

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

AMMIR YACOUB HELOU

Impacto da anóxia neonatal sobre o comportamento materno em ratas e efeitos a longo prazo na orientação da atenção na prole adulta

SÃO PAULO - SP

2020

AMMIR YACOUB HELOU

VERSÃO ORIGINAL

Impacto da anóxia neonatal sobre o comportamento materno em ratas e efeitos a longo prazo na orientação da atenção na prole adulta

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Morfofuncional

Orientador (a): Prof^a Dr^a. Maria Inês Nogueira

SÃO PAULO - SP

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Yacoub Helou, Ammir

Efeitos da anóxia neonatal sobre o comportamento materno em ratas e efeitos a longo prazo na orientação da atenção na prole adulta / Ammir Yacoub Helou; orientadora Maria Inês Nogueira. -- São Paulo, 2020.
105 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Anóxia Neonatal. 2. Comportamento Materno. 3. Vocalização Ultrassônica. 4. Atenção. 5. Interação mãe-filhote. I. Inês Nogueira, Maria , orientador. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Helou, Ammir Yacoub

Título do trabalho: Impacto da anóxia neonatal sobre o comportamento materno em ratas e efeitos a longo prazo na orientação da atenção na prole adulta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe biológica, Leila Fayek Tacla Yacoub, e minha mãe acadêmica, Maria Inês Nogueira. Estudo o comportamento materno pelo fascínio no altruísmo incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a. Maria Inês Nogueira pela confiança, dedicação e carinho. Não foi apenas uma orientadora acadêmica, mas me ensinou valores morais que extrapolam a academia.

À Kelly Borges, técnica do laboratório, por toda a paciência e conhecimento compartilhado. O maior exemplo de dedicação ao trabalho, independente da hora.

À Natalia Cruz Ochoa, colega de laboratório. Sua ajuda foi indispensável para os resultados pilotos deste estudo. Muito obrigado!

Aos meus colegas de laboratório Amrita Jah Kumar, Bruna Petrucelli Arruda, Vitor Yonamine Lee, pela constante troca de conhecimentos, discussões de incomensurável importância.

Ao Prof^o. Dr^o. Gilberto Fernando Xavier, pelo laboratório e colaboração.

Ao Prof^o. Dr^o. Luciano Freitas Felício, pelas ideias durante a elaboração da hipótese testada neste projeto.

Ao meu colega e amigo MSc. Mateus Cruz, você foi meu grande amigo na pós-graduação, além disso, um tutor.

Ao aluno de IC Matheus Cerussi, você me ensinou mais do que imagina.

A todos os meus Anatoamigos. Sem vocês, todo esse trabalho não seria tão prazeroso.

À minha família e amigos que não estão diretamente relacionados ao trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (auxílio pesquisa 2015/18415-8, bolsa pesquisador 2014/22313-3, respectivamente)

“Caminhante, não há caminho, o caminho se faz ao caminhar.”

(Antonio Machado)

RESUMO

HELOU, A. Y. Impacto da anóxia neonatal sobre o comportamento materno em ratas e efeitos a longo prazo na orientação da atenção na prole adulta. 2020. 105 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A encefalopatia hipóxico-isquêmica, condição clínica que mais acomete neonatos humanos, causa déficits sensoriais, motores e cognitivos persistentes, quando não leva a óbito. Diversos danos morfofuncionais são evidenciados em indivíduos que sofreram hipóxia/anóxia neonatal. Do comportamento materno depende a sobrevivência da prole, mediado por fatores genéticos e ambientais, relacionados a área pré-óptica medial (APM) – região de controle do comportamento materno. A interação mãe-filhote depende dos estímulos sensoriais eliciados pela prole como mecanismo de reforço. Em ratos, a vocalização dos neonatos na faixa de 40 kHz corresponde ao chamado de separação, o que estimula a mãe a agrupar o neonato que não se encontra no ninho. Alterações nos comportamentos direcionados à prole constituem agravante ao seu desenvolvimento. Não obstante, danos a longo prazo sobre a atenção observados em modelo animal de anóxia neonatal apontam para redução na manutenção da atenção em indivíduos acometidos. Com o objetivo de estudar as alterações no comportamento materno em relação a prole anoxiada, foi efetuada a quantificação, ao longo do período de lactação (P2-P21), do comportamento materno de ratas *Wistar*, n = 20, primíparas, cujas proles foram submetidas à Anóxia Neonatal em P2 (dias pós-parto); avaliou-se a interação mãe-filhote pela quantificação da frequência de vocalização na faixa de 40 kHz (Chamados de separação) de P3-P18; bem como foi quantificado o número de neurônios c-Fos-IR+ e NeuN-IR+ na APM das mães logo após o último desmame (P21); e foram avaliados os danos cognitivos, a longo prazo, na orientação da atenção da prole adulta (P70) pela Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção, n = 12. Foi possível observar redução nos comportamentos direcionados a prole anoxiada em comparação ao grupo controle. Mães do grupo anóxia apresentaram aumento no comportamento de Auto limpeza (*Self-grooming*). Houve aumento dos chamados de separação do grupo macho anóxia e redução no grupo fêmea anóxia, quando comparados aos seus respectivos controles. Houve redução no ganho de peso corporal dos indivíduos do grupo Anóxia. Os resultados da anóxia neonatal sobre o comportamento materno e aumento de seu estresse, evidenciam a necessidade de avalia-los para compreender e orientar possíveis medidas que os amenizem, uma vez que os efeitos da negligência materna somados aos efeitos negativos da anóxia, podem agravar os danos induzidos pela privação de oxigênio.

Palavras-chave: Comportamento Materno; Vocalização; Área Pré-óptica medial; Interação Mãe-Filhote; Atenção.

ABSTRACT

HELOU, A. Y. Impacts of Neonatal Anoxia on the maternal behavior in rats and late changes in the orientation of attention of the adult offspring. 2020. 105 p. Masters thesis (Life Systems Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Hypoxic-Ischemic encephalopathy, the clinical condition that most impact human neonates, which can cause persistent sensori-motor, and cognitive deficits when it does not lead to death. Several morphofunctional damages are found in subjects that have endured neonatal hypoxia/anoxia. The survival of the offspring depends on the maternal behavior for care and feeding, mediated by genetic and environmental factors, related to the medial preoptic area (MPA)—a key region for the expression of maternal behaviors. Mother-pups feed-back, such as sensory stimuli elicited by the offspring, works as a reinforcement mechanism for the maternal behavior. In rats, the vocalization of newborns, around 40 kHz, corresponds to separation calls that encourages the mother to retrieve the neonate. Changes in behaviors addressed to the offspring make up an aggravating factor in their development. Studies using animal models of neonatal anoxia showed long-term deficits related to a reduction in the maintenance of attention. The aim of this study was to quantify, during the lactation period (P2-P21, postpartum days), the maternal behavior of primiparous rats whose offspring were exposed to Neonatal Anoxia in P2; to evaluate the mother-pup interaction by means of the pups vocalization (40 kHz, separation calls) from P3 to P18; quantify the expression of Fos protein in the MPA of the mothers shortly after the last weaning (P21); and to assess long-term cognitive damages in the attention of adult offspring (P70) using the Covert Attention Task. It was possible to observe a reduction in behaviors directed to the anoxia offspring compared to the control group, and an increase in the separation call of the male anoxia group and a reduction in the female anoxia group when compared to their respective controls. Primiparous of the anoxia offspring showed an increase in self-grooming. It was possible to observe a reduction in the body weight gain of the individuals in the Anoxia group. These results show the correlation of deleterious effects of neonatal anoxia on weight gain with reduction in maternal behavior. Therefore those impacts are relevant to evaluate, the outcomes of both negative influence on the neonate and can guide to procedures to mitigate them, as well as to assess the possible deleterious effects of maternal negligence added to the negative effects of anoxia, which may intensify the damage induced by the neonatal injury.

Keywords: Maternal Behavior; Separation Calls; Medial preoptic area; Mother-pup interaction; Attention.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais vias de danos decorrentes da NA.....	23
Figura 2 – Modelo esquemático das alterações epigenéticas durante o período pós-natal.....	25
Figura 3 - Neuroanatomia dos circuitos relacionados ao comportamento materno...28	
Figura 4 – Modelo hipotético dos circuitos envolvidos com a motivação maternal....29	
Figura 5 - Desenho Experimental.....	33
Figura 6 – Sistema do modelo de Anóxia Neonatal.....	34
Figura 7 - Gaiola experimental para os registros do comportamento materno.....	35
Figura 8 – Comportamento: Amamentação.....	36
Figura 9 – Comportamento: Lamber/Acariciar.....	37
Figura 10 – Microfone e Interface do software usado no registro das vocalizações..38	
Figura 11 – Série de cortes, cortes selecionados.....	39
Figura 12 – Primeiro agrupamento.....	42
Figura 13 – Agrupamento total.....	43
Figura 14 – Amamentação.....	43
Figura 15 – Comportamento materno: Lamber/acariciar.....	44
Figura 16 – Comportamento materno: Self-grooming.....	45
Figura 17 – Quantificação de neurônios NeuN-IR e c-Fos na APM.....	46
Figura 18 – Evolução ponderal.....	48
Figura 19 – Total de chamados (40 kHz).....	49
Figura 20 – Duração média e total das VUS em P7-P9.....	50
Figura 21 – Aparato utilizado para o Teste de Orientação Encoberta da Atenção....	62
Figura - 22 Limiar de detecção de luminescência.....	67
Figura 23 – Resultados parciais da Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção....	68
Figura 24 – Erros quantificados durante a Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Taxa de mortalidade infantil decorrente da privação de oxigênio.....	22
Tabela 2 - Modelos animais de AN por privação de oxigênio.....	24
Tabela anexo A - Métodos de quantificação do comportamento materno em ratos..	90
Tabela anexo B - Dados da estatística inferencial para resultados significativos.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Anóxia Neonatal
APM	Área pré-óptica medial
ATv	Área tegumental ventral
CM	Comportamento materno
CPF	Córtex pré-frontal
P	Dias pós-parto
DA	Dopamina
EHI	Encefalopatia hipóxico-isquêmica
FA	Fêmea anóxia
FC	Fêmea controle
FJB	Fluoro-Jade® B
IHC	Imuno-histoquímica
IR	Imunorreativo
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
MA	Macho anóxia
MC	Macho controle
NA	Núcleo acumbente
NLST	Núcleo leito da estria terminal
vNLST	Porção ventral do Núcleo leito da estria terminal
OT	Ocitocina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OVN	Órgão vomeronasal
OTR	Receptor de ocitocina
SL	Septo Lateral
SOA	Stimulus Onset Asynchrony
TOEA	Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção
3V	Terceiro ventrículo
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção com Hiperatividade
USP	Universidade de São Paulo
VU	Vocalizações ultrassônicas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO 1: Efeitos da anóxia neonatal sobre o comportamento materno.....	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Comportamento materno em roedores.....	19
1.2 Epidemiologia e Fisiopatologia da Anóxia Neonatal	21
1.3 Neuroanatomia química do Comportamento Materno	25
1.4 Alterações decorrentes da AN e suas interações com o CM.....	29
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivos específicos:.....	32
3. MATERIAS E MÉTODOS	33
3.1 Animais e Grupos Experimentais.....	33
3.2 Anóxia Neonatal.....	34
3.3 Avaliação do Comportamento Materno	35
3.3.1 Descrição dos comportamentos maternos avaliados.....	36
3.4 Avaliação da Evolução Ponderal.....	37
3.5 Registro da Vocalização da Prole	37
3.6 Eutanásia, Perfusão e Coleta do Material Biológico.....	38
3.7 Coloração em Nissl.....	39
3.8 Imuno-histoquímica: FOS-IR para atividade neural e NeuN- IR para densidade de neurônios na APM	40
3.9 Análise Estereológica.....	40
3.10 Análise Estatística	41
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Comportamento Materno	41
4.1.1 Primeiro agrupamento.....	42
4.1.2 Agrupamento total.....	42
4.1.3 Amamentação	43
4.1.5 Self-grooming.....	44
4.2 Área pré-óptica medial – c-Fos e NeuN	45

