UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA

TAUANE PAULA GEHM

**Efeitos da separação materna sobre o desenvolvimento de
respostas sociais em ratos**

São Paulo

2017

TAUANE PAULA GEHM

**Efeitos da separação materna sobre o desenvolvimento de
respostas sociais em ratos**

– Versão Original –

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutora em
Psicologia.

Área de Concentração: Psicologia Experimental

Orientadora: Prof. Dr. Maria Helena L. Hunziker

São Paulo

2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
Dados fornecidos pela autora

Gehm, Tauane Paula.

Efeitos da separação materna sobre o desenvolvimento de respostas sociais em ratos / Tauane Paula Gehm; orientadora Maria Helena Leite Hunziker. -- São Paulo, 2017.

114 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Psicologia Experimental) -- Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, 2017.

1. separação materna. 2. comportamento animal. 3. comportamento social. 4. desenvolvimento comportamental. I. Hunziker, Maria Helena Leite, orient. II. Título.

Nome: Tauane Paula Gehm

Título: Efeitos da separação materna sobre o desenvolvimento de respostas sociais em ratos

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em
Psicologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*À minha mãe, a quem admiro e
compreendo mais a cada dia.*

AGRADECIMENTOS

À querida **Maria Helena Leite Hunziker** (Tatu), que transformou profundamente os rumos da minha história de tantos jeitos, que nada do que seja escrito aqui dará conta de sua importância. Dentre as coisas que tenho a agradecer, a que me lembro com mais carinho são as nossas horas de conversa durante a minha graduação, nas quais ela generosamente permitia que meus olhos brilhassem junto aos dela na descoberta de pequenas e grandes coisas. Nesse sentido, a Tatu me ensinou um tipo de parceria, na ciência e na vida, que tornou o mundo mais colorido e menos óbvio. Quando, no contato com ela, descobrimos o que fazia com que meu coração batesse mais forte, ela topou ser suporte para que eu seguisse meu próprio caminho, ainda que diferente dos interesses principais dela. Esse suporte não se configurou apenas como sua orientação generosa, criteriosa e atenta, mas também como um lugar seguro de escuta e de afeto. Obrigada, Tatu, por, de tantas formas, ter existido na minha vida!

À **Maria Stella C. de Alcântara Gil**, por ter feito parte da minha formação de um jeito sempre tão generoso, compartilhando seu extenso conhecimento sobre desenvolvimento e topando os projetos mais diversos. Agradeço também pela dedicação com a qual me ajudou na qualificação, dando sugestões que alteraram meu olhar na condução da coleta desta pesquisa e permitiram constatações que transcenderam o que foi escrito nesta tese.

Ao **François Jacques Tonneau**, pela crítica sincera e construtiva ao meu trabalho ao longo dos últimos anos e pela pronta disposição em ajudar, sempre. Com certeza, suas contribuições tornaram esta pesquisa melhor.

À **Jaide Regra**, por me mostrar tantas novas perspectivas sobre como entender o desenvolvimento e sobre como aplica-lo à prática clínica, fazendo com que eu saísse encantada de todas as nossas conversas.

Ao **Júlio de Rose**, pelas interessantes contribuições ao meu trabalho, desde o mestrado, e pela gentileza com que aceitou participar do final desse processo.

Ao **João Cláudio Todorov**, pelas centenas de e-mails trocados, pelas participações no DDC, pelos encorajamentos e ensinamentos dos últimos anos.

Aos professores que, de forma indireta, fizeram parte deste trabalho e muito me ensinaram nesse processo, dentre os quais destaco **Briseida Dogo de Resente, Carolina**

Laurenti, Marcus Bentes de Carvalho Neto, Miriam Garcia Mijares e Sonia Beatriz Meyer.

À **Laura G. Michelin**, sem a qual eu não faço ideia de como teria conseguido terminar esta pesquisa! Agradeço imensamente por toda a ajuda e dedicação nesse processo. Guardo com carinho a lembrança de nossas tentativas frustradas de medir o tamanho dos ratos, de nossa emoção ao ver cada parto, de nosso espanto ao perceber o quanto os filhotinhos mudavam dia-a-dia... Agradeço por compartilhar comigo a alegria de cada descoberta e a preocupação com cada problema. Essa pesquisa também é sua.

Aos funcionários do Instituto de Psicologia, que tanto me ajudaram nesta pesquisa, dos quais destaco: **Celso Garcia, Graziela Abe, Eduardo Okamura, Francisco Araújo, Noel Santos e Sonia Souza**. Agradeço especialmente ao **Celso Garcia**, que me ajudou muito na rotina do cuidado com os animais e sempre se mostrou bastante preocupado com o bem-estar deles. Agradeço também ao **Nelson Carvas**, pela ajuda com a estatística, e à **Tania A. da Silva**, pelo sorriso e carinho de sempre durante os almoços e cafés.

Aos membros do Laboratório de Análise Biocomportamental (LABC), que tornaram esse processo mais divertido e estimulante: **Amilcar Fonseca, Angélica Yoshiy, Carol Ciardi, Carol Trousdell, Eduardo Souza, Fernanda Bordignon, Juan Vásquez, Lais Nicolodi, Larissa Pedrosa, Laura Michelin, Lígia Mosolino, Luana Flor, Marcia Kameyama, Paula Varesi e Pedro Zuccolo**.

Ao **Fábio Emanuel de S. Moraes**, amor da minha vida, sem o qual todo o trabalho deste doutorado teria sido muito mais difícil! Agradeço por, sem eu pedir, ter abdicado de programas mais divertidos para ficar ao meu lado durante os finais de semana de coleta e de escrita da tese, mesmo sabendo que eu não conseguiria lhe dar atenção durante esses períodos. Agradeço por ter dado apoio e incentivo, sempre interessado em cada passo deste trabalho e disposto a segurar a minha mão quando eu me desesperava. Agradeço por cuidar de mim e da gente, em pequenos detalhes da nossa rotina, seja me enchendo de beijos pela manhã, ou preparando lanches para eu levar ao trabalho. Por fim, agradeço por ser tão generoso e incrível que me faz acreditar que um mundo melhor seja possível! Eu te amo, querido!

À **Herbalife Moraes Gehm**, nossa Herbinha, que esteve fisicamente ao meu lado durante toda a escrita desta tese e, de tempos em tempos, me obrigava a fazer pausas estratégicas para dar carinho a ela.

À minha **mãe**, por ser colo e abrigo nesses anos, por ser a voz que me mandava parar e descansar, por ser quem dizia que tudo ficaria bem. Sem ela, eu não teria chegado até aqui. A meu **pai**, por plantar em mim o gosto pelo conhecimento e me fazer acreditar que eu seria capaz de ser aquilo que quisesse. Aos meus irmãos, **Taise e Augusto**, agradeço por tornar o meu “processo de desenvolvimento” menos solitário, antes e durante esta tese. Aos meus cunhados, **Giovana e Ricardo**, por deixarem a nossa família mais feliz e completa. Ao **Miguelzinho**, agradeço por toda a inspiração que me deu para escrever a introdução desta tese e pela alegria que nos gerou nos últimos meses, sem nem ter nascido ainda.

Ao **Luiz Eduardo de V. Moreira** (Ludu), por compartilhar a vida comigo das mais diversas formas: seja dividindo o mesmo teto, seja escapando para um café entre um paciente e outro, seja pelas várias mensagens diárias que trocamos para contar o que está acontecendo no dia. Obrigada por ser, para mim, a pessoa que está sempre lá e por me deixar ser essa pessoa para você também!

Ao **Marcos Yamada** (Pinguim), pelos anos de amizade, pelo cuidado camuflado de ironia, pelas viagens e passeios, por se fazer presente na distância.

À **Mariana Penteado** e ao **Rafael Trevizoli**, pela amizade fiel e leve que sempre tivemos, por todas as risadas dos últimos anos e por, sempre que eu precisei, estarem lá.

À **Ana Carolina Trousdell Franceschini**, por entender o que ninguém mais entendia e ter compartilhado comigo esses 11 anos de laboratório e pesquisa.

Às minhas queridas parceiras de consultório e de quarteto fantástico: **Marcia Kameyama, Lígia Mosolino e Luana Flor**. À Marcia, agradeço por ser o lugar de conforto nas maiores tempestades e o sorriso nos bons momentos. Você é um anjinho na minha vida! À Lígia, agradeço pela interlocução, pelas conversas nos intervalos do consultório, pelas risadas, pela amizade, pelos sonhos conjuntos! À Luana, por me mostrar que eu não estava sozinha na minha bagunça, fazendo com que eu me sentisse normal nas minhas contradições. Que bom que encontrei vocês!

À **Marina Bialer**, pela presença e escuta sensível em todos os momentos que precisei.

À **CAPES** e ao **CNPq**, pelo financiamento parcial desta pesquisa.

I believe if there's any kind of God it wouldn't be in any of us, not you or me but just this little space in between. If there's any kind of magic in this world it must be in the attempt of understanding someone sharing something. I know, it's almost impossible to succeed but who cares really? The answer must be in the attempt.

— Before Sunrise, 1995

Piglet sidled up to Pooh from behind. "Pooh!" he whispered. "Yes, Piglet?" "Nothing," said Piglet, taking Pooh's paw. "I just wanted to be sure of you."

— A. A. Milne, 1928

RESUMO

Gehm, T. P. (2017). *Efeitos da separação materna sobre o desenvolvimento de respostas sociais em ratos*. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A separação materna é um procedimento bastante utilizado com ratos, no qual a prole é privada do contato com a mãe por algumas horas diárias no período anterior ao desmame, observando-se os efeitos sobre o desenvolvimento comportamental e biológico dos filhotes. O objetivo desta tese foi investigar o efeito da separação materna no desenvolvimento de respostas sociais em ratos de ambos os sexos – mais especificamente, sobre o brincar social, entre os dias pós-natais 28 e 36; sobre o comportamento sexual, entre a puberdade e a idade adulta; e sobre o comportamento materno, na idade adulta, de fêmeas submetidas à separação materna na infância. Para tanto, os episódios de separação foram conduzidos por 3hs diárias, entre os dias pós-natais 2 e 14, tendo como controle ratos não expostos a esse procedimento. Observou-se que os animais submetidos ao procedimento de separação materna emitiram mais respostas de brincar do que os animais controle. No que se refere ao desenvolvimento sexual, machos submetidos ao procedimento na infância tiveram frequência elevada de respostas de cópula menos efetivas, em detrimento das mais efetivas. Já nas fêmeas, constatou-se um atraso no início da puberdade, além de elas terem se tornado atrativas para machos em idade mais precoce que o grupo controle. Por fim, quando as fêmeas submetidas à separação materna na infância se tornaram mães, suas proles tiveram proporção sexual alterada, com maior número de machos, e índices de mortalidade menores. Ademais, mãe e filhotes foram mais atraídos pelo cheiro do ninho em teste olfativo, em comparação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que a separação materna tem efeitos extensos sobre o desenvolvimento de respostas sociais, indicando a necessidade da condução de mais estudos que investiguem os motivos pelos quais esse evento, na infância, leva às alterações observadas.

Palavras-chave: separação materna; comportamento animal; comportamento social; desenvolvimento comportamental.

ABSTRACT

Gehm, T. P. (2017). *Effects of maternal separation on the development of social behaviors in rats*. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Maternal separation is a frequently used procedure with rats in which the offspring is daily deprived of the contact with the mother during a few hours in the period previous to weaning in order to observe the effects on the behavioral and biological development of the pups. Our aim in this study is to explore the effect of maternal separation on the development of social responses in rats of both sexes, specifically on the social play, between the post-natal days 28 and 26; on the sexual behavior, between puberty and adulthood; and on maternal behavior of females in adulthood that underwent maternal separation during childhood. Therefore, the separation episodes were conducted for 3 hours daily between post-natal days 2 and 14. Rats not exposed to this procedure were used as control. We observed that animals submitted to the maternal separation procedure emitted more play responses than control animals. Regarding sexual development, males submitted to maternal separation had high frequency of less effective copula over more effective copula. The females presented a delay in puberty and became attractive to the males in a more precocious age than the control group. Lastly, when the females submitted to maternal separation became mothers their offspring had altered sexual ratio with a higher number of males and a lower mortality rate. In addition, the mother and her pups were more attracted by the nest's odor than the control group in an olfactory test. These results suggest that maternal separation has extensive effects on the development of social responses, indicating the necessity of more studies that investigate why this event in childhood leads to the observed alterations.

Keywords: maternal separation; animal behavior; social behavior; behavioral development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem de filhotes de ratos da linhagem Sprague-Dawley, entre o 1º e o 21º dia de vida, ilustrando algumas das mudanças corporais pelas quais eles passam durante o desenvolvimento.....	30
Figura 2. Comportamento materno de pressionar as mamas contra as paredes no período do desmame, tendo como consequência evitar que os filhotes tenham acesso a elas.....	31
Figura 3. Representação da posição supina (animal na parte inferior da figura) e do <i>pinning</i> , feito pelo animal que está na parte superior da figura.....	44
Figura 4. Quantidade média de intervalos com contato físico entre os ratos, apresentados conforme os dias de registro da interação (PN28, PN32 e PN36), os grupos experimentais (SM e CN), o tipo de parceiro na interação (P. Conhecido e P. Estranho) e o sexo.....	47
Figura 5. Quantidade média de intervalos em que foram constatadas as categorias “perseguir” e “ser perseguido”. Os dados foram apresentados conforme os dias de registro da interação (PN28, PN32 e PN36), os grupos experimentais (SM e CN), o tipo de parceiro na interação (P. Conhecido e P. Estranho) e o sexo.....	49
Figura 6. Quantidade média de respostas de fazer <i>pinning</i> e de ficar na posição supina. Os dados foram apresentados conforme os dias de registro da interação (PN28, PN32 e PN36), os grupos experimentais (SM e CN), o tipo de parceiro na interação (P. Conhecido e P. Estranho) e o sexo.....	50
Figura 7. Idade média, em dias, do início da puberdade para machos e fêmeas, em função do tratamento (Separação Materna – SM, ou Controle – CN) e do sexo. O asterisco representa que a diferença entre as barras indicadas foi estatisticamente significativa ($p = 0.001$).....	67
Figura 8. Frequência média de montagens (A) e de comportamentos sexuais totais (CST, B) para machos, em função do tratamento (Separação Materna – SM, ou Controle – CN) e da idade na interação (PN-40, PN-50 e PN-90).....	68
Figura 9. Frequências médias de lordoses (A), emitidas pelas fêmeas, e de montagens (B), penetrações (C) e comportamentos sexuais totais (CST, D), emitidas por machos, em função do tratamento (Separação Materna – SM, ou Controle – CN) e do dia de interação (Estro 1 – E1, Estro 2 – E2 e Estro 3 – E3).....	70

Figura 10. Frequência média de respostas de lordose em fêmeas dos Grupos SM e CN na idade adulta e de respostas de montagem, penetração e comportamentos sexuais totais (CST) em machos na interação com essas fêmeas. O asterisco representa que a diferença entre as barras indicadas foi estatisticamente significativa ($p = 0,04$).....	71
Figura 11. Quantidade média de filhotes nascidos (A) e sobreviventes (B) na G2, ao total e por sexo, em função do tratamento (separação materna – SM, ou controle – CN). O asterisco representa que a diferença entre as barras indicadas foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).....	85
Figura 12. Curva de sobrevivência para machos (A) e fêmeas (B) da G2, em função do tratamento (separação materna – SM, ou controle – CN). A significância estatística das diferenças em função do tratamento (<i>p-value</i>) está apresentada na parte de baixo de cada gráfico.....	86
Figura 13. Porcentagem de escolha de ratas da G1 pela maravalha retirada no ninho no teste olfativo, em função dos grupos (SM e CN).....	86
Figura 14. Porcentagem de filhotes da G2 (A) que se deslocaram para o compartimento contendo maravalha retirada no ninho (M Ninho), maravalha limpa (M Limpa), ou não escolheram um dos lados (Não Escolhe) no teste olfativo; os dados mostrados em (B) são relativos ao teste motor, sendo registrado o deslocamento para um dos lados da caixa (Escolhe) ou a permanência no compartimento central (Não escolhe). Todos esses resultados estão agrupados em função do tratamento prévio (SM ou CN) recebido pela mãe G1.....	87

SUMÁRIO

Apresentação	14
Introdução Geral.....	17
Artigo 1: Efeitos da separação materna sobre o brincar social em ratos em função do sexo, idade e parceiro social	38
Método	40
Resultados	45
Discussão	52
Referências.....	55
Artigo 2: Desenvolvimento sexual de ratos fêmeas e machos em função da exposição à separação materna	59
Método	62
Resultados	66
Discussão	72
Referências.....	74
Artigo 3: Efeitos na procriação de ratas expostas à separação materna na infância.....	77
Método	79
Resultados	84
Discussão	87
Referências.....	91
Discussão Geral.....	95
Referências Gerais.....	102
Apêndice	113

APRESENTAÇÃO

“Nenhuma esfera do conhecimento está livre de controvérsia, e a ciência não é exceção. Se alguém imagina que os cientistas são pessoas desapaixonadas e imparciais discutindo teorias e ideias à luz fria e cristalina da razão, essa imagem é muito enganosa. A paixão e o fervor acompanham todas as boas discussões científicas”. — Jablonka & Lamb, 2010

A primeira vez que me questionei como a Análise do Comportamento enxerga o desenvolvimento foi em 2008, durante uma disciplina optativa ministrada na graduação pela Profª Dra. Maria Helena Leite Hunziker, a “Tatu”. A disciplina, apelidada pelos graduandos de “AEC-3”, era diferente de todas as outras que os alunos já haviam feito, sendo marcada por um caráter bastante democrático, no qual os alunos é quem escolhiam os temas a serem discutidos ao longo do semestre. Um desses temas foi o desenvolvimento. Durante aquele semestre, as discussões permitidas pela AEC-3 caminharam no sentido de que talvez não houvesse motivos para falar em desenvolvimento a partir de um referencial analítico-comportamental, tendo em vista que os conceitos de aprendizagem, filogênese e cultura poderiam explicar todos os fenômenos agregados sob esse rótulo.

Quase fiquei convencida das conclusões derivadas daquela disciplina, não fossem os dados apresentados por Bijou e Baer (1961, 1965) sobre aprendizagem pré-natal, com os quais só tive contato meses depois. Mais especificamente, definindo desenvolvimento como mudanças progressivas nas interações entre comportamento e ambiente, Bijou e Baer apontaram que tais mudanças poderiam começar antes mesmo do nascimento, o que me levou a buscar pesquisas em diferentes áreas sobre o comportamento pré-natal. Por sugestão do Dr. Marcus Bentes de Carvalho Neto, conheci os trabalhos de Zing-Yang Kuo (1898-1970) e, por tabela, de Gilbert Gottlieb (1929- 2006), que investigaram o comportamento de embriões de aves ainda dentro do ovo e que mudaram por completo a concepção que eu tinha de desenvolvimento. A partir dos dados apresentados e discutidos por eles, entendi que mesmo aquilo que era considerado incondicionado tinha também uma construção na ontogênese de cada indivíduo. Comecei a achar que ganharíamos muito em aplicar tal perspectiva à Análise do Comportamento, estudando como as relações do organismo com o ambiente possibilitam a construção ontogenética de sensibilidades, respostas e relações que, até então, eram ditas não aprendidas. Diante do meu interesse pelo tema, a Tatu felizmente aceitou me orientar em um mestrado e um doutorado sobre desenvolvimento, a partir de um referencial analítico-comportamental.

Desde 2008, fui encontrando pessoas que, além da Tatu e do Marcus Bentes, também estavam interessadas e dispostas a discutir e me ensinar sobre desenvolvimento, dentre as quais estão os Drs. João Cláudio Todorov, Maria Stella C. de Alcantara Gil, Laércia A. Vasconcelos, Jaide A. G. Regra e Carolina Laurenti. Na tentativa de reunir essas e outras pessoas interessadas na questão, em parceria com a Lúgia Mosolino, a Fabiana Meirelles, a Ana Carolina Machionne e a Marcia Kameyama criamos, então, um minicongresso chamado Diálogos sobre Desenvolvimento Comportamental (DDC). Nos dois encontros do DDC (2012 e 2015), um aspecto amplamente apontado foi a dificuldade metodológica em estudar o desenvolvimento, uma vez que os métodos tradicionais da Análise do Comportamento não haviam sido criados para tal. Conforme apontado pelo Todorov em ambos eventos, a Caixa de Skinner foi construída para estudar estados estáveis, não de transição. Sendo assim, quais métodos poderíamos adotar? Ao decidir fazer este doutorado, nos deparamos com essa dificuldade e optamos por, de forma geral, adotar medidas de observação e categorização de comportamentos, método muito menos preciso do que o registro de respostas de pressão à barra na Caixa de Skinner. Entretanto, foi uma primeira aproximação experimental do estudo do desenvolvimento, sendo objetivo de longo prazo a construção de métodos cada vez melhores.

Dentre os temas possíveis a serem estudados, no doutorado escolhemos investigar os efeitos da separação materna no desenvolvimento de comportamentos sociais de ratos. A escolha surgiu, em partes, da minha experiência como psicoterapeuta e de meu contato com a Dra. Sonia Beatriz Meyer como minha supervisora clínica na graduação. No início da minha carreira, os casos mais difíceis que encontrei foram de crianças que apresentaram traços que se assemelharam muito a psicopatologias diagnosticadas apenas na idade adulta, sobretudo relacionadas a transtornos de personalidade. Encontrei muita dificuldade em formular a análise funcional de tais casos, até me deparar com um livro do Winnicott (1987), no qual ele descreveu algumas relações da criança com seu ambiente social que poderiam resultar na construção de um repertório dito “antissocial”. Discutindo com a Prof^a Sonia Meyer sobre os padrões apontados por Winnicott, ela comentou a semelhança disso com a descrição de Linehan (2010) sobre a importância das primeiras relações no desenvolvimento do Transtorno de Personalidade Borderline. Contudo, tanto em Winnicott (1987) como em Linehan (2010), havia a carência de dados experimentais que pudessem fundamentar conclusões sobre a importância das primeiras relações. Pensando nisso, surgiu a ideia desta pesquisa que, embora não tenha sido conduzida com humanos, foi uma tentativa de aproximação experimental da questão com outros animais.

Tendo em vista os interesses que fundamentaram o presente trabalho, esta tese foi dividida em cinco partes. Na primeira (introdução geral), os objetivos da tese são apresentados, discutindo-se também aspectos relativos ao desenvolvimento social dos animais e ao procedimento de separação materna. As três partes seguintes referem-se a artigos experimentais que podem ser lidos de forma independente da tese com um todo. Em um dos artigos, são apresentados dados sobre como a separação materna pode impactar comportamentos de brincar social em ratos. Em outro artigo, investiga-se o impacto desse tipo de procedimento no início da puberdade e nos comportamentos de cópula em ratos de diferentes idades. O último artigo, por sua vez, refere-se à análise de aspectos da relação entre as fêmeas submetidas à separação na infância e suas proles, geradas por elas na idade adulta. Tendo sido priorizada a independência dos artigos em relação ao restante da tese, algumas informações relativas à literatura e ao procedimento foram repetidas entre eles. Por fim, a última parte apresenta uma discussão geral, na qual é debatida a necessidade de revisão do modelo de separação materna frente aos dados obtidos aqui, bem como formas possíveis de compreensão da importância da relação materna no desenvolvimento a partir de um referencial analítico-comportamental.

INTRODUÇÃO GERAL

Em diferentes teorias psicológicas, o vínculo¹ entre filhote e mãe/cuidador(a)² é tido como pedra angular para a compreensão do desenvolvimento social (Spitz, 1965/2004; Winnicott, 1965/1983; Bowlby, 1969). Harry Harlow (1905-1981) e John M. Bowlby (1907-1990) tiveram um papel muito importante no estabelecimento dessa visão. Harlow (1958) questionou a teoria do *Secondary Drive*, que postulava que a vinculação do filhote ao cuidador ocorria devido ao pareamento da figura desse cuidador a reforçadores primários, como o alimento e o calor. No lugar disso, ele apresentou evidências de que o próprio contato físico entre a mãe e o filhote continha aspectos que poderiam ser considerados reforçadores incondicionados.

Mais detalhadamente, Harlow (1958) descreveu o comportamento de macacos criados distantes da mãe natural e na presença de bonecos que imitavam o corpo dela. Em uma das manipulações experimentais apresentadas por ele, os filhotes foram criados expostos a dois desses bonecos: um feito de arame e outro coberto de pano, sendo ambos conectados a uma fonte de calor. Para quatro filhotes, o leite era liberado pela “mãe” de pano; para outros quatro, pela “mãe” de arame. Medindo-se o tempo em que o animal passava no contato com cada uma das “mães”, descobriu-se que, independentemente de qual delas liberasse o alimento, os filhotes preferiam a de pano. Para Harlow, os resultados fortaleceram a noção de que o conforto do contato físico é uma variável de grande importância no desenvolvimento de respostas afetivas, enquanto a lactação é uma variável de importância menor. Em outros testes, observou-se que, em situações de risco, os filhotes sempre corriam para o contato com a “mãe” de pano e, novamente, a fonte de amamentação não pareceu ter relevância na escolha.

Contemporâneo a Harlow, Bowlby (1969) defendeu que os comportamentos relacionados ao vínculo foram selecionados ao longo da evolução³, aumentando a probabilidade de sobrevivência dos filhotes. Por sua vez, a qualidade do vínculo que é desenvolvido entre um filhote específico e o seu cuidador, para Bowlby, depende do ambiente ontogenético, sendo

¹ Vínculo, vinculação e apego são termos geralmente não definidos com precisão. Aqui serão usados como sinônimos para descrever, sobretudo, as interações entre mãe/cuidador e filhote no início da vida. Essas interações normalmente incluem a procura e preferência do filhote pela mãe ou por estímulos associados a ela, bem como a percepção acentuada e a prontidão no responder da mãe aos sinais emitidos pelo filhote.

² Neste texto, o termo mãe será usado como sinônimo de cuidador (a), sem fazer referência à maternidade biológica.

³ A principal função evolutiva do vínculo entre mãe e filhote não é clara, podendo ter sido a de assegurar a alimentação do filhote, protegê-lo de predadores e/ou fornecer oportunidades ao infante de aprender com sua mãe várias atividades necessárias à sobrevivência da espécie (Bowlby, 1969).

afetado por variáveis do próprio filhote (como sexo, experiências de asfixia no parto e danos cerebrais), por variáveis da mãe (como experiência com outras proles e experiências vividas durante a infância dela) e por variáveis do ambiente (como segurança e previsibilidade do ambiente e disponibilidade de alimentos). Colocando o foco na qualidade das interações, uma das grandes contribuições de Bowlby foi a de sugerir que o padrão do vínculo estabelecido influencia o desenvolvimento de aspectos da personalidade, podendo estar na base de algumas psicopatologias.

Mary Ainsworth (1913-1999) ampliou a contribuição de Bowlby, com proposições originadas de um longo trabalho de observação da relação entre mães e bebês. A partir dessas observações, ela e Bell (1969) sugeriram que a prontidão com a qual a mãe responde aos sinais do filho nos primeiros meses de vida influencia a forma como as relações sociais da criança se desenvolverão. Em testes realizados quando as crianças tinham cerca de um ano, mãe e bebê foram colocados em um ambiente novo, do qual a mãe se ausentava durante períodos breves (Ainsworth, Blehar, Waters & Wall, 1978). Diante de uma história de responder materno imediato e adequado, as crianças oscilavam entre exploração do ambiente e busca pela mãe, apresentando sinais de desconforto quando constataavam sua ausência. Esse padrão foi descrito como *apego seguro*. Por outro lado, quando o histórico de interações não envolvia um responder materno adequado, as crianças tendiam ou a explorar menos o ambiente e manter-se mais próximas de seus cuidadores (*apego inseguro ambivalente*) ou a ter respostas diminuídas de busca pela figura materna (*apego inseguro evitativo*). Pesquisas posteriores tentaram demonstrar o impacto do tipo de apego desenvolvido na infância sobre as relações sociais ao longo de toda a vida (Fraley, 2002).

Do ponto de vista da analítico-comportamental, vínculo e apego são rótulos sob os quais estão agrupados comportamentos que resultam em maior proximidade ou atenção de um cuidador (Gewirtz & Peláez-Nogueras, 1991; Schlinger, 1995). Esses rótulos, quando empregados, facilitam a comunicação com pesquisadores de outras abordagens que estudam a relação materna (Gewirtz & Peláez-Nogueras, 1991). Diferente de outras abordagens, contudo, para a Análise do Comportamento, compreender o vínculo envolve não só olhar para topografias de respostas (chorar e sorrir, por exemplo), mas principalmente para as relações funcionais entre essas respostas e o ambiente do filhote/criança (Schlinger, 1995).

Nessa mesma direção, Gewirtz e Peláez-Nogueras (1991) apontam que as reações da criança em situações nas quais a mãe se ausenta dependem das contingências que estiverem em vigor. Em uma pesquisa conduzida em laboratório com crianças de 6 a 11 meses, por exemplo,

eles orientaram cada mãe a dar um beijo em seu filho e avisar que sairia da sala (Gewirtz & Peláez-Nogueras, 1991). Em uma fase da pesquisa (Condição A), a mãe era orientada a não responder a qualquer protesto (choro, chamado, grito, etc) da criança frente à sua saída. Em outra fase (Condição B), a orientação era de que ela voltasse e conversasse com a criança quando esta fizesse qualquer protesto. Os episódios de separação foram conduzidos em um delineamento A-B-A, por 8 a 12 dias, com 6 a 8 separações por dia. Os resultados indicam que a frequência de protestos emitidos pelas crianças foi alta na Condição B e baixa nas Condições A. Com isso, os autores sugerem que a reação à separação pode ser aprendida de forma operante, com os protestos sendo modelados na relação com a mãe.

