipo ansiedade, independentemente dos níveis de corticosterona. Por ser essa hipótese apenas especulativa, serão necessários experimentos adicionais para confirmá-la.

## 6.CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluindo, os presentes resultados revelaram que fêmeas lactantes submetidas à LCN apresentaram melhores escores de qualidade do ninho, nenhuma modificação no comportamento maternal voltado aos filhotes, porém aumento no *grooming*, o qual foi interpretado como consequência de estresse maternal e correlacionado com aumento dos níveis séricos de corticosterona. Ainda, foi verificada menor porcentagem de sobrevivência da prole expostas à LCN. A prole masculina de ratos submetida à LCN apresentou prejuízos no desenvolvimento físico e de reflexos, sugerindo interferência com fatores de crescimento. Na idade juvenil, a prole masculina de ratas expostas à LCN apresentou menor peso corporal, refletindo menor desenvolvimento físico, comportamento tipo-ansiedade e tipo-depressivo, bem como redução dos níveis séricos de corticosterona. Diante destes dados, propõe-se que a LCN promoveu estresse materno, o qual produziu prejuízos na programação perinatal do desenvolvimento da prole e, em período precoce da vida desta prole, aumento de comportamento tipo-ansiedade e de comportamento tipo-depressivo e resiliência ao estresse.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Dulac C, O'Connell LA, Wu Z. Neural control of maternal and paternal behaviors. *Science* (80- ) [Internet]. 2014 Aug 15;345(6198):765–70. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1253291>
2. Kohl J, Autry AE, Dulac C. The neurobiology of parenting: A neural circuit perspective. *BioEssays*. 2017;
3. Sturman-Hulbe M. Maternal behavior in the albino rat. *J Comp Physiol*. 1929;9:203–37.
4. Wiesner BP, Sheard NM. Maternal behavior in the rat. WiesnerB. P. and SheardNorah M.. Pp. 244. Oliver and Boyd, Tweeddale Court, Edinburgh. 1933. *Endocrinology* [Internet]. 1933 Sep;17(5):590–590. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-17-5-590b>
5. Leblond CP, Nelson WO. Maternal behavior in hypophysectomized male and female mice. *Am J Physiol Content* [Internet]. 1937 Aug 31;120(1):167–72. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplegacy.1937.120.1.167>
6. Leblond CP. Extra-Hormonal Factors in Maternal Behavior. *Exp Biol Med* [Internet]. 1938 Feb 1;38(1):66–70. Available from: <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-38-9742>
7. Leblond CP. Nervous and Hormonal Factors in the Maternal Behavior of the Mouse. *Pedagog Semin J Genet Psychol* [Internet]. 1940 Dec;57(2):327–44. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08856559.1940.10534540>
8. Rosenblatt J, Siegel H, Mayer A. Progress in the study of maternal behavior in the rat: hormonal, nonhormonal, sensory, and developmental aspects. In: JS, Rosenblatt, J.S.Hinde R, Beer C, Busnel M., editors. *Advances in the study of behavior*. New York: Academic Press; 1979.
9. Beach FA, Conovitz MW, Steinberg F, Goldstein AC. Experimental

- Inhibition and Restoration of Mating Behavior in Male Rats. *J Genet Psychol* [Internet]. 1956 Dec;89(2):165–81. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00221325.1956.10534212>
10. Numan M. Maternal Behavior. In: *The Physiology of reproduction*. 1994. p. 1921–33.
  11. Numan M, Fleming A, Levy F. Maternal Behavior. In: KE, editor. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* [Internet]. Elsevier; 2006. p. 1921–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125154000500403>
  12. Teodorov E, Felício LF, Bernardi MM. Maternal Behavior. In: Andersen M, Tufick S, editors. *Animal models as Ethical tools in Biomedical Research*. Suiça: Springer International Publishing; 2016. p. 253–70.
  13. Magalhães JZ, Udo MSB, Sánchez-Sarmiento AM, Carvalho MPN, Bernardi MM, Spinosa HS. Prenatal exposure to fipronil disturbs maternal aggressive behavior in rats. *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 2015 Nov;52:11–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0892036215300349>
  14. Svare B, Mann M. Infanticide: genetic, developmental and hormonal influences in mice. *Physiol Behav* [Internet]. 1981 Nov;27(5):921–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031938481900627>
  15. McCarthy MM, Besmer HR, Jacobs SC, Keidan GMO, Gibbs RB. Influence of Maternal Grooming, Sex and Age on Fos Immunoreactivity in the Preoptic Area of Neonatal Rats: Implications for Sexual Differentiation. *Dev Neurosci* [Internet]. 1997;19(6):488–96. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/111246>
  16. Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. In: *Physiology and Behavior*. 2003. p. 359–71.
  17. Kromkhun P, Katou M, Hashimoto H, Terada M, Moon C, Saito TR. Quantitative and qualitative analysis of rat pup ultrasonic vocalization