4.3 Alterações na prole	47
4.3.1 Evolução ponderal	47
4.3.2 Vocalização ultrassônica da prole	49
5. DISCUSSÃO	50
CAPÍTULO 2: Efeitos da anóxia neonatal sobre a orientação da atenção	55
1. INTRODUÇÃO	56
2. OBJETIVOS	59
2.1 Objetivo específico	59
3. MATERIAS E MÉTODOS	60
3.1 Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção	60
3.2 Condicionamento	61
3.3 Sistema para avaliação da atenção	61
3.4 Fases Experimentais:	62
3.5 Tipos de erros quantificados	64
3.6 Eutanásia, Perfusão e Coleta do Material Biológico	65
3.7 Análises estatísticas	65
3.8 Dificuldades Experimentais	66
4. RESULTADOS	67
4.1 Limiar de Detecção de Luminescência	67
4.2 Tarefa de orientação encoberta da Atenção	67
6. CONCLUSÃO	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
8. REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE	84
ANEXO A	90
ANEXO B	91
ANEXO C	99
ANEXO D	100

1. INTRODUÇÃO

A Anóxia Neonatal (AN)¹ caracteriza privação total de oxigênio durante o desenvolvimento neonatal. Clinicamente, o termo para fisiopatologia desencadeada pela AN denomina-se encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI), pois as diferentes condições fisiológicas entre a asfixia perinatal e hipóxia-isquemia não permitem distinção clara (FUNAYAMA, 2005). A AN é a causa mais comum de morte ou comorbidades em neonatos humanos (GROW; BARKS, 2002), somando 23% a mortalidade infantil, entre 0,7 – 1,2 milhões de neonatos afetados anualmente (LAWN; COUSENS; ZUPAN, 2005). A nível mundial, dos 125 milhões de nascimentos registrados por ano, 10 milhões apresentam aporte deficitário de oxigênio e 700 mil vão a óbito por conta de eventos pré-natais; dos 1,2 milhões de indivíduos acometidos pela EHI, 500 mil apresentam prejuízos no desenvolvimento neurológico (MILLAR et al., 2017). Nos recém-nascidos pré-maturos de baixo peso, sua incidência chega a 60%, e nestes desencadeia lesões com consequências graves e persistentes, como: retardo mental, epilepsia, déficit motor e paralisia cerebral (VANNUCCI; TOWFIGHI; VANNUCCI, 2004; HURN; VANNUCCI; HAGBERG, 2005). Seus efeitos de longo prazo acometem 18% dos indivíduos entre 2-5 anos, os quais apresentam danos sensório-motores e/ou déficits de aprendizagem (MILLAR et al., 2017).

Diante dos impactos da AN, diferentes modelos animais, principalmente em roedores, foram desenvolvidos para caracterização sobre vários aspectos (i.e. celulares e comportamentais) desta condição clínica (RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981; EL-KHODOR; BOKSA, 1997; VANNUCCI; TOWFIGHI; VANNUCCI, 2004; TAKADA et al., 2015a, 2016; KUMAR et al., 2017). Pesquisadores do Laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia (ICB/USP), ao validar modelo não invasivo e sistêmico da AN, observaram diversos de seus efeitos deletérios, tais como: morte celular por diferentes mecanismos (e.g. citotoxicidade), redução do número de células no sistema nervoso, e déficits cognitivos, comportamentais e do

¹ A palavra anóxia – corresponde à fisiopatogenia que ocorre em nível tecidual, é inapropriada, pois o que ocorre na maioria dos casos é uma redução do suprimento de oxigênio (Hipóxia). Entretanto, como a terminologia foi consagrada na literatura devido a relatos e lendas sobre asfixia por afogamento e enforcamento – de acordo com o caso de anóxia – falta de oxigênio a tentativa de respirar, será mantida a terminologia consagrada. (i.e. “Sufocação, no recém-nascido”, Cournville, 1950; “Asfixia *neofitorum*”, Ehrhart, 1785; “Asfixia *neonatorum*”, Regnier, 1789; “Morte aparente do recém-nascido”, Löfler, 1792). Levando em consideração estas ressalvas, seguimos com a apresentação do trabalho.

desenvolvimento (TAKADA et al., 2011a; MOTTA-TEIXEIRA et al., 2016; TAKADA et al., 2016; KUMAR et al., 2017). O modelo utiliza animais com aproximadamente 30 horas de idade, 2º dia pós parto (P2) – cuja etapa de desenvolvimento neural corresponde a do prematuro humano com 6 meses, população mais acometida pela AN (RICE; BARONE, 2000), razão pela qual este modelo constitui ferramenta adequada para explorar os mecanismos da AN, ampliar sua compreensão, assim como propor estratégias e procedimentos para corrigir e/ou minimizar seus efeitos deletérios.

A EHI está associada à disfunções cognitivas, sendo a maioria dos estudos de modelos animais da AN focados nas lesões celulares encefálicas e em danos a médio-longo prazo nos indivíduos acometidos. Há, porém, escassez de pesquisas que explorem os possíveis impactos das variações do comportamento materno (CM) em relação a prole acometida pela AN. Uma vez que os cuidados com a prole são de extrema relevância para o desenvolvimento sadio da mesma (FRANCIS; MEANEY, 1999; FELDMAN, 2016; KONISHI; SO; YOSHIMURA, 2018; BERNIER et al., 2019), sendo que os efeitos deletérios da AN podem ser agravados quando somados à negligência materna.

Não obstante, os casos de EHI estão diretamente relacionados a incidência de déficits atencionais como o Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) (PRESS et al., 1983; MILLAR et al., 2017), entretanto, os mecanismos relacionados a orientação da atenção dos indivíduos acometidos têm sido pouco explorados na literatura, e os poucos estudos existentes utilizam diferentes modelos de hipóxia-isquemia (e.g. MIGUEL et al., 2015).

Dada a relevância dos temas abordados, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, a partir da hipótese de que os danos da AN podem ser agravados quando somados a negligência materna, foram avaliadas as variações no comportamento materno de ratas primíparas cuja prole foi submetida a AN, alterações na vocalização e evolução ponderal da prole, bem como alterações na quantidade de neurônios maduros (NeuN-IR) e neurônios ativos (c-Fos-IR) na área pré-óptica medial (APM) das ratas primíparas. No segundo capítulo, considerando a hipótese de que a AN gera prejuízos a longo prazo e possivelmente, também, nos mecanismos de orientação da atenção, à prole adulta foi submetida a Tarefa de

Orientação Encoberta da Atenção (TOEA). Ambos os capítulos discutem as alterações sexo-específicas da AN.

CAPÍTULO 1: Efeitos da anóxia neonatal sobre o comportamento materno

1. INTRODUÇÃO

1.1 Comportamento materno em roedores

O cuidado parental compreende complexo de comportamentos altamente conservados e cruciais para o sucesso reprodutivo – garantir a sobrevivência da prole. Na maioria das espécies de mamíferos, estes cuidados são desempenhados pelas fêmeas com denominação de comportamento materno (CM) (ROSENBLATT, 2003; PÉREZ-TORRERO; RUBIO-NAVARRO, 2015; PEREIRA; FERREIRA, 2016). Em humanos, o período do nascimento e cuidado da prole está associado a característica preocupação materna com o intuito de manter o neonato seguro e em condições plenas de saúde (LECKMAN; HERMAN, 2002).

Em roedores, os principais comportamentos direcionados a prole são: construção de ninho na gaiola (*Nest building*), que consiste na construção de pequeno aglomerado de maravalha para manter os filhotes em temperatura adequada na ausência da genetriz; agrupamento dos neonatos (*Grouping/Retriving*), correspondente ao transporte dos filhotes até o ninho com a ajuda da boca; cifose sobre os filhotes (*Crouching*), a fim de permitir posição otimizada para amamentação e manutenção da temperatura dos filhotes; lambe os filhotes (*Licking*), com o objetivo de manter a higiene; amamentação (*Nursing*); e acariciar (*Grooming*) os filhotes com o focinho, uma vez que esses contatos estimulam a excreção reto-urinária nos estágios iniciais de desenvolvimento e reduzem os sinais de estresse até a idade adulta (NUMAN & INSEL, 2003).

Há uma gama de fatores hormonais e não hormonais que influenciam o comportamento materno. Dentre os fatores não hormonais relacionados ao CM, ROSENBLATT (1967), ao estender o trabalho desenvolvido por WEISNER & SHEARD (1933), demonstrou que o estímulo hormonal não é obrigatório para o surgimento dos comportamentos maternos em ratos. Ao acondicionar machos e fêmeas durante dias consecutivos com neonatos de 5 a 10 dias de idade, comportamentos direcionados a prole (i.e. Reagrupamento dos neonatos; Lamber; adoção de postura em Cifose; Construção de ninho) foram desempenhados em ambos os sexos após o período de 10-15 dias de exposição (ROSENBLATT, 1967; WEISNER AND SHEARD, 1933). A descoberta deste processo – denominado sensibilização, foi de grande importância para o desenvolvimento de diversas questões fundamentais referentes à natureza do CM. Em conclusão, os substratos

neurais que dão suporte aos comportamentos parentais existem em ambos os sexos, e sua ativação pode ocorrer na ausência de estímulos hormonais (STOLZENBERG; CHAMPAGNE, 2016). O rápido aparecimento do comportamento maternal requer um aumento nas respostas de aproximação com a prole, relacionado aos sistemas neurais envolvidos na motivação (NUMAN; FLEMING; LEVY, 2006; NUMAN; STOLZENBERG, 2009b; NUMAN; WOODSIDE, 2010). Entender o desenvolvimento das respostas maternas em ratos pode facilitar a investigação de sistemas neurais envolvidos no cuidado com a prole ao longo do período pós-parto.