No estudo descrito (Gewirtz e Peláez-Nogueras, 1991), o padrão de interação exibido pela criança com a mãe mudou a depender da condição experimental em vigor, sugerindo que as contingências vigentes controlaram comportamentos frequentemente associados a diferentes tipos de apego (Ainsworth et al., 1978). Os teóricos clássicos do apego (Bowlby, 1969; Ainsworth et al., 1978), por sua vez, pautaram-se em dados correlacionais para sugerir que os vínculos iniciais têm um papel muito importante na determinação de como o indivíduo estabelece suas relações sociais ao longo da vida, dando menos ênfase a explicações pautadas nas contingências em vigor. Pensando na contraposição entre esses métodos e enfoques, seria importante, com métodos experimentais, ampliar a investigação sobre os efeitos das primeiras relações no desenvolvimento social da criança/filhote. Esta tese teve como objetivo central abordar tal questão, de um ponto de vista analítico-comportamental, identificando experimentalmente alguns impactos da separação materna no desenvolvimento de respostas sociais de ratos machos e fêmeas.

Sendo este um trabalho sobre impactos das relações iniciais no desenvolvimento de comportamentos sociais, antes de abordar os objetivos mais específicos da tese, serão discutidos: (1) aspectos comportamentais e biológicos de animais⁴, desde antes do nascimento, que contribuem para a formação dos vínculos iniciais, que geralmente se dão entre o filhote e sua mãe; (2) características gerais do desenvolvimento comportamental e biológico de ratos, animais utilizados como sujeitos nesta pesquisa, destacando-se as mudanças que geralmente são observadas no período de vida em que o procedimento experimental foi aplicado; e (3) aspectos relativos à pesquisa sobre separação materna em ratos, variável independente investigada nesta tese.

⁴ De forma coerente com o monismo, considera-se que o comportamento é um fenômeno biológico. A divisão entre biológico e comportamental, feita no texto, define apenas níveis diferentes de análise, não naturezas distintas.

Nascemos preparados para o vínculo: evidências experimentais.

Quando começa o desenvolvimento social? Hoje já se sabe que diferentes espécies são capazes de aprender no período pré-natal (James, 2010; Gehm, 2011) e, possivelmente, o desenvolvimento de comportamentos sociais já começa desde então. Mais especificamente, pesquisas sugerem que, antes do nascimento, é possível aprender por meio da exposição a estímulos (Courtenay, 1989, Hepper & Waldman, 1992, Sneddon, Hadden & Hepper, 1998, Coureaud, Schaal, Hudson, Orgeur & Coudert, 2002), do condicionamento respondente (Smotherman, 1982, Stickrod, Kimble, & Smotherman, 1982; Gruet, Richer & Hars, 2004, Kawai, Morokuma, Tomonaga, Horimoto, & Tanaka, 2004) e do condicionamento operante (Impekoven, 1973; Heaton, 1978). A aprendizagem por exposição a estímulos, também chamada de aprendizagem por familiaridade, provavelmente seja aquela que mais impacta a construção dos primeiros vínculos sociais, que, como dito, geralmente se dão entre a criança/filhotes e seus cuidadores.

A aprendizagem por exposição pode ser definida como o aumento do valor reforçador de um estímulo, ou a diminuição de seu valor aversivo, diante da exposição repetida a ele durante o período pré-natal ou neonatal (James, 2010; Gehm, 2011). Evidências sugerem que ela possui grande generalidade entre espécies, já tendo sido constatada em peixes (Courtenay, 1989), anfíbios (Hepper & Waldman, 1992), aves (Gottlieb, 1997; Sneddon et al., 1998), seres humanos (Varendi, Porter e Winberg, 1996; Kisilevsky et al., 2009) e outros mamíferos (Pedersen & Blass, 1982; Coureaud et al., 2002). Esse tipo de aprendizagem é importante para o vínculo porque, via de regra, os estímulos aos quais o organismo é repetidamente exposto no início da vida são justamente aqueles presentes no ambiente da mãe (Gehm, 2013). Ou seja, o que se torna reforçador para o feto são os estímulos próprios da mãe e próprios do ambiente dela, fazendo com que o recém-nascido prefira e se dirija mais a eles do que a outros aspectos do ambiente neonatal.

Esse tipo de aprendizagem atua, inclusive, na formação de alguns reforçadores sociais primários. Assim, no período pré-natal ou neonatal, se a exposição a estímulos ocorrer de maneira diferente da usual para um indivíduo, é possível que alguns desses reforçadores primários não se constituam como tal. Essa questão pode ser exemplificada por meio de uma pesquisa conduzida por Gottlieb (1997), que demonstrou que a preferência de patos por vocalizações da própria espécie poderia ser alterada com manipulações auditivas no ambiente pré-natal. Isolando ovos de patos de qualquer outro estímulo sonoro antes da eclosão, Gottlieb expôs um grupo de embriões à gravação do chamado de galinhas e outro grupo, à gravação do

chamado de patos. Logo após o nascimento, os filhotes foram expostos a ambos os chamados, avaliando-se para qual deles se dirigiriam. O que foi constatado é que os patos seguiram os chamados da espécie a qual haviam sido expostos no período pré-natal. Ou seja, aqueles expostos ao chamado da galinha, nasceram preferindo e seguindo vocalizações de uma espécie diferente da sua. Portanto, o estabelecimento das vocalizações da própria espécie como reforçador primário depende de experiências anteriores ao nascimento.

Da mesma forma como ocorre com patos, a voz humana provavelmente se constitua como um estímulo reforçador primário para os bebês por meio da aprendizagem por exposição. Ademais, é provável que vozes de pessoas específicas que foram ouvidas durante a gestação se tornem mais reforçadoras do que outras vozes. Nesse sentido, Kisilevsky et al. (2009) investigaram o responder diferencial de fetos humanos a estímulos sonoros conhecidos e desconhecidos. Em um dos estudos, os pesquisadores mensuraram o batimento cardíaco do feto diante de períodos de silêncio e diante da reprodução de gravações da voz da mãe (estímulo conhecido) e da voz de uma pessoa estranha (estímulo novo), reproduzidas perto do abdome materno. Em comparação ao período de silêncio, observou-se que os batimentos aumentaram com a voz materna, mas não com a voz da pessoa estranha. Outras pesquisas investigaram questões semelhantes com humanos recém-nascidos, constatando que os neonatos são mais responsivos à linguagem nativa do que a linguagens estrangeiras (Mehler et al., 1988; Moon, Cooper, & Fifer, 1993), a entonações do que a vozes monótonas (Mehler, Bertoncini, & Barriere, 1978), a histórias ouvidas durante a gestação do que a histórias inéditas (DeCasper & Spence, 1986).

Tal como ocorre com os estímulos auditivos, estímulos gustativos e olfativos com os quais o feto teve contato também se tornam mais reforçadores (Sneddon et al., 1998). Um dos estímulos que mais adquire valor reforçador no ambiente pré-natal, em decorrência da exposição do organismo a seu cheiro e gosto, é o líquido amniótico. Demonstração disso foi obtida por Arias e Chotro (2007), que expuseram filhotes de ratos de 12 dias de vida pós-natal ao pareamento entre o cheiro de etanol e o gosto do líquido amniótico, que havia sido coletado no momento do parto. Em um teste de consumo, realizado 4 dias depois, os animais expostos ao pareamento consumiram mais etanol do que os filhotes dos outros grupos, que haviam sido expostos previamente apenas ao álcool ou a nenhuma das substâncias. Assim, pelo pareamento com o líquido amniótico, o álcool teve seu valor reforçador aumentado. Em outro estudo, Teicher e Blass (1977) demonstraram a importância do cheiro/gosto do líquido amniótico para ratos na identificação e sucção das mamas da mãe no período logo após o parto. Mais

detalhadamente, quando a rata lactante tinha suas mamas lavadas, eliminando odores/gostos, as respostas de sucção não eram emitidas pelos neonatos. Por sua vez, quando as mamas haviam sido expostas a líquido amniótico ou à saliva da mãe, a sucção ocorria. Os autores propõem que a saliva estimule a sucção por conter elementos do líquido amniótico, tendo em vista que, no momento do parto, a lactante lambe a sua região genital, bem como as placentas e os filhotes recém-nascidos.

Evidências sugerem que, tal como em ratos, o líquido amniótico é um estímulo reforçador também para bebês humanos. Varendi et al. (1996) demonstraram isso aplicando tal substância em um dos dois seios de mães humanas, logo após o parto, e, em seguida, colocando o filho recém-nascido de cada uma delas no centro do abdome materno, com o rosto voltado para a linha média entre os dois seios. Eles avaliaram, então, a escolha do bebê entre as duas mamas, descobrindo que os recém-nascidos preferem, em sua maioria, o seio com cheiro do líquido amniótico. Schaal, Marlier e Soussignan (1998), por sua vez, mediram respostas de orientação dos bebês frente a duas amostras de líquido amniótico: uma retirada da mãe biológica e a outra, de uma pessoa desconhecida. Os resultados indicam que o cheiro do líquido com o qual foram gestados é discriminado e preferido pelos neonatos, sugerindo que a aprendizagem por exposição possibilita o desenvolvimento de um responder diferenciado a características singulares dos estímulos a qual o organismo foi exposto previamente.

O gosto e o cheiro do leite materno possuem semelhanças com o gosto e o cheiro do líquido amniótico, pois ambas as substâncias são influenciadas pela alimentação da mãe (Hepper, 1996). Assim, ao ser amamentado pela primeira vez, o neonato reconhece o colostro como sendo familiar devido ao fato de ele possuir características que são comuns àquelas presentes no líquido no qual estava envolto antes de nascer (Hepper, 1996). Isso provavelmente torne o leite da mãe mais reforçador, produzindo respostas de sucção mais frequentes e intensas. Algumas observações conduzidas por Hepper (1996), inclusive, sugerem que mães que passam por uma mudança grande na dieta logo após o parto apresentam maiores dificuldades em estabelecer a amamentação dos seus bebês no seio materno, devido à mudança no sabor do leite.

As demonstrações experimentais, portanto, permitem concluir que a formação do vínculo se inicia antes mesmo do nascimento, quando estímulos próprios da mãe e de seu ambiente se configuram como reforçadores para o filhote por meio da aprendizagem por exposição. Como visto, dentre estes estímulos estão vozes humanas ou vocalizações próprias da espécie, cheiro/gosto do líquido amniótico e do leite materno. Ainda não é clara, contudo, a contribuição de aprendizagens respondentes e operantes no período pré-natal para a construção

do vínculo. Ainda assim, elas serão mais detalhadas a seguir, com a finalidade de demonstrar que tais capacidades já estão presentes ao nascimento, quando se tornam inegavelmente importantes para a construção e manutenção da relação entre a mãe e o filhote.

As pesquisas sobre condicionamento respondente no período fetal são, geralmente, conduzidas com ratos (Smotherman & Robinson, 1985; Smotherman, 2002a, 2002b, 2003; Gruet et al., 2004), embora resultados positivos já tenham sido alcançados também com primatas (Kawai et al., 2004). A título de ilustração, pode-se citar a pesquisa de Smotherman e Robinson (1985), realizada com fetos de ratos. Nesse estudo, os pesquisadores induziram um pareamento pré-natal entre a menta, um estímulo inicialmente neutro, e o cloreto de lítio (LiCl), um estímulo aversivo incondicionado que causa irritação gastrointestinal e produz uma redução geral na movimentação dos fetos. Eles observaram que, diante de uma história de pareamento, a mera exposição posterior do feto à menta gerava uma redução nos movimentos dos mesmos, sugerindo que ela adquiriu função de estímulo condicionado por meio de uma aprendizagem respondente anterior ao nascimento.

Uma vez que os estudos sobre aprendizagem respondente em fetos envolvem, geralmente, procedimentos invasivos, são raras as pesquisas que utilizaram humanos como sujeitos experimentais (Gehm, 2011). Um dos únicos estudos realizados com humanos foi conduzido por Spelt (1948), que expôs fetos nos últimos meses de gestação a uma estimulação vibratória aplicada sobre o abdome da mãe (estímulo neutro), seguida por um ruído forte (estímulo aversivo incondicionado). A resposta mensurada era o movimento fetal, avaliada por meio de uma goma sensível a pequenas variações de pressão colocada no abdome materno. Para o grupo experimental, após o pareamento, foram detectados movimentos fetais frente à estimulação vibratória. Para o grupo controle, previamente exposto à estimulação vibratória, mas não ao som alto, nenhum movimento foi detectado frente à vibração. Embora Spelt (1948) tenha concluído que seus dados eram suficientes para afirmar a existência de aprendizagem respondente pré-natal em humanos, Bijou e Baer (1965) sugeriram que o procedimento apresentava falhas metodológicas importantes, como a possibilidade de que as respostas registradas pudessem ser contrações uterinas produzidas pelas mães, que também ouviam o som, e não movimentos fetais.

Os estudos sobre condicionamento operante no período pré-natal, por sua vez, são mais escassos (Impekoven, 1973; Heaton, 1978). Em um desses estudos, Impekoven (1973) avaliou o comportamento de patos, um dia antes do nascimento dos mesmos. Abrindo uma pequena janela acima da câmara de ar do ovo, ela conseguiu observar o movimento dos pés dos filhotes

antes da eclosão, mensurando a frequência dessa resposta em uma condição de silêncio e em uma condição na qual tal movimentação tinha como consequência a liberação do som de aves⁵. Para um grupo experimental, o chamado de ave liberado era próprio de patos; para o outro, era próprio de galináceos. Em comparação à condição de silêncio, apenas o grupo que tinha o chamado de patos liberado contingente à movimentação dos pés apresentou aumento da frequência dessa resposta. Tais dados sugerem que o chamado de patos, mas não o de galináceos, atuou como consequência reforçadora, aumentando a frequência de respostas que produziam seu som. Portanto, é possível concluir que, mesmo antes do nascimento, patos são capazes de aprender relações operantes em esquemas de reforçamento positivo. Ampliando a pesquisa de Impekoven (1973), Heaton (1978) também encontrou evidências de aprendizagem por reforçamento negativo em patos, dois dias antes da idade de eclosão.

Embora não sejam conhecidas pesquisas que estudaram o condicionamento operante no período pré-natal com outras espécies, é bastante provável que filhotes de mamíferos já nasçam capazes de aprender por meio de suas consequências. Nesse sentido, desde o nascimento (ou antes dele), aprendizagens respondentes, operantes e por exposição se somariam na construção do vínculo. Ou seja, é provável que uma vez estabelecido o valor reforçador de estímulos sociais, pela exposição do organismo a eles ou por outros meios, estes passem a integrar contingências de condicionamento operante e respondente. Dessa forma, as respostas que geram tais estímulos seriam fortalecidas por aprendizagem operante e, por meio da aprendizagem respondente, novos estímulos relacionados aos cuidadores se tornariam reforçadores.

Em uma pesquisa que evidenciou tal questão, Sai (2005) avaliou o desenvolvimento da preferência pelo rosto da mãe biológica em função do contato pós-natal do neonato com a voz dela. Mais detalhadamente, logo após o parto, mães foram orientadas a interagir com seus filhos recém-nascidos por 5 a 15 minutos. Um grupo delas foi orientado a fazer o que quisesse na interação, exceto emitir qualquer som. Para o outro grupo, o som era permitido. A preferência pelo rosto materno foi avaliada em um teste visual algumas horas depois desse contato. No teste, a mãe e uma mulher estranha ao bebê foram colocadas atrás de um aparato e orientadas a não falar. Mensurou-se, então, o número de vezes que o neonato se virou para cada uma delas.

⁵ Apesar dessa informação não ser descrito pela autora, sabe-se que no dia anterior à eclosão, os animais já haviam sido expostos ao som da própria espécie e, assim, seu valor reforçador já havia sido estabelecido. Isso pode ser concluído porque os patos começam a piar cerca de 2 a 3 dias antes de eclodir e são capazes de escutar a própria vocalização. Segundo Gottlieb (1997) a escuta do seu próprio piar é suficiente para o desenvolvimento do chamado da própria espécie como reforçador.

Como resultado, apenas os recém-nascidos do grupo previamente exposto a som olharam mais para a mãe do que para a estranha. Os demais bebês tiveram comportamentos semelhantes frente aos dois rostos. Por esse dado, é possível concluir que a preferência e a discriminação do rosto materno são favorecidas pelo contato com a voz da mãe. Supõe-se, assim, que o rosto tenha adquirido função reforçadora pelo pareamento respondente entre ele e a voz materna, cujo valor reforçador foi previamente aprendido pela exposição no ambiente pré-natal.

No que tange às aprendizagens no período neonatal, há, contudo, um ponto que merece mais destaque: evidências científicas sugerem que as aprendizagens de algumas relações respondentes no período neonatal possuem especificidades que as diferem das aprendizagens observadas em animais adultos. Como será esclarecido adiante, é possível que tais especificidades tenham sido selecionadas ao longo da evolução por serem importantes para a manutenção do vínculo do filhote com sua mãe.

Um estudo, feito por Roth e Sullivan (2001) se mostrou relevante para essa discussão. Nele, filhotes de ratos de 8 ou 12 dias foram submetidos a uma de três condições: (1) pareamento - exposição à menta (estímulo neutro) e, após 1s, a choque elétrico (estímulo aversivo incondicionado); (2) atraso - exposição à menta e, após 2min, a choque elétrico; ou (3) menta - exposição à menta sem choque elétrico. No dia seguinte, os animais foram testados em um Labirinto em Y, tendo que escolher entre um braço do labirinto no qual havia cheiro de menta, ou um braço com cheiro de madeira (estímulo neutro). Filhotes que passaram pela condição de pareamento aos 12 dias de vida, em comparação aos grupos atraso ou a menta, tiveram menor frequência de escolha do braço com menta, indicando que ela adquiriu propriedades aversivas a partir da associação com o choque. Entretanto, quando os ratos passaram pelo pareamento no 8º dia de vida, o braço com menta foi escolhido na quase totalidade das tentativas, sugerindo que ela adquiriu propriedades reforçadoras, ao invés de aversivas, a partir da associação com o choque.

Dados semelhantes ao de Roth e Sullivan (2001) foram obtidos em outras pesquisas, indicando que, até os 9 dias de vida de ratos, estímulos neutros pareados a estímulos aversivos adquirem propriedades reforçadoras (Camp & Rudy, 1988; Roth & Sullivan, 2005; Moriceau, Wilson, Levine, & Sullivan, 2006). Uma possibilidade para explicar esses resultados seria a de que os filhotes, até essa idade, podem não sentir dor frente a choques ou outros estímulos supostamente aversivos. Porém, evidências experimentais sobre alterações comportamentais e biológicas de ratos neonatos frente a estímulos aversivos incondicionados indicam o oposto (Collier & Bolles, 1980; Emerich, Scalzo, Enters, Spear, & Spear, 1985). Outra possibilidade,

avertada por Moriceau, Roth e Sullivan (2010), é de que o pareamento aversivo até os 9 dias de vida não se dê da mesma maneira que em adultos porque, de outra forma, prejudicaria o vínculo entre o filhote e sua mãe.

Mais especificamente, Moriceau et al. (2010) sugerem que, nos primeiros 9 dias de vida, ratos são extremamente dependentes de cuidado materno, que geralmente vem acompanhado de patadas, mordidas e outros estímulos dolorosos provenientes do contato com a mãe. Pelas leis do condicionamento respondente, seria possível que, a partir disso, alguns estímulos associados à mãe adquirissem propriedades aversivas, fazendo com que os filhotes se afastassem deles e, portanto, da própria mãe, o que seria desvantajoso para a sobrevivência (Moriceau et al., 2010). Por outro lado, após os 9 dias, os ratos começam a andar e o contato com o mundo se amplia para além do ninho, de forma que o ambiente se torne mais perigoso e seja mais importante que alguns estímulos condicionados passem a ser evitados. Observa-se, então, uma mudança no processo comportamental (Moriceau et al., 2010): enquanto o pareamento de um estímulo neutro a um aversivo incondicionado gera, até os 9 dias, aumento do valor reforçador do estímulo condicionado, após os 9 dias, gera aumento de seu valor aversivo. Segundo Moriceau e Sullivan (2005), tal mudança no processo coincide com alterações orgânicas no circuito neural de condicionamento de medo que, no infante, envolve regiões como o bulbo olfativo e locus cerúleo e, no adulto, regiões como amígdala, hipocampo e o córtex frontal.

Dados obtidos por uma pesquisa conduzida por Martin e Alberts (1979), porém, permitem supor que a mudança no processo comportamental não se encerre no 10º dia de vida. Até a idade próxima ao início do desmame (21 dias), quando o filhote ainda é dependente da mãe, o aumento do valor aversivo de um estímulo em função de seu pareamento a um incondicionado não ocorre em qualquer contexto. Mais especificamente, expondo filhotes de até 16 dias de vida ao pareamento entre leite com gosto de geraniol e cloreto de lítio, Martins e Alberts (1979) demonstraram que a aversão pelo gosto de geraniol só se formou quando, no pareamento, o contato com o leite não foi contingente a respostas de sucção. Já quando a exposição ao pareamento foi feita com filhotes de 21-22 dias, a aversão foi constatada a despeito da forma como se deu o contato com o leite.

Temporalmente, esses dados coincidem, ao menos em partes, com um fenômeno chamado de *The Stress Hyporesponsive Period* (SHRP), que se estende do 4º ao 14º dia de vida de ratos, durante a qual o filhote é pouco responsivo a estressores (Levine, 2001). Em termos biológicos, ele se traduz como uma relativa inatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

(HPA) e em níveis de circulação de corticosterona/cortisol relativamente baixos a despeito da exposição a alguns estressores (Callaghan & Richardson, 2013). O SHRP é visto como um mecanismo de proteção importante, pois altos níveis desses hormônios no início da vida podem prejudicar o desenvolvimento normal do cérebro e, conseqüentemente, promover prejuízos comportamentais (Lehmann & Feldon, 2000). Curiosamente, esse mecanismo pode ser inibido se o filhote for separado de sua mãe por um período prolongado (Lehmann & Feldon, 2000).

Segundo Gunnar e Donzella (2002), bebês humanos também demonstram essa redução de respostas biológicas ao estresse ao longo do primeiro ano de vida. Além de um ritmo de funcionamento diferente do adulto, os bebês apresentam uma rápida adaptação do eixo HPA a estressores repetidos. Geralmente, observam-se níveis menores de liberação de glucocorticóides já na segunda exposição ao estressor. Contudo, isso ocorre apenas quando há indicativos da presença da mãe. Do contrário, os níveis de glucocorticóides atingem valores tão ou mais altos do que os dos adultos. Gunnar e Donzella sugerem, assim, que os efeitos funcionais observados em bebês podem ser considerados semelhantes àqueles do período SHRP em ratos, tanto na redução das respostas biológicas ao estresse quanto no papel da mãe na regulação do fenômeno. Como os mecanismos subjacentes a isso em humanos ainda não foram completamente elucidados, a semelhança com os ratos é considerada apenas análoga, não podendo ainda se concluir algo sobre a homologia.

Em suma, as evidências sugerem que, ao menos para ratos, a presença da mãe pode modular a aquisição da função aversiva de alguns estímulos, bem como alterar eventos biológicos que são típicos no desenvolvimento de filhotes. Além disso, no início da vida, as aprendizagens respondentes não se dão exatamente da forma prevista e, por extensão, a aquisição da função reforçadora e aversiva em contingências operantes, também não. Diversas pesquisas têm demonstrado que, do ponto de vista biológico, variações na relação materna e no ambiente inicial do desenvolvimento alteram desde a expressão gênica (Fish et al., 2004; Weaver et al., 2004; Oberlander et al., 2008) até a estrutura e o funcionamento cerebral (Braun, Lange, Metzger & Poeggel, 1999; Ovtscharoff Jr. & Braun, 2001; Korraa, Nagger, Mohamed & Helmy, 2014). Mas, do ponto de vista analítico-comportamental, quais são os impactos de variações na relação materna e no ambiente inicial sobre o desenvolvimento comportamental posterior? Essa é uma questão que ainda precisa ser mais investigada.

Considerações sobre o desenvolvimento geral de ratos

Esta seção foi destinada à descrição de marcos típicos do desenvolvimento de ratos. Isso foi feito com o objetivo de situar o leitor sobre características dos organismos que foram utilizados como sujeitos dessa pesquisa, bem como sobre os processos no qual a separação materna pode interferir ao ser aplicada em uma idade ou outra. Os dados apresentados foram pautados tanto na literatura especializada sobre o desenvolvimento comportamental de diferentes linhagens de *Rattus norvegicus* criados em cativeiro (Meaney & Stewart, 1981; Pass & Freeth, 1993; Whishaw & Kolb, 2005, entre outros), quanto em observações diárias feitas em nosso laboratório com mais de 30 proles de *Rattus norvegicus* da linhagem Sprague-Dawley. Essas observações foram registradas por meio de escrita livre e/ou pelo preenchimento de um questionário (Apêndice 1) sobre características físicas e comportamentais dos animais⁶. Quando os dados obtidos por nós foram conflitantes com a literatura, priorizou-se aqui a descrição dos nossos, por terem sido coletados com a mesma linhagem e ambiente adotados nesta pesquisa.

Começando pela gestação, sua duração varia entre 21 e 22 dias, nascendo, em geral, 8 a 16 filhotes por vez, com proporção equiparada entre os sexos (Rees, Lovic & Fleming, 2005). O trabalho de parto leva cerca de 6h, desde o início das contrações até o nascimento do último filhote (Alberts, 2005). Cada filhote nasce dentro de um saco amniótico, que é removido e ingerido pela mãe entre os nascimentos. Após todos os filhotes serem expelidos do corpo materno e limpos, a mãe os agrupa em um ninho e, logo depois, posiciona seu o corpo por cima deles. Isso permite o aquecimento da prole, bem como a amamentação, sendo ambos necessários para a sobrevivência dos filhotes (Alberts, 2005). O primeiro episódio de amamentação fica, sobretudo, sob controle olfativo (Teicher & Blass, 1977; Alberts, 2005), de forma que filhotes que nascem sem olfato não conseguem mamar e, com isso, acabam morrendo. Mais especificamente, o odor presente nos mamilos gera maior agitação motora nos neonatos, levando-os acidentalmente ao contato com as mamas que, por estimulação tátil, ativa o reflexo de sucção (Alberts, 2005).

Durante o cuidado materno, do nascimento ao desmame, a mãe emite comportamentos como agrupar os filhotes, lambê-los e fazer *grooming* neles, ficar sobre a prole, amamentá-la e construir o ninho (Rees, Lovic & Fleming, 2005). As lambidas e o *grooming* são feitos tanto na parte anogenital, ocorrendo mais frequentemente durante a amamentação, como no resto do

⁶ Os questionários foram preenchidos por dois observadores, avaliando-se o índice de concordância. Para todos os itens, o índice kappa foi superior a 80%, indicando uma concordância quase perfeita (Landis e Koch, 1977).

corpo, ocorrendo em contextos menos específicos (Rees, Lovic & Fleming, 2005). Como os filhotes nascem incapazes de urinar e defecar sozinhos, a estimulação anogenital provida pela mãe tem a função de ativar neles o reflexo de micção e de estimular a defecação (Alberts, 2005). Ao mesmo tempo, suas fezes/urinas, ricas em sódio, são fontes de hidratação para mãe nos dias após o parto, estimulando nela as lambidas e o *grooming* na região. Conforme a prole cresce e os rins se desenvolvem, os filhotes adquirem maior controle da musculatura anogenital e, paralelamente, suas urinas/fezes deixam de ser atrativas para a mãe (Alberts, 2005).

Ao nascerem, no dia 0, os ratos possuem uma coloração rosada, sem pelos. A pele é tão fina que é possível ver as bordas de alguns órgãos internos a olho nu. No local dos olhos dos ratos, há apenas uma protuberância e, no local do pavilhão auditivo, apenas uma dobra na pele (Alberts, 2005). Os primeiros pelos começam a ser vistos a partir do 4º dia de vida e, por conta do crescimento deles, a coloração do animal fica mais branca a cada dia. No 6º dia, a linha da pálpebra superior já começa a ser vista e, por volta do 13º dia, ocorre a abertura dos olhos. Por sua vez, o pavilhão auditivo separa-se, em partes, da cabeça por volta do 9º dia e o canal auditivo se abre por volta do 12º dia. Algumas mudanças corporais dos filhotes, entre o 1º e o 21º dia de vida, podem ser observadas na Figura 1.

Desde o nascimento, os animais já conseguem se movimentar, embora de forma rudimentar. Nos primeiros dias, quando estão de bruços, seus membros muitas vezes se esticam para fora da região abdominal e os movimentos são descoordenados, de forma que apenas parte deles resulte em deslocamento. Quando se deparam com pequenas frestas, um comportamento típico dos neonatos é posicionar a cabeça na fresta e movimentar seus membros, o que normalmente resulta no deslocamento do filhote para dentro do buraco que a fresta configura. Isso é de grande vantagem na disputa pela amamentação com o restante da prole, tendo em vista que os corpos dos irmãos que estão sendo amamentados bloqueiam o acesso direto às mamas e a única forma de atingi-las é passando pelos pequenos orifícios que se formam entre os corpos. Só entre o 8º e o 9º dia é que o animal passa a sustentar a cabeça, o que facilita também a sustentação do restante do corpo e permite o andar, que ocorrem por volta do 10º dia de vida. A sustentação da cabeça também permite a emissão de respostas típicas de farejar, caracterizadas por movimentações rápidas da ponta do focinho e das vibrissas em direção a um local específico e movimentos respiratórios acelerados, embora alguma sensibilidade olfativa já esteja presente desde o nascimento.

Figura 1. Imagem de filhotes de ratos da linhagem Sprague-Dawley, entre o 1º e o 21º dia de vida, ilustrando algumas das mudanças corporais pelas quais eles passam durante o desenvolvimento.

Em torno do 15º dia, a mãe começa a restringir os períodos de amamentação, sendo o calor gerado pelo contato com a prole um dos estímulos ambientais que aparentemente controla o início desse processo (Alberts, 2005). Para tanto, o comportamento dela é de pressionar suas mamas contra o solo ou as paredes, em alguns momentos, impedindo que a prole tenha livre acesso às mamas (Cramer, Thiels & Alberts, 1990), conforme pode ser visto na Figura 2. Paralelamente, entre o 14º e o 15º dia, os filhotes começam a ingerir água e alimentos sólidos. No início, consomem as migalhas da mãe, que por ser a comida normalmente ingerida por ela, possui alguma similaridade com o sabor do leite (Alberts, 2005). Aos 16 dias de vida, já podem ser observados episódios de disputa por alimento entre os animais da prole, com um “roubando” a comida do outro. No 19º dia, por sua vez, os animais já começam a desenvolver comportamentos que evitam o “roubo”, girando o corpo em outra direção quando um dos irmãos se aproxima durante a alimentação (Alberts, 2005). Em laboratório, o desmame é feito geralmente aos 21 ou 22 dias, retirando-se a prole do contato com a mãe (Pass & Freeth, 1993).