- sounds induced by a hypothermic stimulus. *Lab Anim Res* [Internet]. 2013;29(2):77. Available from: <https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5625/lar.2013.29.2.77>
18. Brouette-Lahlou I, Vernet-Maury E, Vigouroux M. Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: pups' anogenital licking. *Behav Brain Res.* 1992;50(1–2):147–54.
  19. Roth LL, Rosenblatt JS. Mammary Glands of Pregnant Rats: Development Stimulated by Licking. *Science* (80- ) [Internet]. 1966 Mar 18;151(3716):1403–4. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.151.3716.1403>
  20. Serafim AP, Felicio LF. Reproductive experience influences grooming behavior during pregnancy in rats. *Brazilian J Med Biol Res.* 2002;35(3):391–4.
  21. Wade GN. Sex Hormones, Regulatory Behaviors, and Body Weight. In: *Advances in the Study of Behavior* [Internet]. 1976. p. 201–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065345408600856>
  22. Harding KM, Lonstein JS. Placentophagia in weanling female laboratory rats. *Dev Psychobiol.* 2014;
  23. Ricci EL, Bernardi MM, Górnjak SL, Spínosa HS. Behavioral teratogenicity induced by maternal food restriction: maternal cannibalism and poor reflex development in offspring. *Biotemas.* 2014 Jan;27(2):185.
  24. Schardein JL, Petrere JA, Hentz DL, Camp RD, Kurtz SM. Cannibalistic traits observed in rats treated with a teratogen. *Lab Anim* [Internet]. 1978 Apr;23;12(2):81–3. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/00236778780953080>
  25. Peters LC, Sist TC, Kristal MB. Maintenance and decline of the suppression of infanticide in mother rats. *Physiol Behav* [Internet]. 1991 Aug;50(2):451–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031938491900934>
  26. Mercer RT, Rubin R. Maternal Identity and the Maternal Experience. *Am J*

- Nurs. 1985;
27. Mousseau TA, Fox CW. The adaptive significance of maternal effects. *Trends in Ecology and Evolution*. 1998.
  28. Furuta M, Bridges RS. Effects of maternal behavior induction and pup exposure on neurogenesis in adult, virgin female rats. *Brain Res Bull*. 2009;
  29. Cramer CP, Thiels E, Alberts JR. Weaning in rats: I. Maternal behavior. *Dev Psychobiol* [Internet]. 1990 Sep;23(6):479–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dev.420230604>
  30. Serafim AP, Felicio LF. Dopaminergic modulation of grooming behavior in virgin and pregnant rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 2001;34(11):1465–70.
  31. Bridges RS. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2015 Jan;36:178–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091302214001071>
  32. Kinsley CH, Bardi M, Karelina K, Rima B, Christon L, Friedenberg J, et al. Motherhood induces and maintains behavioral and neural plasticity across the lifespan in the rat. *Arch Sex Behav* [Internet]. 2008 Feb [cited 2011 Sep 17];37(1):43–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18074214>
  33. Viltart O, Vanbesien-Mailliot CCA. Impact of Prenatal Stress on Neuroendocrine Programming. *Sci World J* [Internet]. 2007;7:1493–537. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2007/978404/abs/>
  34. Welberg LAM, Seckl JR. Prenatal Stress, Glucocorticoids and the Programming of the Brain. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2008 Jul 18;13(2):113–28. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2826.2001.00601.x>
  35. Bilbo SD, Schwarz JM. The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2012 Aug;33(3):267–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091302212000386>
  36. Evans NP, Bellingham M, Robinson JE. Prenatal programming of

- neuroendocrine reproductive function. *Theriogenology*. 2016.
37. Merlot E, Couret D, Otten W. Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2008 Jan;22(1):42–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159107001559>
  38. Sterling P, Eyer J. Allostasis: A New Paradigm to Explain Arousal Pathology. In: *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*. 1988. p. 629–649.
  39. Benton TG, Stearne SC. The Evolution of Life-histories. *J Anim Ecol* [Internet]. 1993 Oct;62(4):796. Available from: <https://www.jstor.org/stable/5403?origin=crossref>
  40. Via S, Lande R. Genotype-Environment Interaction and the Evolution of Phenotypic Plasticity. *Evolution (N Y)* [Internet]. 1985 May;39(3):505. Available from: <https://www.jstor.org/stable/2408649?origin=crossref>
  41. Banta JA, Richards CL. Quantitative epigenetics and evolution. *Heredity (Edinb)* [Internet]. 2018 Sep 6;121(3):210–24. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41437-018-0114-x>
  42. Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents [13]. *Nature*. 1936.
  43. Rivier C, Rivier J, Vale W. Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science*. 1986;231:607–9.
  44. Lovejoy DA, Jahan S. Phylogeny of the corticotropin-releasing factor family of peptides in the metazoa. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2006 Mar;146(1):1–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016648005003722>
  45. Lovejoy DA, Michalec OM. Evolution and Phylogeny of the Corticotropin-Releasing Factor Family of Peptides. In: *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*. 2017.
  46. Costa-Pinto FA, Cohn DWH, Sa-Rocha VM, Sa-Rocha LC, Palermo-Neto J. Behavior: A relevant tool for brain-immune system interaction studies. In:

- Annals of the New York Academy of Sciences. 2009. p. 107–19.
47. França K, Lotti TM. Psycho-Neuro-Endocrine-Immunology: A Psychobiological Concept. In: Advances in Experimental Medicine and Biology [Internet]. 2017. p. 123–34. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-56017-5\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-56017-5_11)
  48. Ader R. Developmental psychoneuroimmunology. Dev Psychobiol [Internet]. 1983 Jul;16(4):251–67. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dev.420160402>
  49. Ader R, Cohen N. Psychoneuroimmunology: Conditioning and Stress. Annu Rev Psychol. 1993;
  50. Ader R, Cohen N, Felten D. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. Lancet [Internet]. 1995 Jan;345(8942):99–103. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673695900667>
  51. Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology Meets Neuropsychopharmacology: Translational Implications of the Impact of Inflammation on Behavior. Neuropsychopharmacology [Internet]. 2012 Jan 14;37(1):137–62. Available from: <http://www.nature.com/articles/npp2011205>
  52. Phillips DI. Fetal growth and programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In: Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2001.
  53. Babenko O, Kovalchuk I, Metz GAS. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. Neurosci Biobehav Rev [Internet]. 2015 Jan;48:70–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763414003091>
  54. Morsi A, DeFranco D, Witchel SF. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Fetus. Horm Res Paediatr [Internet]. 2018;89(5):380–7. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/488106>

55. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of Disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal “programming” of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 Jun;3(6):479–88. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncpendmet0515>
56. Barker DJP. The Wellcome Foundation Lecture, 1994. The fetal origins of adult disease. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* [Internet]. 1995 Oct 23;262(1363):37–43. Available from: <http://www.royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.1995.0173>
57. Barker DJP, Bagby SP, Hanson MA. Mechanisms of disease: In utero programming in the pathogenesis of hypertension. *Nature Clinical Practice Nephrology*. 2006.
58. Maccari S, Krugers HJ, Morley-Fletcher S, Szyf M, Brunton PJ. The Consequences of Early-Life Adversity: Neurobiological, Behavioural and Epigenetic Adaptations. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2014 Oct;26(10):707–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jne.12175>
59. Ng PC. Effect of Stress on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Fetus and Newborn. *J Pediatr* [Internet]. 2011 Feb;158(2):e41–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347610009649>
60. Moisiadis VG, Matthews SG. Glucocorticoids and fetal programming part 1: outcomes. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2014 Jul 27;10(7):391–402. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrendo.2014.73>
61. Seckl JR. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2001 Dec;185(1–2):61–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720701006335>
62. Kim DR, Bale TL, Epperson CN. Prenatal Programming of Mental Illness: Current Understanding of Relationship and Mechanisms. *Curr Psychiatry Rep* [Internet]. 2015 Feb 24;17(2):5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11920-014-0546-9>
63. Gerardin DC., Bernardi M, Moreira EG, Pereira OCM. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an

- antiestrogen. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2006 Apr [cited 2011 Nov 29];83(4):618–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16650888>
64. Jia N, Li Q, Sun H, Song Q, Tang G, Sun Q, et al. Alterations of Group I mGluRs and BDNF Associated with Behavioral Abnormality in Prenatally Stressed Offspring Rats. *Neurochem Res* [Internet]. 2015 May 18;40(5):1074–82. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-015-1565-6>
65. Zohar I, Weinstock M. Differential Effect of Prenatal Stress on the Expression of Corticotrophin-Releasing Hormone and its Receptors in the Hypothalamus and Amygdala in Male and Female Rats. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2011 Apr;23(4):320–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2826.2011.02117.x>
66. Xu J, Yang B, Yan C, Hu H, Cai S, Liu J, et al. Effects of duration and timing of prenatal stress on hippocampal myelination and synaptophysin expression. *Brain Res* [Internet]. 2013 Aug;1527:57–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899313008925>
67. Guan L, Jia N, Zhao X, Zhang X, Tang G, Yang L, et al. The involvement of ERK/CREB/Bcl-2 in depression-like behavior in prenatally stressed offspring rats. *Brain Res Bull* [Internet]. 2013 Oct;99:1–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923013001378>
68. Moore CL, Power KL. Prenatal stress affects mother-infant interaction in norway rats. *Dev Psychobiol* [Internet]. 1986 May;19(3):235–45. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dev.420190309>
69. Dong E, Dzitoyeva SG, Matrisciano F, Tueting P, Grayson DR, Guidotti A. Brain-Derived Neurotrophic Factor Epigenetic Modifications Associated with Schizophrenia-like Phenotype Induced by Prenatal Stress in Mice. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2015 Mar;77(6):589–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322314006349>
70. Rubanzana W, Hedt-Gauthier BL, Ntaganira J, Freeman MD. Exposure to genocide and risk of suicide in Rwanda: a population-based case-control

- study. *J Epidemiol Community Health* [Internet]. 2015 Feb;69(2):117–22. Available from: <http://jech.bmjjournals.org/lookup/doi/10.1136/jech-2014-204307>
71. Sun H, Wu H, Liu J, Wen J, Zhu Z, Li H. Prenatal Stress Impairs Spatial Learning and Memory Associated with Lower mRNA Level of the CAMKII and CREB in the Adult Female Rat Hippocampus. *Neurochem Res* [Internet]. 2017 May 25;42(5):1496–503. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-017-2206-z>
  72. Moura CA, Oliveira MC, Costa LF, Tiago PRF, Holanda VAD, Lima RH, et al. Prenatal restraint stress impairs recognition memory in adult male and female offspring. *Acta Neuropsychiatr* [Internet]. 2020 Jun 29;32(3):122–7. Available from: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0924270820000034/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0924270820000034/type/journal_article)
  73. Weinstock M. Prenatal stressors in rodents: Effects on behavior. *Neurobiol Stress* [Internet]. 2017 Feb;6:3–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352289516300133>
  74. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* [Internet]. 2004 Aug 27;7(8):847–54. Available from: <http://www.nature.com/articles/nn1276>
  75. Numan M. Neural basis of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology*. 1988;13(1–2):47–62.
  76. Champagne FA, Curley JP, Keverne EB, Bateson PPG. Natural variations in postpartum maternal care in inbred and outbred mice. *Physiol Behav* [Internet]. 2007 Jun;91(2–3):325–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938407000959>
  77. Champagne FA, Weaver ICG, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ. Natural Variations in Maternal Care Are Associated with Estrogen Receptor -?? Expression and Estrogen Sensitivity in the Medial Preoptic Area. *Endocrinology*. 2003;144(11):4720–4.
  78. Zhang TY, Parent C, Weaver I, Meaney MJ. Maternal programming of