O cuidado materno ocorre em sequência organizada de eventos. Inicialmente, a mãe se dirige ao ninho, reagrupa os filhotes, amamenta, lambe, e por fim, afasta-se do ninho (CROSKERRY et al., 1976) – hipertermia como regulador da interação mãe-filhote (JANS; LEON, 1983). Este padrão comportamental pode ser alterado mediante estímulos advindos da prole (e.g. vocalizações) quando acometida por fatores estressantes (e.g. separação materna, referência), ao qual a mãe prontamente responde ao reagrupar os filhotes a fim de amenizar tais efeitos (BOERO et al., 2018).

Posto que filhotes de roedores nascem sem capacidade auditiva e visual, com disposição motora reduzida e sem pelos, a vocalização, ao variar em frequência e amplitude, informa à mãe sobre suas condições (MOLTZ; BOBBINS, 1965; HOFER; BRUNELLI; SHAIR, 1994; BRANCHI; SANTUCCI; ALLEVA, 2006; BRUNELLI et al., 2015; HEUN-JOHNSON; LEVITT, 2016; MOGI et al., 2017). Os neonatos emitem vocalizações ultrassônicas (VU), acima da capacidade de audição humana – 20 kHz -, relativamente curtas (i.e. 80-150 ms) na faixa de 40 kHz (na verdade, entre 30-65 kHz), denominados chamados de separação (do inglês, *separation calls*) (PORTFORS, 2007; TAKAHASHI; KASHINO; HIRONAKA, 2010; SCHWARZ; SHOLAR; BILBO, 2012). Os neonatos geralmente emitem tais vocalizações em resposta a potenciais situações estressantes (HEUN-JOHNSON; LEVITT, 2016) e no contexto de separação materna (BRUNELLI et al., 2015). Os chamados de separação aumentam em quantidade por volta de P3-P5, seu pico ocorre entre P5-P10, e desaparece até P20. O estímulo crítico para ocorrência dos chamados de separação não decorre exclusivamente da separação da mãe, mas também resulta de queda de temperatura e outros fatores estressantes (PORTFORS, 2007; TAKAHASHI; KASHINO; HIRONAKA, 2010; LAHVIS; ALLEVA; SCATTONI, 2011; SCHWARZ; SHOLAR; BILBO, 2012). Posto que a VU da prole na faixa de 40 kHz estimula

positivamente o CM, alterações na quantidade, frequência e amplitude dessas vocalizações medeiam a interação mãe-filhote (PORTFORS, 2007; TAKAHASHI; KASHINO; HIRONAKA, 2010; LAHVIS; ALLEVA; SCATTONI, 2011), este constitui modelo animal para estudo das possíveis alterações das VU decorrente do insulto anóxico.

A AN constitui fator estressante para os neonatos (CAPUTA et al., 2005). O Laboratório de Neurociências (ICB/USP), em estudo anterior, avaliou as possíveis alterações do CM em ratas cuja prole foi submetida à AN. Esse estudo evidenciou aumento dos comportamentos direcionados a prole durante o período matutino e comportamentos não relacionados a prole durante o período noturno (VASCONCELOS, 2013). Entretanto, a AN foi realizada em P5, e o CM foi quantificado por apenas 30 minutos após a anóxia, sem a análise ao longo do período de amamentação, questão proposta no presente projeto (Ver APÊNDICE 1 – Projeto piloto).

Em paralelo ao presente projeto, foi elaborado uma revisão dos métodos de quantificação do comportamento materno. As informações coletadas foram resumidas e estão apresentadas em forma de tabela (ANEXO A).

1.2 Epidemiologia e Fisiopatologia da Anóxia Neonatal

Em relação a análise de dados sobre a mortalidade decorrente da Anóxia Neonatal, devem-se considerar o consenso e confiabilidade das metodologias utilizadas para o diagnóstico dessa condição clínica. Em 1980, Wigglesworth (1980) sugere a identificação dos óbitos perinatais por meio da classificação das condutas neonatais e obstétricas, em 1981, o Centro da Organização Mundial da Saúde (OMS) amplia essas condutas, para também, complicações maternas e fetais (LAURENTI & MELLO JORGE, 1981). A seguir, apresentamos tabela elaborada a partir dos dados apresentados em Funayama, 2005:

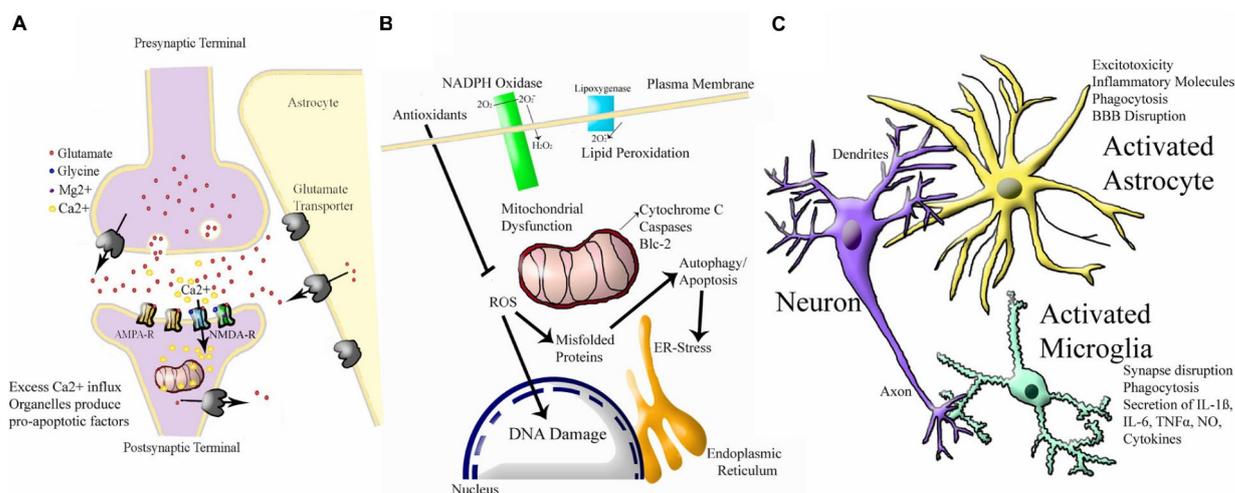
Tabela 1 – Taxa de mortalidade infantil decorrente da privação de oxigênio

Autor	Fonte	Método	Óbitos
Parras, 1994; Kaempfer et al, 2000; Bussaw et al, 2001; Alvares Ponce et al, 2002; Jekova, 2002	Organização Mundial da Saúde (OMS)	Taxa de mortalidade neonatal precoce (>7 dias) somados à tardia (7 a 28 dias) em 10000 nascidos vivos ¹ .	6,6 - Canadá; 9 – Espanha; 46–Estados Unidos; 87 – Bulgária; 471 – Índia; 1048 – Haiti; 600 – Bolívia; 60 – Chile 39 - Cuba
Miura, Failace & Fiore, 1997 Neves, 2001 Leal & Szwarcwald, 1996 Morais Neto et. al., 2001 Lansky, França e Leal, 2002	OMS no Brasil	Taxa de mortalidade neonatal precoce (>7 dias) somados à tardia (7 a 28 dias) em 10000 nascidos vivos*.	127 – Porto Alegre (RS) 130 – Juiz de fora (MG) 156 – Rio de Janeiro (RJ) 169,9 – Goiânia (GO) 202 – Belo Horizonte (MG)
Kilstajn et. al., 2003	OMS no Estado de SP Cidades do Sul, Sudeste e Centro	Taxa de mortalidade neonatal precoce (>7 dias) somados à tardia (7 a 28 dias) em 10000 nascidos vivos*.	170

Fonte: Funayama (2005). *Grupo de nascidos a termo e pré-termo

Diante desses dados, diferentes modelos animais, principalmente em roedores, foram desenvolvidos para elucidar os mecanismos celulares envolvidos nos casos de AN (RICE; VANNUCCI; BRIERLEY, 1981; IUVONE; GELOSO; DELL'ANNA, 1996; VANNUCCI; TOWFIGHI; VANNUCCI, 2004; TAKADA et al., 2011b). Estudos anatômicos descrevem que, seguido de eventos anóxicos, há redução do volume do encéfalo. Entretanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela morte celular continuam em debate (MILLAR et al., 2017). Dentre estes mecanismos, a Excitotoxicidade, o Estresse Oxidativo, e as Inflamações compõem as principais vias relacionadas aos danos decorrentes da AN (MILLAR et al., 2017) (Figura 1).

Figura 1 – Principais vias de danos decorrentes da AN.



Modelo simplificado das principais cascatas moleculares envolvidas nos eventos de Anóxia Neonatal. **A.** Excitotoxicidade. Ca^{2+} = Íons cálcio, Mg^{2+} = Íons magnésio, AMPA-R = α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole, NMDA-R = N-methyl-D-aspartate receptor. **B.** Estresse Oxidativo. NADPH + Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen, O_2 = Oxigênio, O_2^- = Radicais livres de Oxigênio, H_2O_2 = Peroxido de Hidrogênio, ROS = Espécie reativa de oxigênio, Bcl-2 = Proteína celular leucêmica; ER – Retículo endoplasmático. **C.** Inflamação. BBB = Barreira Hematoencefálica, NO = Oxido nítrico. (Adaptado de Millar et al., 2017).

São observadas alterações cognitivas e celulares em modelos animais da AN. Silva et al. (2015), ao utilizar a *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling* (TUNEL) para revelar a fragmentação do DNA de células da região do Hipocampo, *Fluoro-Jade® B* (FJB) para mostrar a degeneração de neurônios, *Caspase-3 immunohistochemistry* (IHC) e *Transmission electron microscopy* (TEM) para detectar apoptose celular, bem como alterações em estruturas relacionadas à morte celular, foi possível observar um aumento da apoptose nos indivíduos submetidos à anóxia (TAKADA et al., 2015a, 2016). No teste do Labirinto Aquático de *Morris*, ratos do grupo anóxia comparados a ratos do grupo controle apresentaram aumento na latência para encontrar a plataforma, bem como menor velocidade e distância de nado, o que sugere prejuízos na memória e cognição (TAKADA et al., 2015b, 2016).