Figura 2. Comportamento materno de pressionar as mamas contra as paredes no período do desmame, tendo como consequência evitar que os filhotes tenham acesso a elas.

O brincar social – entendido aqui como um conjunto de comportamentos apresentados por pelo menos dois ratos, envolvendo atividade locomotora que propicia interação física entre eles – começa a ser visto esporadicamente em torno do 16º dia de vida. Alguns dos episódios

de brincar surgem como derivações do contato entre os animais na disputa pelo alimento, de forma que, quando isso ocorre, o alimento é deixado de lado. Sua frequência aumenta com o passar dos dias, atingindo um pico entre a 4ª e a 5ª semana de vida (22 a 35 dias, Meaney & Stewart, 1981; Thor & Holloway, 1984; Vanderschuren, Achterberg & Trezza 2016). Segundo Thor e Holloway (1984), tal pico corresponde a um período de 7 a 10 dias antes do início da puberdade.

A puberdade, em machos, é avaliada por meio da separação entre glândula e prepúcio do pênis (Korenbrodt, Huhtaniemi & Weiner, 1977), que ocorre por volta do 41º dia de vida, após o aumento da procura pelo sexo oposto, ao redor do 36º dia (Meaney & Stewart, 1981). Para a maioria dos machos, as primeiras montagens sobre fêmeas ocorrem entre o 41º e o 45º dia, com picos de frequência entre o 46º e o 50º dia e decréscimos a partir do 51º dia. Nas fêmeas, por sua vez, o dia de abertura vaginal, que marca o início da puberdade, se dá em torno do 34º dia. Poucos dias depois, ocorre o primeiro estro – fase do ciclo estral correspondente à ovulação e à receptividade sexual. Em fêmeas adultas, esta fase ocorre a cada 4 ou 5 dias, porém, em ratas mais jovens a periodicidade entre os primeiros estros é mais irregular (Zemunik et al., 2003). A lordose, comportamento sexual feminino que indica receptividade sexual, surge entre o 41º e o 45º dia (Meaney & Stewart, 1981) e tem sua frequência progressivamente aumentada até o 55º dia (Brown, 2005). A fertilidade das fêmeas é observada até a idade de, aproximadamente, 1,5 anos (Durbin, Williams, Jeung & Arnold, 1966), quando esta entra na menopausa.

Pesquisas sobre separação materna em ratos: métodos e resultados

Uma das formas de investigar experimentalmente o impacto da ausência materna em ratos é por meio do emprego de procedimentos de *separação materna*. De forma geral, o que une as diferentes pesquisas que utilizam esse procedimento é o estabelecimento, anterior ao desmame, de pelo menos um episódio de privação prolongada do contato entre a mãe e um ou mais filhotes. Após cada episódio de separação, o contato entre eles é, então, reestabelecido.

Apesar de experimentos sobre os efeitos separação materna serem conduzidos desde a década de 1970 (Lehmann & Feldon, 2000), até hoje não há consistência nos resultados observados com esse tipo de procedimento. Por exemplo, enquanto alguns estudos sugerem que a separação materna gera aumento da ansiedade (Sousa et al., 2014; Bailoo, Jordan, Garza & Tyler, 2014) e prejuízo na aprendizagem de respostas de esquiva (Lehmann, Pryce, Bettschen, & Feldon, 1999), outros indicam que ela pode ter efeito ansiolítico (Rodríguez & Dueñas, 2013;

Llidó, Mòdol, Darbra & Pallarès, 2013) e melhora no desempenho em uma aprendizagem de esquiva (Lehmann, Pryce, Bettschen, & Feldon, 1999). A inconsistência provavelmente decorra das diferenças entre detalhes dos procedimentos adotados pelos diferentes laboratórios, tal como indica uma revisão crítica da literatura apresentada por Lehmann e Feldon, em 2000.

Como já se passaram 17 anos desde a publicação de Lehmann e Feldon (2000), nessa seção são apresentadas as análises feitas por eles, acrescida de uma avaliação, feita ao longo deste estudo, de diferenças metodológicas observadas entre artigos experimentais recentes que analisaram os efeitos da separação materna. Para a condução da avaliação dos artigos recentes, uma pesquisa na base de dados *PsycNet* foi realizada no dia 01 de julho de 2017, utilizando os descritores “maternal separation” e “rats” no título. Delimitou-se também que fossem selecionados apenas artigos publicados a partir de 2011. Ao todo, 80 referências foram fornecidas pela *PsycNet*, das quais 70 de fato tratavam da temática da separação materna. As demais haviam empregado procedimentos distintos, tais como desmame precoce, ou separação natural que ocorre entre mãe e filhote na ontogênese. Todos os 70 artigos foram lidos e as análises apresentadas aqui sobre o cenário atual da área foram feitas com base nessa leitura.

De acordo com Lehmann e Feldon (2000), há diversos aspectos importantes no procedimento de separação materna que variam entre as pesquisas, como a frequência e duração dos episódios de separação, o período etário em que ela é feita e o tipo de grupo controle estabelecido. Com relação à frequência, eles apontam a existência de três tipos de procedimento: (a) separação diária dos filhotes por algumas horas durante dias consecutivos, (b) separação repetida em dias não consecutivos ou (c) uma única separação (geralmente de 24h). A nossa análise dos artigos indicados pela *PsycNet*, porém, revelou maior consistência da escolha da frequência no cenário atual, com mais de 94% das pesquisas tendo utilizado um protocolo de separação materna do tipo (a), em dias consecutivos. Por sua vez, no que se refere à duração da separação, há indicações de que o período de duas horas seria o mínimo necessário para que algum efeito seja observado em medidas relativas ao eixo HPA (Lehmann & Feldon, 2000). Os artigos publicados nos últimos anos utilizaram períodos de 3hs ou mais, sendo que a maioria das pesquisas (64,2%) utilizou 3hs de separação diária.

Como mostrado na seção anterior, a idade é uma variável de grande importância, considerando o quanto o organismo e as possibilidades de interação mudam nos primeiros dias de vida. Curiosamente, essa foi justamente a dimensão que mais variou entre os artigos indicados na busca pela *PsycNet*. As faixas etárias nas quais o procedimento foi aplicado com maior frequência foram a dos 2 aos 14 dias (cerca de 37%), abrangendo o SHRP, e do 1º ao 21º

dia (cerca de 21%), abrangendo todo o período de amamentação. Apenas 2 dos 70 artigos se debruçaram sobre uma comparação dos efeitos entre diferentes faixas etárias. O primeiro (Cao et al., 2014) apresentou dados que sugeriram maior prejuízo em uma tarefa de aprendizagem espacial para animais submetidos à separação nos dias 14-21 do que para aqueles submetidos entre os dias 2-9. O outro (Roque, Mesquita, Palha, Sousa, & Correia-Neves, 2014) identificou respostas indicativas de depressão e ansiedade mais intensas em animais submetidos ao procedimento entre os dias 2-15 do que entre os dias 7-20. Ou seja, por esses dados é possível supor que não seria a precocidade da separação a variável mais importante, podendo haver diferentes períodos mais críticos para a aplicação do procedimento, a depender da variável dependente que está sendo investigada.

No que tange à origem dos animais do grupo controle, Lehmann e Feldon (2000) apontam algumas possibilidades: retirá-los da mesma ninhada que os animais experimentais ou retirá-los de ninhadas diferentes. No primeiro caso, enquanto alguns filhotes são isolados do contato com a mãe, configurando o grupo experimental, os demais permanecem em contato com ela, configurando o grupo controle. Esse tipo de prática permite diminuir a variabilidade entre os grupos, tendo em vista que, para ambos, variáveis genéticas e maternas serão semelhantes. Por outro lado, em decorrência da redução temporária do tamanho da prole, a retirada de alguns animais no período de separação pode resultar em maior cuidado destinado aos animais que permanecem em contato com a mãe. Esse aumento do cuidado pode gerar dificuldade na interpretação dos dados, não permitindo identificar se as diferenças se devem à ausência da mãe no grupo experimental, ao cuidado desproporcional recebido pelo grupo controle, ou à interação entre esses dois fatores. Por sua vez, a utilização de proles diferentes para grupos diferentes é geralmente feita aplicando-se o mesmo procedimento a todos os animais da ninhada. Isso aumenta a variabilidade entre os grupos, mas elimina a dificuldade de análise decorrente do procedimento anterior. Além disso, tendo em vista que os 70 artigos avaliados, sem exceção, utilizaram diferentes ninhadas para diferentes grupos, a adoção dessa estratégia aumenta a possibilidade de comparação dos dados de uma nova pesquisa com o restante da literatura.

Lehmann e Feldon (2000) apontam outra questão relativa ao grupo controle: sua manipulação no período anterior ao desmame. Segundo eles, uma das possibilidades é não manipular os filhotes até o dia do desmame, sendo essa prática denominada *no handling* (NH). Isso evita qualquer separação, ainda que breve, entre mãe e prole, mas dificulta a limpeza e manutenção das caixas-viveiro. Outra possibilidade, é manipular os filhotes apenas durante os

procedimentos padrões de controle e manutenção das condições básicas (*animal facility reared*, AFR), tais como sexagem dos filhotes e limpeza da caixa-viveiro, sendo uma opção mais adaptada à rotina normal dos biotérios. A terceira e última opção, conhecida como *early handled* (EH) é separá-los brevemente de suas mães nos mesmos dias que a separação materna é conduzida, mas por período mais curtos de tempo - geralmente, 15 min a cada vez. Isso torna a questão da manipulação humana equivalente entre os grupos (Lehman & Feldon, 2000).

Fora do contexto das pesquisas de separação materna, o *early handled* é um procedimento amplamente investigado na literatura, sendo reconhecido por gerar mudanças no desenvolvimento comportamental e biológico dos filhotes (Raineke, Lucion & Weinberg, 2014). Essas mudanças são muitas vezes atribuídas não às breves separações em si, mas ao aumento da frequência das lambidas e do *grooming* materno sobre os filhotes no momento do reencontro com a mãe. Considerando que esses períodos curtos de separação geralmente acontecem na natureza, alguns acreditam que o *early handled* mimetize mais a realidade do cuidado materno na espécie do que as outras duas opções (Lehmann & Feldon, 2000). Nossa posição, contudo, é que o seu uso é menos interessante que os demais, uma vez que pode envolver o mesmo fenômeno investigado no grupo experimental. Ou seja, a escolha por este tipo de grupo controle pode resultar em um procedimento que não isola os efeitos da separação materna.

Nos dados recentemente coletados da literatura, observa-se que a grande maioria dos artigos optou pelo uso do *animal facility reared* como grupo controle (como Rodrigues & Dueñas, 2013 e Vivinetto, Suárez & Rivarola, 2013, por exemplo). Aqueles que fazem uso do *early handled* normalmente adicionam algum outro tipo de grupo controle, geralmente o *animal facility reared* (Xue, Shao, Wang & Shao, 2013; Park, Kim, Kang, Chung & Kim, 2014, por exemplo).

Outras diferenças nos procedimentos empregados entre os artigos identificados pela busca na *PsycNet* puderam ser observadas, sobretudo em relação a alguns cuidados com os filhotes durante os períodos de separação. Embora a maioria dos procedimentos tenha descrito que a ninhada permaneceu junta durante o período de separação materna, algumas pesquisas isolaram os filhotes não só das mães como também dos irmãos (por exemplo, Hensleigh & Pritchard, 2014 e Wang, Li, Du, Shao & Wang, 2015). Além disso, enquanto grande parte das pesquisas utilizou formas artificiais de aquecimento dos filhotes quando estes estavam sem a mãe (Dimatelis, Vermeulen, Bugarith, Stein & Russell, 2015; Wang et al., 2015, por exemplo), outras não o fizeram (Yoo et al., 2011).

A partir de tudo o que foi apontado, pode-se concluir que algumas características metodológicas são mais frequentes nas pesquisas atuais: a separação materna é geralmente conduzida em dias consecutivos, durante 3hs, entre os dias 2-14 ou 1-21. O grupo controle normalmente utilizado é proveniente de ninhadas diferentes das do grupo experimental, sendo adotada, com mais frequência, a prática denominada “*animal facility reared*” na manipulação desses animais. Ademais, na maioria dos estudos, os animais separados são mantidos em contato com a ninhada durante a ausência da mãe. Porém, apesar de haver uma predominância na escolha da duração, frequência, idade e grupo controle, os procedimentos empregam diferentes combinações para esses parâmetros, tornando a inconsistência metodológica um cenário ainda atual.

Com relação aos comportamentos mais investigados, a maioria dos 70 artigos mensurou aspectos relacionados à ansiedade (Roque et al., 2014; Dimatelis et al., 2015; Wang et al., 2015, entre outros), à memória (Sun, Tu, Shi, Xue & Zhao, 2014; Wang et al., 2015; Tata et al., 2015, entre outros), ao condicionamento e extinção de medo (Sampath et al., 2014; Sun et al., 2014; Xiong, Yang, Wang, Xu & Mao, 2014, entre outros) e à depressão (Leussis, Freund, Brenhouse, Thompson & Andersen, 2012; Roque et al., 2014; Dimatelis et al., 2015, entre outros). Como já adiantamos, os resultados foram inconsistentes, com dados que indicam melhora, piora ou não influencia da separação materna em qualquer um desses campos.

Foi possível constatar também que, nos artigos recentes, pouco se investigou sobre a influência da separação materna em comportamentos sociais. Apenas três deles apresentaram medidas relacionadas ao brincar social (Muhammad & Kolb, 2011; Bodensteiner, Christianson, Siltumens & Krzykowski, 2014; Lundberg, Martinsson, Nylander & Roman, 2016), sendo que um desses artigos (Bodensteiner et al., 2014) analisou também questões relacionadas a comportamentos de cópula em animais submetidos à separação materna. Com relação ao brincar, os três artigos adotaram procedimentos diferentes e encontraram resultados também distintos: não efeito (Bodensteiner et al., 2014), diminuição da probabilidade de ataque (Muhammad & Kolb, 2011) ou aumento do número de *pinnings*⁷ (Lundberg et al., 2016) em animais submetidos à separação materna. No campo do comportamento sexual, Bodensteiner et al. (2014) avaliou o contato de ratos machos com fêmeas, constando menor frequência de comportamentos de cópula em machos submetidos à separação materna. Nenhum trabalho

⁷ *Pinnings* e ataques são tipos de comportamentos frequentemente emitidos durante os episódios de brincadeira social. O ataque é caracterizado pela aproximação do focinho de um animal à nuca do outro e o *pinning* se caracteriza pelo contato dorsal de um dos animais com a superfície, enquanto outro animal (que faz o *pinning*) fica por cima de seu corpo, geralmente prendendo-o (Panksepp, Siviy & Normansell, 1984).

analisou como se dá, na idade adulta, o comportamento materno de fêmeas que passaram pelo procedimento de separação na infância.

Objetivos

É indiscutível que a relação entre o filhote e a mãe seja de suma importância nos primeiros momentos da vida, sobretudo pelo fato de que a mãe geralmente se configura como o principal ambiente do recém-nascido. Entretanto, ainda não é claro como o que acontece nessa relação inicial impacta o comportamento do animal em longo prazo. Então, cabe o questionamento: mantendo-se o ambiente de desenvolvimento relativamente semelhante entre dois animais, se um deles passar por separação materna na infância e o outro não, os comportamentos de ambos se desenvolverão de forma semelhante? Esta pesquisa investiga tal questão, escolhendo como alvo de análise os comportamentos sociais. Para tanto, investigou-se se a exposição de ratos machos e fêmeas à separação materna entre o 2º e o 14º dia de vida pós-natal altera o desenvolvimento de alguns comportamentos sociais.

A investigação se dividiu em três partes, buscando efeitos da separação materna sobre (1) o brincar social, dos 28 aos 36 dias; (2) o comportamento sexual, da puberdade à idade adulta; e (3) o comportamento materno (apenas em fêmeas), na idade adulta. Cada uma dessas partes configurou um artigo, apresentado nas páginas que se seguem. A delimitação dos objetivos de cada artigo foi feita considerando não apenas a questão central desta tese, mas também as lacunas presentes nas pesquisas já realizadas sobre cada um dos comportamentos investigados. Além disso, nos Artigos 2 e 3, foram investigados também aspectos biológicos e demográficos, relacionados aos comportamentos sociais em questão, que permitissem formular melhores hipóteses sobre os efeitos da separação materna no respectivo comportamento.

ARTIGO 1: EFEITOS DA SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O BRINCAR SOCIAL EM RATOS EM FUNÇÃO DO SEXO, IDADE E PARCEIRO SOCIAL

A brincadeira é um fenômeno bastante estudado em mamíferos (Surviliene, Ruksenas & Pomeroy, 2016; Vanderschuren, Achterberg & Trezza, 2016; Worch, 2010), sobretudo quando se dá na interação entre dois ou mais animais, caracterizando a *brincadeira social* (LaFreniere, 2011; Nunes, Weidenbach, Lafler & Dever, 2015; Thor & Holloway, 1984). Embora a brincadeira social possa acontecer ao longo de toda a vida, o momento em que ocorre com maior frequência é na infância (Pellis & Pellis, 2007) – mais precisamente, na quarta e na quinta semana de vida, quando se trata de ratos (Thor & Holloway, 1984; Vanderschuren et al., 2016). Os impactos deste tipo de brincar no desenvolvimento de ratos são geralmente avaliados por meio da privação do contato deles com outros animais nessas semanas (Vanderschuren & Trezza, 2014). Como efeitos, tem-se a diminuição da frequência de interações sociais ao longo da vida (Hol, Van den Berg, Ree & Spruijt, 1999; Van den Berg et al., 1999), alterações no comportamento sexual (Van den Berg et al., 1999) e alterações em respostas de defesa e ataque em ambientes hostis (Potegal & Eimon, 1989; Van den Berg et al., 1999; Von Frijtag, Schot, Van Den Bos & Spruijt, 2002). Frente a isso, diferentes autores sugerem que a brincadeira social atue como contexto no qual repertórios importantes para a vida adulta são aprendidos (Thor & Holloway, 1984; LaFreniere, 2011; Vanderschuren & Trezza, 2014).

Se a brincadeira social pode alterar o desenvolvimento comportamental do animal, se faz importante identificar eventos que, ao longo da vida, podem impactar esse tipo de brincar. Pesquisas já realizadas com ratos sugerem que algumas variáveis pré-natais e pós-natais podem ter esse impacto, tais como o estresse pré-natal (Morley-Fletcher, Real, Maccari & Laviola, 2003; Ward & Stehm, 1991; Takahashi, Haglin, & Kalin, 1992), déficits nutricionais pré-natais (Almeida, Tonkiss & Galler, 1996) e pós-natais (Almeida & De Araújo, 2001; Camargo & Almeida, 2005; Loranca, Torrero & Salas, 1999), *handling* neonatal (Aguilar, Caramés & Espinet, 2009; Sivy & Harrison, 2008) e outros aspectos da relação neonatal entre mãe e filhotes (Bodensteiner, Christianson, Siltumens & Krzykowski, 2014; Muhammad & Kolb, 2011; Parent & Meaney, 2008; Veenema & Neumann, 2009; Zimmerberg & Sageser, 2011). O presente artigo se insere justamente na investigação do impacto de variáveis da relação mãe-filhote sobre o desenvolvimento do brincar social em ratos.

Os efeitos da relação mãe-filhote já foram investigados tanto por pesquisas correlacionais quanto experimentais. Em pesquisas correlacionais, as mães são classificadas em

diferentes grupos, em função da qualidade apresentada por elas no cuidado com a prole, sendo esta qualidade determinada, sobretudo, pela frequência de lambidas e *grooming* (LG) das mães em seus filhotes. Os resultados indicam que filhotes de mães com baixas taxas de LG são mais agressivos e dominantes nas brincadeiras sociais que filhotes de mães com altas taxas de LG (Parent & Meaney, 2008; Parent, Del Corpo, Cameron & Meaney, 2013).

Em pesquisas experimentais, por sua vez, manipula-se diretamente o cuidado materno, possibilitando testar a hipótese de que essa variável, de fato, interfere no desenvolvimento do brincar social. O cuidado é geralmente manipulado por meio do procedimento de separação materna, no qual o rato recém-nascido é separado por algumas horas diárias de sua mãe. Os resultados das pesquisas experimentais sobre os efeitos da separação materna no brincar social foram inconsistentes (Arnold & Sivy, 2002; Veenema & Neumann, 2009; Muhammad & Kolb, 2011; Zimmerberg & Sageser, 2011; Bodensteiner et al., 2014; Lundberg, Martinsson, Nylander & Roman, 2016). Veenema e Neumann (2009) e Lundberg et al. (2016) encontraram um aumento da dominância de ratos machos submetidos à separação materna no contexto da brincadeira social, semelhante ao que foi observado em filhotes de mães com baixas taxas de LG em pesquisas correlacionais (Parent & Meaney, 2008). Por sua vez, Arnold e Sivy (2002), Muhammad e Kolb (2011) e Zimmerberg e Sageser (2011) observaram alterações na frequência de evasão e menor frequência de lutas em animais submetidos à separação materna frente a situação de brincadeira social, sugerindo uma diminuição da dominância.

A inconsistência dos resultados pode ser decorrente de variações metodológicas entre os diferentes estudos experimentais que investigaram a questão (Arnold & Sivy, 2002; Veenema & Neumann, 2009; Muhammad & Kolb, 2011; Zimmerberg & Sageser, 2011 e Bodensteiner et al., 2014). A maioria das pesquisas conduziu a separação materna entre o 1º ou 2º dia e o 14º dia de vida, porém com variações (1) na idade do animal experimental quando o brincar social foi avaliado; (2) no sexo do animal experimental; (3) no grau de convivência prévia do animal experimental com seu parceiro de brincadeira; e (4) nas categorias de análise utilizadas para avaliar o brincar social. Além disso, no que tange a categorização das respostas de brincar, nenhuma pesquisa descreveu a realização de teste de concordância entre observadores, não sendo possível prever se diferentes pessoas chegariam a resultados semelhantes ao observarem a mesma interação com as mesmas categorias de análise.

Na busca de resultados mais consistentes, o papel das variáveis metodológicas anteriormente citadas precisa ser mais investigado. Considerando isso, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da exposição à separação materna sobre o brincar social, avaliando-se

os efeitos de tal exposição em função (1) do sexo do animal, (2) da idade do animal no período em que o brincar social foi avaliado, e (3) do grau de convivência prévia do animal experimental com o animal parceiro nos episódios de brincadeira. Visando aumentar a fidedignidade dos dados coletados, utilizou-se o teste de concordância entre os observadores relativo aos registros das categorias comportamentais descritas.

MÉTODO

1. Sujeitos.

Ao todo, foram utilizados 96 ratos Sprague-Dawley (machos e fêmeas em igual número), sendo 32 deles utilizados como sujeitos experimentais. Os outros 64 foram utilizados como parceiros nas interações de brincadeira. Os animais experimentais foram provenientes de oito proles, selecionando-se de cada prole dois sujeitos de cada sexo. Por sua vez, os animais parceiros foram provenientes de dez proles, não havendo restrição quanto ao número de filhotes provenientes da mesma ninhada utilizados neste experimento. Todos os ratos foram gerados, nascidos e mantidos em caixas-viveiro forradas com maravalha. Eles permaneceram, durante todo o experimento, em uma mesma sala do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, a qual contava com sistema de renovação de ar, temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12h (4h-16h). Durante toda a pesquisa, os animais tiveram livre acesso à água e ração.

2. Equipamentos.

Foram utilizadas caixas-viveiro feitas de polipropileno translúcido com grades superiores de arame cromado, com duas configurações de tamanho: caixa grande (41x34x16cm) e caixa pequena (30x19x13cm). Durante a separação materna, empregaram-se luvas de vinil (Modelo Danny DA-301/CA) e um tapete térmico (*Soft Professional* com Infravermelho, *Styllus Term*) de 100x45cm, com sistema de aquecimento elétrico que permitia ser calibrado com quatro temperaturas (26, 32, 38 e 44°C). Foi também utilizado um *timer* para marcação do tempo de separação materna e do registro das interações de brincar.

O brincar foi avaliado em uma *caixa de observação* (50x50x70cm), confeccionada com paredes de acrílico transparente e piso de fórmica, coberto com papel *contact* preto. Um sistema de filmagem foi acoplado à essa caixa, possibilitando o registro da interação entre os animais a

partir de diferentes ângulos. O sistema era composto por oito câmeras de alta definição com visão noturna (Modelo Intelbras – Infravermelho - VMD 1120 IR G3). Ele era conectado à internet via cabo, de forma a permitir que os pesquisadores acessassem as filmagens em tempo real a partir de qualquer computador que também tivesse acesso à internet. Os *softwares* Excel (Microsoft) e Intelbras Media Player-2016 foram adotados nas categorizações das filmagens. Para a marcação dos animais, utilizaram-se pincéis atômicos da cor vermelha (Pilot-1110P).

3. Procedimento.

Gestação, nascimento, sexagem e redução da prole.

Dezoito casais de ratos Sprague-Dawley, com idades entre três e cinco meses e sem experiência sexual anterior, foram alojados por 14 dias em uma caixa-viveiro grande. Após esse período, o macho foi retirado da caixa e a fêmea foi monitorada por meio de um sistema de vigilância 24h, com a finalidade de checar o nascimento da prole. Oito das proles deram origem aos sujeitos experimentais, enquanto as outras dez, aos animais parceiros. O dia do nascimento foi considerado PN-0 (dia pós-natal zero). No PN-1, foi feita a contagem e sexagem dos filhotes, por meio da avaliação da distância anogenital (*cf* Farris, 1942). Caso houvesse 11 ou mais filhotes, a prole era reduzida a 10, igualando-se ao máximo o número de machos e fêmeas. Com exceção dos períodos de sexagem, limpeza das caixas-viveiros e, se aplicável, de separação materna (ver adiante), os filhotes foram mantidos com as mães sem interrupções até o dia do desmame (PN-21).

Separação Materna.

Dentre as oito proles que deram origem aos animais experimentais, metade foi aleatoriamente designada ao procedimento de separação materna (Grupos SM), e a outra metade, utilizada como controle (Grupos CN). A separação materna consistiu na privação do contato entre a prole e sua mãe por 3hs diárias (9h-12h), entre PN-2 e 14. No início de cada período de separação, a mãe era retirada da caixa-viveiro e colocada em outra caixa com iguais características, na mesma sala de manutenção. Em seguida, a caixa contendo os filhotes era conduzida até outra sala, com características básicas semelhantes à anterior. Os filhotes eram, então, retirados da caixa e colocados sobre uma mesa forrada com tapete térmico, aquecido a

32°C, de forma a manter sua temperatura corporal, permanecendo nessa condição por 3hs. Ao final desse período, a prole era recolocada na caixa-viveiro e levada de volta à sala de manutenção, sendo a mãe reintroduzida nessa caixa em seguida. Durante os períodos em que os animais do Grupo SM foram privados do contato com a mãe, os animais do Grupo CN não foram submetidos a qualquer manipulação. No desmame (PN-21), dois machos e duas fêmeas de cada uma das oito proles foram selecionados aleatoriamente para a continuidade desta pesquisa. Cada animal foi alojado em dupla, com outro de mesma idade e sexo (denominado animal parceiro), em uma caixa-viveiro pequena.

Os animais parceiros cresceram em iguais condições às do Grupo CN. No desmame, metade deles (16 de cada sexo) foi alojada junto com um sujeito experimental, do Grupo SM ou CN, sendo denominados *parceiros conhecidos*. Eles foram diferenciados do sujeito experimental por um pequeno corte na orelha, feito no mesmo dia do desmame. A outra metade deles foi alojada com um animal também parceiro, do mesmo sexo e idade, sendo ambos denominados *parceiros estranhos*.

Do nascimento até o desmame, qualquer manipulação nas caixas-viveiro foi feita utilizando-se luvas de vinil. Após colocar as luvas, o experimentador esfregava suas mãos em maravalha limpa e, em seguida, em maravalha retirada da caixa da prole a ser manipulada. Isso foi feito com a finalidade de neutralizar odores diferentes daqueles aos quais os animais já estavam submetidos.

Condução das interações de brincar social.

O brincar social foi registrado no PN-28, 32 e 36. Nas 24h que antecederam cada um desses dias, os animais, experimentais e parceiros, foram privados de contato social. Ou seja, cada um permaneceu isolado em uma caixa-viveiro pequena. Nos dias de registro das interações de brincar social, o sujeito experimental foi colocado por dois períodos de 5 min na caixa de observação, sendo em um deles junto com o animal com o qual foi alojado (parceiro conhecido) e outro com um animal parceiro estranho. Ao longo desses 5 min, a interação entre eles foi filmada. A ordem de exposição variou, com metade dos sujeitos iniciando a interação com o parceiro conhecido e a outra metade, com o parceiro estranho. O intervalo entre as duas exposições foi de 30 min, em média. Durante esse intervalo, cada um dos animais permaneceu em sua própria caixa-viveiro, privado de contato social.

Para a correta identificação dos animais nas filmagens, os parceiros tinham seus corpos pintados com pincel atômico vermelho antes de cada interação registrada. Inicialmente, colocou-se na caixa de observação o sujeito experimental e, em seguida, o animal parceiro em questão. Entre os registros, a caixa foi limpa com álcool. Quando as duas interações terminaram, o sujeito experimental foi recolocado na caixa viveiro junto com o mesmo parceiro conhecido com quem convivera até então. Ao longo de todas as interações, o parceiro conhecido foi sempre o mesmo e o parceiro estranho foi um diferente a cada registro realizado.