- individual differences in defensive responses in the rat. In: Annals of the New York Academy of Sciences. 2004. p. 85–103.
79. Francis DD, Kuhar MJ. Frequency of maternal licking and grooming correlates negatively with vulnerability to cocaine and alcohol use in rats. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2008 Sep;90(3):497–500. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305708001433>
80. Meaney MJ. Epigenetics and the Biological Definition of Gene × Environment Interactions. *Child Dev* [Internet]. 2010 Jan;81(1):41–79. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-8624.2009.01381.x>
81. Curley JP, Champagne FA. Influence of maternal care on the developing brain: Mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods. *Front Neuroendocrinol*. 2016;40:52–66.
82. Orso R, Creutzberg KC, Wearick-Silva LE, Wendt Viola T, Tractenberg SG, Benetti F, et al. How Early Life Stress Impact Maternal Care: A Systematic Review of Rodent Studies. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2019 Aug 28;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2019.00197/full>
83. Raineki C, Lucion AB, Weinberg J. Neonatal handling: An overview of the positive and negative effects. *Developmental Psychobiology*. 2014.
84. Tractenberg SG, Levandowski ML, de Azeredo LA, Orso R, Roithmann LG, Hoffmann ES, et al. An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2016 Sep;68:489–503. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014976341630032X>
85. Llorente-Berzal A, Mela V, Borcel E, Valero M, López-Gallardo M, Viveros M-P, et al. Neurobehavioral and metabolic long-term consequences of neonatal maternal deprivation stress and adolescent olanzapine treatment in male and female rats. *Neuropharmacology* [Internet]. 2012 Mar;62(3):1332–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390811003091>

86. Rice CJ, Sandman CA, Lenjavi MR, Baram TZ. A Novel Mouse Model for Acute and Long-Lasting Consequences of Early Life Stress. *Endocrinology* [Internet]. 2008 Oct;149(10):4892–900. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2008-0633>
87. Li Y-Q, Wang X-Y, Zhai H, Zheng Y-Q, Zhang XY, Kosten T, et al. Effects of early postnatal sibling deprivation on anxiety and vulnerability to cocaine in offspring rats. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2008 Aug 2;199(2):245–53. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-008-1169-9>
88. de Almeida Magalhães T, Correia D, de Carvalho LM, Damasceno S, Brunialti Godard AL. Maternal separation affects expression of stress response genes and increases vulnerability to ethanol consumption. *Brain Behav* [Internet]. 2018 Jan;8(1):e00841. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/brb3.841>
89. Crnic LS. Models of infantile malnutrition in rats: Effects on maternal behavior. *Dev Psychobiol* [Internet]. 1980 Nov;13(6):615–28. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dev.420130607>
90. Blaze J, Roth TL. Caregiver maltreatment causes altered neuronal DNA methylation in female rodents. *Dev Psychopathol*. 2017;29(2):477–89.
91. Luchetti A, Oddi D, Lampis V, Centofante E, Felsani A, Battaglia M, et al. Early handling and repeated cross-fostering have opposite effect on mouse emotionality. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2015 Apr 21;9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2015.00093/abstract>
92. Cirulli F, Capone F, Bonsignore L, Aloe L, Alleva E. Early behavioural enrichment in the form of handling renders mouse pups unresponsive to anxiolytic drugs and increases NGF levels in the hippocampus. *Behav Brain Res* [Internet]. 2007 Mar 28;178(2):208–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432806007133>
93. Franklin TB, Russig H, Weiss IC, Gräff J, Linder N, Michalon A, et al. Epigenetic Transmission of the Impact of Early Stress Across Generations.

- Biol Psychiatry [Internet]. 2010 Sep;68(5):408–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322310005767>
94. Fuentes S, Daviu N, Gagliano H, Garrido P, Zelena D, Monasterio N, et al. Sex-dependent effects of an early life treatment in rats that increases maternal care: vulnerability or resilience? Front Behav Neurosci [Internet]. 2014;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2014.00056/abstract>
  95. Spruijt BM, Welbergen P, Brakkee J, Gispen WH. An ethological analysis of excessive grooming in young and aged rats. Ann NY Acad Sci. 1988;525:89–100.
  96. Natarajan D, De Vries H, Saaltink DJ, De Boer SF, Koolhaas JM, Hager T, et al. Ethology and neurobiology of grooming behavior. Physiol Rev [Internet]. 1992;72(3):825–52. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0137185%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4165351&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  97. Kalueff AV., Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. Nat Rev Neurosci [Internet]. 2015;17(1):45–59. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrn.2015.8>
  98. Kirsten TB, Bernardi MM. Prenatal lipopolysaccharide induces hypothalamic dopaminergic hypoactivity and autistic-like behaviors: Repetitive self-grooming and stereotypies. Behav Brain Res [Internet]. 2017 Jul;331:25–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016643281730548X>
  99. Richter PMA, Ramos RT. Obsessive-Compulsive Disorder. Contin Lifelong Learn Neurol [Internet]. 2018 Jun;24:828–44. Available from: <http://journals.lww.com/00132979-201806000-00011>
  100. Gispen WHH, Isaacson RLL. ACTH-induced excessive grooming in the rat. Pharmacol Ther. 1981 Jan;12(1):209–46.
  101. Dunn AJ, Berridge CW, Lai YI, Yachabach TL. CRF-induced excessive