Para o estudo das diferenças entre os sexos no desenvolvimento sensorial e motor de ratos *Wistar* submetidos ao modelo de AN – protocolo não-invasivo e sistêmico (TAKADA et al., 2011b) –, nosso laboratório avaliou os seguintes parâmetros: peso corporal, comprimento, eixo médio-lateral do crânio, erupção de incisivo superior, preensão palmar, susto auditivo e geotaxia negativa; para

quantificação da densidade celular no córtex sensorio motor, foi utilizado o método de Nissl. Foi possível observar uma diferença significativa de peso, sendo que os indivíduos anóxiados de ambos os sexos apresentaram redução no peso corporal nos primeiros dias pós-parto (P7 a P21); fêmeas anóxia apresentaram retardo no desenvolvimento dos reflexos avaliados quando comparadas a fêmeas controle (KUMAR et al., 2017). Foi possível observar redução na densidade de neurônios no córtex cerebral dos ratos anóxiados. Apesar de afetar o córtex primário em ambos os sexos, as fêmeas apresentaram maior dano nas regiões anterior e posterior do córtex motor (KUMAR et al., 2017). Déficits cognitivos relacionados ao córtex pré-frontal (CPF) representam variedade de desordens neurológicas e neuropsiquiátricas, que impactam significativamente na qualidade de vida dos indivíduos acometidos (HEISLER et al., 2015).

Com relação aos modelos utilizados para simular a AN em roedores, câmeras com privação de oxigênio, mas sem indução de isquemia, são utilizados pela vantagem de dispensar a oclusão da carótida. A ausência de uma revisão ou meta-análise dos modelos para investigação da AN exclusivamente sem isquemia, elaboramos a que segue; uma breve compilação dos principais artigos publicados utilizando diferentes modelos animais para AN no banco de dados do Pubmed (ainda incompleta):

Tabela 2 – Modelos animais de AN por privação de oxigênio.

Autor	Espécie	Dia AN	Temp	O ₂ parcial	CO ₂ parcial	Duração	Alterações comportamentais	Alterações moleculares
Rastogi et al., 1968	Rato	P0	-	0%	-	20 minutos	Aumento da ansiedade	Redução do crescimento, nível elevado de fosforo no sangue.
Vannucci & Duffy, 1976	Rato	P7	37°C	0%	-	20 minutos		Redução dos níveis de glicose no encéfalo
Wasterlain, 1979	Rato	P2, 11	-	0%	-	30 minutos diários	Desenvolvimento locomotor retardado, convulsões	
Hedner et al., 1980	Rato	P1	-	6%	-	30 minutos		Redução dos níveis de dopamina no encéfalo
Dell'Anna et al., 1991	Rato	P1	35°C	0%	-	25 minutos	Hiperatividade na tarefa de Campo aberto, déficit no Labirinto Aquático de <i>Morris</i>	
Nalivaeva et al., 2003	Rato	E13	-	7%	-	3 horas		Aumenta da expressão de proteína beta-amiloide em adultos
Daval et al., 2004	Rato	P1	36°C	0%	-	20 minutos		Diminuição da densidade celular no hipocampo.

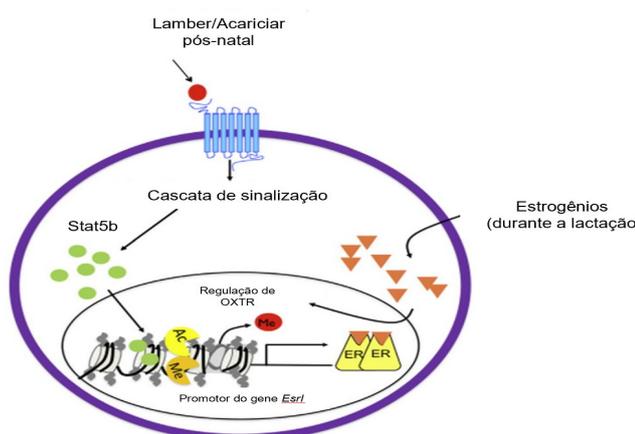
Pourie et al., 2006	Rato	P0,1	36°C	0%	-	5 minutos		Biomarcadores para morte celular não foram encontrados, neurogênese normal no hipocampo - leve retardo na migração de células
Zhang et al., 2013	Rato	P7	37°C	8%	-	2 horas		Aumento do peso parcial de água no encéfalo, funções nervosas danificadas
Takada et al., 2015	Rato	P1	37°C	0%	100%	25 minutos	Redução na aprendizagem do Labirinto Aquático de <i>Morris</i>	Aumenta marcação de TUNEL no hipocampo

Fonte: Helou, 2020. P = Dias Pós-parto, E = dias de prenhez, Temp. = Temperatura.

1.3 Neuroanatomia química do Comportamento Materno

O encéfalo materno é exposto à várias alterações plásticas que contribuem para atender as demandas da reprodução e sobrevivência da prole (PEREIRA; FERREIRA, 2016). Stolzenberg & Champagne (2016) discutem as alterações hormonais comuns durante a gestação e o período de lactação em ratas, como as flutuações nos níveis de estrogênio, progesterona, ocitocina e prolactina. Os pesquisadores mencionam alterações não hormonais relacionadas ao comportamento materno, como alterações na remodelação da cromatina no encéfalo materno (Figura 2).

Figura 2 – Modelo esquemático das alterações epigenéticas durante o período pós-natal.



Alterações epigenéticas induzidas pelo Comportamento Materno na Área pré-óptica medial. O aumento da expressão do comportamento de Lamber/Acariciar os filhotes estão associados ao aumento de Stat5b, que por sua vez, pode se ligar ao promotor do gene *Esrl* e promover alterações nas histonas. O aumento dos níveis de estrogênio durante a gravidez e lactação regula positivamente a sensibilidade de genes ER (i.e. Receptores de Ocitocina), diretamente proporcional ao comportamento materno. Ac – Grupos Acetil; ER – Receptores de Estrogênio; *Esrl* – Codificador de receptores de estrogênio alfa; Me – Grupos Metil; OXTR – Receptores de ocitocina (adaptado de Stolzenberg & Champagne, 2016).

A literatura estabelece que o substrato neural que subsidia os comportamentos parentais existentes em ambos os sexos é a área pré-óptica medial (APM)(STOLZENBERG; CHAMPAGNE, 2016). A APM tem sido considerada região chave de organização e controle neuroendócrino do CM (NUMAN, 1988a; NUMAN; STOLZENBERG, 2009b; KOHL et al., 2018; KOHL; DULAC, 2018). Nela são expressos receptores de hormônios fundamentais nessas funções, cujos neurônios são “reguladores” dos comportamentos direcionados a prole (KOHL et al., 2018; KOHL; DULAC, 2018). Modelos neurais sugerem que a APM regula respostas maternas pela inibição de respostas aversivas e de defesa, enquanto outros neurônios eferentes aumentam as respostas aos estímulos advindos da prole (STACK et al., 2002; OLAZÁBAL et al., 2004; NUMAN, 2006a; NUMAN; STOLZENBERG, 2009a; DULAC; O’CONNELL; WU, 2014; LIN; LI; LUO, 2018)(STACK et al., 2002; OLAZÁBAL et al., 2004; NUMAN, 2006b; NUMAN; STOLZENBERG, 2009a; DULAC; O’CONNELL; WU, 2014; LIN; LI; LUO, 2018; MARIANA PEREIRA A; *,).

A expressão de c-Fos, ou outros produtos de *immediate early genes*, são amplamente utilizados para identificação de atividade neural, o que faz desta técnica uma ferramenta útil para o estudo neuroendócrino e anatômico do encéfalo de ratas primíparas ou multíparas (HOFFMAN; SMITH; VERBALIS, 1993). NUMAN et al. (1998), ao comparar Fos-IR entre ratas nulíparas e primíparas, concluíram que a APM e Núcleo leito da estria terminal estão intimamente associados ao CM. O aumento da expressão de c-Fos e Fos-B é observado logo após a interação mãe-filhote e amamentação (STACK; NUMAN, 2000; STACK et al., 2002).

Fatores hormonais e neuropeptídicos da ocitocina (OT) agem no encéfalo durante o período próximo ao parto para deprimir circuitos neurais que possam promover a rejeição ao neonato, bem como estimulam circuitos neurais responsáveis pela atração e respostas pró sociais aos estímulos advindos da prole (OLAZÁBAL et al., 2013a; NUMAN; YOUNG, 2016). Uma das funções da ação do estradiol nos neurônios da APM é estimular a expressão de *OTR*, torna os neurônios dessa região – críticos para o desempenho do CM – sensíveis a ação da OT, atuam também na motivação maternal (NUMAN; STOLZENBERG, 2009a).

Para a análise das estruturas encefálicas relacionadas ao comportamento materno, foi elaborada a seguinte revisão (STACK et al., 2002; OLAZÁBAL et al., 2004; NUMAN; STOLZENBERG, 2009b; DULAC; O’CONNELL; WU, 2014; WU et al.,

2014; NUMAN; YOUNG, 2016; PEREIRA; FERREIRA, 2016; STOLZENBERG; CHAMPAGNE, 2016; LIN; LI; LUO, 2018):

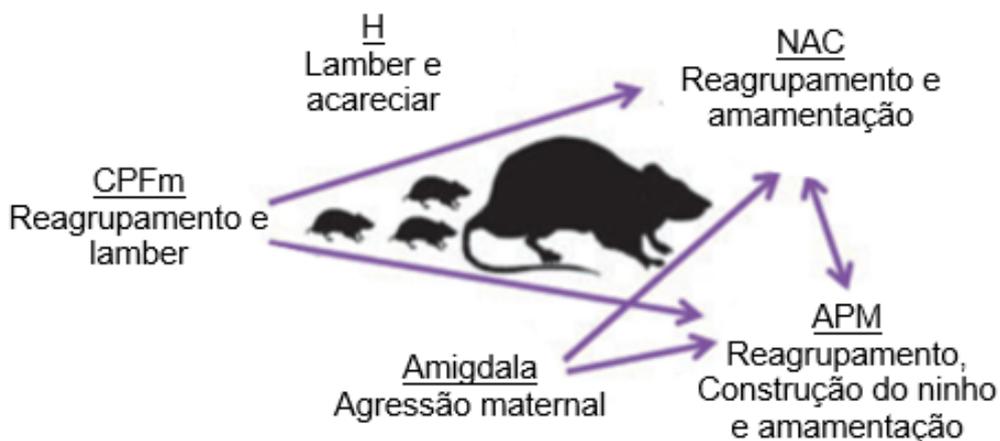
- A) Áreas olfatórias: O olfato é uma modalidade sensorial de singular importância para a regulação da interação mãe-filhote. Ratos com anosmia apresentam uma diminuição no lambar anogenital e reagrupamento dos filhotes. O órgão vomeronasal (OVN), quando removido, não afeta diretamente o reagrupamento, amamentação ou a construção do ninho, entretanto, reduz significativamente a agressão materna.
- B) Área Pré-Óptica medial: A APM é considerada o centro de controle do Comportamento materno. Esta área expressa receptores de hormônios fundamentais para a manutenção do comportamento materno, bem como há nela neurônios que são ativados durante os comportamentos direcionados a prole em ratos e camundongos. Lesões bilaterais nesta região interrompem os comportamentos de reagrupamento, construção de ninho, amamentação e agressão materna. Neurônios nas diferentes regiões da APM são ativados quando há exposição dos filhotes, e a estimulação dessa área é suficiente para ativar respostas maternas. Modelos neurais sugerem que a APM regula as respostas maternas: inibindo a aversão e respostas de defesa, enquanto outros neurônios eferentes aumentam as respostas maternas em relação a prole.
- C) Núcleo leito da estria terminal: O NLST, junto a APM, é considerado uma “super-região” para os comportamentos maternos. Lesões entre as conexões da APM e o NLST alteram diretamente o comportamento materno. O estímulo eletrofisiológico do NLST em ratas nulíparas aumenta drasticamente as respostas maternas quando comparadas à ratas controle. Em contraste ao comportamento materno, a agressão materna é provavelmente mediada via NLST pela presença de Ocitocina e Vasopresina.
- D) Amígdala: Em ratos, lesões ou a supressão da amígdala causa déficit no reagrupamento e amamentação. A região medial da amígdala – a qual recebe informações de feromônios do bulbo olfatório, se mostra crucial para a ativação normal da agressão materna. Sugere-se que a aversão aos

neonatos partilha de uma circuitaria comum entre os comportamentos de defesa.