Categorização das Interações de Brincar Social

O brincar social foi aqui definido como um conjunto de comportamentos apresentados por dois ratos, envolvendo atividade locomotora que propicia interação física entre eles. Em uma etapa inicial, as filmagens feitas da interação entre os animais foram observadas por um experimentador, que descreveu, por escrito, respostas que identificou durante o brincar social. Em uma segunda etapa, essas respostas foram agrupadas em categorias (ver adiante) não excludentes, que permitiram a categorização das interações. Para tanto, uma planilha de Excel foi elaborada, na qual as colunas correspondiam às diferentes categorias de respostas e as linhas, a intervalos de observação de 5 s cada, totalizando 60 intervalos/linhas para cada filmagem de 5 min.

Para categorias de respostas cursivas, de duração muito variável, foi feito um *registro binário* (0 ou 1), no qual “1” indicava que a categoria havia sido observada em qualquer momento do intervalo de 5 s, e “0” que ela não ocorreu nesse intervalo. Por sua vez, para categorias de respostas que possuíam curta duração, com início e término bem definidos, foi feito *registro de frequência*, no qual o número total de respostas observadas ao longo de cada intervalo de 5 s foi anotado na célula correspondente. Nesse tipo de registro, se a resposta fosse constatada no exato momento de troca entre os intervalos, a marcação da mesma era feita apenas no primeiro intervalo. Abaixo são descritas as categorias de análise:

- I. *Ter contato físico* (registro binário) – Situações nas quais um rato encosta ou sobrepõe qualquer parte do seu corpo, excetuando-se a cauda, ao corpo do outro. Ou seja, ainda que não seja possível determinar o toque entre os animais, em casos em a filmagem mostra sobreposição dos corpos, considera-se a ocorrência de contato físico.
- II. *Perseguir* (registro binário) – Respostas do sujeito experimental de caminhar ou correr em direção ao animal parceiro, enquanto este se afasta.

- III. *Ser perseguido* (registro binário) – Semelhante ao item anterior, contudo, neste caso, o animal parceiro é quem caminha ou corre em direção ao animal experimental, enquanto este se afasta.
- IV. *Fazer pinning* (registro de frequência) – Contato físico no qual o animal experimental toca o parceiro, que está em posição supina (Figura 3). A posição supina é caracterizada pelo contato dorsal do rato com o solo (ficar barriga para cima), de forma que, em alguns momentos, ele fique sem contato das duas patas traseiras com o piso. Seu início ocorre no momento em que, pela primeira vez desde o início daquela posição dorsal, o animal parceiro fica com as duas patas traseiras, simultaneamente, sem contato com o solo. Seu término se dá quando o animal parceiro volta a ficar sobre as quatro patas.
- V. *Ficar na posição supina* (registro de frequência) – Semelhante ao item anterior, contudo, neste caso, é o animal parceiro quem faz o *pinning*, enquanto o experimental se encontra em posição supina.

Figura 3. Representação da posição supina (animal na parte inferior da figura) e do *pinning*, feito pelo animal que está na parte superior da figura.

Para cada filmagem de 5 min, uma planilha diferente foi preenchida. Sendo as categorias não excludentes, mais de uma delas poderiam ser registradas no mesmo intervalo. Para preencher as planilhas, foram utilizados dois observadores independentes, que desconheciam o sexo, idade, tipo de parceiro e tratamento pelo qual o sujeito experimental havia passado. O primeiro observador categorizou todas as sessões, enquanto o segundo categorizou 5% delas, para fins de análise de concordância entre eles. Os observadores fizeram seus registros em locais e momentos diferentes, sem que houvesse contato entre eles durante a categorização.

Eles foram orientados a: (1) ler as categorias previamente; (2) consulta-las ao longo da categorização quando houvesse dúvida; e (3) preencher apenas uma categoria de resposta por vez, passando para a próxima apenas quando os 60 intervalos de uma tivessem sido preenchidos.

Análise de Dados.

Como variáveis dependentes, adotaram-se as quantidades de vezes em que as categorias foram registradas em cada interação filmada, sendo estas quantidades analisadas em função do tratamento (separação materna ou controle), do tipo de parceiro (conhecido e estranho) e dos dias de registro do brincar (PN-28, 32 e 36). Análises separadas foram feitas para machos e para fêmeas.

O contato físico foi avaliado por meio de um modelo linear de efeitos aleatórios, com a significância dos coeficientes de inclinação do modelo sendo verificada por meio de Testes T. Para a análise das outras variáveis dependentes, foi utilizado um modelo GLM ajustado com a distribuição de Poisson. Quando necessário, os efeitos principais do grupo, do dia de registro e da interação entre eles foram avaliados com a estatística ‘poor man’s F’. A influência do tipo de parceiro, em todas as categorias, foi verificada pela análise comparativa dos critérios de informação de Akaike (AIC). Todos os testes foram implementados no pacote lme4 do Programa R. O nível de significância adotado foi o de 5% ($p < 0.05$).

A concordância entre observadores foi calculada a partir do índice kappa, também implementado no Programa R. Os índices foram classificados conforme descrito por Landis e Koch (1977): insignificantes (0 a 19%), medianos (20% a 39%), moderados (40% a 59%), substanciais (60% a 79%) e quase perfeitos (80% a 100%). Tomou-se como amostra 5% das filmagens de cada medida avaliada.

RESULTADOS

1. Contato Físico

Na Figura 4 estão plotados os dados referentes à quantidade média de intervalos em que os animais tiveram contato físico, apresentados em função do tratamento (separação materna ou controle), dos dias de registro do brincar (PN-28, PN-32 e PN-36), do tipo de parceiro

(conhecido ou estranho) e do sexo. Para ambos os sexos e tipos de parceiro, os animais submetidos à separação materna apresentaram seus menores índices no PN-28 e os maiores no PN-32. Portanto, o pico de contato físico ocorreu no segundo registro (PN-32). Os animais do Grupo CN, por sua vez, tiveram aumento progressivo do número de intervalos com contato físico ao longo das interações, ou seja, menor índices no PN-28 e maiores no PN-36.

Em machos, a análise estatística não revelou diferença significativa entre os Grupos SM e CN [$F(1) = 1,79$; $p = 0,08$]. Porém, houve efeito em função dos dias de registro [$F(2) = 15,66$; $p < 0,001$], sendo observado aumento do número de intervalos com contato físico entre os PNs-28 e 32 ($p < 0,001$) e os PNs-28 e 36 ($p < 0,001$). Um efeito da interação entre grupo e dia de registro também foi encontrado [$F(2) = 3,47$; $p = 0,04$], revelando que apenas para o Grupo SM houve uma redução estatisticamente significativa entre os PNs-32 e 36 ($p = 0,01$). Além disso, a análise estatística sugeriu que o contato físico não foi influenciado diferencialmente por parceiros conhecidos e estranhos (AIC = 543,38 para 545,17, $p = 0,64$).

Já a análise do contato físico em fêmeas revelou diferença estatisticamente significativa entre os Grupos SM e CN [$F(1) = 5,78$; $p = 0,02$], sendo esta categoria mais frequente em ratas submetidas à separação materna. Para ambos os grupos, foi constatado efeito do dia de registro [$F(1) = 14,21$; $p < 0,001$], indicando aumento da ocorrência de intervalos com contato físico entre os PNs-28 a 36 ($p < 0,001$) e 32 e 36 ($p = 0,02$). Porém, não houve efeito significativo da interação entre grupo e dia [$F(2) = 2,35$; $p = 0,10$], sugerindo que, apesar do Grupo SM apresentar redução entre os PNs-32 e 36, tal diferença não foi estatisticamente significativa. Por fim, da mesma forma como em machos, não houve influência do tipo de parceiro sobre a categoria (AIC = 577 para AIC = 578; $p = 0,26$).

Assim sendo, para machos e fêmeas, a separação materna alterou a ocorrência da categoria “ter contato físico”. Em machos, o efeito do tratamento variou nos diferentes dias de registro, de forma que os Grupos SM e CN tivessem picos de frequência em diferentes idades. Em fêmeas, como um todo, a separação materna aumentou a ocorrência de contato físico.

Figura 4. Quantidade média de intervalos com contato físico entre os ratos, apresentados conforme os dias de registro da interação (PN-28, PN-32 e PN-36), os grupos experimentais (SM e CN), o tipo de parceiro na interação (P. Conhecido e P. Estranho) e o sexo.

2. Perseguição

Os dados relativos às categorias de perseguir e ser perseguido estão plotados na Figura 5, em função do tratamento, dos dias de registro do brincar, do tipo de parceiro e do sexo. Em ambas as configurações de parceiros, machos submetidos à separação materna apresentaram aumento da ocorrência das categorias perseguir e ser perseguido entre os PNs-28 e 36, enquanto machos do Grupo CN tiveram índices relativamente semelhantes nessas idades. Para a categoria perseguir, em machos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em função do grupo [$\chi^2(1) = 0,396$; $p = 0,530$] e dos dias de registro [$\chi^2(2) = 0,14$; $p = 0,93$].

Porém, foi constatada significância em função da interação entre grupo e dias [$\chi^2(2) = 62,43$; $p = 0,03$], com aumento da ocorrência entre os PNs-28 e 32 ($p = 0,02$) e 28 e 36 ($p = 0,02$) apenas para o Grupo SM. O tipo de parceiro não foi uma variável relevante na determinação dos resultados (AIC 547 para 554; $p = 0,62$).

O mesmo padrão observado em “perseguir” se repetiu na categoria “ser perseguido”, em machos. Ou seja, a análise estatística não revelou diferenças significantes em função do grupo [$\chi^2(1) = 0,07$; $p = 0,79$] e dos dias de registro [$\chi^2(2) = 0,46$; $p = 0,79$], mas revelou para a interação entre grupo e dias [$\chi^2(2) = 9,67$; $p = 0,007$]. Apenas o Grupo SM apresentou aumento significativo entre os PNs-28 e 32 ($p = 0,01$) e 28 e 36 ($p = 0,003$). Novamente, o tipo de parceiro não foi uma variável relevante (AIC = 572 para 577; $p = 0,3$).

Por sua vez, fêmeas submetidas à separação materna apresentaram quantidades médias de intervalos com perseguir superiores às ratas controle, a despeito da idade e do tipo de parceiro. Além disso, para ambos os grupos, SM e CN, houve aumento da ocorrência da categoria entre os PNs-28 e 36 quando os parceiros eram estranhos e diminuição, quando conhecidos. A análise estatística não revelou diferenças significantes entre os grupos [$\chi^2(1) = 3,28$; $p = 0,07$], dias de registro [$\chi^2(2) = 3,1$; $p = 0,21$] e entre a interação entre grupo e dias [$\chi^2(2) = 0,76$; $p = 0,68$]. Entretanto, na análise da influência dos tipos de parceiro (AIC = 614 para 611; $p = 0,02$), revelou significância em função do parceiro [$\chi^2(1) = 4,68$; $p = 0,03$] e da interação entre parceiro e dias de registro [$\chi^2(2) = 6,34$; $p = 0,04$]. Mais especificamente, houve aumento de ocorrência da categoria entre os PNs-28 e 32 ($p = 0,03$) e 28 a 36 ($p = 0,03$) apenas quando as interações ocorreram com parceiros estranhos.

Já na categoria “ser perseguido”, fêmeas de ambos os grupos apresentaram comportamentos semelhantes, não havendo diferenças estatisticamente significantes em função do grupo [$\chi^2(1) = 0,32$; $p = 0,57$], dos dias de registro [$\chi^2(2) = 4,11$; $p = 0,13$], da interação entre grupo e dias [$\chi^2(2) = 1,24$; $p = 0,54$]. O tipo de parceiro, novamente, não se mostrou uma variável relevante (AIC = 653 para 661; $p = 0,7$).

Figura 5. Quantidade média de intervalos em que foram constatadas as categorias “perseguir” e “ser perseguido”. Os dados foram apresentados conforme os dias de registro da interação (PN-28, PN-32 e PN-36), os grupos experimentais (SM e CN), o tipo de parceiro na interação (P. Conhecido e P. Estranho) e o sexo.

Figura 6. Quantidade média de respostas de fazer *pinning* e de ficar na posição supina. Os dados foram apresentados conforme os dias de registro da interação (PN-28, PN-32 e PN-36), os grupos experimentais (SM e CN), o tipo de parceiro na interação (P. Conhecido e P. Estranho) e o sexo.

3. *Pinning* e posição supina.

As frequências médias das categorias relativas ao *pinning* e à posição supina estão plotadas na Figura 6, em função do grupo, dos dias de interação, do tipo de parceiro e do sexo dos animais. Machos do Grupo SM apresentaram frequências de *pinning* superiores ao Grupo CN em algumas idades e frequências de posição supina inferiores em todas as idades. Porém, para ambas as categorias, tais diferenças não foram estatisticamente significantes, nem em função do grupo [$\chi^2(1) = 0,21$; $p = 0,72$ para *pinning* e $\chi^2(1) = 2,07$ e $p = 0,15$ para supina], nem em função dos dias de registro [$\chi^2(2) = 2,06$; $p = 0,36$ para *pinning* e $\chi^2(2) = 4,22$ e $p = 0,12$ para supina], ou da interação entre essas variáveis [$\chi^2(2) = 2,94$; $p = 0,23$ para *pinning* e $\chi^2(2) = 0,82$; $p = 0,66$ para supina]. O tipo de parceiro também não se mostrou uma variável relevante para essas categorias de respostas (AIC = 269 para AIC = 275; $p = 0,43$ para *pinning*; AIC = 179 para 275; $p = 1,0$ para posição supina).

Fêmeas do Grupo SM, por sua vez, tiveram frequências de *pinning* superiores às do Grupo CN nos dois primeiros dias de registro, a despeito do tipo de parceiro. Contudo, enquanto seus índices decresceram entre os PNs-28 e 36, os índices das ratas do Grupo CN aumentaram. A análise estatística revelou diferença significativa em relação ao grupo [$\chi^2(1) = 8,32$; $p = 0,003$], tendo o Grupo SM, de forma geral, feito mais *pinning*s. Também foram encontradas diferenças significativas em função dos dias de registro [$\chi^2(2) = 6,52$; $p = 0,04$] e da interação entre grupo e dias [$\chi^2(2) = 13,28$; $p = 0,001$]. Ou seja, enquanto o Grupo CN apresentou aumento de frequência entre os PNs-28 e 36 ($p = 0,02$), no Grupo SM, ocorreu redução entre os PNs-28 e 32 ($p = 0,001$) e 32 e 36 ($p = 0,005$). O tipo de parceiro não se mostrou uma variável relevante (AIC = 266 para AIC = 273; $p = 0,54$).

A posição supina em fêmeas ocorreu em maior frequência para fêmeas submetidas à separação materna do que para as ratas controle, em todas as idades e com ambos os tipos de parceiro. Porém, as diferenças não foram estatisticamente significantes em função do grupo [$\chi^2(1) = 4,21$; $p = 0,15$], dos dias de registro [$\chi^2(2) = 2,34$; $p = 0,12$], da interação entre grupo e dias [$\chi^2(2) = 0,82$; $p = 0,61$], ou do tipo de parceiro (AIC = 292 para 288; $p = 0,07$).

4. Concordância entre observadores

Para a categoria de fazer contato físico, perseguir, ser perseguido, fazer *pinning* e ficar na posição supina, os índices kappa foram, respectivamente 88,9 ($p < 0,001$), 86,9 ($p < 0,001$);

88,5 ($p < 0,001$), 85,5 ($p < 0,001$) e 93,9 ($p < 0,001$). Portanto, pelos critérios de Landis e Koch (1977), todas as categorias tiveram uma concordância quase perfeita.

DISCUSSÃO

Como efeito geral da separação materna, constatou-se que os animais submetidos a ela tiveram frequências maiores de respostas de brincar social em quase todas as categorias de análise quando comparados aos sujeitos controle, sendo algumas dessas diferenças estatisticamente significantes. O que esse dado sugere?

Uma interpretação possível é que a separação materna aumente a dominância social de animais submetidos a ela, tendo em vista que o *pinning* e o perseguir são comportamentos que podem ser associados a maior dominância social (Meaney & Stewart, 1981; Panksepp, 1981) e, na comparação com os sujeitos controle, foram emitidos em maior frequência por animais submetidos à separação materna. Contudo, essa conclusão é válida apenas se, tal como é geralmente feito na literatura especializada do tema (Arnold & Sivi, 2002; Muhammad & Kolb, 2011; Zimmerberg & Sageser, 2011), os comportamentos dos animais parceiros forem excluídos da análise. Por outro lado, ao considerar o comportamento deles por meio das categorias “ser perseguido” e “ficar na posição supina”, é possível concluir que parceiros de sujeitos expostos à separação materna também perseguiram e fizeram mais *pinnings* do que parceiros dos animais controle. Ou seja, as frequências dessas respostas aumentaram tanto para os ratos que passaram por separação materna quanto para seus parceiros de interação, de forma que, aparentemente, a hipótese da dominância social de um sobre o outro não se configura como uma interpretação plausível. Sendo o brincar social uma relação entre, pelo menos, dois animais, a comparação com o parceiro de brincadeira pode revelar, inclusive, mais do que a comparação com um grupo controle. A condução de mais pesquisas que olhem para todas as partes envolvidas nessa relação, sujeitos experimentais e parceiros, talvez possibilite a criação de melhores análises sobre as diferenças observadas entre os grupos.

Outra possibilidade interpretativa é que a separação materna aumente, como um todo, a frequência de brincadeira social em animais submetidos a ela, bem como em seus parceiros. Pesquisas indicam que quanto mais um animal brinca, mais ele estimula seu parceiro a brincar (Pellis & McKenna, 1992; Trezza & Vanderschuren, 2008). Se estiver correta a interpretação de que a separação materna gera animais que brincam mais, seria importante descobrir os meios

pelos quais esse efeito se dá. Uma hipótese seria que a separação materna altera a atividade locomotora de animais expostos a ela, influenciando indiretamente a frequência do brincar. Porém, as pesquisas indicam o contrário: o procedimento geralmente tem como efeito a redução da atividade motora dos animais submetidos a ele (MattheWs, Hall, Wilkinson & Robbins, 1996; Llorente et al., 2007). Outra hipótese é de que a separação materna possa alterar a sensibilidade do organismo a estímulos sociais, de forma a torna-los mais reforçadores. Assim, pela alteração do valor reforçador desses estímulos, animais submetidos ao procedimento de separação emitiriam mais respostas que resultassem em contato social, seja na brincadeira ou em outros contextos (Villiers & Herrnstein, 1976; Bonem & Grossman, 1988). Tal questão precisa ser mais investigadas em futuras pesquisas.

Além disso, os dados aqui obtidos sugerem que os efeitos da separação materna sobre o brincar social foram modulados pelas variáveis sexual e etária, mas não pelo tipo de parceiro presente nas interações. Com relação ao sexo dos sujeitos, foi possível observar que machos e fêmeas foram afetados por esse procedimento, mas de formas diferentes: nas categorias relativas à perseguição, o efeito se deu predominantemente sobre machos, enquanto no *pinning*, predominantemente sobre fêmeas. O contato físico, talvez por ser uma classe pouco específica de respostas, afetou ambos os sexos. Nessa categoria, machos e fêmeas submetidos à separação materna tiveram comportamentos semelhantes entre si, embora algumas diferenças em relação ao grupo controle tenham sido estatisticamente significantes apenas para fêmeas e outras, apenas para machos.

Outras pesquisas sobre as implicações da separação materna no brincar social também observaram efeitos exclusivos para fêmeas ou para machos a depender do comportamento analisado (Arnold & Sivi, 2002; Muhammad & Kolb, 2011). Frente ao ataque do parceiro (i. e., aproximação do focinho do parceiro da nuca do animal experimental), Arnold e Sivi (2002) encontraram efeitos apenas em machos ao adotarem como medida respostas de evasão, enquanto Muhammad e Kolb (2011) encontram efeitos apenas em fêmeas com a medida de posição supina. Esses resultados indicam a importância da escolha das respostas a serem analisado nas interações de brincar.

Variáveis etárias, por sua vez, se mostraram relevantes em todas as categorias de análise. Conforme citado anteriormente, as respostas de brincar em ratos atingem um pico em determinada idade, geralmente na quarta e quinta semana de vida (PNs-22 a 35), seguido por uma redução na frequência de tais respostas (Thor & Holloway, 1984; Vanderschuren, Achterberg & Trezza, 2016). Ao considerar apenas as três idades aqui analisadas, os dados

obtidos sugerem que a separação materna alterou o pico da ocorrência de contato físico, sobretudo para machos, que ao invés de se dar aos 36 dias de vida (Grupo CN), se deu aos 32. Além disso, apenas em machos submetidos à separação materna, as respostas de perseguir e ser perseguido apresentaram aumento de ocorrência entre os dias de vida 28 e 36 e, apenas para fêmeas submetidas ao mesmo procedimento, houve redução progressiva do número de *pinnings* entre os testes.

Os efeitos observados sugerem que a separação materna pode alterar o processo de interação organismo-ambiente, que se dá ao longo do tempo, e não apenas características pontuais. Sendo assim, faz-se importante a condução de pesquisas que avaliem os comportamentos em diferentes períodos do desenvolvimento, já que índices obtidos em um único momento podem, em alguns casos, mascarar ou simplificar o fenômeno. Outras pesquisas poderiam investigar o que faz com que as mudanças observadas entre os dias de vida sejam diferentes para animais submetidos à separação materna. A idade, neste caso, não pode ser considerada como fator causal, tendo em vista que ela é apenas um índice, arbitrariamente instituído, que se correlaciona às mudanças observadas no processo de interação entre organismo e ambiente (Gewirtz & Peláez, 1996; Harzem, 1996). Para compreender os motivos dessas diferenças, há de se olhar para o processo a qual a idade está correlacionada.

O grau de convivência prévio com o parceiro, por sua vez, aparentemente não modulou os efeitos da separação materna. Seu único impacto foi sobre a resposta de perseguir, em fêmeas. Porém, tal efeito se deu sobre os Grupos SM e CN, indistintamente. Outras características dos animais parceiros, entretanto, precisam ser melhor investigadas. Por exemplo, Arnold e Siviý (2002) e Zimmerberg e Sageser (2011) adotaram um procedimento no qual animais submetidos à separação materna eram observados em interação com animais igualmente submetidos a essa condição, enquanto animais do grupo controle eram observados em interação com animais não separados de suas mães. Futuras pesquisas poderiam investigar o impacto de o animal parceiro ter passado por história de separação materna semelhante àquela do animal experimental.

Os resultados aqui obtidos, portanto, sugerem que a separação materna aumentou, de maneira geral, a ocorrência de comportamentos de brincar em animais submetidos a ela. O sexo do animal e a idade na qual o teste foi conduzido se configuraram como variáveis importantes, impactando os efeitos da separação materna sobre o brincar social. Outra questão que se mostrou relevante, embora não tenha sido foco deste estudo, foi a forma de mensuração do brincar, revelando a importância da escolha adequada das categorias de respostas avaliadas e

da inclusão da análise do comportamento do animal parceiro. Por sua vez, o grau de convivência prévia com o animal parceiro teve pouco impacto nos efeitos da separação materna.

REFERÊNCIAS

- Aguilar, R.; Caramés, J. M. & Espinet, A. (2009). Effects of neonatal handling on playfulness by means of reversal of the desire to play in rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 123(4), 347-356.
- Almeida, S. S. & De Araújo, M. (2001). Postnatal protein malnutrition affects play behavior and other social interactions in juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 74(1-2), 45-51.
- Almeida, S. S.; Tonkiss, J. & Galler, J. R. (1996). Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 60(1), 197-201.
- Arnold, J. L. & Sivi, S. M. (2002). Effects of neonatal handling and maternal separation on rough-and-tumble play in the rat. *Developmental Psychobiology*, 41(3), 205-215.
- Bodensteiner, K. J.; Christianson, N.; Siltumens, A. & Krzykowski, J. (2014). Effects of early maternal separation on subsequent reproductive and behavioral outcomes in male rats. *Journal of General Psychology*, 141(3), 228-246.
- Bonem, M. & Crossman, E. K. (1988). Elucidating the effects of reinforcement magnitude. *Psychological Bulletin*, 104(3), 348-362.
- Camargo, L. M. M. & Almeida, S. S. (2005). Early postnatal protein malnutrition changes the development of social play in rats. *Physiology & Behavior*, 85(3), 246-251.
- Farris, E. J. (1942). Breeding of the rat. Em: *The rat in laboratory investigation* (eds J. Q. Griffith & E. J. Farris), Philadelphia: Lippincott.
- Gewirtz, J. L.; & Peláez, M. (1996). El análisis conductual del desarrollo. Em: Bijou, S. W.; & Ribes, E. (cords). *El desarrollo del comportamiento*. México: Universidad de Guadalajara, 77-106.
- Harzem, P. (1996). La psicología infantil, el desarrollo y los patrones de la acción humana – Un ensayo sobre conceptos y problemas. Em: Bijou, S. W.; & Ribes, E. (cords). *El desarrollo del comportamiento*. México: Universidad de Guadalajara, 203-241.

- Hol, T.; Van den Berg, C. L.; Van Ree, J. M. & Spruijt, B. M. (1999). Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behavioural Brain Research*, 100, 91-97.
- LaFreniere, P. (2011). Evolutionary Functions of Social Play: Life Histories, Sex Differences, and Emotion Regulation. *American Journal of Play*, 3(4), 464-488.
- Landis, J. R. & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159-174.
- Llorente, R.; Arranz, L.; Marco, E-M; Moreno, E.; Puerto, M.; Guaza, C.; De la Fuente, M. & Viveros M-P (2007) Early maternal deprivation and neonatal single administration with a cannabinoid agonist induce long-term sex-dependent psychoimmunoendocrine effects in adolescent rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 636–650.
- Loranca, A.; Torrero, C. & Salas, M. (1999). Development of Play Behavior in Neonatally Undernourished Rats. *Physiology & Behavior*, 66(1), 3–10.
- Lundberg, S.; Martinsson, M.; Nylander, I & Roman, E. (2017). Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. *Hormones and Behavior*, 87, 137-144.
- Matthews, K.; Hall, F. S.; Wilkinson, L. S. & Robbins, T. W. (1996). Retarded acquisition and reduced expression of conditioned locomotor activity in rats following repeated early maternal separation: effects of prefeeding, d-amphetamine, dopamine antagonists and clonidine. *Psychopharmacology*, 126, 75-84.
- Meaney, M. J., & Stewart, J. (1981). A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). *Animal Behaviour*, 29, 34–45.
- Morley-Fletcher, S.; Real, M.; Maccari, S. & Laviola, G. (2003). Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *European Journal of Neuroscience*, 18(12), 3367–3374.
- Muhammad, A. & Kolb, B. (2011). Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. *Behavioural Brain Research*, 223, 7–16.

- Nunes, S.; Weidenbach, J. N.; Lafler, M. R. & Dever, J. A. (2015). Sibling relatedness and social play in juvenile ground squirrels. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69(3), 357–369.
- Panksepp, J. (1981). The ontogeny of play in rats. *Developmental Psychobiology*, 14(4), 327–332.
- Parent, C. I.; Del Corpo, A.; Cameron, N. M. & Meaney, M. J. (2013). Maternal care associates with play dominance rank among adult female rats. *Developmental Psychobiology*. 55(7), 745–756.
- Parent, C. I & Meaney, M. J. (2008). The influence of natural variations in maternal care on play fighting in the rat. *Developmental Psychobiology*. 50(8), 767–776.
- Pellis S. M. & McKenna, M. M. (1992). Intrinsic and extrinsic influences on play fighting in rats: effects of dominance, partner's playfulness, temperament and neonatal exposure to testosterone propionate. *Behavioural Brain Research*., 50, 135–145.
- Pellis, S. M. & Pellis, V. C. (2016). Rough-and-Tumble Play and the Development of the Social Brain. *Current Directions in Psychological Science*, 16(2), 95 – 98.
- Potegal, M. & Eison, D. F. (1989). Aggressive behaviors in adult rats deprived of playfighting experience as juveniles. *Developmental Psychobiology*, 22(2), 159–72.
- Siviy, S. M. & Harrison, K. A. (2008). Effects of Neonatal Handling on Play Behavior and Fear Towards a Predator Odor in Juvenile Rats. *Journal of Comparative Psychology*, 122(1), 1–8.
- Surviliene, V.; Ruksenas, O.; Pomeroy, P. (2016). Play Behavior of Wild Grey Seals (*Halichoerus grypus*): Effects of Haulout Group Size and Composition. *Aquatic Mammals*, 42(2), 144–161.
- Takahashi, L. K.; Haglin, C. & Kalin, N. H. (1992). Prenatal stress potentiates stress-induced behavior and reduces the propensity to play in juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 51(2), 319–323.
- Thor, D. H. & Holloway Jr., R. (1984). Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 22(6), 587–590.

- Trezza, V. & Vanderschuren, L. J. M. J. (2008). Cannabinoid and opioid modulation of social play behavior in adolescent rats: differential behavioral mechanisms. *European Neuropsychopharmacology*, 18, 519–530.
- Van den Berg, C. L.; Hol, T.; Van Ree, J. M.; Spruijt, B. M.; Everts, H. & Koolhaas, J. M. (1999). Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Developmental Psychobiology*, 34, 129-138
- Vanderschuren, L. J. M. J.; Achterberg, E. J. M. & Trezza, V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 70, 86–105.
- Vanderschuren, L. J. & Trezza, V. (2014). What the laboratory rat has taught us about social play behavior: role in behavioral development and neural mechanisms. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 16: 189-212.
- Veenema, A. H. & Neumann, I. D. (2009). Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 463-467.
- Villiers, P. & Herrnstein, R. J. (1976) Toward a law of response strength. *Psychological Bulletin*, 83, 1131-1153.
- Von Frijtag, J. C.; Schot, M.; Van Den Bos, R; Spruijt, B.M. (2002) Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats. *Developmental Psychobiology*., 41, 58–69.
- Ward, I. L. & Stehm, K. E. (1991). Prenatal stress feminizes juvenile play patterns in male rats. *Physiology & Behavior*, 50(3), 601–605.
- Worch, E. A. (2010). Play Behavior of Red Colobus Monkeys in Kibale National Park, Uganda. *Folia Primatologica*, 81,163-176.
- Zimmerberg, B. & Sageser, K. A. (2011). Comparison of two rodent models of maternal separation on juvenile social behavior. *Frontiers in psychiatry*, 2-39.