- grooming behavior in rats and mice. *Peptides*. 1987;8(5):841–4.
102. Dunn AJ. Studies on the Neurochemical Mechanisms and Significance of ACTH-induced Grooming. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1988 May;525(1 Neural Mechan):150–68. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1988.tb38603.x>
103. Dube S, Anda R, Whitfield C, Brown D, Felitti V, Dong M, et al. Long-Term Consequences of Childhood Sexual Abuse by Gender of Victim. *Am J Prev Med* [Internet]. 2005 Jun;28(5):430–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749379705000784>
104. Harmelen A-L, Van Tol MJ, Van Der Wee NJ., Veldman DJ, Spinhoven P, Van Buchem MA, et al. The long-term neuroanatomical impact of childhood emotional maltreatment [Internet]. Vol. 67, *Biological Psychiatry*. 2010. p. 138S-139S. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=70129920>
105. Greger HK, Myhre AK, Lydersen S, Jozefiak T. Child maltreatment and quality of life: a study of adolescents in residential care. *Health Qual Life Outcomes* [Internet]. 2016 Dec 10;14(1):74. Available from: <http://hqlo.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12955-016-0479-6>
106. Bailey HN, DeOliveira CA, Wolfe VV, Evans EM, Hartwick C. The impact of childhood maltreatment history on parenting: A comparison of maltreatment types and assessment methods. *Child Abuse Negl* [Internet]. 2012 Mar;36(3):236–46. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145213412000282>
107. Rates SMM, Melo EM de, Mascarenhas MDM, Malta DC. Violence against children: an analysis of mandatory reporting of violence, Brazil 2011. *Cien Saude Colet* [Internet]. 2015 Mar;20(3):655–65. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232015000300655&lng=en&tlang=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232015000300655&lng=en&tlang=en)
108. Rincón-Cortés M, Sullivan RM. Emergence of social behavior deficit, blunted corticolimbic activity and adult depression-like behavior in a rodent

- model of maternal maltreatment. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2016 Oct 25;6(10):e930–e930. Available from: <http://www.nature.com/articles/tp2016205>
109. World Health Organization, International Society for Prevention of Child Abuse and Neglect. Preventing child maltreatment: A guide to taking action and generating evidence. World Health Organization. 2006.
110. Rezende B, Martínez Avila de Mello M, Bergamo ILD, Paula L, Faleiros J. Negligência infantil: estudo comparativo do nível socioeconômico, estresse parental e apoio social. *Temas em Psicol* [Internet]. 2010;18(1):71–84. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=513751435007>
111. Moreira K, Oliveira D de, Oliveira C, Alencar L, Orfão L, Farias E. Profile of children and adolescents victims of violence. *Rev Enferm UFPE Line*. 2017;11(1):4410–7.
112. Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Sistema de Vigilância de Violências e Acidentes (Viva):2009, 2010 e 2011. Brasília: MS; 2013. Brasil; 2013.
113. Nunes AJ, Sales MCV. Violência contra crianças no cenário brasileiro. *Cien Saude Colet* [Internet]. 2016 Mar;21(3):871–80. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232016000300871&lng=pt&tlang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232016000300871&lng=pt&tlang=pt)
114. Morais R, Carvalho A, Magalhães L. A Influência do Contexto Ambiental no Desenvolvimento de Crianças na Primeira Infância. *Rev Vozes dos Val* [Internet]. 2011;11:1–22. Available from: [www.ufvjm.edu.br/vozes](http://www.ufvjm.edu.br/vozes)
115. Galjaard S, Devlieger R, Van Assche FA. Fetal growth and developmental programming. Vol. 41, *Journal of Perinatal Medicine*. 2013. p. 101–5.
116. Cutuli D, Caporali P, Gelfo F, Angelucci F, Laricchiuta D, Foti F, et al. Pre-reproductive maternal enrichment influences rat maternal care and offspring developmental trajectories: behavioral performances and neuroplasticity correlates. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2015 Mar 12;9:66. Available from:

<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2015.00066/abstract>

117. Fuchs A, Möhler E, Resch F, Kaess M. Impact of a maternal history of childhood abuse on the development of mother-infant interaction during the first year of life. *Child Abus Negl.* 2015;
118. Ludmer JA, Gonzalez A, Kennedy J, Masellis M, Meinz P, Atkinson L. Association between maternal childhood maltreatment and mother-infant attachment disorganization: Moderation by maternal oxytocin receptor gene and cortisol secretion. *Horm Behav.* 2018;
119. Rocha NACF, dos Santos Silva FP, dos Santos MM, Dusing SC. Impact of mother–infant interaction on development during the first year of life: A systematic review. *J Child Heal Care.* 2019;
120. Teisl M, Cicchetti D. Physical Abuse, Cognitive and Emotional Processes, and Aggressive/Disruptive Behavior Problems. *Soc Dev* [Internet]. 2008;17(1):1–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-9507.2007.00412.x>
121. Ford JD, Fraleigh LA, Connor DF. Child abuse and aggression among seriously emotionally disturbed children. *J Clin Child Adolesc Psychol.* 2010;39(1):25–34.
122. Bifulco A, Moran PM, Baines R, Bunn A, Stanford K. Exploring psychological abuse in childhood: II. Association with other abuse and adult clinical depression. Vol. 66, *Bulletin of the Menninger Clinic.* 2002. p. 241–58.
123. Goodman GS, Quas JA, Ogle CM. Child Maltreatment and Memory. *Annu Rev Psychol* [Internet]. 2010 Jan;61(1):325–51. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.psych.093008.100403>
124. Gustafson TB, Sarwer DB. Childhood sexual abuse and obesity. *Obes Rev.* 2004;5(3):129–35.
125. Bentley T, Widom CS. A 30-year follow-up of the effects of child abuse and neglect on obesity in adulthood. *Obesity.* 2009;17(10):1900–5.
126. Andrade RD, Santos JS, Maia MAC, Mello DF de. Factors related to