- E) Nucleus accumbens e Área tegumentar ventral: Ambas as regiões apresentam relação positiva na regulação da atração relacionada aos estímulos advindos da prole, essenciais para o início da expressão dos comportamentos de reagrupamento e amamentação da prole. Lesões nessa região, causam redução nos comportamentos de reagrupamento, mas não alteram os comportamentos de lamber e construção do ninho.

Keller & Roth (2016), ao revisar as influências ambientais na epigenética e comportamento de ratas, apresentam as seguintes áreas encefálicas envolvidas com comportamento materno: Núcleo leito da estria terminal, Núcleo paraventricular, nucleus accumbens, córtex pré-frontal, área pré-óptica medial, amígdala e hipocampo (KELLER; ROTH, 2016)(figura 3).

Figura 3 - Neuroanatomia dos circuitos relacionados ao comportamento materno.

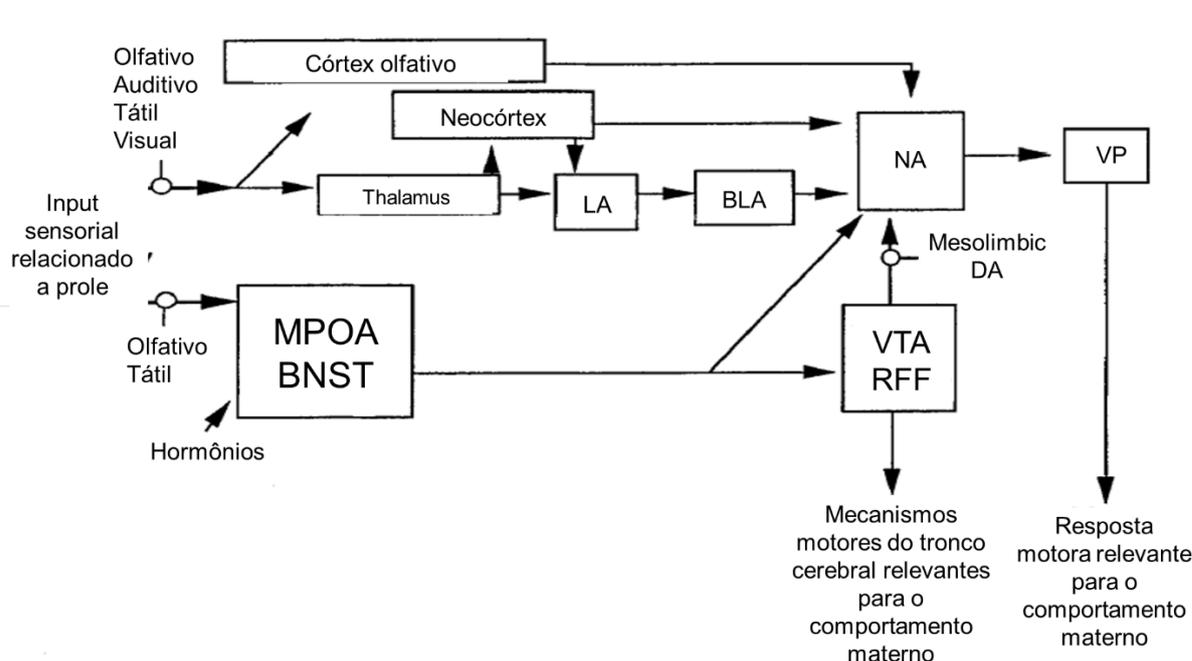


Neuroanatomia dos circuitos relacionados ao comportamento materno. A figura acima ilustra as áreas-chave que estão sujeitas a modulação epigenética por fatores ambientais referentes ao comportamento materno. As setas indicam – simplificada – as projeções dos circuitos encefálicos. Abreviações: NAC = Nucleus accumbens, H = Hipocampo, APM = Área medial pré-óptica, CPFm = Córtex pré-frontal medial (adaptada de Keller & Roth, 2016).

Estudos clássicos de lesões em modelos animais (ratos, camundongos, ratazanas) indicam a Área pré-óptica medial (APM), a porção ventral do núcleo leito da estria terminal (vNLST) e o Septo Lateral (SL) como regiões fundamentais para a regulação do comportamento materno (NUMAN; NUMAN, 1994; STACK; NUMAN, 2000; NUMAN; WOODSIDE, 2010). NUMAN & INSEL (2003) descrevem a neuroanatomia dos possíveis circuitos envolvidos na regulação da Motivação

Materna, com o intuito de descrever como os neurônios eferentes da APM e do vNLST para o *Nucleus accumbens* e a Área tegumentar ventral (ATv)/Campo retrorubral (CRR) podem influenciar na resposta materna (NUMAN & INSEL, 2003). Para o modelo neural hipotético, ver Figura 4.

Figura 4 – Modelo hipotético dos circuitos envolvidos com a motivação maternal.



Modelo neural explicando como a convergência da Área pré-óptica meidial (APM)/Núcleo leito ventral da estria terminal (vNLST) para o *Nucleus accumbens* (NA) pode regular a resposta materna relativa aos estímulos advindos da prole em ratos. A presença de projeções eferentes do NA para o *Pallidum Ventral* (PV) regula a ocorrência da proatividade voluntária das respostas aos estímulos relacionados a prole. Estímulos olfatórios, mecanoreceptivos, visuais e auditivos são capazes de alcançar o NA via conexões neurais provenientes do Tálamo, Neocórtex, Córtex olfatório, Amígdala lateral (AL), e Amígdala Basolateral (ABL). É proposto que tais aferências, por si, não são capazes de ativar as saídas do NA para VP. Entradas mecanoreceptivas, olfatórias, e hormonais são apresentadas estimulando neurônios MPA/vNLST; quando essa região é suficientemente ativada por tais estímulos, acredita-se que elas enviem projeções facilitadoras para o NA – tanto diretamente ou via Dopamina mesolímbica (DM) que se origina na área tegumentar ventral (ATV) e Campo retrorubral (CRR). É proposto que as aferências da MPA/vNLST para o NC permitem ele retransmitir os efeitos dos estímulos advindos da prole para VP – resposta materna. (Fonte: Numan & Insel, 2003).

1.4 Alterações decorrentes da AN e suas interações com o CM

O estresse (i.e. Anóxia) é um fator de risco para uma variedade de patologias (SAMAIYA et al., 2016). A manipulação da prole pelo experimentador, embora seja um procedimento rápido e de rotina, pode levar a alterações no comportamento direcionado a prole. Mães de filhotes manipulados tendem a passar mais tempo lambendo e acariciando a prole (FRANCIS; MEANEY, 1999). Como foi previamente

tratado e demonstrado em outros trabalhos (ver sessão 1.1), as mães constituem o primeiro elo entre o ambiente e a prole em desenvolvimento. Parece razoável que as variações da interação mãe-prole sejam de fundamental importância para o desenvolvimento dos neonatos.

O primeiro contato da prole ao nascer é feito com a mãe, de forma que ela se torna uma das principais influências sobre o desenvolvimento dos ratos recém-nascidos durante os primeiros dias de vida. Sendo assim, já foi observado que a qualidade do CM modifica o estado emocional do lactente, com efeito nas vocalizações dos filhotes (MYERS et al., 1989; HOFER; BRUNELLI; SHAIR, 1994). Estudos recentes descrevem as vocalizações dos filhotes no contexto de isolamento da mãe e do ninho, e mostram que a separação mãe-filhote é suficiente para estimular o neonato a vocalizações na frequência de 40 kHz, sendo este paradigma amplamente utilizado para induzir tais vocalizações da prole, o que induz a mãe a reagrupar o neonato (BOULANGER-BERTOLUS et al., 2017).

O agrupamento dos filhotes é necessário assim que eles saem do ninho a fim de garantir sua sobrevivência, e este comportamento é estimulado pelas vocalizações ultrassônicas dos mesmos (BRUNELLI et al., 2015). É evidente o fato de ratas primíparas direcionarem comportamentos maternos de maneira diferenciada em relação ao sexo da prole, como por exemplo, lambendo mais os filhotes machos (*anogenital licking*), já que isso auxilia no desenvolvimento e maturação sexual (masculinização) da região hipotalâmica desses indivíduos. A expressão diferenciada de comportamentos direcionados a prole têm efeitos que perduram ao longo de toda a vida no encéfalo e comportamento dos filhotes. Danos relacionados ao encéfalo, em humanos e ratos, podem resultar em comunicação deficiente (LAHVIS; ALLEVA; SCATTONI, 2011). A vocalização ultrassônica de roedores, variando em frequência e amplitude, informa à mãe as condições desses indivíduos, o que estimula o reagrupamento – faixa de 40 kHz, por exemplo os chamados de separação (*separation calls*) (PORTFORS, 2007; TANAKA et al., 2010; LAHVIS; ALLEVA; SCATTONI, 2011). Filhotes de P1 (dias pós-parto) à P4, nascem normalmente surdos e cegos, sua capacidade motora é reduzida, não apresentam pelos e não conseguem manter sua temperatura corpórea fora do ninho ficando indefesos (MOLTZ; BOBBINS, 1965; GLYNN; HOWLAND; FOX, 2018).

Alterações que acometem o sistema nervoso durante situações de anóxia podem decorrer de modificações fisiológicas e podem ser mediadas durante e após o parto, mas, também por variações nos comportamentos direcionados à prole (LV et al., 2015). Existem semelhanças entre as alterações que ocorrem no sistema nervoso durante eventos de anóxia neonatal e aquelas decorrentes de variações no comportamento materno, o que reforça a hipótese de que alterações consequentes da anóxia podem ser moduladas por variações no comportamento materno (VASCONCELOS, 2013).