ARTIGO 2: DESENVOLVIMENTO SEXUAL DE RATOS FÊMEAS E MACHOS EM FUNÇÃO DA EXPOSIÇÃO À SEPARAÇÃO MATERNA

A separação materna é um procedimento utilizado com ratos e outras espécies, no qual a prole é separada de sua mãe por, geralmente, algumas horas diárias em um período anterior ao desmame (Reite, Kaemingk & Boccia, 1989; Wewers, Kaiser & Sachser, 2003; Vetulani, 2013), sendo avaliados os impactos dessa privação no desenvolvimento dos filhotes. Em ratos, tais impactos são investigados sobretudo nas manifestações de ansiedade (Roque, Mesquita, Palha, Sousa, & Correia-Neves, 2014; Dimatelis, Vermeulen, Bugarith, Stein & Russell, 2015; Wang, Li, Du, Shao & Wang, 2015), memória (Sun, Tu, Shi, Xue & Zhao, 2014; Wang et al., 2015; Tata et al., 2015), condicionamento e extinção de medo (Sampath et al., 2014; Sun et al., 2014; Xiong, Wang, Xu & Mao, 2014) e depressão (Leussis, Freund, Brenhouse, Thompson & Andersen, 2012; Roque et al., 2014; Dimatelis et al., 2015).

Algumas pesquisas investigaram também os efeitos da separação materna no desenvolvimento sexual de ratos, tanto sobre as interações sexuais dos animais no contato com um parceiro do sexo oposto, quanto em mudanças biológicas – tais como a descida dos testículos em machos, a periodicidade do ciclo estral em fêmeas e o início da puberdade em ambos os sexos (Forsberg, Abrahamsson, Södersten & Eneroth, 1985; Lau, Kunefelter & Cameron, 1996; Rhees, Lephart & Eliason, 2001; Biagini & Pich, 2002; Greisen, Bolwig, Husum, Nedergaard & Wörtwein, 2005; Bodensteiner, Christianson, Siltumens & Krzykowski, 2014). Em machos, os resultados sobre início da puberdade não são claros: enquanto Bodensteiner et al. (2014) constataram atraso de um dia nos animais expostos à separação materna, Lau et al. (1996) não observaram diferença entre os grupos. Apenas um estudo investigou o efeito da separação materna no início da puberdade em fêmeas, que não constatou efeito diferencial (Lau et al., 1996). Com relação às outras medidas biológicas, não foram encontradas diferenças nem para a idade de descida dos testículos em machos (Biagini & Pich, 2002), nem para a periodicidade do ciclo estral em fêmeas entre os dias pós-natais (PN) 45 a 56 (Rhees et al., 2001) e 74 a 90 (Lau et al., 1996) em função da separação materna na infância.

O impacto da separação materna no comportamento de ratos, machos e fêmeas, na interação com o sexo oposto foi investigado apenas com animais na idade adulta. A maioria dos estudos que investigou o efeito em machos encontrou prejuízo no repertório sexual dos animais submetidos à separação na infância (Forsberg et al., 1985; Rhees et al., 2001 e Bodensteiner et al., 2014). Esse prejuízo correspondeu a maiores latências na emissão da

primeira resposta de montagem e de penetração (Rhees et al., 2001), de ejaculação (Forsberg et al., 1985) e na soma de diferentes medidas de comportamentos reprodutivos (Bodensteiner et al., 2014). Apenas um estudo, de Greisen et al. (2005), encontrou uma facilitação do comportamento sexual em machos submetidos à separação materna, com diminuição das latências de montagem, penetração e intervalo pós-ejaculatório (i.e., intervalo entre uma ejaculação e a penetração seguinte) no contato com uma fêmea. Contudo, diferente das demais pesquisas, Greisen et al. (2005) adotaram como grupo controle animais que foram manipulados pelo experimentador por 15 minutos diários no período neonatal, sendo este procedimento reconhecido por gerar efeitos difusos no desenvolvimento biológico e comportamental dos filhotes (Rainecki, Lucion & Weinberg, 2014).

Um número menor de pesquisas investigou o comportamento sexual de fêmeas adultas, submetidas à separação materna na infância, na interação com um macho (Forsberg et al., 1985; Greisen et al., 2005). Apenas a pesquisa de Forsberg et al. (1985) relatou diferença no comportamento sexual em função do histórico de privação de contato com a mãe. Em tal pesquisa, ratas adultas foram submetidas a interações com o sexo oposto, medindo-se o número de lordoses⁸ apresentadas por elas em função de diferentes doses de estradiol e do tratamento (separação materna ou controle). Os pesquisadores observaram um aumento da frequência de lordose para fêmeas submetidas à separação materna, independentemente da dose injetada de estradiol. Contudo, o procedimento de Forsberg et al. (1985) misturava o efeito da separação materna a um processo de desnutrição: quando filhotes, as fêmeas foram separadas das mães por períodos de 24h, em dias alternados, entre os PNs-5 e 45, sendo alimentadas apenas quando estavam em contato com a mãe. Isso resultou em uma redução significativa do peso delas. Portanto, é difícil concluir quais aspectos da história de vida contribuíram para tais resultados: a ausência da mãe e/ou a ausência de alimento na infância.

Como mencionado, as pesquisas que investigaram os impactos da separação materna no comportamento emitido no contato com o sexo oposto foram conduzidas apenas com animais adultos, embora o comportamento sexual se inicie antes dessa fase. Observações feitas por Meaney e Stewart (1981), com ratos criados sem qualquer privação social, indicam que o interesse dos machos pelas fêmeas já se inicia por volta do 36º dia de vida. As respostas de montagem começam a ocorrer entre o 41º e o 45º dia, com picos de frequência entre o 46º e o

⁸ Lordose é um comportamento emitido por fêmeas de ratos, indicativo de receptividade sexual (Meaney & Stewart, 1981). O estradiol, por sua vez, é um hormônio que aumenta tal receptividade, induzindo respostas de lordose.

50º dia. As fêmeas, por sua vez, já exibem lordoses entre o 41º e 45º dia (Meaney & Stewart, 1981). Seria interessante saber se isso ocorre da mesma forma com animais submetidos à separação materna na infância, investigando os efeitos desse procedimento sobre os comportamentos emitidos na interação com o sexo oposto em diferentes fases do desenvolvimento, não apenas na idade adulta.

No presente estudo, pretendeu-se ampliar a investigação do efeito da separação materna no desenvolvimento sexual de ratos machos e fêmeas. Mais especificamente, objetivou-se investigar o impacto da separação materna, para cada sexo, sobre a idade de início da puberdade e sobre comportamentos emitidos em interações com animais do sexo oposto antes e durante a idade adulta.

MÉTODO

1. Sujeitos

Foram utilizados 32 ratos Sprague-Dawley, machos e fêmeas em igual número. Os sujeitos foram gerados, paridos e mantidos em uma sala do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, que contava com sistema de renovação de ar, temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12h (4h-16h). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em caixas-viveiro forradas com maravalha e livre acesso à ração e água, sendo alojados com suas mães até o dia do desmame (PN-21) e, depois, em duplas com um animal de mesma idade e sexo.

Os ratos empregados como sujeitos desta pesquisa haviam sido utilizados em outro estudo, cuja manipulação envolveu observá-los em interação com animais do mesmo sexo (Artigo 1). Essa possibilidade de interação social, comum na vida de roedores, foi igual para todos os animais, de forma que, no atual estudo, a única diferença entre os grupos foi a exposição ao procedimento de separação materna, como será visto adiante.

2. Equipamentos.

As caixas-viveiro utilizadas eram feitas de polipropileno translúcido com grades superiores de arame cromado (30x19x13cm). Durante a separação materna, empregaram-se luvas de vinil (Modelo Danny DA-301/CA) e um tapete térmico (*Soft Professional* com

Infravermelho, *Styllus Term*) de 100x45cm, com sistema de aquecimento elétrico que permitia ser calibrado com quatro temperaturas (26, 32, 38 e 44°C). Foi também utilizado um *timer* para marcação do tempo de separação materna e do registro das interações com o animal do sexo oposto.

Para a realização do esfregaço vaginal, foram utilizados cotonetes, cloreto de sódio (0,9%), lâminas de vidro (26x76mm) e microscópio binocular (Nikon Eclipse E-100, com objetivas de 4x, 10x, 40x e 100x). As interações sexuais foram avaliadas *na caixa de observação* (50x50x70cm), confeccionada com paredes de acrílico transparente e piso de fórmica, coberto com papel *contact* preto. Um sistema de filmagem foi acoplado à caixa de observação, possibilitando o registro da interação entre os animais a partir de diferentes ângulos. O sistema era composto por oito câmeras de alta definição com visão noturna (Modelo Intelbras – Infravermelho - VMD 1120 IR G3). Ele era conectado à internet via cabo, de forma a permitir que os pesquisadores acessassem as filmagens em tempo real a partir de qualquer computador que também tivesse acesso à internet. Os *softwares* Excel (Microsoft) e Intelbras Media Player-2016 foram adotados nas categorizações das filmagens. Para a marcação dos animais, utilizaram-se pincéis atômicos da cor vermelha (Pilot-1110P).

3. Procedimento.

Gestação, nascimento, sexagem e redução da prole.

Os sujeitos foram provenientes da cópula entre oito casais com idades entre três e cinco meses e sem experiência sexual anterior. O dia do nascimento das proles foi considerado PN-0. No PN-1, foi feita a contagem e sexagem dos animais, por meio da avaliação da distância anogenital dos filhotes (*cf* Farris, 1942). Caso houvesse 11 ou mais filhotes, a prole era reduzida a 10 neonatos, igualando-se ao máximo o número de machos e fêmeas.

Separação Materna

Nos primeiros dias de vida, metade dos animais de cada sexo foi submetida ao procedimento separação materna (Grupo SM), enquanto os demais permaneceram com suas mães até o desmame (Grupo CN). A separação materna consistiu na privação do contato entre a prole e sua mãe por 3hs diárias (9h-12h), entre os PNs-2 e 14. No início de cada período de

separação, a mãe era retirada da caixa-viveiro e colocada em outra caixa com iguais características, na mesma sala de manutenção. Em seguida, a caixa contendo os filhotes era conduzida até outra sala, com características básicas semelhantes à anterior. Os filhotes eram, então, retirados da caixa e colocados sobre uma mesa forrada com tapete térmico, aquecido a 32°C, de forma a manter sua temperatura corporal, permanecendo nessa condição por 3hs. Ao final desse período, a prole era recolocada na caixa-viveiro e levada de volta à sala de manutenção, sendo a mãe reintroduzida nessa caixa em seguida. Durante os períodos em que os animais do Grupo SM foram privados do contato com a mãe, os animais do Grupo CN não foram submetidos a qualquer manipulação. No desmame (PN-21), dois machos e duas fêmeas de cada prole foram selecionadas aleatoriamente para a continuidade desta pesquisa. Eles foram, então, mantidos em duplas com animais do mesmo sexo e idade, que não haviam passado por separação materna.

Do nascimento até o período de desmame, qualquer manipulação nas caixas-viveiro foi feita utilizando-se luvas de vinil. Após colocar as luvas, o experimentador esfregava suas mãos em maravalha limpa e, em seguida, em maravalha retirada da caixa da prole a ser manipulada. Isso foi feito com a finalidade de neutralizar odores diferentes daqueles aos quais os animais já estavam submetidos.

Medida de início da puberdade.

A data de início da puberdade foi avaliada diariamente (8h-9h) em machos e fêmeas, a partir do PN-30. Em machos, o início da puberdade foi considerado o dia em que a separação entre prepúcio e glândula (separação prepucial) foi constatada. A separação prepucial foi verificada por meio da retração do prepúcio do rato diante de uma pressão manual aplicada pelo pesquisador sobre o pênis do animal (*cf* Korenbrot, Huhtaniemi & Weiner, 1977). Em fêmeas, por sua vez, o dia de início da puberdade foi considerado o dia de abertura vaginal, constatado por meio da observação visual direta da região vaginal (Lau et al., 1996).

Comportamento sexual de machos.

Cada macho foi observado em interação com uma fêmea adulta, sexualmente receptiva (i.e., em fase de estro), em três momentos do desenvolvimento: dias antes do início da puberdade (PN-40), poucos dias após o início da puberdade (PN-50) e na idade adulta (PN-90). As interações tiveram duração de 40 min cada, sendo conduzidas no período de escuro (20h-

23h), com uma fêmea diferente a cada vez. Para tanto, inicialmente, colocava-se o macho na *caixa de observação* e, 5 min depois, a fêmea. O registro foi feito pelo sistema de câmera com visão noturna, estando o experimentador presente na sala apenas no momento de colocar e retirar os animais da caixa.

Após o encerramento da fase de coleta da pesquisa, as filmagens foram analisadas por observadores que desconheciam a idade e o tratamento pelo qual o animal havia passado (separação materna ou controle). Ao longo da observação, eles registraram o número de ocorrências de cada uma das seguintes categorias ao longo dos 40 min de interação:

- I. Montagem – situações nas quais o macho coloca as duas patas dianteiras sobre a fêmea, aproximando a pelve de seu corpo – geralmente, na região traseira da fêmea. Para ser categorizado como montagem, não deve haver indicativos de penetração ou ejaculação.
- II. Penetração – topografia semelhante à da montagem, sendo distinta da categoria anterior por ocorrer somente na região traseira da fêmea e por ser finalizada com um marcado salto do macho para trás. Para ser categorizado como penetração, não deve haver indicativos de ejaculação.
- III. Ejaculação – semelhante à penetração, mas, no momento de finalização, o rato permanece por mais tempo montado na fêmea, com pouco ou nenhum movimento pélvico. Normalmente é a fêmea quem se afasta, encerrando o contato físico. Além disso, se observa uma redução geral nos comportamentos sexuais do macho nos minutos que se seguem à ejaculação.

Para o registro das categorias, foi utilizada uma planilha cujas linhas representavam os minutos da interação, na qual o observador deveria preencher o número de vezes que cada categoria foi observada naquele minuto. As colunas, por sua vez, representavam as categorias de análise. Uma planilha diferente foi preenchida para cada 40 min de interação.

Foram utilizados dois observadores independentes. Um deles, categorizou todas as sessões filmadas. O outro categorizou 5% das sessões, para fins de análise de concordância entre eles. Cada um dos observadores fez seu registro em locais e momentos diferentes, sem que houvesse contato entre eles durante a categorização. Eles foram orientados a: (1) ler as categorias previamente e a (2) consulta-las ao longo da categorização quando houvesse dúvida.

Comportamento sexual de fêmeas antes da idade adulta.

Após o dia de abertura vaginal, o ciclo estral de cada fêmea foi checado diariamente (19h-20h) por meio da técnica de esfregaço vaginal, mensurando-se o dia dos três primeiros estros. Para tanto, inseria-se cuidadosamente um cotonete umedecido com cloreto de sódio no canal vaginal da rata, rotacionado contra a parede vaginal, de forma a coletar células epiteliais, que eram colocadas em uma lâmina e analisadas em microscópio (Paccola, Resende, Stumpp, Miraglia & Cipriano, 2013).

Logo após a detecção de cada um dos três estros no microscópio, um macho adulto foi colocado na *caixa de observação* e, 5 min depois, a fêmea foi colocada junto a ele por 8 min. As interações, portanto, ocorriam no período de escuro, com um macho diferente a cada vez. A duração de 8 min foi determinada por ser um tempo suficiente para a emissão de lordoses, montagens e penetrações, mas insuficiente para que o macho emitisse a primeira resposta de ejaculação, conforme constatado por estudos pilotos conduzidos em nosso laboratório e por dados extraídos da literatura (Fosberg et al., 1985; Pattij et al., 2005). Dessa forma, evitou-se que as fêmeas emprenhassem antes da idade adulta, possibilitando a avaliação do comportamento sexual das mesmas em diferentes períodos.

A análise das interações foi feita seguindo as mesmas configurações descritas no item anterior, no que tange ao registro com o sistema de filmagem, aos observadores e à utilização de planilhas. Como relação às categorias, foram observados os comportamentos de machos e fêmeas. O comportamento dos machos foi avaliado com a finalidade de determinar o quanto as fêmeas eram sexualmente “atrativas” para eles, registrando-se o número de montagens e penetrações, tal como definidas na seção anterior. Por sua vez, o comportamento das fêmeas foi avaliado pela emissão de lordoses, definida como o arqueamento da região dorsal da fêmea, resultando em elevação da região anogenital e da cabeça e em maior proximidade do abdome ao solo (Meaney & Stewart, 1981).

Comportamento sexual de fêmeas na idade adulta.

A partir do terceiro estro, a realização de esfregaço vaginal diário foi suspensa até que a rata completasse 90 dias de vida. No PN-90, a prática de realização diária do esfregaço foi retomada (19h-20h) até a detecção de um novo estro. Logo após tal detecção, conduziu-se outro registro de interação entre a fêmea e um macho adulto, nos mesmos moldes daquela descrita no item anterior. Entretanto, sua duração foi de 40 min.

A categorização da interação foi feita da mesma forma que as demais, no que tange ao registro de filmagens, análise de observadores e utilização de planilha. As categorias utilizadas para os machos foram montagem, penetração e ejaculação (descritas anteriormente). Por sua vez, a lordose foi mensurada no comportamento das fêmeas.

Análise de dados.

As variáveis dependentes analisadas foram: 1) idade, em dias, do início da puberdade, para machos e fêmeas; 2) idade, em dias, dos três primeiros estros em fêmeas; 3) frequências das categorias de análise – montagem, penetração, ejaculação e lordose; e 4) frequência do comportamento sexual total (CST) de machos – índice formado pela soma de montagens, ejaculações e penetrações emitidas pelo animal em cada interação. Os dados foram analisados em função do tratamento recebido pelo animal (separação materna ou controle) e, quando aplicável, da idade/estro (PN-40, 50 e 90 para sujeitos machos e 1º, 2º e 3º estro, para sujeitos fêmeas).

As diferenças entre os grupos foram avaliadas por meio do teste estatístico Wilcoxon Mann-Whitney e de um Modelo GLM ajustado com distribuição de Poisson, ambos implementado no Programa R. Quando necessário, os efeitos principais do grupo, tempo e da interação entre eles foram avaliados com a estatística ‘poor man’s F’. Foi adotado o nível de significância de 5%. Em situações em que determinada categoria de análise não foi constatada em mais de três sujeitos em pelo menos um dos grupos, os resultados foram descritos sem o emprego de testes estatísticos.

A concordância entre observadores foi calculada a partir do índice kappa, também implementado no Programa R. Os índices foram classificados conforme descrito por Landis e Koch (1977): insignificantes (0 a 19%), medianos (20% a 39%), moderados (40% a 59%), substanciais (60% a 79%) e quase perfeitos (80% a 100%). Tomou-se como amostra 5% das filmagens de cada medida avaliada.

RESULTADOS

1. Puberdade.

Os dados referentes à puberdade de machos e fêmeas estão plotados na Figura 7. Em machos, ambos os grupos entraram na puberdade em idades semelhantes, entre o 41º e o 42º

dia de vida pós-natal. A estatística Wilcoxon-Mann-Whitney indica não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($U = 25.5$; $p = 0.407$). Para fêmeas, contudo, foram encontradas diferenças ($U = 1.5$; $p = 0.001$), tendo as ratas do Grupo SM entrado no estro, em média, cinco dias depois das fêmeas do Grupo CN.

Figura 7. Idade média, em dias, do início da puberdade para machos e fêmeas, em função do tratamento (Separação Materna – SM, ou Controle – CN) e do sexo. O asterisco representa que a diferença entre as barras indicadas foi estatisticamente significativa ($p = 0.001$).

2. Comportamento sexual de machos submetidos à separação materna.

O comportamento sexual de machos foi avaliado por meio do número de montagens, penetrações, ejaculações e comportamento sexual total (CST). As frequências de montagens, em função do grupo e do dia de interação com a fêmea, estão plotadas na Figura 8A. O Grupo SM apresenta frequências menores de montagem nas duas primeiras interações e maiores na terceira, quando comparado ao Grupo CN. A realização de um Modelo GLM ajustado com distribuição de Poisson revelou não haver diferenças significantes entre os grupos ($\chi^2(1) = 0.1452$; $p = 0.703$). Porém, foram encontradas diferenças estatísticas em função da idade ($\chi^2(2) = 19.736$; $p < 0.001$) e da interação entre grupo e idade ($\chi^2(2) = 66.5506$; $p < 0.001$), indicando que as mudanças observadas entre os PNs-40, 50 e 90 se deram de maneira distinta em função da separação materna. O Grupo SM apresentou aumento constante da frequência de montagens entre os testes, sendo detectada diferença estatística entre os PNs-40 e 50 ($p < 0.001$), 40 e 90 ($p < 0.001$) e 50 e 90 ($p < 0.001$), enquanto o Grupo CN teve redução na frequência entre os PNs-40 e 90 ($p = 0.035$).

Figura 8. Frequência média de montagens (A) e de comportamentos sexuais totais (CST, B) para machos, em função do tratamento (Separação Materna – SM, ou Controle – CN) e da idade na interação (PN-40, PN-50 e PN-90).

A ocorrência de penetrações se deu apenas no PN-90 (dados não plotados), nas frequências médias de 4,75 para o Grupo SM e de 16,88 para o Grupo CN. O teste de Wilcoxon-Mann-Whitney revelou que essa diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($U = 12,0$; $p = 0,03$). Nenhuma ejaculação foi constatada em qualquer uma das interações.

Os dados relativos ao CST, por sua vez, estão plotados na Figura 8B. Nos PNs-40 e 50, os valores de ambos os grupos são idênticos aos observados na montagem, tendo em vista que essa foi a única categoria observada. No PN-90, os índices de CST aumentam para ambos os grupos, que atingem frequências semelhantes. Considerando a redução de frequência das montagens observada entre os PNs-50 e 90 no Grupo CN (Figura 8A), o aumento do CST na última interação pode ser atribuído às respostas de penetração. Análises conduzidas por meio de um Modelo GLM ajustado com distribuição de Poisson para o CST não indicam diferenças significativas entre os grupos ($\chi^2(1) = 0.3356$; $p = 0.5624$). Ambos, contudo, apresentaram mudanças ao longo do tempo ($\chi^2(2) = 88.951$; $p < 0.001$), havendo aumento de frequência entre os PNs-40 e 90 ($p < 0,001$) e 50 e 90 ($p < 0,001$). Além disso, tais mudanças ocorreram de maneira distintas entre os grupos, conforme mostra o efeito de interação ($\chi^2(2) = 35.0211$; $p < 0.001$), indicando que apenas os animais que sofreram separação materna apresentaram aumento também entre os PNs-40 e 50 ($p < 0.001$).

3. Interações sexuais de fêmeas submetidas à separação materna.

3.1. Antes da idade adulta.

O comportamento sexual de fêmeas antes da idade adulta foi avaliado na interação com animais do sexo oposto nos três primeiros estros. As médias etárias dos três primeiros estros do Grupo SM foram, respectivamente, 44,5; 56,37 e 62,5 dias, enquanto, no Grupo CN, foram 39,5; 52,9 e 59,3 (dados não plotados). Um Modelo GLM ajustado com distribuição de Poisson revelou não haver diferenças significativas entre os grupos ($\chi^2(1) = 2.2386$; $p = 0.135$), nem efeito de interação entre grupo e idade dos três primeiros estros ($\chi^2(2) = 0.0349$; $p = 0.983$).

As interações sexuais foram avaliadas a partir das respostas das fêmeas de lordose e das respostas dos machos de montagem, penetração e de CST, no contato com elas. Para ambos os grupos, a lordose teve baixa frequência, mantendo níveis médios abaixo de 1 lordose por estro (Figura 9A). No Grupo CN, esse comportamento foi observado em uma única fêmea, apenas no 1º estro, enquanto no Grupo SM, foi observado, respectivamente, em 1, 3 e 3 fêmeas nos três estros. Considerando o número reduzido de animais no qual a lordose foi constatada, não foram realizadas análises estatísticas.

As respostas de montagens, por sua vez, ocorreram em maior frequência no Grupo SM (Figura 9B), conforme indicou a análise estatística feita como o Modelo GLM ajustado com distribuição de Poisson ($\chi^2(1) = 21.919$; $p < 0.001$). No 1º estro, inclusive, machos em contato com fêmeas do Grupo CN não apresentaram sequer uma resposta desta categoria. A análise estatística revelou, ainda, diferenças ao longo dos estros ($\chi^2(2) = 18.9435$; $p < 0.001$), sugerindo aumento da frequência de montagens entre o 1º e o 2º estro ($p < 0,001$). Não houve efeito de interação entre grupo e estro ($\chi^2(2) = 1.6492$; $p = 0.438$), embora o Grupo SM tenha apresentado aumento de frequência entre o 2º e o 3º estro, enquanto o Grupo CN apresentou redução.

Ambos os grupos tiveram frequências médias inferiores a duas penetrações nos três estros (Figura 9C). No Grupo CN, a categoria foi observada apenas no segundo estro, em uma única fêmea. Já no Grupo SM, a categoria foi constatada em 1, 3 e 5 fêmeas nos três primeiros estros, respectivamente. As diferenças entre os grupos no terceiro estro foram avaliadas por meio do teste Wilcoxon Mann-Whitney, que revelou diferença significativa entre os Grupos SM e CN ($U=16$, $p = 0,017$).

Por fim, para ambos os grupos, o CST (Figura 9D) teve padrões e frequências semelhantes àqueles observados na montagem, com a diferença de que, para o Grupo SM, o crescimento da curva de CST foi maior do que o da montagem. Os resultados obtidos com um Modelo GLM ajustado com distribuição de Poisson revelaram diferenças significativas entre os grupos ($\chi^2(1) = 24.8025$; $p < 0.001$) e entre os estros ($\chi^2(2) = 26.841$; $p < 0.001$), indicando aumento da frequência entre o 1º e o 2º estro ($p < 0,001$). Não houve diferenças significativas para a interação entre grupo e estro ($\chi^2(2) = 3.1293$; $p = 0.2092$), embora apenas o Grupo SM tenha apresentado aumento da frequência entre o 2º e o 3º estro.

Figura 9. Frequências médias de lordoses (A), emitidas pelas fêmeas, e de montagens (B), penetrações (C) e comportamentos sexuais totais (CST, D), emitidas por machos, em função do tratamento (Separação Materna – SM, ou Controle – CN) e do dia de interação (Estro 1 – E1, Estro 2 – E2 e Estro 3 – E3).

3.2. Na idade adulta.

Na Figura 10, está plotada a frequência de lordoses em fêmeas na idade adulta, bem como as frequências de montagens, penetrações e CST em machos na interação com elas. Como a ejaculação foi constatada apenas duas vezes em um único animal do Grupo CN, esse dado não foi plotado na figura.

Houve diferença entre os grupos apenas em relação à montagem ($U = 13,0$; $p = 0,044$), com o Grupo SM apresentando frequência superior ao Grupo CN. Não foi constatada diferença estatisticamente significativa para os Grupos CN e SM nas categorias lordose ($U = 31$; $p = 0,898$), penetração ($U = 26,5$; $p = 0,536$) e CST ($U = 20,0$; $p = 0,203$). Destaca-se, porém, que fêmeas do Grupo CN tiveram índices um pouco maiores do que as do Grupo SM nas categorias lordose e penetração – tendência oposta àquela observada nos três primeiros estros.

Figura 10. Frequência média de respostas de lordose em fêmeas dos Grupos SM e CN na idade adulta e de respostas de montagem, penetração e comportamentos sexuais totais (CST) em machos na interação com essas fêmeas. O asterisco representa que a diferença entre as barras indicadas foi estatisticamente significativa ($p = 0,04$).

4. Concordância entre observadores.

O índice kappa revelou uma concordância entre observadores de 83% ($p < 0,001$) para a categoria montagem, de 87% ($p < 0,001$) para a categoria penetração e de 86% ($p < 0,001$) para a categoria lordose. Portanto, todas elas apresentaram índices quase perfeitos, de acordo com os critérios de Landis e Koch (1977). Como a ejaculação foi constatada uma única vez neste experimento, sua concordância não foi avaliada.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que a separação materna alterou a idade de início da puberdade em fêmeas, mas não em machos. Mais especificamente, em fêmeas, foi constatado atraso no dia de abertura vaginal em animais submetidos à separação materna – dado que contraria o obtido por Lau et al. (1996), que não encontraram diferenças entre os grupos. Porém, Lau et al. (1996) aplicaram um procedimento no qual os episódios de separação tiveram duração maior (6h diárias) e foram conduzidos em dias diferentes (4 a 22) dos aqui adotados. Considerando que alguns autores já demonstraram que, com durações e dias distintos, os efeitos da separação materna podem diferir (Bodensteiner, Ghiraldi & Miner, 2012; Roque et al., 2014), é possível que as variações entre os procedimentos tenham determinado as diferenças de resultados. Por sua vez, a ausência de efeito aparente sobre o início da puberdade em machos contrariou o dado obtido por Bodensteiner et al. (2014), que, com um procedimento bastante semelhante ao adotado aqui, observaram atraso de um dia na separação prepucial de animais submetidos à separação materna. Uma explicação possível é que a periodicidade com a qual a separação prepucial é mensurada – uma vez ao dia, em ambos os estudos – pode não ser frequente o suficiente para sempre detectar diferenças etárias tão pequenas entre os grupos.

Com relação à avaliação do comportamento sexual na interação com o sexo oposto, foram encontradas diferenças tanto em machos quanto em fêmeas como função da separação materna. Em machos, animais submetidos à separação materna iniciaram com menores índices de montagem e apresentaram crescimento constante desses índices até a idade adulta. Já nos machos controles, constatou-se, na idade adulta, uma redução da frequência de respostas de montagem e aumento de respostas de penetração. Considerando que penetrações são mais efetivas para a cópula do que montagens, esses dados podem indicar maior qualidade do contato sexual em machos do Grupo CN, quando comparado ao Grupo SM. Tal constatação é coerente com as conclusões apresentadas por Forsberg et al. (1985), Rhees et al. (2001) e Bodensteiner et al. (2014), de que a exposição à separação materna na infância pode piorar o desempenho sexual em ratos machos.