- women's health in puerperium and repercussions on child health. *Esc Anna Nery - Rev Enferm* [Internet]. 2015;19(1):181–6. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1414-8145.20150025>
127. Neumann ID. Brain mechanisms underlying emotional alterations in the peripartum period in rats. Vol. 17, *Depression and Anxiety*. 2003. p. 111–21.
128. Ivy AS, Brunson KL, Sandman C, Baram TZ. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience* [Internet]. 2008 Jun;154(3):1132–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452208005630>
129. Moussaoui N, Larauche M, Biraud M, Molet J, Million M, Mayer E, et al. Limited Nesting Stress Alters Maternal Behavior and In Vivo Intestinal Permeability in Male Wistar Pup Rats. Pawluski J, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 May 5;11(5):e0155037. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0155037>
130. Yan C-G, Rincón-Cortés M, Raineki C, Sarro E, Colcombe S, Guilfoyle DN, et al. Aberrant development of intrinsic brain activity in a rat model of caregiver maltreatment of offspring. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2017 Jan 17;7(1):e1005. Available from: <http://www.nature.com/articles/tp2016276>
131. Gilles EE, Schultz L, Baram TZ. Abnormal corticosterone regulation in an immature rat model of continuous chronic stress. *Pediatr Neurol*. 1996;15(2):114–9.
132. Raineki C, Moriceau S, Sullivan RM. Developing a Neurobehavioral Animal Model of Infant Attachment to an Abusive Caregiver. *Biol Psychiatry*. 2010;67(12):1137–45.
133. Raineki C, Cortes MR, Belnoue L, Sullivan RM. Effects of Early-Life Abuse Differ across Development: Infant Social Behavior Deficits Are Followed by Adolescent Depressive-Like Behaviors Mediated by the Amygdala. *J Neurosci* [Internet]. 2012;32(22):7758–65. Available from: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5843-11.2012>

134. van Hasselt FN, Tieskens JM, Trezza V, Krugers HJ, Vanderschuren LJMJ, Joëls M. Within-litter variation in maternal care received by individual pups correlates with adolescent social play behavior in male rats. *Physiol Behav* [Internet]. 2012 Jul;106(5):701–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938411005622>
135. Raineki C, Sarro E, Rincón-Cortés M, Perry R, Boggs J, Holman CJC, et al. Paradoxical neurobehavioral rescue by memories of early-life abuse: the safety signal value of odors learned during abusive attachment. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40(4):906–14.
136. Moore CL. Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Dev Psychobiol* [Internet]. 1984 Jul;17(4):347–56. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dev.420170403>
137. Joaquim AO, Coelho CP, Motta PD, Bondan EF, Teodorov E, Martins MFM, et al. Transgenerational effects of a hypercaloric diet. *Reprod Fertil Dev* [Internet]. 2017;29(2):325. Available from: <http://www.publish.csiro.au/?paper=RD15165>
138. Giovanoli S, Engler H, Engler A, Richetto J, Voget M, Willi R, et al. Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. *Science*. 2013;339(6123):1095–9.
139. Vanderschuren LJ, Niesink RJ, Van Ree JM. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21(3):309–26.
140. Thor DH, Holloway WR. Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bull Psychon Soc* [Internet]. 1984 Dec 5;22(6):587–90. Available from: <http://link.springer.com/10.3758/BF03333916>
141. Kirsten TB, Taricano M, Maiorka PC, Palermo-Neto J, Bernardi MM. Prenatal Lipopolysaccharide Reduces Social Behavior in Male Offspring. *Neuroimmunomodulation* [Internet]. 2010;17(4):240–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20203530>
142. Panksepp J. The ontogeny of play in rats. *Dev Psychobiol*. 1981;14(4):327–32.

143. Pletnikov M V, Rubin SA, Vasudevan K, Moran TH, Carbone KM. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res.* 1999;100(1–2):43–50.
144. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 1980 Aug;13(2):167–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0091305780900672>
145. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977;266:730–2.
146. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 1978;47:379–91.
147. Bielefeldt Leotti Torman V, Coster R, Riboldi J. Normalidade de variáveis. *Hcpa.* 2012;32(2):227–34.
148. Reis GM, Júnior JIR. Comparação de testes paramétricos e não paramétricos aplicados em delineamentos experimentais [Internet]. Iii Saepro. 2007. p. 1–13. Available from: <http://www.saepro.ufv.br/wp-content/uploads/2007-3.pdf>
149. Molet J, Maras PM, Avishai-Eliner S, Baram TZ. Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. *Dev Psychobiol* [Internet]. 2014 Dec;56(8):1675–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910169>
150. Ivy AS, Brunson KL, Sandman C, Baram TZ. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience.* 2008;154(3):1132–42.
151. Cohen S. Origins of Growth Factors: NGF and EGF. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2004 Dec;1038(1):98–102. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1315.017>
152. Snead ML, Luo W, Oliver P, Nakamura M, Don-Wheeler G, Bessem C, et

- al. Localization of epidermal growth factor precursor in tooth and lung during embryonic mouse development. *Dev Biol.* 1989;
153. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990;265(14):7709–77126.
154. Hata R-I, Hori H, Nagai Y, Tanaka S, Kondo M, Hiramatsu M, et al. Selective Inhibition of Type I Collagen Synthesis in Osteoblastic Cells by Epidermal Growth Factor\*. *Endocrinology [Internet].* 1984 Sep;115(3):867–76. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-115-3-867>
155. Turley EA, Hollenberg MD, Pratt RM. Effect of epidermal growth factor/urogastrone on glycosaminoglycan synthesis and accumulation in vitro in the developing mouse palate. *Differentiation [Internet].* 1985 Mar;28(3):279–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301468111606750>
156. Lee L, Weinstein I. Tumor-promoting phorbol esters inhibit binding of epidermal growth factor to cellular receptors. *Science (80- ) [Internet].* 1978 Oct 20;202(4365):313–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.308698>
157. Lee L-SS, Weinstein IB. Mechanism of tumor promoter inhibition of cellular binding of epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci.* 1979 May 31;76(10):5168–5172.
158. Schlessinger J, Schreiber A, Levi A, Lax I, Libermann T, Yarden Y. Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1983;14(2):93–111.
159. Calamandrei G, Alleva E. Epidermal growth factor has both growth-promoting and growth-inhibiting effects on physical and neurobehavioral development of neonatal mice. *Brain Res.* 1989;
160. Luger A, Calogero AE, Kalogeras K, Gallucci WT, Gold PW, Loriaux DL, et al. Interaction of epidermal growth factor with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Potential physiologic relevance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;