Posto que a negligência materna impacta negativamente o desenvolvimento da prole, o presente estudo propõe avaliar as alterações no CM de ratas primíparas cuja prole foi submetida a AN em comparação a ratas primíparas de proles controle, pela quantificação em vídeo do CM e registro das VU da prole, com intuito de testar a hipótese de que alterações consequentes da AN na prole podem modular variações no CM, o que pode constituir agravante para esta condição.

2. OBJETIVOS

Avaliar a hipótese de que os efeitos deletérios da anóxia neonatal na prole modulam negativamente o comportamento materno, o que conseqüentemente pode incrementar os efeitos da injúria neonatal.

2.1 Objetivos específicos:

1. Quantificar, por registro em vídeo, o CM de ratas primíparas cuja prole foi submetida a AN em comparação aos respectivos controles (P2-P16);
2. Avaliar alterações da vocalização ultrassônica (duração média, total e quantidade) na frequência de 40 kHz (chamados de separação) da prole anóxia e controle, bem como avaliar eventual diferença de sexo (P3-P18);
3. Avaliar a evolução ponderal da prole anóxia em relação a prole controle, e comparar ambos os sexos (P2-P21; P30, P40, P50, P60 e P70);
4. Avaliar a atividade neural (c-Fos-IR) e a densidade de neurônios maduros (NeuN-IR) na APM das ratas primíparas logo após o desmame (P21) e comparar os grupos anóxia e controle;

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Animais e Grupos Experimentais

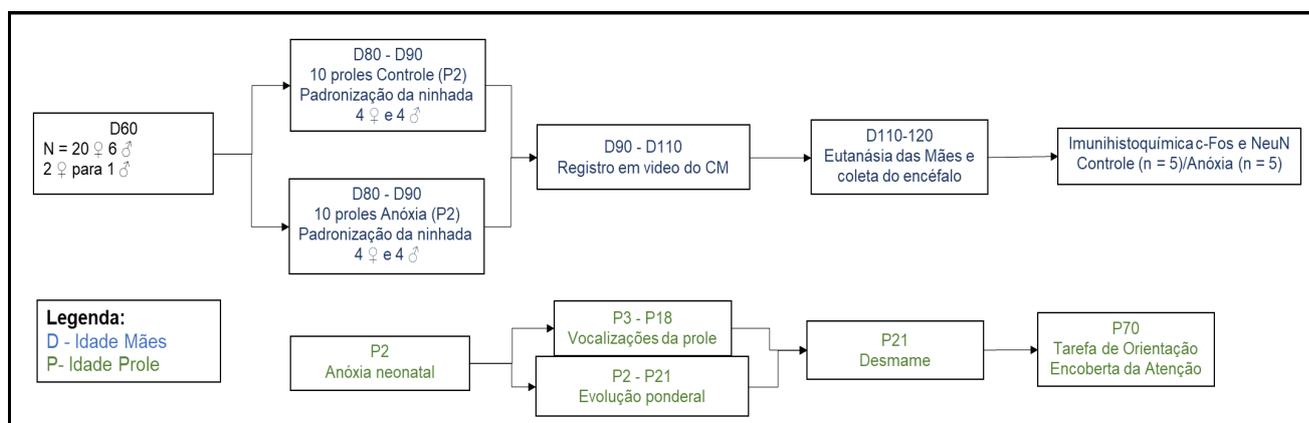
Rattus norvegicus, linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios) foram mantidos no Biotério de experimentação do ICB III (Departamento de Anatomia) e utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA-ICB, protocolo 4372270918, e normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Para a avaliação do comportamento materno, foram utilizadas 20 ratas nulíparas em P60 (P = dias pós-parto) e quatro (4) machos sexualmente experientes. Todas as fêmeas foram submetidas ao processo de acasalamento, pelo método de harem – 1 macho sexualmente experiente para 2 fêmeas. Para o acasalamento, foi determinado a fase do ciclo estral (Mascondes et al., 2002), sendo as fêmeas alocadas junto aos machos em diestro.

As proles foram divididas em dois grupos: 10 proles submetidas a anóxia neonatal (Grupo Anóxia), e 10 proles controles (Grupo Controle). A padronização da prole foi devidamente realizada ao manter a proporção de 4 machos e 4 fêmeas por mãe, bem como procedimentos para evitar o efeito de ninhada.

Foram utilizados 5 lotes de experimentos com 4 fêmeas cada, distribuídos ao longo de 15 meses, intervalo de 3 meses entre eles, totalizando 10 mães por grupo experimental, conforme desenho experimental a seguir (Figura 5):

Figura 5 - Desenho Experimental.



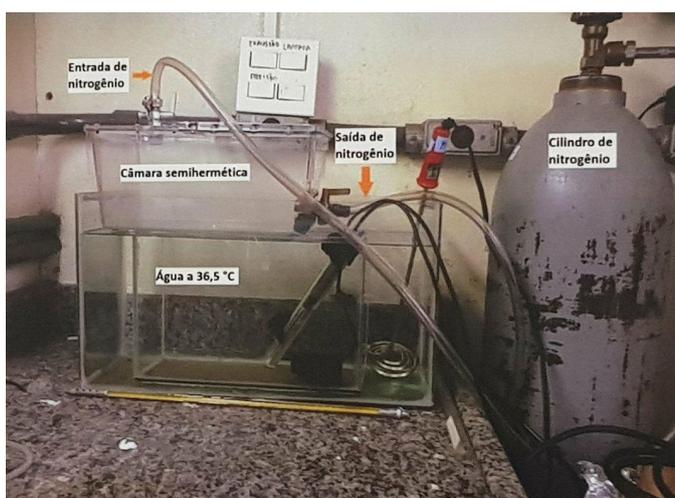
Desenho experimental esquemático da prática da pesquisa. Fonte: Helou, 2020.

3.2 Anóxia Neonatal

A exposição dos filhotes à anóxia em P2 foi realizada com o sistema adaptado e validado por Takada et al. (2011), constituído por câmara semi-hermética de policarbonato (31 x 14 x 19,5 cm), com entrada e saída de gás acoplada a manômetro, fluxômetro e um cilindro de nitrogênio gasoso. Com o objetivo de evitar hipotermia e potencializar os efeitos da anóxia, a temperatura da câmara foi mantida entre 35 e 37°C pela imersão parcial da mesma em água aquecida por resistência elétrica (Figura 6).

A câmara foi previamente higienizada com álcool 70% (entre uma ninhada e outra este procedimento foi repetido), saturada completamente com nitrogênio 100% em fluxo de 3 L/minuto e pressão próxima à pressão atmosférica (101,7 kPa) sob controle de um manômetro acoplado ao sistema. Os animais foram alocados rapidamente na câmara, por 25 minutos nestas condições e posteriormente reanimados (tempo de anóxia avaliado para que o índice de mortalidade fosse inferior a 10% Takada et al, 2011). O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento, entretanto, exposto apenas ao ar ambiente. Por fim, os indivíduos foram devolvidos às respectivas mães, momento em que foi iniciado o registro em vídeo dos comportamentos direcionados à prole.

Figura 6 – Sistema do modelo de Anóxia Neonatal.



Sistema do modelo de Anóxia Neonatal contendo cilindro de nitrogênio acoplado a câmara semihermética. A câmara semihermética está parcialmente imersa em água aquecida a 36,5°C. Fonte: Takada et al., 2011.

3.3 Avaliação do Comportamento Materno

O protocolo utilizado para a quantificação do CM foi estruturado e adaptado baseado em revisão da literatura (ANEXO A).

No primeiro dia de registro do CM, 4 animais (2 machos e 2 fêmeas) foram submetidos ao estímulo anóxico, e outros 4 animais foram mantidos com a mãe em gaiola experimental, para habituação, durante 25 minutos. Após insulto, os animais que estavam com a mãe foram retirados para serem submetidos à anóxia, enquanto os animais anoxiados foram devolvidos à mãe para iniciar o primeiro registro em vídeo (25 minutos). Após este período, os demais animais foram devolvidos à mãe, dando continuidade ao registro do CM por mais 30 minutos com oito filhotes (4 machos e 4 fêmeas). Os indivíduos do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento.

A gaiola experimental para observação do CM consiste em material de acrílico para visualização e registro em vídeo dos comportamentos maternos (Figura 7 - A). O registro de vídeo foi realizado de P2 à P16, durante 30 minutos, nos períodos: matutino (06h00-08h00) e noturno (18h00-20h00), com exceção ao primeiro dia de registro. Todos os filhotes foram avaliados diariamente. Durante os registros noturnos, foi utilizada iluminação infravermelha - permite o registro dos comportamentos sem alterar o ciclo claro/escuro dos animais (Figura 7 - B). Adaptado de CAPONE et al. (2005).

Figura 7 - Gaiola experimental para os registros do comportamento materno.



A. Período matutino (06h00 – 08h00). **B.** Período noturno (18h00 – 20h00), iluminação infravermelha. Em ambos períodos os filhotes estão próximos a mãe. Fonte: HELOU, 2019.

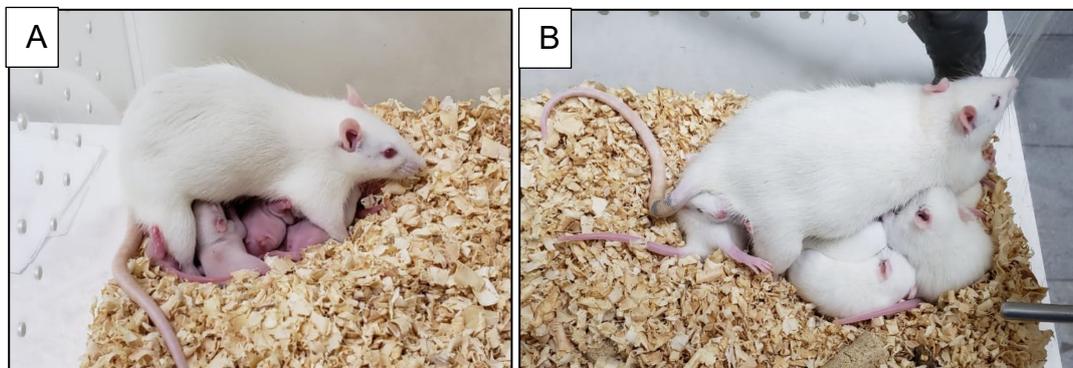
3.3.1 Descrição dos comportamentos maternos avaliados

a) Primeiro agrupamento: a mãe recolhe o filhote pela pele na região dorsal com seus incisivos e o carrega para o ninho. Foi registrada a Latência para início do comportamento;

b) Agrupamento total: a mãe agrupa todos os filhotes, agarrando-os com a boca pela pele na região dorsal com seus incisivos e os carrega até o ninho. Foi registrado o tempo total em segundos para agrupar todos os filhotes;

c) Amamentação total: Os comportamentos de amamentação foram agrupados para efeito amostral e quantificados em tempo (segundos) de amamentação total. Os comportamentos de amamentação são: Amamentação com a coluna arqueada – mãe permanece imóvel em posição de cifose (Figura 8 – A); Amamentação Passiva - Mãe deitada de lado amamenta um ou mais filhotes; e Amamentação-Cobertor, Mãe deitada sobre a prole, relativamente imóvel (Figura 8 – B);

Figura 8 – Comportamento: Amamentação.