Tendo em vista que machos de ambos os grupos apresentaram frequências equiparáveis de CST na idade adulta, é improvável que as diferenças nas frequências de montagens e penetrações entre os grupos sejam decorrentes de fatores motivacionais. Ou seja, para ambos, o contato com a fêmea parece ser reforçador. A explicação para tais diferenças pode residir, todavia, nas características topográficas das respostas de cópula: enquanto a montagem pode

ser emitida em qualquer região do corpo da fêmea, a penetração demanda posicionamento corporal mais preciso do macho em relação a ela. Considerando isso, é possível que, em comparação à montagem, a penetração envolva uma cadeia maior de movimentos, tornando sua emissão mais difícil e aumentando a latência entre o início de sua emissão e o acesso à consequência (contato com a fêmea). Se animais submetidos à separação materna forem diferencialmente afetados por essa dificuldade e/ou latência, isso poderia explicar a alta frequência de montagens, em detrimento de outras respostas de cópula. Essa hipótese, contudo, precisa ser mais investigada em futuros estudos.

Com relação aos efeitos da separação materna sobre as interações sexuais de fêmeas, não foram observadas diferenças nas taxas de lordose em qualquer idade. Porém, analisando as frequências de montagem, penetração e CST nos três primeiros estros, os dados permitem supor que as fêmeas submetidas à separação materna se tornam “atrativas” para machos adultos em idade mais precoce que fêmeas controle. Curiosamente, na idade adulta, essa “atratividade” se torna mais equiparada entre os grupos, com machos apresentando respostas de cópula semelhantes em frequência para as fêmeas submetidas ou não à separação materna. Como explicar a diferença entre os grupos nos primeiros estros? Para responder a essa questão, seria importante investigar, em diferentes idades, outros aspectos do comportamento e da biologia de fêmeas submetidas à separação materna, que não apenas a lordose. Futuras pesquisas poderiam investigar, por exemplo, os efeitos da separação materna em ratas sobre a liberação de feromônios relacionados à atratividade sexual e sobre a emissão de respostas que tenham como consequência a aproximação ou o afastamento do macho.

Os dados com fêmeas da idade adulta diferem daquele encontrado por Fosberg et al. (1985), no qual ratas submetidas à separação materna tiveram maiores índices de lordose. Porém, como mencionado, o estudo de Fosberg et al. (1985) utilizou um tempo de privação materna maior (24h ininterruptas, em dias alternados), que, sendo muito longo, gerou desnutrição nos filhotes. Evidências científicas sugerem que déficits nutricionais na infância podem gerar aumento da frequência de lordose na idade adulta (Fernandez, Ordás, Sanchez, Marín & Menedez-Patterson, 1986), sendo possível que os dados obtidos por Fosberg et al. (1985) sejam decorrentes da desnutrição e não da separação materna.

Em conjunto, os resultados obtidos aqui indicam que a separação materna pode atuar de formas diferentes no comportamento sexual de machos e fêmeas. Nos machos, o efeito observado foi de altos índices de montagem e frequências menores de comportamentos sexuais mais efetivos. Já em fêmeas, a separação materna gerou um atraso no início da puberdade, mas

tornou-as “atrativas” para machos em uma idade mais precoce. Sendo este o único estudo conhecido por nós sobre interações sexuais antes da idade adulta, seria importante que outras pesquisas tentassem replicar e expandir os dados encontrados aqui.

REFERÊNCIAS

- Biagini, G. & Pich, E. M. (2002). Corticosterone administration to rat pups, but not maternal separation, affects sexual maturation and glucocorticoid receptor immunoreactivity in the testis. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73, 95–103.
- Bodensteiner, K. J.; Christianson, N.; Siltumens, A. & Krzykowski, J. (2014). Effects of early maternal separation on subsequent reproductive and behavioral outcomes in male rats. *Journal of General Psychology*, 141(3), 228-246.
- Bodensteiner, K. J.; Ghiraldi, L. L. & Miner, S. S. (2012). Differential effects of short- and long-term early maternal separation on subsequent maternal behavior in rats. *The Journal of General Psychology*, 139(2), 78-99.
- Dimatelis, J. J.; Vermeulen I. M.; Bugarith, K.; Stein, D. J. & Russell, V. A. (2015). Female rats are resistant to developing the depressive phenotype induced by maternal separation stress. *Metabolic Brain Disease.*, n/a-n/a.
- Farris, E. J. (1942). Breeding of the rat. Em: *The rat in laboratory investigation* (eds J. Q. Griffith & E. J. Farris), Philadelphia: Lippincott.
- Fernandez, S. F.; Ordás, I. A.; Sanchez, J. M. G.; Marín, B. & Menedez-Patterson, A. (1986). Influence of malnutrition during gestation and suckling on reproductive function and sexual behavior in rats. *Nutrition Research*, 6(5), 517–526.
- Forsberg, G.; Abrahamsson, K.; Södersten, P. & Eneroth, P. (1985). Effects of restricted maternal contact in neonatal rats on sexual behaviour in the adult. *Journal of Endocrinology*, 104(3), 427-431.
- Greisen, M. H.; Bolwig, T. G.; Husum, H.; Nedergaard, P. & Wörtwein G. (2005). Maternal separation affects male rat copulatory behaviour and hypothalamic corticotropin releasing factor in concert. *Behavioural Brain Research*, 158(2), 367–375.
- Korenbrod, C. C.; Huhtaniemi, I. T. & Weiner, R. I. (1977). Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology of Reproduction*, 17, 298–303.

- Landis, J. R. & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159-174.
- Lau, C.; Kunefelter, G. & Cameron, A. M. (1996). Reproductive Development and Functions in the Rat after Repeated Maternal Deprivation Stress. *Fundamental and Applied Toxicology*, 30, 298-301.
- Leussis, M. P.; Freund, N.; Brenhouse, H. C.; Thompson, B. S. & Andersen, S. L. (2012). Depressive-like behavior in adolescents after maternal separation: sex differences, controllability, and GABA. *Developmental Neuroscience*, 34(2-3), 210-217.
- Meaney, M. J. & Stewart, J. (1981). A descriptive study of social development in the rat (*rattus norvegicus*). *Animal Behaviour*, 29, 34-45.
- Paccola, C.C.; Resende, C. G.; Stumpp, T.; Miraglia, S. M. & Cipriano, I. (2013). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal Reproduction*, 10, 677-683.
- Pattij, T.; de Jong, T. R.; Uitterdijk, A.; Waldinger, M. D.; Veening, J. G.; Cools, A. R.; van der Graaf, P. H. & Olivier, B. (2005). Individual differences in male rat ejaculatory behaviour: searching for models to study ejaculation disorders. *European Journal of Neuroscience*, 22, 724-734
- Raineki, C., Lucion, A. B., & Weinberg, J. (2014). Neonatal Handling: An Overview of the Positive and Negative Effects. *Developmental Psychobiology*, 56(8), 1613-1625.
- Reite, M.; Kaemingk, K. & Boccia, M. L. (1989). Maternal separation in bonnet monkey infants: Altered attachment and social support. *Child Development*, 60, 473-480.
- Rhees, R. W.; Lephart, E. D. & Eliason, D. (2001). Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioural Brain Research*, 123(1), 1-10.
- Roque, S.; Mesquita, A. R.; Palha, J. A.; Sousa, N. & Correia-Neves, M. (2014). The behavioral and immunological impact of maternal separation: A matter of timing. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, n/a-n/a.
- Sampath, D.; Sabitha, K. R.; Hegde, P.; Jayakrishnan, H. R.; Kutty, B. M.; Chattarji S.; Rangarajan, G. & Laxmi, T. R. (2014). A study on fear memory retrieval and REM sleep

in maternal separation and isolation stressed rats. *Behavioural Brain Research*, 273, 144-154.

Sun, X. M.; Tu, W. Q.; Shi, Y. W.; Xue, L & Zhao, H. (2014). Female-dependent impaired fear memory of adult rats induced by maternal separation, and screening of possible related genes in the hippocampal CA1. *Behavioural Brain Research*, 267, 111-118.

Tata, D. A; Markostamou, I; Ioannidis, A.; Gkioka, M.; Simeonidou, C.; Anogianakis, G. & Spandou, E. (2015). Effects of maternal separation on behavior and brain damage in adult rats exposed to neonatal hypoxia-ischemia. *Behavioural Brain Research*, 280, 51-61.

Vetulani J. (2013) Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacological Reports*, 65,1451-1461.

Xiong, G. J.; Yang, Y.; Wang, L. P.; Xu, L. & Mao, R. R. (2014). Maternal separation exaggerates spontaneous recovery of extinguished contextual fear in adult female rats. *Behavioural Brain Research*, 269, 75-80.

Wang, Q; Li, M; Du, W; Shao, F & Wang, W (2015). The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 280, 16-23.

Wewers, D.; Kaiser S. & Sachser, N. (2003) Maternal separation in guinea-pigs: A study in behavioural endocrinology, *Ethology*, 109, 443–453.

ARTIGO 3: EFEITOS NA PROCRIAÇÃO DE RATAS EXPOSTAS À SEPARAÇÃO MATERNA NA INFÂNCIA

A separação materna é um procedimento bastante adotado com ratos para investigar os efeitos da relação inicial entre mãe e filhote sobre o desenvolvimento comportamental posterior (Leussis, Freund, Brenhouse, Thompson & Andersen, 2012; Roque, Mesquita, Palha, Sousa & Correia-Neves, 2014; Sampath et al., 2014; Sun, Tu, Shi, Xue & Zhao, 2014; Dimatelis, Vermeulen, Bugarith, Stein & Russell, 2015; entre outros). De forma geral, nesse procedimento, o contato entre a mãe e a prole é interrompido por algumas horas diárias no período anterior ao desmame. A forma como tal separação é conduzida, entretanto, varia entre as pesquisas, sobretudo no que tange aos dias e à quantidade de horas de separação (Lehmann & Feldon, 2000). A maioria dos estudos adota procedimentos de 3hs diárias, entre os dias pós-natais (PN) 2 e 14 (Gehm, 2017). Lehmann e Feldon (2000) apontam que um mínimo de 2h diárias de separação é necessário para induzir mudanças na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que regula a responsividade do filhote ao estresse.

Os resultados das pesquisas sobre separação materna são inconsistentes, possivelmente em decorrência da variação entre os procedimentos. Enquanto alguns estudos sugerem que, em ratos, a separação pode produzir aumento da ansiedade (Sousa et al., 2014; Bailoo, Jordan, Garza & Tyler, 2014), aumento da probabilidade de comportamentos relacionados à depressão (Aisa, Tordera, Lasheras, Del Rio & Ramirez, 2007) e prejuízo na aprendizagem de esquiva (Lehmann, Pryce, Bettschen, & Feldon, 1999), outros indicam que ela pode ter efeito ansiolítico (Rodríguez & Dueñas, 2013; Llidó, Mòdol, Darbra & Pallarès, 2013), não alterar respostas relacionadas à depressão (Marais, van Rensburg, van Zyl, Stein, & Daniels, 2008) e aumentar o desempenho da aprendizagem de esquiva (Lehmann, Pryce, Bettschen, & Feldon, 1999).

Resultados contrastantes também foram encontrados em pesquisas que investigaram se ratas expostas à separação materna na infância poderiam ter comportamentos maternos alterados na idade adulta (Boccia & Pedersen, 2001, Lovic, Gonzalez & Fleming, 2001, Rees & Fleming, 2001, Rees, Akbari, Steiner & Fleming, 2008 e Bodensteiner, Ghiraldi & Miner, 2012). A maioria delas constatou déficits no cuidado materno de ratas submetidas à separação (Boccia & Pedersen, 2001, Lovic et al., 2001, Rees & Fleming, 2001), enquanto apenas um estudo, o de Bodensteiner et al. (2012), encontrou melhora do cuidado delas com a prole.

No estudo de Bodensteiner et al. (2012), a separação foi conduzida entre os PNs-2 e 20, por 8h, 4h ou 0h diárias (Grupos 1, 2 e 3, respectivamente). Na idade adulta, as ratas que, quando filhotes passaram por essa separação, tinham seus comportamentos maternos testados em sua própria prole, no período que compreende o nascimento até o desmame. Como resultado, obteve-se que o grupo exposto a 4h de separação foi o que apresentou qualidade superior na construção do ninho e menor tempo para agrupar os filhotes no ninho quando estes eram colocados em diferentes posições da caixa-viveiro (teste de agrupamento). Esses dados sugerem que a qualidade do cuidado desenvolvido pelas mães depende da quantidade de horas diárias de separação materna que experimentaram na infância. A depender dessa quantidade, o cuidado materno pode, inclusive, ser maior em ratas previamente submetidas à separação.

Por sua vez, os estudos que encontraram déficits no cuidado materno (Boccia & Pedersen, 2001, Lovic et al., 2001, Rees & Fleming, 2001) empregaram procedimentos que envolvem muitas diferenças em relação ao de Bodensteiner et al. (2012). Inicialmente, a separação materna se deu entre 3 a 5hs diárias, com variações em relação aos dias em que ela foi conduzida. Tais pesquisas também introduziram, logo após o desmame de algumas ratas (PN-22), a sua exposição a filhotes desconhecidos, supostamente para que o comportamento materno pudesse ser desenvolvido antes mesmo de as ratas estarem prenhas. Quando adultas, logo após o parto, elas foram separadas permanentemente de suas proles, ficando no máximo 15 min em contato com os filhotes – tempo insuficiente para que a ativação de hormônios relacionados ao cuidado materno acontecesse em função desse contato. Após quatro dias, elas foram expostas a proles desconhecidas, por dias consecutivos, com uma ninhada diferente a cada dia. Como resultado, as ratas que haviam sido expostas à separação na infância apresentaram déficits do comportamento materno junto à prole, ou seja, menores índices de lambidas anogenitais e/ou corporais (Boccia & Pedersen, 2001; Lovic et al., 2001; Rees & Fleming, 2001), de *crouching* (i.e., se agachar sobre os filhotes, Lovic et al., 2001) e prejuízos no teste de agrupamento (Rees & Fleming, 2001), independentemente de terem sido ou não a expostas a ninhadas no PN-22.

Ainda que os estudos de Boccia e Pedersen (2001), Lovic et al. (2001) e Rees e Fleming (2001) sejam utilizados como referências na literatura especializada no tema, há que se considerar que metodologicamente eles apresentam problemas no que diz respeito ao procedimento empregado. Esse procedimento impede duas classes de eventos naturalmente presentes na relação mãe-filhotes: a referida ativação hormonal e a formação de vínculos comportamentais entre mãe e filhotes. Diferentemente, o estudo de Bodensteiner et al. (2012)

é metodologicamente mais próximo da relação que se dá na natureza, sendo o único que apresenta resultados contrários aos anteriores. Nesse sentido, seria interessante a condução de mais pesquisas que adotassem procedimento equivalente ao de Bodensteiner et al. (2012), para verificar se os efeitos descritos podem ser replicados ou mesmo ampliados.

Outros estudos demonstraram ainda que a separação materna, em ratos, altera os níveis de circulação de hormônios como a oxitocina e a vasopressina, relacionados ao comportamento materno (Lukas, Bredewold, Neumann & Veenema, 2010; Ji et al., 2016). Em níveis adequados, esses hormônios inibem comportamentos de abandonar ou matar os filhotes (McCarty, 1990), ao mesmo tempo que aumentam a atração por sinais da prole (Francis, Champagne & Meaney, 2000). Contudo, não foram encontradas pesquisas que tenham investigado taxas de mortalidade da prole, nem a atração por sinais dos filhotes em fêmeas submetidas à separação materna. Tendo em vista tal carência e a relevância de ampliar a investigação conduzida por Bodensteiner et al. (2012), o objetivo deste trabalho foi verificar efeitos diversos em fêmeas adultas que procriaram tendo histórico de separação materna na própria infância. Mais especificamente, esta pesquisa analisou os índices de natalidade, sobrevivência e proporção sexual de proles provenientes de mães submetidas à separação materna na infância, bem como a atração pelo cheiro do ninho pela mãe e por seus filhotes em um teste olfativo.

MÉTODO

4. Sujeitos.

Foram utilizadas 16 fêmeas de ratos Sprague-Dawley (Geração 1 - G1), provenientes de oito proles diferentes. Quando adultas, essas fêmeas pariram dezesseis proles contendo, ao todo, 181 filhotes (Geração 2 – G2), que também foram utilizados como sujeitos desta pesquisa. Ambas as gerações foram mantidas, desde o nascimento, em caixas-viveiros forradas com maravalha, em uma sala do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, que contava com sistema de renovação de ar, temperatura controlada e ciclo claro-escuro de 12h (4h-16h). Durante toda a pesquisa, os animais tiveram livre acesso à água e ração.

Entre o desmame e a idade adulta, as ratas G1 foram utilizadas em outros dois estudos, cuja manipulação envolveu expô-las a interações com animais do mesmo sexo na infância (Artigo 1) e com animais do sexo oposto na puberdade e idade adulta (Artigo 2). Essa possibilidade de interação social, comum na vida de roedores, foi igual para todos os animais,

de forma que no atual estudo a única diferença entre os grupos foi a exposição ao procedimento de separação materna, como será visto adiante.

5. Equipamentos.

Para manutenção dos animais, foram empregadas caixas-viveiro (41x34x16cm) feitas de polipropileno translúcido com grades superiores de arame cromado. Um tapete térmico (*Soft Professional* com Infravermelho, *Styllus Term*) de 100x45cm, com sistema de aquecimento elétrico que permitia quatro temperaturas (26, 32, 38 e 44°C), foi adotado na condução da separação materna. Para o registro do tempo da separação e dos testes, empregou-se um *timer*, e para o manuseio dos animais, luvas de vinil (Modelo Danny DA-301/CA).

Uma caixa de teste (60x33x33cm) foi empregada para avaliação do desempenho olfativo e motor, confeccionada com paredes e piso de acrílico transparente. A caixa era dividida em três compartimentos de igual tamanho (20x33x33cm), separados por duas paredes internas. As paredes internas possuíam um orifício cada, localizado no canto inferior (9x9cm), que permitia a passagem do animal entre os compartimentos.

A observação e o registro dos comportamentos dos animais foram feitos por meio de um sistema de filmagem composto por oito câmeras de alta definição com visão noturna e transmissão simultânea pela internet (Modelo Intelbras – Infravermelho - VMD 1120 IR G3).

Na realização e análise do esfregaço vaginal, utilizaram-se cotonetes, cloreto de sódio (0,9%), lâminas de vidro (26x76mm) e microscópio binocular (Nikon Eclipse E-100, com objetivas de 4x, 10x, 40x e 100x).

6. Procedimento.

Separação materna na G1.

Nos primeiros dias de vida das fêmeas da G1, metade delas foi submetida ao procedimento de separação materna (Grupo SM), enquanto as demais permaneceram com suas mães até o desmame (Grupo CN). A separação materna consistiu na privação do contato entre a prole da G1 e sua mãe por 3hs diárias (9h-12h), entre PN-2 e 14, sendo o dia do nascimento considerado PN-0. No início de cada período de separação, a mãe era retirada da caixa-viveiro

e colocada em outra caixa com iguais características, na mesma sala de manutenção. Em seguida, a caixa contendo os filhotes da G1 era conduzida até outra sala, com características básicas semelhantes à anterior. Os filhotes eram, então, retirados da caixa e colocados sobre uma mesa forrada com tapete térmico, aquecido a 32°C, de forma a manter sua temperatura corporal, permanecendo nessa condição por 3hs. Ao final desse período, a prole era recolocada na caixa-viveiro e levada de volta à sala de manutenção, sendo a mãe reintroduzida nessa caixa em seguida. Durante os períodos em que os animais do Grupo SM foram privados do contato com a mãe, os animais do Grupo CN não foram submetidos a qualquer manipulação. No desmame (PN-21), duas fêmeas de cada prole foram selecionadas aleatoriamente para a continuidade desta pesquisa. Elas foram, então, mantidas em duplas com ratas da mesma idade, que não haviam passado por separação materna, até a detecção do primeiro estro na idade adulta (ver adiante).

Procriação das ratas G1.

A partir de PN-90, as células do canal vaginal de cada fêmea G1 foram analisadas diariamente, no período de escuro (19h-20h), por meio da técnica de esfregaço vaginal. Para tanto, inseria-se cuidadosamente um cotonete umedecido com cloreto de sódio no canal vaginal da rata, rotacionado contra a parede vaginal, de forma a coletar células epiteliais, que eram colocadas em uma lâmina e analisadas em microscópio (Paccola, Resende, Stumpp, Miraglia & Cipriano, 2013). No dia de detecção do primeiro estro, a rata foi alojada com um macho adulto em uma caixa-viveiro. A partir de então, diariamente, no período de luz (8h-12h), o esfregaço vaginal foi feito para avaliação da presença de espermatozoides no microscópio. O dia em que os espermatozoides foram detectados foi considerado o primeiro dia de gestação da rata. O macho, então, foi retirado da caixa-viveiro e a realização de esfregaços suspensa.

Nascimento da prole, sexagem, controle de natalidade e sobrevivência dos filhotes da G2.

Entre o dia de detecção dos espermatozoides e o dia do nascimento da prole G2, diariamente, no período de luz (8h-12h), cada rata da G1 foi pesada e as caixas-viveiro foram checadas visualmente para verificar vestígios de sangue. Isso foi feito com a finalidade de verificar a possibilidade de ter ocorrido partos e abortos. Após vinte dias da detecção dos espermatozoides, a rata passou também a ser monitorada de hora em hora até o momento do

parto através de um sistema de vigilância acessado pelo pesquisador por meio de um computador localizado fora da sala de manutenção.

Assim que o parto terminou, a rata mãe (G1) foi retirada da caixa-viveiro e colocada em outra com iguais características por um período máximo de 5 min. Durante esse período, o pesquisador registrou o número de filhotes vivos e mortos, bem como o sexo de cada animal da G2. A sexagem foi feita avaliando-se a distância anogenital dos filhotes (*cf.* Farris, 1942). Qualquer manipulação na mãe ou na prole foi feita utilizando-se luvas de vinil que, após vestidas, eram esfregadas em maravalha limpa e, depois, em maravalha retirada da caixa-viveiro da prole. Isso foi feito com objetivo de neutralizar odores diferentes daqueles dos filhotes.

A prole permaneceu com sua mãe desde o nascimento (PN-0) até o desmame (PN-21). Nesse período, a quantidade de filhotes vivos e mortos foi registrada uma vez por dia no período de luz (8h-12h). Em situações em que foi encontrado um filhote morto, ele foi retirado brevemente da caixa para avaliar seu sexo e, em seguida, recolocado de volta. Tal procedimento durou, no máximo, 30s a cada vez. Caso a mãe não ingerisse o filhote morto, ele era permanentemente retirado da caixa no dia de troca da maravalha. A troca de maravalha foi feita regularmente, para todos os animais, nos PNs-5, 9, 13 e 17.

Testes olfativo e motor.

No PN-9 (G2), cada rata da G1 foi separada de sua prole por noventa minutos para a realização dos testes olfativo e motor. Durante esse período, a prole foi retirada da caixa-viveiro de convívio com a mãe e realocada em uma caixa com características semelhantes. O teste olfativo foi realizado, individualmente, com a mãe e com os seus filhotes, colocando-se o animal no compartimento central da *caixa de teste*, na parede oposta à dos orifícios que permitiam a passagem entre os compartimentos. Em um dos compartimentos da extremidade foi colocada maravalha retirada do ninho da respectiva rata e, no outro, maravalha limpa. Para metade dos animais de cada grupo, a maravalha limpa foi colocada no compartimento da esquerda; para a outra metade, no compartimento da direita.

O teste foi inicialmente conduzido com a mãe, logo no início do período de isolamento. Um pesquisador observou o comportamento da rata, medindo em qual das duas partes da caixa (direita ou esquerda) ela entrava primeiro. A entrada foi considerada apenas quando todo o corpo do animal ficou dentro do compartimento. Assim que isso ocorreu, o teste foi

interrompido e a mãe devolvida à sua caixa-viveiro, sem os filhotes. Em seguida, a maravalha dos dois compartimentos foi descartada e a caixa de teste foi limpa com álcool. Uma nova porção de maravalha limpa e de maravalha retirada do ninho foi então colocada na mesma posição em que o teste da mãe havia sido conduzido. Cada um dos filhotes G2, exceto um por prole (ver adiante), foi, então, testado.

O teste olfativo conduzido com os filhotes seguiu a mesma configuração daquele conduzido com a mãe, exceto pela estipulação de um tempo máximo (6 min) em que a escolha pelo compartimento direito ou esquerdo poderia ser feita. Para cada filhote, registrou-se uma de três possibilidades: (1) permaneceu no compartimento central ao longo dos 6 min; (2) entrou no compartimento com maravalha limpa ou (3) entrou no compartimento com maravalha da prole. Tal como com a mãe, o critério de entrada foi o corpo todo do animal estar dentro de um dos compartimentos das extremidades, tendo o teste sido encerrado assim que isso ocorreu ou após esgotado o tempo máximo. Entre os testes, a parte central foi limpa com álcool. Em casos nos quais o filhote escolheu o compartimento com a maravalha limpa, este também foi limpo e a maravalha substituída por uma nova. No caso de escolha pelo compartimento com a maravalha do ninho, ela não foi substituída, pois os odores do filhote apenas se somaram aos já presentes nela e, diferente da mãe, os filhotes não espalham ou defecam na maravalha.

Com o único filhote de cada prole G2 que não passou pelo teste olfativo, formaram-se dois grupos (SM e CN) de oito sujeitos cada, quatro machos e quatro fêmeas por grupo. Exceto pelo critério sexual, visando manter o equilíbrio de gênero nesses dois grupos, a escolha do filhote em cada prole se deu de forma aleatória. Eles então passaram, individualmente, por um teste motor que visou verificar se diferenças nos padrões de escolha dos filhotes submetidos ao teste olfativo poderiam ser atribuídas a diferenças na atividade motora dos grupos. Para esses filhotes, nenhuma maravalha foi colocada em qualquer dos compartimentos. No teste, o filhote foi posicionado no compartimento central, registrando-se uma de duas possibilidades: (1) ficar nele durante todo o período; ou (2) entrar em um dos outros dois compartimentos das extremidades, seguindo os mesmos critérios de entrada do teste olfativo. Encerrou-se o teste assim que o animal entrou em uma das duas extremidades ou após transcorridos 6 min. Entre a troca dos filhotes, o compartimento central e, se aplicável, o da extremidade escolhida foram limpos com álcool, com a finalidade de neutralizar odores. Após os noventa minutos de isolamento, nas quais os testes olfativos e motor foram realizados, a prole foi devolvida à caixa-viveiro em que a mãe se encontrava.

Análise de Dados.

As variáveis dependentes analisadas foram: 1) número de machos, fêmeas e total de filhotes nascidos; 2) número de machos, fêmeas e total de filhotes sobreviventes a cada dia até o desmame; 3) escolha feita pelos animais no teste olfativo; e 4) escolha dos animais no teste motor. Os dados foram analisados em função do tratamento recebido pela rata da G1 (separação materna ou controle).

A análise das variáveis dependentes descritas nos Itens 1 e 2 foi feita utilizando o teste de Shapiro-Wilk para testar a hipótese de normalidade. Quando encontrada evidência de distribuição normal, foi utilizado o Teste T de Student e, quando não ($p < 0,05$), foi empregado o teste não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Ademais, entre o nascimento e o desmame, a função de sobrevivência por dia de vida foi calculada usando o método de Kaplan-Meier, para machos e fêmeas separadamente. O teste de log-rank foi aplicado para comparar as diferenças entre as curvas de sobrevida para cada grupo de tratamento. O nível de significância adotado para todos os testes foi o de 5% ($p < 0.05$). Para análise das escolhas nos testes olfativo e motor, utilizou-se estatística descritiva, comparando-se o percentual de animais que escolheram cada uma das opções possíveis.

RESULTADOS

A Figura 11 mostra as diferenças em termos de natalidade e sobrevivência dos filhotes da G2, em função do tratamento recebido pelas mães (G1) na infância. Na Figura 11A, estão plotados os dados referentes ao total de filhotes G2 nascidos e a sua distribuição por sexo. Esses dados indicam que, embora as mães previamente expostas ao procedimento de separação materna tenham tido, em média, 2,6 filhotes a mais do que as mães controle, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($U = 18,5$; $p = 0,09$). Contudo, em relação ao sexo, foi significativamente maior o número de machos nascidos de mães que haviam passado pela separação materna na infância do que de mães sem esse tratamento ($U = 12,0$; $p = 0,02$). Diferentemente, o número de filhotes fêmeas foi igual em ambos os grupos ($U = 32,0$; $p = 0,72$).

Figura 11. Quantidade média de filhotes nascidos (A) e sobreviventes (B) na G2, ao total e por sexo, em função do tratamento (separação materna – SM, ou controle – CN). O asterisco representa que a diferença entre as barras indicadas foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A quantidade média, total e por sexo, de animais G2 sobreviventes até o dia do desmame (PN-21) está plotada na Figura 11B. Mães que passaram pela separação materna na infância tiveram, em média, maior número de filhotes sobreviventes, diferença essa estatisticamente significativa ($U = 10,0$; $p = 0,009$). Também foi estatisticamente significativo o maior número de machos sobreviventes que haviam nascido de mães expostas à separação materna na infância ($U = 4,5$; $p = 0,001$), mas não o de filhotes fêmeas ($U = 27,0$; $p = 0,42$).

A porcentagem de sobrevivência de filhotes machos e fêmeas em função dos dias entre nascimento e desmame é apresentada na Figura 12. É possível verificar que a maioria dos que morreram teve uma sobrevida de apenas um dia. As Figuras 12A e 12B mostram as diferenças entre filhotes machos e fêmeas: machos filhos de mães expostas à separação materna na infância apresentam maior sobrevida do que os filhotes das mães controle, enquanto a sobrevida dos filhotes fêmeas não diferiu em função do tratamento materno. A estatística log-rank revelou que a diferença entre machos, em função do tratamento, foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$), mas não entre fêmeas ($p = 0,280$).