161. Polk DH, Ervin MG, Padbury JF, Lam RW, Reviczky AL, Fisher DA. Epidermal growth factor acts as a corticotropin-releasing factor in chronically catheterized fetal lambs. *J Clin Invest* [Internet]. 1987 Mar 1;79(3):984–8. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/112910>
162. Childs G V., Patterson J, Unabia G, Rougeau D, Wu P. Epidermal growth factor enhances ACTH secretion and expression of POMC mRNA by corticotropes in mixed and enriched cultures. *Mol Cell Neurosci*. 1991;
163. Fan X, Nagle GT, Collins TJ, Childs G V. Differential regulation of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha messenger ribonucleic acid in the rat anterior pituitary and hypothalamus induced by stresses. *Endocrinology*. 1995;
164. Buts JP. -Bioactive factors in milk-. *Arch Pediatr* [Internet]. 1998 Mar;5(3):298–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10328000>
165. Bernstein RM, Hinde K. Bioactive factors in milk across lactation: Maternal effects and influence on infant growth in rhesus macaques ( *Macaca mulatta* ). *Am J Primatol* [Internet]. 2016 Aug;78(8):838–50. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajp.22544>
166. Kaleva M, Toppari J. Genetics and Hormones in Testicular Descent. *Hormones* [Internet]. 2003;2(4):211–6. Available from: [http://www.hormones.gr/pdf/Genetics and Hormones.pdf](http://www.hormones.gr/pdf/Genetics%20and%20Hormones.pdf)
167. Shono, Imajima, Zakaria, Suita. Does maternal stress induce abnormal descent of the testis in prepubertal rats? *BJU Int* [Internet]. 2001 Dec 25;84(3):353–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1464-410x.1999.00145.x>
168. Shono T, Suita S. Disturbed pituitary-testicular axis inhibits testicular descent in the prenatal rat. *BJU Int*. 2003;
169. Pallarés ME, Adrover E, Baier CJ, Bourguignon NS, Monteleone MC, Brocco MA, et al. Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring. *Stress*. 2013;

170. Jeje SO, Akindele OO, Balogun ME, Raji Y. Maternal treatment with dexamethasone during lactation delays male puberty and disrupts reproductive functions via hypothalamic-pituitary-gonadal axis alterations. *Pathophysiology*. 2016;
171. Cain MP, Kramer SA, Tindall DJ, Husmann DA. Alterations in maternal epidermal growth factor (EGF) effect testicular descent and epididymal development. *Urology* [Internet]. 1994 Mar;43(3):375–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0090429594900833>
172. Cain MP, Kramer SA, Tindall DJ, Husmann DA. Epidermal Growth Factor Reverses Antiandrogen Induced Cryptorchidism and Epididymal Development. *J Urol* [Internet]. 1994 Aug;152(2 Part 2):770–3. Available from: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/S0022-5347%2817%2932704-0>
173. Belluscio LM, Berardino BG, Ferroni NM, Ceruti JM, Cánepa ET. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. *Physiol Behav* [Internet]. 2014 Apr;129:237–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938414001218>
174. Hamer EG, Hadders-Algra M. Prognostic significance of neurological signs in high-risk infants - a systematic review. *Dev Med Child Neurol* [Internet]. 2016 Mar;58:53–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/dmcn.13051>
175. Futagi Y, Toribe Y, Suzuki Y. The Grasp Reflex and Moro Reflex in Infants: Hierarchy of Primitive Reflex Responses. *Int J Pediatr* [Internet]. 2012;2012:1–10. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijpedi/2012/191562/>
176. Secher T, Novitskaia V, Berezin V, Bock E, Glenthøj B, Klementiev B. A neural cell adhesion molecule-derived fibroblast growth factor receptor agonist, the FGL-peptide, promotes early postnatal sensorimotor development and enhances social memory retention. *Neuroscience*. 2006;
177. Miki T, Yokoyama T, Kusaka T, Suzuki S, Ohta KI, Warita K, et al. Early

- postnatal repeated maternal deprivation causes a transient increase in OMpg and BDNF in rat cerebellum suggesting precocious myelination. *J Neurol Sci.* 2014;
178. Hall CS. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J Comp Psychol.* 1936;22(3):345–52.
  179. Bernardi MMM, De Souza H, Palermo Neto J, Neto JP. Effects of single and long-term haloperidol administration on open field behavior of rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1981;73(2):171–5.
  180. Bernardi,MM; Palermo-Neto J, MM Bernardi MM JP-N, Bernardi MMM, Palermo-Neto J. Effects of apomorphine administration on rearing activity of control and experimental rats withdrawn from long-term haloperidol treatment. *Gen Pharmacol.* 1984;15(4):363–5.
  181. Lazarini CA, Florio JC, Lemonica IP, Bernardi MM. Effects of prenatal exposure to deltamethrin on forced swimming behavior, motor activity, and striatal dopamine levels in male and female rats. *Neurotoxicol Teratol.* 2001;23(6):665–73.
  182. Hashimoto H. New Insights into the Central PACAPergic System from the Phenotypes in PACAP- and PACAP Receptor-Knockout Mice. *Ann N Y Acad Sci [Internet].* 2006 Jul 1;1070(1):75–89. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1317.038>
  183. Maccari S, Darnaudery M, Morley-Fletcher S, Zuna AR, Cinque C, Van Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev [Internet].* 2003 Jan;27(1–2):119–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763403000149>
  184. Brunton PJ, Russell JA. Prenatal Social Stress in the Rat Programmes Neuroendocrine and Behavioural Responses to Stress in the Adult Offspring: Sex-Specific Effects. *J Neuroendocrinol [Internet].* 2010 Apr;22(4):258–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2826.2010.01969.x>
  185. Brunton PJ, Sullivan KM, Kerrigan D, Russell JA, Seckl JR, Drake AJ. Sex-