A. Amamentação com a coluna arqueada (cifose), filhotes em P7. **B.** Amamentação-Cobertor (mãe deitada sobre a prole), filhotes em P18. Fonte: HELOU, 2019.

d) Lamber/Acariciar: Lamber e acariciar o filhote. Nesse comportamento foi quantificada a sua duração total em segundos (Figura 9);

Figura 9 – Comportamento: Lamber/Acariciar.



Comportamento de lamber/acariciar, filhotes em P3. Fonte: HELOU, 2019.

e) Foram quantificados também os comportamentos das mães não dirigidos diretamente a prole em relação a sua duração total em segundo, tais como: Comer; Beber, Auto Limpeza (*Self-grooming*) e Exploração fora do ninho. Apenas o comportamento de *self-grooming* foi observado em todos os registros.

3.4 Avaliação da Evolução Ponderal

Durante a lactação (P2-P21), a prole foi pesada diariamente durante o período matutino (07h00-09h00) em balança digital a fim de comparar os seguintes grupos: Macho Controle (MC), Macho Anóxia (MA), Fêmea Controle (FC) e Fêmea Anóxia (FA). Estes animais também foram pesados em P30, P40, P50, P60 e P70 para avaliar o ganho de peso corporal a médio-prazo.

3.5 Registro da Vocalização da Prole

Para a quantificação dos Chamados de Separação - 40kHz -, de P3 à P18, duas (2) fêmeas e dois (2) machos foram selecionados diariamente - não simultaneamente -, separados da genetriz e alocados isoladamente em gaiola experimental (15 x 10 x 15 cm) para o início do registro das vocalizações. O registro das vocalizações teve duração de 300 segundos por dia, todos os dias, período matutino (06h00-09h00). Para a captação das vocalizações ultrassônicas, foi utilizado

o microfone M500-384 USB (Petterson Elektronik®) (Figura 10 – A), ajustado para registrar o número de ocorrências, tempo médio e total das vocalizações ultrassônicas (VU) na frequência de 40 kHz, posicionado à 7 cm acima do animal. Para processar os dados registrados, foi utilizado o software BatSound Software® (versão 4.4) (Figura 10 - B). O valor médio da quantidade, tempo médio e tempo total das vocalizações na frequência de 40 kHz/300s foi quantificado para comparar os grupos experimentais MC, MA, FC e FA (n = 20, por grupo). Protocolo Adaptado de BRANCHI et al. (2006).

Figura 10 – Microfone e Interface do software usado no registro das vocalizações.

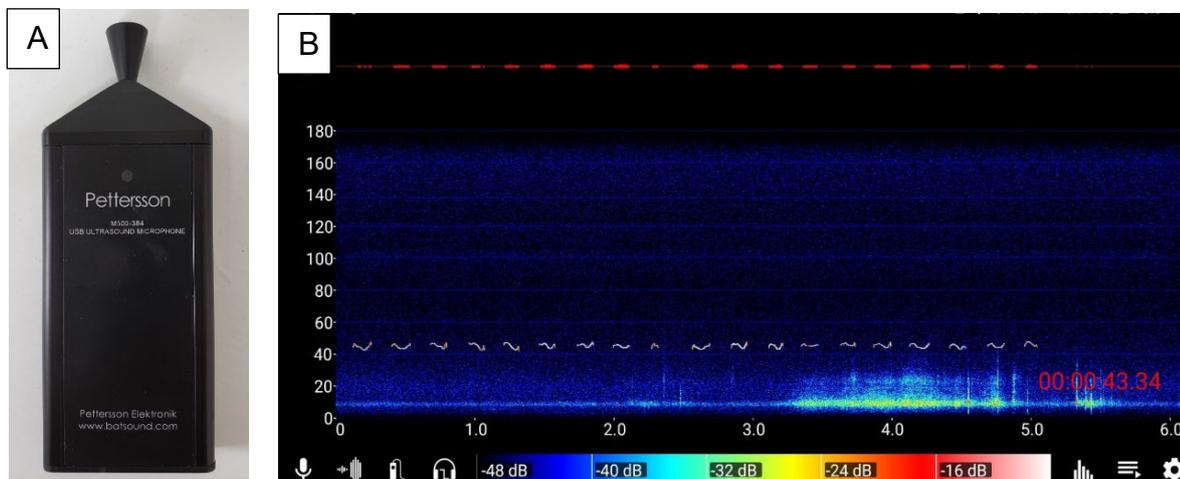


Figura 10 – A. Microfone M500-384 USB. B. Interface do software BatSound Software®^K, animal: Macho Controle – P5, frequência de 40 kHz. Fonte: HELOU, 2019.

3.6 Eutanásia, Perfusão e Coleta do Material Biológico

Para realizar eutanásia das mães, 70 minutos após o desmame (P21), foi respeitado o tempo para a expressão da proteína Fos (aproximadamente 90 minutos), as fêmeas foram profundamente anestesiadas – injeção intraperitoneal de Xilazina (10mg/kg) e Ketamina (60 mg/kg), 30 minutos antes da injeção dos anestésicos, foi administrado o pré-anestésico acepromazina (2,5 mg/kg) para reduzir o estresse do animal. Quando a anestesia atinge profundamente o indivíduo e o mesmo não apresenta mais os reflexos patelar e palpebral, é dado o início da cirurgia de perfusão transcardíaca. Após serem perfundidos com solução salina 9% para a limpeza do leito vascular, é feita a fixação dos tecidos em formaldeído 4% (em buffer PBS 0,1 M, pH 7,4, 4°C). Em seguida, os encéfalos foram coletados e pós-fixados na mesma solução

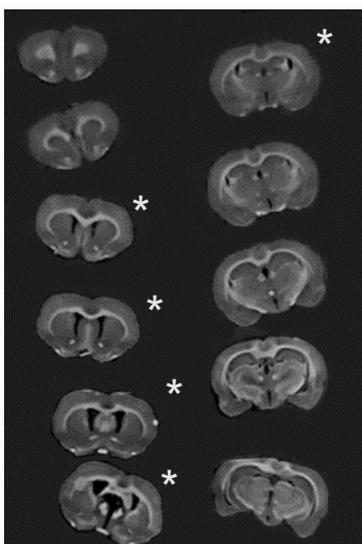
de fixação *overnight*, posteriormente crioprotégido em solução de 30% sacarose em PBS 0,1 M (*phosphate buffer saline*) até serem seccionados.

Os encéfalos foram seccionados em micrótomo de congelamento (Leica®, modelo: SM 2000 R) em cortes coronais de 40 µm de espessura (Interneural 9.12 mm, Bregma 0.12 mm à Interneural 8.88, Bregma -0,12). Estes foram coletados e conservados em solução anticongelante (PBS, Sacarose e Etilenoglicol) em placa acrílica com 6 séries de 5 compartimentos, de forma que a distância entre cada corte de uma mesma série foi de 200 µm.

3.7 Coloração em Nissl

Para coloração de Nissl foi utilizada uma série por animal (Figura 11). Ao início da coloração, os cortes previamente montados em lâminas gelatinizadas foram desidratados em série alcoólica crescente (50%, 70%, 95% - I, 95% - II; 3 minutos cada), diafanizados em Xilol (Xilol – I, 5 minutos; Xilol – II, 10 minutos), e novamente hidratados em série alcoólica decrescente. Em seguida, as lâminas foram imersas em Tionina (0,25%) para a coloração (aproximadamente 30 segundos), novamente desidratadas, diafanizadas, e, por fim, as lamínulas foram montadas às lâminas com DPX (Sigma-Aldrich® Inc., UK) como meio de montagem.

Figura 11 – Série de cortes, cortes selecionados.



Série de cortes de 200 µm de distância entre os cortes. Área de interesse: área pré-óptica medial. Aproximadamente Interneural 9.12 mm, Bregma 0.12 mm à Interneural 8.88, Bregma -0,12 (PAXINOS & WATSON, 2007). *Cortes selecionados. Fonte: HELOU, 2019.

3.8 Imuno-histoquímica: FOS-IR para atividade neural e NeuN- IR para densidade de neurônios na APM

Para cada reação de imuno-histoquímica, foram selecionadas uma série dos cortes de encéfalo por animal, conforme protocolo usual do laboratório.

Inicialmente, os cortes foram lavados seis (6) vezes durante 5 minutos em PBS 0,1 M, em seguida incubados em água oxigenada (H₂O₂) e triton X-100 (0,3%) por 5 minutos, para inibir a peroxidase endógena e abrir poros na membrana celular. Repetidas as lavagens em PBS 0,1 M, os cortes foram incubados por 1 hora em solução de PBS 0,1 M, Triton X-100 (0,3%) e Soro de Cabra Biotinilado (NGS, 30:1000). Em seguida, foi feita a incubação no anticorpo primário anti-Fos (1:3000, ABE457, lote: 2987437) ou anti-NeuN (1:1000, MAB377, lote: 1991263) por 48 horas.

Passadas as 48 horas, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M e incubados em anticorpo secundário biotinilado (1:200, Biotilynated Anti-Rabbit IgG, lote: Y0515 e 1:200, Biotilynated Anti-Mouse, c-Fos e NeuN, respectivamente), por 90 minutos e em seguida novamente lavados e incubados em solução avidina-biotina por 90 minutos.

O complexo antígeno-anticorpo foi evidenciado pela incubação dos cortes em DAB (0,5%) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), durante 3 minutos, e posterior adição de H₂O₂ 0,01% até apresentar coloração acastanhada, tempo controlado visualmente pelo experimentador, em geral em torno de 1 a 10 min. Por fim, os cortes foram novamente lavados em PBS 0,1 M (6x/5minutos), montados em lâminas gelatinizadas, desidratados e cobertos com lamínulas e DPX (Sigma-Aldrich® Inc., UK) como meio de montagem.

3.9 Análise Estereológica

Com auxílio de microscópio de campo claro (E-1000 Nikon Eclipse Corporation) e câmera digital acoplada a computador, com aumento de 10x foram obtidas as imagens a serem analisadas. A quantidade de células c-Fos-IR e NeuN-IR foram avaliadas pela estereologia utilizando o programa ImageJ® (National Institute of Health), a região de interesse (APM) foi delimitada com auxílio de atlas estereotático (PAXINOS & WATSON, 2007) e de uma série corada com tionina, método de Nissl. A análise foi realizada em 5 animais por grupo experimental, com ao menos 5 cortes

seriados por animal. Todas as células imunorreativas com coloração marrom escuro foram consideradas.