Observações assistemáticas, feitas durante a condução do experimento, indicam que tais mortes, em geral, se deram por rejeição da mãe ao filhote desde o momento do parto, que deixou um (ou alguns) dos animais de sua prole fora do ninho. Não foram observadas situações nas quais o filhote foi comido pela mãe.

Figura 12. Curva de sobrevida para machos (A) e fêmeas (B) da G2, em função do tratamento (separação materna – SM, ou controle – CN). A significância estatística das diferenças em função do tratamento (*p-value*) está apresentada na parte de baixo de cada gráfico.

Na Figura 13 estão plotados os dados sobre as escolhas das mães (G1) no teste olfativo, em função do tratamento prévio recebido. Como pode ser observado, todas as mães do Grupo SM, sem exceção, escolheram o lado da caixa que continha maravalha retirada do ninho. Por sua vez, as mães do Grupo CN escolheram em igual número os lados contendo maravalha retirada do ninho ou maravalha limpa, sugerindo um padrão de escolha aleatório.

Figura 13. Porcentagem de escolha de ratas da G1 pela maravalha retirada no ninho no teste olfativo, em função dos grupos (SM e CN).

As porcentagens de filhotes (G2) que se deslocaram para os compartimentos das extremidades nos testes olfativo e motor estão apresentadas na Figura 14. À esquerda da figura

(14A), estão plotados os dados do teste olfativo, mostrando que a maioria dos filhotes de mães controle não fez qualquer escolha durante os 6 min de teste, em contraposição aos filhotes das mães tratadas com separação materna, que escolheram predominantemente o compartimento contendo maravalha do ninho. Em ambos os grupos, poucos filhotes escolheram o compartimento com maravalha limpa. O resultado do teste motor, mostrado à direita (Figura 14B), revela que, quando não havia maravalha nos compartimentos da extremidade da caixa, de forma semelhante em ambos os grupos, 75% dos animais (G2) permaneceram no compartimento central.

Figura 14. Porcentagem de filhotes da G2 (A) que se deslocaram para o compartimento contendo maravalha retirada no ninho (M Ninho), maravalha limpa (M Limpa), ou não escolheram um dos lados (Não Escolhe) no teste olfativo; os dados mostrados em (B) são relativos ao teste motor, sendo registrado o deslocamento para um dos lados da caixa (Escolhe) ou a permanência no compartimento central (Não escolhe). Todos esses resultados estão agrupados em função do tratamento prévio (SM ou CN) recebido pela mãe G1.

DISCUSSÃO

De acordo com os dados aqui obtidos, a separação materna de G1 não influenciou de forma significativa a quantidade total de filhotes nascidos. Contudo, essa experiência da mãe na infância parece ter aumentado a quantidade de machos, mas não de fêmeas, nascidos na G2, impactando a proporção sexual da prole. Há demonstrações de que, em mamíferos, a proporção sexual de animais nascidos pode ser alterada por variáveis como o tamanho da ninhada, a idade

da mãe, o número de proles paridas anteriormente pela mãe, a nutrição materna, a demografia populacional, o período do ano, o momento da ovulação, entre outros (Clutton-Brock & Iason, 1986). Curiosamente, ainda que seja por meio da célula germinativa do macho que o sexo seja definido (Rosenfeld & Roberts, 2004), diversas variáveis as quais a mãe está submetida influenciam o sexo dos filhotes.

Considerando que no presente estudo as principais variáveis apontadas (alimentação, idade, período do ano, entre outras) foram mantidas constantes entre os grupos, pode-se sugerir que a separação materna experimentada pela mãe na sua infância seja, provavelmente, responsável pela diferente proporção sexual da prole. Sobre isso, cabe questionar que aspectos dela podem ser responsáveis por um aumento no número de machos nascidos na geração seguinte (G2). Uma possibilidade seria sugerir que a separação cria uma condição de estresse nas ratas submetidas a esse tratamento, o qual seria um dos fatores que, na fase de fecundação, influenciam o efeito diferencial sobre a proporção de machos gerados. Porém, as pesquisas sobre os efeitos do estresse na proporção sexual de ratos (Lane & Hyde, 1973; Moriya & Hiroshige, 1978) têm resultados contrários aos observados aqui. Ou seja, tais estudos observaram maior nascimento de fêmeas do que de machos em contextos nos quais a mãe havia passado por situações de estresse antes da fecundação, e no presente estudo a separação materna resultou em uma maior proporção de nascimento de machos. Assim, mesmo que os presentes resultados apontem que a separação materna pode ser um fator de interferência na proporção sexual da prole, aumentando o número de filhotes machos, eles não coincidem com a interpretação de um suposto estresse induzido por essa condição. Não sendo conhecidas outras pesquisas sobre separação materna que investigaram tal questão, seria importante a condução de novos experimentos que replicassem o procedimento adotado aqui e investigassem os mecanismos subjacentes às diferenças sexuais encontradas.

Com relação à sobrevivência dos filhotes, é possível presumir que a exposição de ratas à separação materna na infância operou como um fator de proteção para suas proles, diminuindo as chances de mortalidade dos filhotes, sobretudo em machos. O dado indicativo de que as mortes ocorreram em sua quase totalidade no primeiro dia é coincidente com o relatado por Paul e Kupferschmidt (1975). Quanto à relação dessas mortes com o comportamento materno, foi citado anteriormente que observações assistemáticas feitas no presente estudo sugeriram que elas foram decorrentes, ao menos em parte, do abandono materno. Essas observações são compatíveis com análises encontradas na literatura relativas ao fato de que o abandono dos filhotes, desde o nascimento, tenha a função de reduzir a prole, de forma que os animais que

sobrevivem tenham maior acesso a recursos como comida e espaço (Ebensperger, 1988). Se essa hipótese estiver correta, é possível que a redução da prole seja um fenômeno comum em animais não tratados experimentalmente, podendo ser atenuado pela exposição da mãe à separação materna em sua infância.

Embora não sejam compreendidos os mecanismos ontogenéticos e filogenéticos que resultem em uma maior sobrevivência geral dos filhotes de mães submetidas à separação materna, é possível formular a hipótese de que, em termos de sobrevivência da espécie, o abandono dos filhotes será mais ou menos vantajoso a depender do tempo de contato entre mãe e filhote. Quando o padrão é que as mães estejam constantemente com os filhotes, como no Grupo CN aqui estudado, é provável que todos aqueles que recebem cuidado sobrevivam. Ou seja, ao maximizar o cuidado de alguns filhotes e abandonar outros, os que são cuidados provavelmente sobreviverão e se tornarão mais fortes pela maior disponibilidade de recursos. Abandonar mais machos do que fêmeas também traria benefícios à sobrevivência da espécie dado que é necessário um número pequeno de machos para fecundar várias fêmeas. Em contrapartida, quando o padrão é a mãe não estar disponível em tempo integral para os filhotes, como no Grupo SM aqui estudado, a prole fica mais suscetível ao ataque de predadores e a outros incidentes que resultem na morte dos filhotes. Sendo assim, quanto mais filhotes existirem, maior a chance de sobrevivência de alguns. Portanto, não seria interessante que a mãe faça a seleção inicial, abandonando alguns.

As diferenças entre os grupos no teste olfativo sugerem que mães submetidas à separação materna na infância são atraídas por sinais olfativos de seus filhotes com mais frequência do que outras mães, bem como que seus filhotes se dirigem com mais frequência para o ambiente que contém o odor materno. Em relação a esse comportamento dos filhotes, o teste motor aqui realizado aparentemente elimina a possibilidade de se explicar a discrepância entre os grupos em função de diferenças motoras, uma vez que o desempenho dos animais foi idêntico em ambos os grupos. Esse conjunto de dados permite sugerir a hipótese de que a separação materna, quando conduzida por 3hs diárias entre o 2º e o 14º dia pós-natal, favorece o desenvolvimento de algumas respostas de cuidado materno que aumentam a probabilidade da sobrevivência dos filhotes, bem como comportamentos dos filhotes (sua aproximação da mãe) que facilitam esses cuidados. Nesse sentido, pode-se afirmar que os dados obtidos nesta pesquisa estão em maior consonância com os de Bodensteiner et al. (2012) do que com os de Boccia e Pedersen (2001), Lovic et al. (2001) e Rees e Fleming (2001), ou seja, de que a

separação materna da rata mãe na sua infância promove aumento dos cuidados com seus filhotes.

Pode-se também sugerir que os dados obtidos no presente estudo ao longo do teste olfativo com filhotes sugerem que o teste de agrupamento, adotado por pesquisadores como Rees e Fleming (2001) e Bodensteiner et al. (2012), pode ter sua análise, ao menos parcialmente, equivocada. Esse teste, utilizado para avaliar o tempo que a mãe leva para reagrupar seus filhotes no ninho quando estes são espalhados pela caixa-viveiro, parte do pressuposto de que a mãe é a única responsável por deslocar os animais da prole até o ninho, ignorando o fato de que os próprios filhotes podem se movimentar, aproximando-se ou mesmo chegando ao ninho sem a interferência materna. Portanto, frente aos dados obtidos no teste olfativo realizado no presente estudo, é preciso repensar a aplicação e as análises derivadas dos resultados do teste de agrupamento.

Parece contra intuitivo supor que a separação materna possa aprimorar algumas habilidades de maternagem em ratas submetidas a ela, bem como possa aumentar as chances de sobrevivência de seus filhotes, inclusive em função dos comportamentos dos próprios filhotes. Em um primeiro momento, seria mais esperado supor o contrário, ou seja, que essa separação fosse uma fonte de estresse que, como tal, poderia ter efeitos prejudiciais ao animal na vida adulta (Nishi, Horii-Hayashi & Sasagawa, 2014). Contudo, é importante destacar que, sob o rótulo de separação materna, são enquadrados diversos procedimentos que têm como única semelhança a privação diária do contato do filhote com sua mãe por algumas horas (Lehmann & Feldon, 2000). Culturalmente, é frequentemente suposto que qualquer privação dessa natureza possa ter efeitos prejudiciais no desenvolvimento do sujeito. Cabe questionar, entretanto, quais dados embasam tal pressuposição, bem como que função tem, fora do ambiente laboratorial, a mãe permanecer integralmente com sua prole até o desmame.

No ambiente fora do laboratório, a rata mãe deve se ausentar para buscar alimento e isso naturalmente impõe períodos de separação dela com os filhotes. Portanto, é possível que, comparativamente ao que se dá na natureza, a manutenção da mãe junto à sua prole, sem interrupções (como ocorre nos biotérios de criação de ratos), seja em si uma alteração dos padrões comportamentais maternos da espécie. Se isso for verdade, a lógica de se estudar a separação materna em ratos como um modelo de negligência materna pode ser falha. Mais pesquisas são necessárias para compreender os motivos que levam à superioridade de algumas respostas de cuidados emitidas por mães submetidas à separação materna, bem como a forma como esses efeitos variam em função de características do procedimento adotado.

REFERÊNCIAS

- Aisa, B.; Tordera, R.; Lasheras, B.; Del Río, J. & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256-266.
- Bailoo, J. D.; Jordan, R. L.; Garza, X. J. & Tyler A.N. (2013). Brief and long periods of maternal separation affect maternal behavior and offspring behavioral development in C57BL/6 mice. *Developmental Psychobiology*, 56(4), 674-685.
- Boccia, M. L. & Pedersen, C. A. (2001). Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology*, 26(7), 657-672.
- Bodensteiner, K. J.; Ghiraldi, L. L. & Miner, S. S. (2012). Differential effects of short- and long-term early maternal separation on subsequent maternal behavior in rats. *The Journal of General Psychology*, 139(2), 78-99.
- Champagne, F. A.; Francis, D. D. & Meaney, M. J. (2000). Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(12), 1145-1148.
- Clutton-Brock, T. H. & Iason, G. R. (1986). Sex ratio variation in mammals. *The quarterly review of biology*, 61(3), 339-374.
- Dimatelis, J. J.; Vermeulen I. M.; Bugarith, K.; Stein, D. J. & Russell, V. A. (2015). Female rats are resistant to developing the depressive phenotype induced by maternal separation stress. *Metabolic Brain Disease*, 31(1), 109-119.
- Ebensperger, L.A. (1998) Strategies and counterstrategies to infanticide in mammals. *Biological Reviews*, 73, 321-346.
- Farris, E. J. (1942). Breeding of the rat. Em: *The rat in laboratory investigation* (eds J. Q.Griffith & E. J. Farris), Philadelphia: Lippincott.
- Francis D. D., Champagne F. C., Meaney M. J. (2000). Variations in maternal behavior are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 12, 1145-1148.

- Gehm, T. P. (2017). *Efeitos da separação materna sobre o desenvolvimento de respostas sociais em ratos*. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ji, H.; Su, W.; Zhou, R.; Feng, J.; Lin, Y.; Zhang, Y.; Wang, X.; Chen, X. & Li, J. (2016). Intranasal oxytocin administration improves depression-like behaviors in adult rats that experienced neonatal maternal deprivation. *Behavioural Pharmacology*, 27(8), 689-696.
- Lane, E. A. & Hyde, T. S. (1973). Effect of maternal stress on fertility and sex ratio: A pilot study with rats. *Journal of Abnormal Psychology*, 82(1), 78-80.
- Lehmann, J., & Feldon, J. (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: Consistent or confusing? *Reviews in Neuroscience*, 11, 383-408.
- Lehmann, J., Pryce, C. R., Bettschen, D., & Feldon, J. (1999). The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64(4), 705-715.
- Leussis, M. P.; Freund, N.; Brenhouse, H. C.; Thompson, B. S. & Andersen, S. L. (2012). Depressive-like behavior in adolescents after maternal separation: sex differences, controllability, and GABA. *Developmental Neuroscience*, 34(2-3), 210-217.
- Llidó, A.; Mòdol, L.; Darbra, S. & Pallarès, M. (2013). Interaction between neonatal allopregnanolone administration and early maternal separation: effects on adolescent and adult behaviors in male rat. *Hormones and Behavior*, 63(4), 577-585.
- Lovic, V., Gonzalez, A. & Fleming, A.S. (2001). Maternally Separated Rats Show Deficits in Maternal Care in Adulthood. *Developmental Psychobiology*, 39(1), 19-33.
- Lukas, M.; Bredewold, R.; Neumann, I. D. & Veenema, A. H. (2010). Maternal separation interferes with developmental changes in brain vasopressin and oxytocin receptor binding in male rats. *Neuropharmacology*, 58(1), 78-87.
- Marais, L.; van Rensburg, S. J.; van Zyl, J. M.; Stein, D. J. & Daniels, W. M. (2008). 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. *Neuroscience Research*, 61(1), 106-112.
- McCarty, M. M. (1990). Oxytocin inhibits infanticide in female house mice (*Mus domesticus*). *Hormones and Behavior*, 24(3), 365-375.

- Moriya, K. & Hiroshige, T. (1978). Sex ratio of offsprings of rats bred at 5°C. *International Journal of Biometeorology*, 22 (4), 312–315.
- Nishi, M.; Horii-Hayashi, N. & Sasagawa, T. (2014). Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Frontiers in Neuroscience*, 8(166), 1-6.
- Paccola, C. C.; Resende, C. G.; Stumpp, T.; Miraglia, S. M. & Cipriano, I. (2013). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal Reproduction*, 10, 677–683.
- Paul, L., & Kupferschmidt, J. (1975). Killing of conspecific and mouse young by male rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88(2), 755-763.
- Rees, S. L.; Akbari, E.; Steiner, M. & Fleming, A. S. (2008). Effects of early deprivation and maternal separation on pup-directed behavior and HPA axis measures in the juvenile female rat. *Developmental Psychobiology*, 50(4), 315-21.
- Rees, S. L. & Fleming, A.S. (2001). How early maternal separation and juvenile experience with pups affect maternal behavior and emotionality in adult postpartum rats. *Animal Learning & Behavior*, 29(3), 221-233.
- Rodríguez, D. A. L. & Dueñas, Z. (2013). Maternal separation during breastfeeding induces gender-dependent changes in anxiety and the GABA-A receptor alpha-subunit in adult Wistar rats. *PLoS ONE*, 8(6), n/a-n/a.
- Roque, S.; Mesquita, A. R.; Palha, J. A.; Sousa, N. & Correia-Neves, M. (2014). The behavioral and immunological impact of maternal separation: A matter of timing. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(192), n/a-n/a.
- Rosenfeld, C. H. & Roberts, R. M. (2004). Maternal Diet and Other Factors Affecting Offspring Sex Ratio: A Review. *Biology of Reproduction*, 71, 1063–1070.
- Sampath, D.; Sabitha, K. R.; Hegde, P.; Jayakrishnan, H. R.; Kutty, B. M.; Chattarji S.; Rangarajan, G. & Laxmi, T. R. (2014). A study on fear memory retrieval and REM sleep in maternal separation and isolation stressed rats. *Behavioural Brain Research*, 273, 144-154.
- Sousa, V. C.; Vital, J.; Costenla, A. R.; Batalha, V. L.; Sebastião, A. M.; Ribeiro, J. A.; Lopes, L. V. (2014). Maternal separation impairs long term-potentiation in CA1-CA3 synapses

and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiology of Aging*, 35(7), 1680-1685.

Sun, X. M.; Tu, W. Q.; Shi, Y. W.; Xue, L. & Zhao, H. (2014). Female-dependent impaired fear memory of adult rats induced by maternal separation, and screening of possible related genes in the hippocampal CA1. *Behavioural Brain Research*, 267, 111-118.

Zelena, D.; Stocker, B.; Barna, I.; Tóth, Z. E. & Makara, G. B. (2014). Vasopressin Deficiency Diminishes Acute and Long-Term Consequences of Maternal Deprivation in Male Rat Pups. *Psychoneuroendocrinology* 51, 378-391.

DISCUSSÃO GERAL

A separação materna, conforme aqui realizada, produziu mudanças no desenvolvimento de respostas sociais em todas as esferas estudadas: nas relações de brincadeira social, nas relações sexuais com animais do sexo oposto e nas relações das fêmeas com suas proles. A relevância desses dados e as reflexões suscitadas por eles serão apresentadas em três frentes de discussão: (1) reflexões sobre como compreender, do ponto de vista analítico-comportamental, o impacto dos primeiros vínculos sobre o desenvolvimento comportamental; (2) considerações sobre os efeitos da separação materna no desenvolvimento de respostas sociais e possíveis interpretações dos resultados aqui obtidos; e (3) críticas suscitadas pelos dados aqui obtidos em relação à noção de que a presença constante da mãe é necessária para o desenvolvimento saudável dos filhotes.

1. O impacto dos primeiros vínculos sobre o desenvolvimento comportamental na perspectiva da Análise do Comportamento.

Conforme descrito anteriormente, Para Bijou e Baer (1961), o desenvolvimento é compreendido como mudanças progressivas nas interações entre as respostas de um organismo e seu ambiente. O termo *progressivo*, neste caso, é utilizado para indicar que aquilo que ocorreu ao longo da vida do indivíduo influencia seu comportamento atual. O comportamento, portanto, ocorre não só como função do ambiente presente, mas também da história de interações. Sabe-se que a biologia de um organismo é alterada pelas interações dele com o mundo (Maguire et al., 2000; Fish et al., 2004; Weaver et al., 2004; Oberlander et al., 2008), de forma que os impactos de sua história sejam possíveis por meio desse organismo modificado (Skinner, 1974).

Mas, se todas as interações modificam o organismo, por que estudar a relação materna e não qualquer outro aspecto que afete o desenvolvimento? Sendo o comportamento um fenômeno cumulativo, o que acontece nas primeiras relações se constitui como a base para o que virá em seguida. Diferentes pesquisas descrevem, sob o rótulo “efeito de ordem”, uma das decorrências desse carácter cumulativo: aquilo que é aprendido primeiro pode facilitar algumas aprendizagens posteriores e dificultar outras (Maier & Seligman, 1976; Braun-LaTour & LaTour, 2005; Imam & Warner, 2013). Por ser o contexto no qual algumas de suas primeiras aprendizagens ocorrem, a relação com a mãe se configura como um campo de estudo privilegiado para a compreensão do comportamento.

Além disso, ao alterar a probabilidade das aprendizagens seguintes, as primeiras relações podem ser o começo de uma série de mudanças em cascata. Como analisado anteriormente, na relação com a mãe, geralmente é estabelecida a função reforçadora de estímulos associados a ela, bem como são aprendidas relações entre algumas respostas e a produção desses estímulos como consequência. É altamente provável que, em relações sociais posteriores, os animais sejam mais atraídos por estímulos semelhantes aos que se tornaram reforçadores a partir da relação materna, bem como emitam respostas análogas às aquelas aprendidas no contato com ela. Dependendo de que estímulos e respostas forem essas, outros aspectos do desenvolvimento se tornam mais prováveis – por exemplo, respostas relacionadas à maior ou menor dominância social, que, por sua vez, impactam a probabilidade de outros comportamentos. Ou seja, as primeiras aprendizagens podem direcionar o desenvolvimento, tornando mais provável a ocorrência de alguns padrões do que de outros ao longo da ontogênese. Para um exemplo aplicado de como a relação com os pais pode induzir o desenvolvimento em cascata de algumas características nos filhos, sugere-se a leitura de Granic e Patterson (2006).

Outro argumento favorável ao estudo da relação materna é que ela ocorre em um período de grandes transformações do filhote, biológicas e comportamentais. Assim, variações no cuidado com o filhote podem impactar um número elevado de processos de mudança. Alguns desses impactos podem produzir alterações no organismo mais difíceis de serem revertidas pelas contingências normalmente dispostas ao longo da ontogênese – fenômeno esse rotulado pelas ciências que estudam o desenvolvimento como *canalização* (Gottlieb, 1991).

Mais especificamente, a canalização é um termo utilizado para descrever que, conforme as interações da vida ocorrem, a plasticidade orgânica e as potencialidades comportamentais se tornam mais limitadas (Kuo, 1976). No nível mais básico, pode-se analisar o caso das células de um animal, que, no princípio, são totipotentes – i.e., podem se diferenciar em células de qualquer parte do corpo (coração, rins, cérebro, etc). Uma vez diferenciadas, não se conhecem meios que permitam, por exemplo, que um neurônio gere uma célula do coração. Na esfera comportamental, a canalização é bastante citada no estudo do *imprinting* (Gottlieb, 1991, 1997): uma vez que o primeiro objeto se movimenta diante do campo visual de uma ave, ela passará a seguir objetos com características semelhantes ao longo da ontogênese; porém, a partir de então, o mesmo efeito não ocorrerá com novos objetos que se movimentarem diante do seu campo visual.

Tanto no caso celular quanto no comportamental, são desconhecidas contingências que, se manipuladas, possam fazer com que as potencialidades iniciais (totipotência e efeito dos estímulos visuais) sejam recuperadas. Assim, em determinados casos, a seleção de certas características na ontogênese produz uma restrição relativamente permanente da variabilidade potencial do organismo. Como tal restrição depende das experiências vividas, sobretudo daquelas que ocorrem nos momentos iniciais da ontogênese (Gottlieb, 1991), a relação materna novamente se configura como um campo privilegiado de estudo ao fazer parte do ambiente inicial dos recém-nascidos.

Portanto, parece que, mais do que alguns outros aspectos da ontogênese, a relação materna pode exercer uma forte influência sobre o desenvolvimento comportamental dos filhotes. Porém, há inúmeras variáveis que integram essa relação, sendo importante investigar que aspectos dela produzem quais resultados. O modelo de separação materna se mostrou interessante para investigar um desses aspectos: a presença/ausência da mãe.

2. Efeitos da separação materna

No presente estudo, a separação materna, conduzida por 3hs diárias entre os dias de vida 2 e 14, se mostrou suficiente para produzir mudanças importantes no desenvolvimento dos filhotes. No brincar social, de modo geral, constatou-se que animais submetidos a esse procedimento, bem como seus parceiros, brincaram mais que animais controle. O desenvolvimento sexual, por sua vez, também foi influenciado pela separação materna: em machos, o procedimento gerou maiores índices de montagem, em detrimento de outras respostas sexuais, como a penetração; em fêmeas, atrasou o início da puberdade e induziu, em idade precoce, mais respostas de cópula em seus parceiros sexuais. Por fim, quando essas fêmeas submetidas à separação materna na infância se tornaram mães, na idade adulta, houve alteração na proporção sexual de suas proles e menores índices de mortalidade nos filhotes. Além disso, elas e seus filhotes foram mais atraídos pelo cheiro do ninho em um teste olfativo, quando comparado às mães e às proles do grupo controle.

O que esses dados, em conjunto, sugerem sobre a importância da separação materna no desenvolvimento comportamental da prole? Em primeiro lugar, eles revelam a impossibilidade de se concluir por uma melhora ou piora global no desenvolvimento social como função dessa experiência na infância: diferentes comportamentos foram afetados, alguns aparentemente trazendo ganhos, outros, prejuízos aos filhotes. Por exemplo, enquanto os resultados observados

no comportamento sexual de machos poderiam indicar prejuízo na cópula, a maior atração por sinais olfativos do ninho sugere ganhos no cuidado com a prole. Sendo assim, análises mais detalhadas são necessárias para compreender os efeitos da separação materna.

De forma geral, observou-se que animais submetidos à separação materna emitiram mais respostas dirigidas a estímulos sociais, tal como evidenciado pelas frequências elevadas de brincar social e pelo aumento da atração pelo cheiro do ninho. Alguns dados da literatura sugerem que um responder mais frequente pode ser diretamente proporcional ao valor reforçador da consequência (Villiers & Herrnstein, 1976; Bonem & Grossman, 1988). Assim sendo, é possível que um dos efeitos da separação materna seja o aumento, relativamente permanente, do valor reforçador de estímulos sociais. É possível também que, para animais submetidos a esse procedimento, seja necessário um número maior de reforçadores sociais em determinado intervalo de tempo para que ocorra saciação, de forma que as frequências das respostas permaneçam altas por mais tempo. Porém, ainda há poucos dados que permitam concluir sobre a pertinência dessas hipóteses, sendo necessário que outros estudos investiguem diretamente a questão do valor reforçador e da saciação a estímulos sociais em função da separação materna.

Outra possibilidade é que a ausência da mãe, conforme aqui manipulada, atue como um evento sobre o qual os filhotes não têm controle. Santos, Gehm e Hunziker (2011) conjecturam, a partir de evidências experimentais, que a incontrolabilidade (ausência de contingência operante) pode produzir dois tipos de efeito no organismo: aumentar tanto a sua sensibilidade a estímulos antecedentes (com função discriminativa), como a sua sensibilidade à contiguidade entre a resposta e a sua consequência. Souza (2017) testou a segunda parte dessa hipótese, e seus resultados aparentemente confirmaram que a exposição à incontrolabilidade de eventos aversivos torna os sujeitos mais sensíveis ao fator contiguidade embutido nas contingências operantes: um atraso variável de 0,6 s, em média, em contingência de fuga, foi suficiente para prejudicar a aprendizagem em sujeitos previamente expostos a eventos aversivos incontroláveis, mas não em sujeitos não expostos a esse tratamento prévio. Se um dos aspectos críticos da separação materna for seu caráter incontrolável, e se a hipótese de Santos et al. (2011) estiver correta, é possível que alguns dos efeitos observados aqui, e no restante da literatura sobre separação materna, possam ser decorrentes das alterações nas sensibilidades dos filhotes à contiguidade entre resposta e consequência e aos estímulos antecedentes, com função discriminativa. Isso iria na mesma direção da hipótese aventada no Artigo 2, na qual é pressuposto que a maior frequência de montagens, em detrimento de respostas de penetração,

possa ser decorrente, entre outras coisas, de diferenças na contiguidade entre início de emissão da resposta e acesso à consequência. Também possibilitaria explicar a maior sensibilidade das mães, submetidas à separação materna em suas infâncias, ao estímulo antecedente que é o cheiro do ninho da prole.

Essas hipóteses, contudo, não explicam todos os dados obtidos, tendo em vista que se focam apenas sobre as mudanças observadas nas relações operantes. Os dados de atraso na puberdade de fêmeas e de proporção sexual da prole de mães submetidas à separação materna na infância indicam que os impactos desse procedimento recaem também sobre a biologia do organismo. Sendo assim, seria importante a condução de estudos multidisciplinares, que investigassem o fenômeno a partir de diferentes recortes de análise, construindo um cenário que contemplasse seus múltiplos efeitos.

3. A importância da presença da mãe para o desenvolvimento saudável do filhote.

Indubitavelmente, a presença da mãe e/ou de outros cuidadores no início da vida é importante para a sobrevivência dos mamíferos e, como visto, controla aspectos de seu desenvolvimento biológico e comportamental. Porém, criou-se na sociedade contemporânea a noção de que tal presença precisa ser quase ininterrupta, de forma que qualquer ausência seja considerada potencialmente maléfica para o desenvolvimento do filhote (Badinter, 1980, Hrdy, 1999). Os dados obtidos nesta pesquisa contradizem essa noção, tendo em vista que, como citado anteriormente, alguns dos efeitos da separação materna poderiam, inclusive, ser considerados benéficos para o animal.

A concepção de que a mãe precisa estar constantemente presente é acompanhada da suposição de que ela seja dotada de um “instinto materno”, entendido como uma preparação biológica para cuidar da prole e abdicar de outras esferas de sua vida em nome desse cuidado. Badinter (1980), contudo, desvela a construção social dessa acepção de maternidade, cuja criação foi impulsionada, entre outras coisas, por interesses econômicos de países europeus a partir do Século XVII em reduzir as taxas de mortalidade infantil. Frente a tais interesses, passou-se a incentivar que as mulheres amamentassem e cuidassem de seus filhos ao invés de manda-los a amas de leite, que viviam em condições precárias de higiene. Aos poucos, integrou-se ao discurso social ideias que naturalizaram a abnegação e o amor incondicional da mãe pelo filho, apontando-se tais características como inerentes às fêmeas mamíferas (Badinter, 1980).