- specific effects of prenatal stress on glucose homoeostasis and peripheral metabolism in rats. *J Endocrinol.* 2013;
186. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental Origins of Disease Paradigm: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. *Pediatr Res* [Internet]. 2004 Sep;56(3):311–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1203/01.PDR.0000135998.08025.FB>
187. Wood S, Beyer B, Cappon G. Appendix C-B Species comparison of postnatal CNS development: functional measures. In: Taylor& Francis, editor. *Developmental and reproductive toxicology- A practical approach.* 2 end. New York, NY, USA: CRC Press; 2006. p. 1103–30.
188. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2013 Jul;106–107:1–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008213000300>
189. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* (80- ). 1997 Sep;277(5332):1659–62.
190. Champagne F, Meaney MJ. Like mother, like daughter: Evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. In: *Progress in Brain Research.* 2001. p. 287–302.
191. De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JAM, Sutanto W, Levine S. Stress, glucocorticoids and development. In: *Progress in Brain Research* [Internet]. 1988. p. 101–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612308605002>
192. Levine S. The Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. The Influence of Maternal Factors. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006 Dec 17;746(1):275–88. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1994.tb39245.x>
193. Schmidt M, Okimoto DK, Dent GW, Gordon MK, Levine S. Maternal

- Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the 20-Day-Old Rat: Consequences of Laboratory Weaning. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2002 May 29;14(6):450–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2826.2002.00797.x>
194. Rosenfeld P, Sacheck D, Levine S. Multifactorial regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during development. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 1992 Jan;16(4):553–68. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763405801964>
195. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Mol Brain Res* [Internet]. 1993 May;18(3):195–200. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169328X9390189V>
196. Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman K V, Nemeroff CB, Plotsky PM. Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2004 Feb 15;55(4):367–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322303010953>
197. Machado TD, Dalle Molle R, Laureano DP, Portella AK, Werlang ICR, Benetti CDS, et al. Early life stress is associated with anxiety, increased stress responsivity and preference for “comfort foods” in adult female rats. *Stress* [Internet]. 2013 Sep 23;16(5):549–56. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10253890.2013.816841>
198. Mureşan L, Georgescu A. The Road to Resilience in 2050. *RUSI J* [Internet]. 2015 Nov 2;160(6):58–66. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03071847.2015.1123948>
199. Galvão-Coelho NL, Silva HPA, Sousa MBC de. Resposta ao estresse: II. Resiliência e vulnerabilidade. *Estud Psicol* [Internet]. 2015;20(2):72–81. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1678-4669.20150009>

200. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009.
201. Pfau ML, Russo SJ. Peripheral and central mechanisms of stress resilience. Vol. 1, *Neurobiology of Stress*. 2015. p. 66–79.
202. Charney DS. Psychobiological Mechanisms of Resilience and VulnerabilityImplications for Successful Adaptation to Extreme Stress. *Focus J Lifelong Learn Psychiatry* [Internet]. 2004;2(3):368–91. Available from:  
<http://dx.doi.org/%5Cnhttp://psychiatryonline.org/data/Journals/FOCUS/2606/368.pdf>
203. Russo SJ, Murrough JW, Han M-H, Charney DS, Nestler EJ. Neurobiology of resilience. *Nat Neurosci* [Internet]. 2012 Nov 14;15(11):1475–84. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nn.3234>
204. Wood CE, Walker C-D. Fetal and Neonatal HPA Axis. In: *Comprehensive Physiology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2015. p. 33–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c150005>
205. Suckeck D. Maternal regulation of the infant's hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress response: Seymour 'Gig' Levine's legacy to neuroendocrinology. *J Neuroendocrinol* [Internet]. 2018 Jul;30(7):e12610. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jne.12610>
206. Tiller JWG. Depression and anxiety. *Med J Aust*. 2013;
207. Neumann ID, Wegener G, Homberg JR, Cohen H, Slattery DA, Zohar J, et al. Animal models of depression and anxiety: What do they tell us about human condition? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2011.
208. Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WMU. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res*. 2008;61(1):106–12.

209. Wilcoxon JS, Redei EE. Maternal glucocorticoid deficit affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and behavior of rat offspring. *Horm Behav.* 2007;
210. Naert G, Ixart G, Maurice T, Tapia-Arancibia L, Givalois L. Brain-derived neurotrophic factor and hypothalamic-pituitary-adrenal axis adaptation processes in a depressive-like state induced by chronic restraint stress. *Mol Cell Neurosci.* 2011;
211. Lam VYY, Raineki C, Wang LY, Chiu M, Lee G, Ellis L, et al. Role of corticosterone in anxiety- and depressive-like behavior and HPA regulation following prenatal alcohol exposure. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2019;
212. Deakin J. The role of serotonin in depression and anxiety. *Eur Psychiatry.* 1998 Apr;13(S2):57s-63s.
213. Ressler KJ, Nemeroff CB. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depression and Anxiety.* 2000.
214. Olivier B. Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology.* 2015.