O comportamento de mães não humanas no contato com a prole foi utilizado como evidência do instinto materno e como argumento favorável à existência de um amor incondicional dirigido à prole (Badinter, 1980). Contudo, é possível pressupor que esse argumento foi disseminado por pessoas que não conheciam a fundo o comportamento de fêmeas com os seus filhotes. Em ratos, por exemplo, não é raro observar que as mães machucam os recém-nascidos, mordendo-os e pisando sobre seus corpos. Além disso, como apontado, as ratas lactantes com frequência abandonam seus filhotes e os deixam agonizando fora do ninho até que morram de fome e/ou frio. O infanticídio, inclusive, ocorre em várias espécies de mamíferos (Hrdy, 1999).

Na natureza, também é impraticável que as mães fiquem em contato incessante com seus filhotes, uma vez que precisam, pelo menos, sair para buscar alimento. A partir da observação do comportamento de diferentes espécies, Hrdy (1999) destaca que os períodos de ausência materna são comuns nos animais, embora a concepção socialmente instituída de maternidade induza um raciocínio contrário. A sobrevivência da prole é, assim, fortemente influenciada pela presença de *alomães* – i.e., outros indivíduos, machos e fêmeas, que emitem comportamentos de cuidado da prole (Hrdy, 1999). O que é frequente na natureza, portanto, é que o cuidado da prole não seja responsabilidade exclusiva da genitora, mas sim dela e, em maior ou menor grau, do grupo social a qual ela faz parte.

Considerando a impossibilidade da permanência da mãe junto à prole em tempo integral na natureza, cabe questionar se a separação materna, conforme vem sendo pesquisada, é um bom modelo de negligência/maus-tratos no cuidado com os filhotes (Morgan, Horn & Bergman, 2001; Barreau et al., 2007; Vetulani, 2013). Tal questionamento se justifica, sobretudo, tendo em vista que sob o rótulo de separação materna se enquadra uma ampla variedade de procedimentos, com diferentes durações de separação. É difícil sustentar que episódios de 2h ou 24h de separação configurem contextos de negligência equivalentes entre si. Ademais, sua determinação como modelo de maus-tratos parece ser menos pautada em seus efeitos para o desenvolvimento e mais sobre um ideal de maternidade socialmente construído. Para a construção de um conhecimento científico mais sólido e menos influenciado por ideologias, seria importante que os efeitos de variações na relação materna fossem estudados sem classificar tais variações como “boas” ou “ruins” (Morgan et al., 2001; Barreau et al., 2007; Vetulani, 2013). Nessa mesma linha, seria interessante desatrelar a separação materna a um modelo animal de negligência.

4. Considerações finais.

Os resultados aqui obtidos corroboram a perspectiva de que os primeiros vínculos podem impactar o desenvolvimento comportamental do indivíduo (Spitz, 1965/2004; Winnicott, 1965/1983; Bowlby, 1969; Teicher & Samson, 2013; Li & Godinet, 2014; Edalati & Krank, 2015). Porém, embora a atual concepção de maternidade permitisse supor que a separação materna geraria prejuízos nas relações sociais dos animais a ela submetidos, os resultados decorrentes do modelo de separação aqui empregado não permitem tal constatação. Em conjunto, os dados indicam que os efeitos da separação materna são mais complexos do que meramente “melhorar ou piorar” o desempenho dos animais em contextos sociais.

Considerando que a separação materna mostrou ter extenso impacto sobre o desenvolvimento dos filhotes, faz-se necessário que a Análise do Comportamento se debruce mais a investigar os efeitos das primeiras relações sobre o comportamento dos animais. Com seu rigor metodológico e sua tradição em pesquisa experimental, ela poderia contribuir para a melhor compreensão do fenômeno, sobretudo se vinculada a pesquisas multidisciplinares que permitissem um olhar mais amplo para os efeitos diversos da separação materna sobre o desenvolvimento.

REFERÊNCIAS GERAIS

- Ainsworth, M. D. S. & Bell, S. M. (1969). Some contemporary patterns in the feeding situation. In A. Ambrose (Ed). *Stimulation in early infancy*. London: Academic Press, 133-170.
- Ainsworth, M.; Blehar, M.; Waters, E. & Wall, S. (1978). Patterns of attachment. Hillsdale, N.J.: Erlbaum.
- Bijou, S.W. & Baer, D.M. (1961). *Child Development: A systematic and Empyrical theory*. USA: Appleton-Century-Crofts, volume I.
- Alberts, J. R. (2005). Infancy. Em: I. Q. Whishaw & B. Kolb. *The behavior of the laboratory rat: A handbook with tests*. Oxford University Press, 266-277.
- Arias, C. & Chotro, M. G. (2007). Amniotic Fluid can Act as an Appetitive Unconditioned Stimulus in Preweanling Rats. *Developmental Psychobiology*, 49(2), 139-149.
- Badinter, E. (1980). *Um Amor Conquistado: o Mito do Amor Materno*. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira.
- Bailoo, J. D.; Jordan, R. L.; Garza, X. J. & Tyler A.N. (2013). Brief and long periods of maternal separation affect maternal behavior and offspring behavioral development in C57BL/6 mice. *Developmental Psychobiology*, 56(4), 674-685.
- Barreau, F.; Cartier, C.; Leveque, M.; Ferrier, L.; Moriez, R.; Laroute, V.; Rosztoczy, A.; Fioramonti, J. & Bueno, L. (2007). Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *The Journal of Physiology*, 580, 347–356.
- Bijou, S.W. & Baer, D.M. (1961). *Child Development: A systematic and Empyrical theory*. USA: Appleton-Century-Crofts, volume I.
- Bijou, S.W. & Baer, D.M. (1965). *Child Development: universal stage of infancy*. USA: Meredith Publishing Company, volume II.
- Bodensteiner, K. J.; Christianson, N.; Siltumens, A. & Krzykowski, J. (2014). Effects of early maternal separation on subsequent reproductive and behavioral outcomes in male rats. *Journal of General Psychology*, 141(3), 228-246.
- Bonem, M. & Crossman, E. K. (1988). Elucidating the effects of reinforcement magnitude. *Psychological Bulletin*, 104(3), 348-362.

- Bowlby, J. (1969). *Attachment and loss*. Vol. 1. Attachment. New York: Basic Books.
- Braun, K.; Lange, E.; Metzger, M. & Poeggel, G. (1999). Maternal separation followed by early social deprivation affects the development of monoaminergic fiber systems in the medial prefrontal cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience*, 95(1), 309-318.
- Braun-LaTour, K. A. & LaTour, M. S. (2005). Transforming consumer experience: When Timing Matters. *Journal of Advertising*, 34(3), 19-30.
- Brown, R. W. (2005). Adolescence. Em: I. Q. Whishaw & B. Kolb. *The behavior of the laboratory rat: A handbook with tests*. Oxford University Press, 278-286.
- Callaghan, B.L. & Richardson, R. (2013). Early experiences and the development of emotional learning systems in rats. *Biology of Mood and Anxiety Disorders*, 3(8), n/a-n/a.
- Camp, L.L.; Rudy, J. W. (1988). Changes in the categorization of appetitive and aversive events during postnatal development of the rat. *Developmental Psychobiology*, 21, 25-42.
- Cao, X.; Huang, S.; Cao, J.; Chen, T.; Zhu, P.; Zhu, R.; Su, P. & Ruan, D. (2014) The timing of maternal separation affects Morris water maze performance and long-term potentiation in male rats. *Developmental Psychobiology*, 56(5), 1102-1109.
- Collier, A. & Bolles, R. C. (1980). The ontogenesis of defensive reactions to shock in preweanling rats. *Developmental Psychobiology*, 13, 141-150.
- Coureaud, G.; Schaal, B.; Hudson, P.; Orgeur, P. & Coudert, P. (2002). Transnatal olfactory continuity in the rabbit: Behavioral evidence and short-term consequence of its disruption. *Developmental Psychobiology*, 40, 372-390.
- Courtenay, S. C. (1989). *Learning and memory of chemosensory stimuli by underyearling coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum)*. Thesis. University of British Columbia.
- Cramer, C. P., Thiels, E. and Alberts, J. R. (1990), Weaning in rats: I. Maternal behavior. *Developmental Psychobiology*, 23, 479-493.
- DeCasper, A. J. & Spence, M. J. (1986). Prenatal maternal speech influences newborns' perception of speech sound. *Infant Behavior and Development*, 9, 133-150.

- Dimatelis, J. J.; Vermeulen I. M.; Bugarith, K.; Stein, D. J. & Russell, V. A. (2015). Female rats are resistant to developing the depressive phenotype induced by maternal separation stress. *Metabolic Brain Disease*, n/a-n/a.
- Durbin, P. W.; Williams, M. H.; Jeung, N. & Arnold, J. S. (1966). Development of spontaneous mammary tumors over the life-span of the female Charles River (Sprague-Dawley) rat: The influence of ovariectomy, thyroidectomy, and adrenalectomy-ovariectomy. *Cancer Research*, 26, 400–411.
- Edalati, H. & Krank, M. D. (2016). Childhood Maltreatment and Development of Substance Use Disorders. *Trauma, Violence, & Abuse*, 17(5), 454 – 467.
- Emerich, D. F.; Scalzo, F. M.; Enters, E. K.; Spear, N. E. & Spear, L. P. (1985). Effects of 6-hydroxydopamine-induced catecholamine depletion on shock-precipitated wall climbing of infant rat pups. *Developmental Psychobiology*, 18, 215–227.
- Fish, E. W., Shahrokh, D., Bagot, R., Caldji, C., Bredy, T., Szyf, M. & Meaney, M. J. (2004). Epigenetic Programming of Stress Responses through Variations in Maternal Care. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1036, 167–180.
- Fraley, R. C. (2002). Attachment Stability From Infancy to Adulthood: Meta-Analysis and Dynamic Modeling of Developmental Mechanisms. *Personality and Social Psychology Review*, 6(2), 123–151.
- Gehm, T. P. (2011). As primeiras aprendizagens com estímulos aversivos: considerações iniciais. *Acta Comportamentalia*, 19, 33-45.
- Gehm, T. P. (2013). *Reflexões sobre o estudo do desenvolvimento na perspectiva da Análise do Comportamento*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Gewirtz, J. L., & Pelaez-Nogueras, M. (1991). The attachment metaphor and the conditioning of infant separation protests. In J. L. Gewirtz & W. M. Kurtines (Eds.), *Intersections with attachment*. Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Gottlieb, G. (1991). Experiential canalization of behavioral development: Theory. *Developmental Psychology*, 27(1), 4-13.
- Gottlieb, G. (1997). *Synthesizing Nature-Nurture – Prenatal Roots of Instinctive Behavior*. New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.

- Granic, I. & Patterson, G. R. (2006). Toward a comprehensive model of antisocial development: A dynamic systems approach. *Psychological Review*, 113(1), 101-131.
- Gruest, N, Richer, P., & Hars, B. (2004). Emergence of long-term memory for conditioned aversion in the rat fetus. *Developmental Psychobiology*, 44, 189-198.
- Gunnar, M. R. & Donzella, B. (2002). Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology*, 27, 199-222.
- Harlow, H. (1958) The Nature of Love. *American Psychologist*, 13, 673-685.
- Heaton, M. B. (1978). Development of operant escape learning in the Peking duck embryo. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(3), 397-405.
- Hensleigh, E. & Pritchard, L. M. (2014). The effect of early environmental manipulation on locomotor sensitivity and methamphetamine conditioned place preference reward. *Behavioral Brain Research*, 268, 66-71.
- Hepper, P. G. (1996). Fetal memory: Does it exist? What does it do? *Acta Paediatrica Supplement*, 416, 16-20.
- Hepper, P. G. & Waldman, B. (1992). Embryonic olfactory learning in frogs. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology. B*, 44(3-4), 179-197.
- Hrđy, S. B. (1999). *Mãe Natureza – uma visão feminina da evolução: maternidade e seleção natural*. Rio de Janeiro: Editora Campos.
- Imam, A. A. & Warner, T. A. (2014). Test order effects in simultaneous protocols. *Learning & Behavior*, 42(1). 93-103.
- Impekoven, M. (1973). Response-contingent prenatal experience of maternal calls in the Peking duck, *Animal Behaviour*, 21(1), 164-168.
- Jablonka, E.; & Lamb, M. J. (2005). *Evolution in four dimensions*. Genetic, epigenetic, behavioral and symbolic variation in the history of life. Cambridge, MA: The MIT Press.
- James, D. K. (2010). Fetal learning: A critical review. *Infant and Child Development*, 19, 45-54.

- Kawai, N., Morokuma, S., Tomonaga, M., Horimoto, N., & Tanaka, M. (2004). Associative learning and memory in a chimpanzee fetus: Learning and long-lasting memory before birth. *Developmental Psychobiology*, *44*, 116-122.
- Kisilevsky, B. S., Hains, S. M. J., Brown, C. A., Lee, C. T., Cowperthwaite, B., Stutzman, S. S., ... Wang, Z. (2009). Fetal sensibility to properties of maternal speech and language. *Infant Behavior and Development*, *32*, 59-71.
- Korenbrodt, C. C.; Huhtaniemi, I. T. & Weiner, R. I. (1977). Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biology of Reproduction*, *17*, 298-303.
- Korraa, A. A.; Nagger, A. A. I. E.; Mohamed, R. A. E. & Helmy, M. N. (2014). Impact of kangaroo mother care on cerebral blood flow of preterm infants. *Italian Journal of Pediatrics*, *40*(83), 1-6.
- Kuo, Z.-Y. (1976). *The dynamics of behavior development*. New York: Plenum Press.
- Landis, J. R. & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, *33*, 159-174.
- Lau, C.; Kunefelter, G. & Cameron, A. M. (1996). Reproductive Development and Functions in the Rat after Repeated Maternal Deprivation Stress. *Fundamental and Applied Toxicology*, *30*, 298-301.
- Lehmann, J., & Feldon, J. (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: Consistent or confusing? *Reviews in Neuroscience*, *11*, 383-408.
- Lehmann, J., Pryce, C. R., Bettschen, D., & Feldon, J. (1999). The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *64*(4), 705-715.
- Leussis, M. P.; Freund, N.; Brenhouse, H. C.; Thompson, B. S. & Andersen, S. L. (2012). Depressive-like behavior in adolescents after maternal separation: sex differences, controllability, and GABA. *Developmental Neuroscience*, *34*(2-3), 210-217.
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, *73*, 255-260.

- Li, F. & Godinet, M. T. (2014). The impact of repeated maltreatment on behavioral trajectories from early childhood to early adolescence. *Children and Youth Services Review*, 36, 22-29.
- Llidó, A.; Mòdol, L.; Darbra, S. & Pallarès, M. (2013). Interaction between neonatal allopregnanolone administration and early maternal separation: effects on adolescent and adult behaviors in male rat. *Hormones and Behavior*, 63(4), 577-585.
- Linehan, M. M. (2010). *Terapia cognitivo-comportamental para o transtorno da personalidade borderline*. Porto Alegre: Artmed.
- Lundberg, S.; Martinsson, M.; Nylander, I & Roman, E. (2017). Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. *Hormones and Behavior*, 87, 137-144.
- Maguire, E. A.; Gadian, D. G.; Johnsrude, I. S.; Good, C. D.; Ashburner, J.; Frackowiak, R. S. J.; Frith, C. D. (2000). Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4398-4403.
- Maier, S. F. & Seligman, M. E. P. (1976). Learned helplessness: theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology: General*, 105, 3-46.
- Martin, L. T., & Alberts, J. R. (1979). Taste aversions to mother's milk: The age-related role of nursing in acquisition and expression of a learned association. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93, 430-445.
- Meaney, M. J. & Stewart, J. (1981). A descriptive study of social development in the rat (*rattus norvegicus*). *Animal Behaviour*, 29, 34-45.
- Mehler, J.; Bertoncini, J. & Barriere, M. (1978). Infant recognition of mother's voice. *Perception*, 7(5), 491-497.
- Mehler, J.; Jusczyk, P.; Lambertz, G.; Halsted, N.; Bertoncini, J. & Amiel-Tison, C. (1988). A precursor of language acquisition in young infants. *Cognition*, 29, 143-178.
- Moon, C., Cooper, R., & Fifer, W. (1993). Two-day-olds prefer their native language. *Infant Behavior and Development*, 16, 495-500.

- Morgan, B. E.; Horn, A. R & Bergman, N. J. (2011). Should neonates sleep alone? *Biological Psychiatry*, 70(9), 817-825.
- Moriceau, S.; Wilson, D. A.; Levine, S. & Sullivan, R. M. (2006). Dual circuitry for odor-shock conditioning during infancy: Corticosterone switches between fear and attraction via amygdala. *Journal of Neuroscience*, 26, 6737–6748.
- Moriceau, S., Roth, T. L., & Sullivan, R. M. (2010). Rodent Model of Infant Attachment Learning and Stress. *Developmental Psychobiology*, 52(7), 651–660.
- Moriceau, S. & Sullivan, R. M. (2005). Neurobiology of infant attachment. *Developmental Psychobiology*, 47, 230-242.
- Muhammad, A. & Kolb, B. (2011). Mild prenatal stress-modulated behavior and neuronal spine density without affecting amphetamine sensitization. *Developmental Neuroscience*, 33(2), 85-98.
- Oberlander, T. F.; Weinberg, J.; Papsdorf, M.; Grunau, R.; Misri, S. & Devlin, A. M. (2008) Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Journal Epigenetics*, 3, 97-106.
- Ovtscharoff, W. & Braun, K. (2001). Maternal separation and social isolation modulate the postnatal development of synaptic composition in the infralimbic cortex of Octodon degus. *Neuroscience*, 104(1), 33-40.
- Panksepp, J.; Siviy, S. & Normansell, L. (1984) The psychobiology of play: Theoretical and methodological perspectives. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 8, 465-492.
- Park, H; Kim, S.; Kang, W.; Chung, J. & Kim, J. (2014) Increased activation of synapsin 1 and mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase in the amygdala of maternal separation rats CNS. *Neuroscience & Therapeutics*, 20(2), 172-181.
- Pass, D. & Freeth, G. (1993) The Rat. *Anzccart news*, 6, 1–4.
- Pedersen, P. E., & Blass, E. M. (1982). Prenatal and postnatal determinants of the 1st suckling episode in albino rats. *Developmental Psychobiology*, 15, 349-355.

- Pellis, S. M. & Pellis, V. C. (2005). Play and Fighting. Em: I. Q. Whishaw & B. Kolb. *The behavior of the laboratory rat: A handbook with tests*. Oxford University Press, 298-306.
- Rees, S. L.; Lovic, V. & Fleming, A. S. (2005). Maternal Behavior. Em: I. Q. Whishaw & B. Kolb. *The behavior of the laboratory rat: A handbook with tests*. Oxford University Press, 287-297.
- Rodríguez, D. A. L. & Dueñas, Z. (2013). Maternal separation during breastfeeding induces gender-dependent changes in anxiety and the GABA-A receptor alpha-subunit in adult Wister rats. *PLoS ONE*, 8(6), n/a-n/a.
- Roque, S.; Mesquita, A. R.; Palha, J. A.; Sousa, N. & Correia-Neves, M. (2014). The behavioral and immunological impact of maternal separation: A matter of timing. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, n/a-n/a.
- Roth, T. L. & Sullivan, R. M. (2001). Endogenous opioids and their role in odor preference acquisition and consolidation following odor-shock conditioning in infant rats. *Developmental Psychobiology*, 39, 188-198.
- Roth, T. L. & Sullivan, R. M. (2005). Memory of early maltreatment: Neonatal behavioral and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. *Biological Psychiatry*, 57, 823-831.
- Sai, F. (2005). The role of the mother's voice in developing mother's face preference: Evidence for intermodal perception at birth. *Infant and Child Development*, 14, 29-50.
- Sampath, D.; Sabitha, K. R.; Hegde, P.; Jayakrishnan, H. R.; Kutty, B. M.; Chattarji S.; Rangarajan, G. & Laxmi, T. R. (2014). A study on fear memory retrieval and REM sleep in maternal separation and isolation stressed rats. *Behavioural Brain Research*, 273, 144-154.
- Santos, C. V.; Gehm, T. P. & Hunziker, M. H. L. (2011). Learned helplessness in the rat: Effect of response topography in a within-subject design. *Behavioural Processes*, 86(2), 178-183.
- Schaal, B.; Marlier, L. & Soussignan, R. (1998). Olfactory function in the human fetus: Evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. *Behavioral Neuroscience*, 112(6), 1-12.

- Schlinger, H. D. (1995). *A behavior analytic view of child development*. New York: Plenum Press.
- Skinner, B. F. (1974). *About Behaviorism*. London, Jonathan Cape.
- Smotherman, W. P. (1982). Odor aversion learning by the rat fetus. *Physiology and Behavior*, 29, 769-771.
- Smotherman, W. P. (2002a). Classical conditioning in the rat fetus: I. Temporal characteristics and behavioral correlates of the conditioned response. *Developmental Psychobiology*, 40, 104-115.
- Smotherman, W. P. (2002b). Classical conditioning in the rat fetus. II. Involvement of mu kappa opioid systems in the conditioned response. *Developmental Psychobiology*, 40, 116-130.
- Smotherman, W. P. (2003). Classical conditioning in the rat fetus. III. Retention, extinction, and re-Activation of conditioned response (CR). *Developmental Psychobiology*, 42, 181-193.
- Smotherman, W. P., & Robinson, S. R. (1985). The rat fetus in its environment: Behavioral adjustments to novel, familiar, aversive, and conditioned stimuli presented in utero. *Behavioral Neuroscience*, 99, 521-530.
- Sneddon, H., Hadden, R., & Hepper, P. G. (1998). Chemossensory Learning in the Chicken Embryo. *Physiology & Behavior*, 64, 133-139.
- Sousa, V. C.; Vital, J.; Costenla, A. R.; Batalha, V. L.; Sebastião, A. M.; Ribeiro, J. A. & Lopes, L. V. (2014). Maternal separation impairs long term-potentiation in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. *Neurobiology Aging*, 35(7), 1680-1685.
- Souza, E. J. (2017). *Efeitos do atraso do reforço negativo na produção de desamparo aprendido em ratos*. Tese de Doutorado não publica. São Paulo: Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.
- Spelt, D. K. (1948). The conditioning of the human fetus in utero. *Journal of Experimental Psychology*, 38, 338-346.
- Spitz, R. (2004). *O primeiro ano de vida*. São Paulo, SP: Martins Fontes. Originalmente publicado em 1965.

- Stickrod, G.; Kimble, D. P. & Smotherman, W. P. (1982). In utero taste/odor aversion conditioning in the rat. *Physiology and Behavior*, 28, 5-7.
- Sun, X. M.; Tu, W. Q.; Shi, Y. W.; Xue, L & Zhao, H. (2014). Female-dependent impaired fear memory of adult rats induced by maternal separation, and screening of possible related genes in the hippocampal CA1. *Behavioural Brain Research*, 267, 111-118.
- Tata, D. A; Markostamou, I; Ioannidis, A.; Gkioka, M.; Simeonidou, C.; Anogianakis, G. & Spandou, E. (2015). Effects of maternal separation on behavior and brain damage in adult rats exposed to neonatal hypoxia-ischemia. *Behavioural Brain Research*, 280, 51-61.
- Teicher, M. H. & Blass, E. M. (1977). First Suckling Response of the Newborn Albino Rat: The Roles of Olfaction and Amniotic Fluid. *Science*, 198 (4317), 635-636.
- Teicher, M. H. & Samson, J. A. (2013). Childhood Maltreatment and Psychopathology: A Case for Ecophenotypic Variants as Clinically and Neurobiologically Distinct Subtypes. *American Journal of Psychiatry*, 170(10), 1114-1133.
- Thor, D. H. & Holloway Jr., W. R. (1984). Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 22(6), 587-590.
- Vanderschuren, L. J. M. J.; Achterberg, E. J. M. & Trezza, V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 70, 86-105.
- Vivinetto, A. L.; Suárez, M. M. & Rivarola M. A. (2013) Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behavioral Brain Research*, 240, 110-118.
- Varendi, H., Porter, R. H. & Winberg J. (1996). Attractiveness of amniotic fluid odor: evidence of prenatal olfactory learning? *Acta Paediatrica*, 85, 1223-1227.
- Vetulani, J. (2013). Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacological Reports*, 65(6), 1451-1461.
- Villiers, P. & Herrnstein, R. J. (1976) Toward a law of response strength. *Psychological Bulletin*, 83, 1131-1153.

- Wang, Q; Li, M; Du, W; Shao, F & Wang, W (2015). The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behavioral Brain Research*, 280, 16-23.
- Weaver, I. C. G.; Cervoni, N.; Champagne, F. A.; D'Alessio, A. C.; Sharma, S.; Seck, J. R.; Dymov, S.; Szyf, M. & Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 7, 847-854.
- Whishaw, I. Q. & Kolb, B. (2005). *The behavior of the laboratory rat: A handbook with tests*. Oxford University Press.
- Winnicott, D. W. (1983). *O ambiente e os processos de maturação*. Porto Alegre: Artes Médicas. Originalmente publicado em 1965.
- Winnicott, D. W. (1987). *Privação e delinquência*. São Paulo: Martins Fontes.
- Xiong, G. J.; Yang, Y.; Wang, L. P.; Xu, L. & Mao, R. R. (2014). Maternal separation exaggerates spontaneous recovery of extinguished contextual fear in adult female rats. *Behavioral Brain Research*, 269, 75-80.
- Xue, X.; Shao, S.; Wang, W. & Shao, F. (2013) Maternal Separation Induces Alterations in Reversal Learning and Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in Adult Rats. *Neuropsychobiology*, 68, 243-250.
- Yoo, S. B.; Ryu, V.; Park, E. Y.; Kim, B. T.; Kang, D. W.; Lee, J. H. & Jahng, J. W. (2011). The arcuate NPY, POMC, and CART expressions responding to food deprivation are exaggerated in young female rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides*, 45(5), 343-349.
- Zemunik, T.; Peruzovic, M.; Capkun, V.; Zekan, L.; Tomic, S. & Milkovic, K.. (2003). Reproductive ability of pubertal male and female rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(7), 871-877

Apêndice I – Questionário de avaliação do desenvolvimento da prole.

Observador(a): _____

Data: ____/____/20____

Nº da Rata: _____

Nascimento: ____/____

Quantidade de filhotes: _____

INSTRUÇÕES: Para cada item, representado por um número no início das linhas, você deve assinalar a(s) alternativa(s) que melhor descrevem aquilo que você observou. A depender da sua observação, você pode assinalar mais de uma alternativa, bem como não assinalar qualquer uma delas.

I. AMAMENTAÇÃO		
<i>1. Amamentação</i>	☐ Sim - Siga para o item 2	☐ Não - Pule para o item 6
<i>2. Posição da mãe</i>	☐ Por cima dos filhotes ☐ Deitada de lado	☐ Barriga para cima ☐ Outro
<i>3. Arqueamento da mãe</i>	☐ Sim	☐ Não
<i>4. Posição dos filhotes</i>	☐ Barriga para cima ☐ Barriga para baixo	☐ De lado ☐ Vertical
<i>5. Pisada/Mordida/Patada na prole</i>	☐ Sim	☐ Não
II. COMPORTAMENTO MATERNO		
<i>1. Agrupamento dos filhotes</i>	☐ Um local, todos juntos ☐ Um local, alguns dispersos	☐ Dois locais ☐ Dispersão
<i>2. Grooming na prole</i>	☐ Sim, região anogenital ☐ Sim, outra região	☐ Não
<i>3. Movimentação da maravalha</i>	☐ Constrói ninho ☐ Cobre filhotes	☐ Outros movimentos ☐ Não
<i>4. Movimentação de filhote(s) pela mãe</i>	☐ Sim, pela boca ☐ Sim, outra forma	☐ Não
<i>5. Comer e/ou beber</i>	☐ Ninho ☐ Fora	☐ Não
<i>6. Farejar</i>	☐ Ninho ☐ Fora	☐ Não
<i>7. Autogrooming</i>	☐ Ninho ☐ Fora	☐ Não
<i>8. Dormir</i>	☐ Ninho ☐ Fora	☐ Não
III. FILHOTES: ASPECTOS FÍSICOS		
<i>1. Pelagem</i>	☐ Sim	☐ Não
<i>2. Relação entre cabeça e corpo</i>	☐ Mesma espessura	☐ Espessura diferente
<i>3. Abertura dos olhos</i>	☐ Aberto ☐ Fechado, pálpebra definida	☐ Sem sinais de abertura
<i>4. Conduto auditivo</i>	☐ Aberto	☐ Fechado

IV. FILHOTES: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS SIMPLES		
1. Movimento dos Membros	() Deslocamento () Deslocamento ineficiente () Outros (voluntários)	() Involuntário () Não
2. Movimento do Rabo	() Sim	() Não
3. Movimento da Cabeça	() Erguer apenas em movim. () Rotação Direita-Esquerda () Sustentação	() Involuntário () Não
4. Movimento do Tronco	() Rotação Lateral () Flexão () Extensão	() Involuntário () Não
5. Movimento involuntário combinado	() Sim	() Não
V. FILHOTES: ASPECTOS COMPORTAMENTAIS COMPLEXOS		
1. Empurrar com a cabeça	() Sim, em frestas. () Sim, em outros locais.	() Não
2. Arrastar-se	() Sim	() Não
3. Coçar-se	() Sim	() Não
4. Farejar	() Sim, anogenital () Sim, outro	() Não
5. Andar	() Sim	() Não
6. Autogrooming	() Sem flexão () Com flexão, anogenital	() Com flexão, outra região () Não
7. Allogrooming	() Sim	() Não
8. Ficar em pé	() Sim	() Não
9. Equilíbrio sobre outros animais	() Sim	() Não
10. Morder	() Sim, um animal () Sim, outro	() Não
11. Brincar	() <i>Pinning</i> () <i>Pouncing</i> () Perseguição	() Ataque mútuo () Outro () Não
12. Pular	() Sim	() Não
13. Cavar	() Sim	() Não
14. Escalar	() Sim	() Não
15. Comer/Beber independente	() Sim	() Não
16. Disputa por alimento sólido	() Sim	() Não
17. Defecar	() Sim	() Não
18. Reação Visual	() Sim	() Não
19. Reação ao Som	() Sim	() Não