Foram definidos os parâmetros a serem utilizados na amostragem: largura e área do quadro de contagem, estimativa da área e volume total da estrutura a ser analisada e distância de segurança. As células quantificadas foram aquelas localizadas dentro do quadro de contagem, ou tangenciadas pelas bordas superior e/ou direita do quadrado (margens toleradas), exceção para aquelas tangenciadas pelas bordas inferior e/ou esquerda (margens não-toleradas). Análise binária manual adaptada de ZHAO & LI (2010). Os valores de 5 animais de cada grupo experimental foram utilizados para obter a média e erro padrão da amostragem (Controle x Anóxia). Região delimitada para escolha dos cortes: Interneural 9.12 mm, Bregma 0.12 mm à Interneural 8.88, Bregma -0,12.

3.10 Análise Estatística

A análise estatística para os dados paramétricos foi realizada por Análise de Variância para Medidas Repetidas (ANOVA) de duas vias, pós-teste *Tukey's* para comparação entre os grupos. Para análise de dados não-paramétricos, foi utilizado o Teste T não pareado, correção para análises múltiplas: *Sidak-Bonferroni*. As diferenças foram consideradas significativas dentro do intervalo de confiança de 95%, ou seja, $p < 0,05$. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa STATISTICA 12.0 (StatSoft®) e o *GraphPad® Prism Software, Inc*, versão 8.4.2 para confecção dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Comportamento Materno

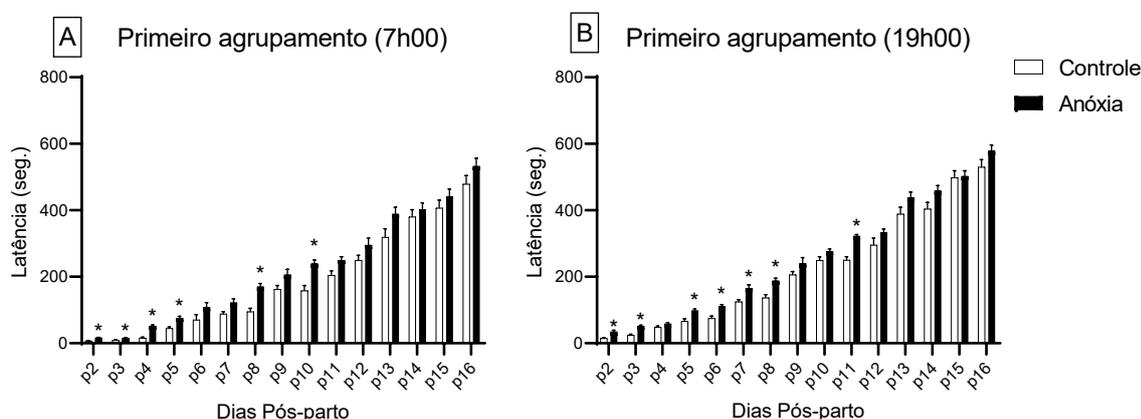
Os parâmetros analisados apresentaram diferenças entre mães do grupo anóxia e controle, bem como houve diferença entre os períodos de ciclo claro e escuro, entretanto, os resultados não se repetiram todos os dias. Para detalhes dos

resultados significativos das análises estatísticas, ver ANEXO B. Para comparações entre os período matutino e noturno, ver ANEXO C.

4.1.1 Primeiro agrupamento

Ratas primíparas cuja prole foi submetida a anóxia neonatal (Grupo Anóxia) apresentaram aumento na latência para iniciar o agrupamento da prole. No período matutino (7h00), foi possível observar aumento significativo em P2, P3, P4, P5, P8 e P10 ($p < 0,05$) (Figura 12 - A). No período noturno (19h00), esse aumento significativo do grupo Anóxia se repetiu em P2, P3, P5, P6, P7, P8 e P11 ($p < 0,05$) (Figura 12- B).

Figura 12 – Primeiro agrupamento.

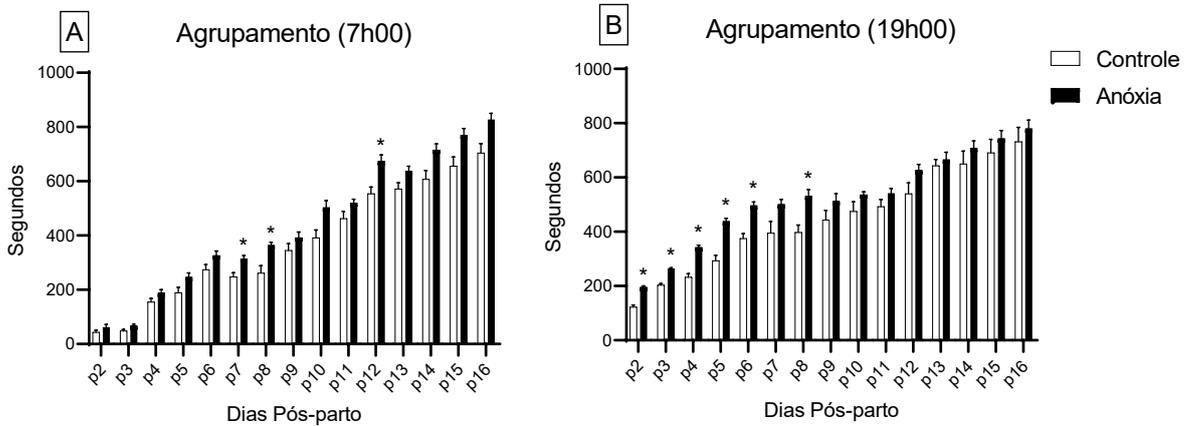


Latência para o início do reagrupamento da prole. **A.** Período Matutino (7h00). **B.** Período Noturno (19h00). Os dados estão representados como média \pm EPM. Teste T não-pareado, pós-teste *Sidak-Bonferroni*. * $p < 0,05$. $n = 10$ por grupo experimental.

4.1.2 Agrupamento total

Neste parâmetro, foi quantificado o tempo total para agrupar todos os filhotes. Primíparas do grupo anóxia apresentaram aumento do tempo para realizar o agrupamento total da prole no período matutino (7h00) em P7, P8 e P12 ($p < 0,05$) (Figura 13 – A). No período noturno (19h00), este aumento do grupo anóxia se repetiu em P2, P3, P4, P5, P6 e P8 ($p < 0,05$) (Figura 13 12 – B).

Figura 13 – Agrupamento total.

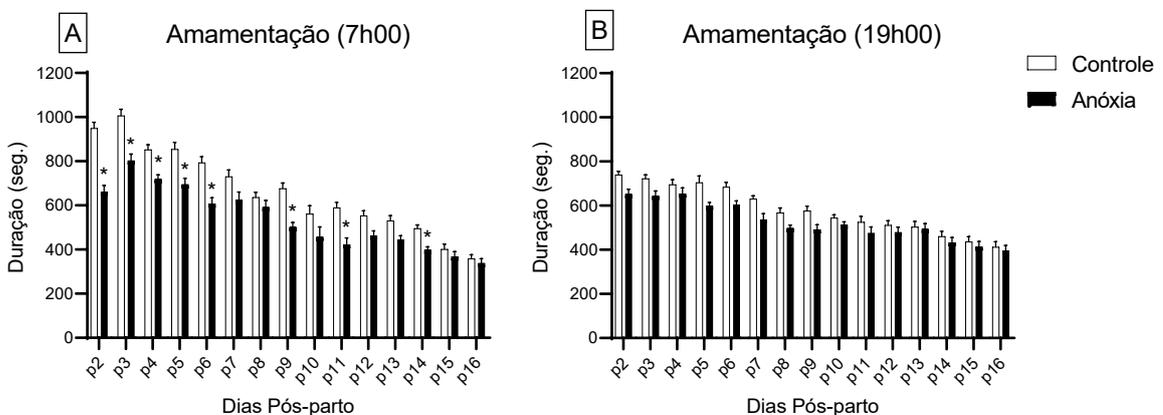


Tempo total em segundos para agrupar todos os filhotes. **A.** Período Matutino (7h00). **B.** Período Noturno (19h00). Os dados estão representados como média \pm EPM. Teste T não-pareado, pós-teste *Sidak-Bonferroni*. * $p < 0,05$. $n = 10$ por grupo experimental.

4.1.3 Amamentação

Primíparas do grupo anóxia apresentaram redução no tempo total de amamentação no período matutino (7h00) em P2, P3, P4, P5, P6, P9, P11 e P14 ($p < 0,05$) (Figura 14 - A). No período noturno (19h00), esta redução não se repete (Figura 14 - B), embora haja uma redução no tempo de amamentação no período noturno em ambos os grupos (Controle e Anóxia).

Figura 14 – Amamentação.

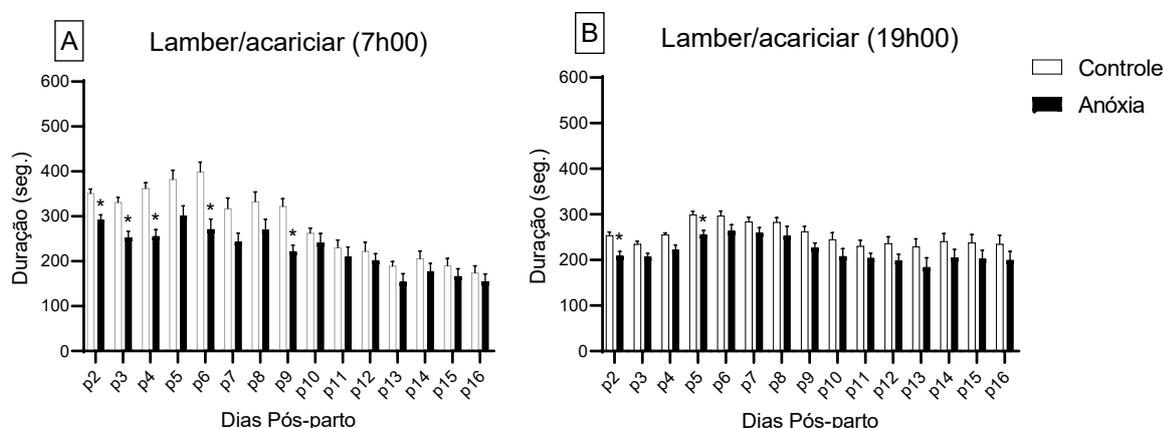


Amamentação, tempo total em segundos de. **A.** Período Matutino (7h00). **B.** Período Noturno (19h00). Os dados estão representados como média \pm EPM. Teste T não-pareado, pós-teste *Sidak-Bonferroni*. * $p < 0,05$. $n = 10$ por grupo experimental.

4.1.4 Lamber/Acariciar

Quanto ao comportamento de lamber e acariciar a prole, primíparas do grupo anóxia apresentaram redução no tempo total deste comportamento no período matutino (7h00) em P2, P3, P4, P6 e P9 ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 15 - A). No período noturno (19h00), o efeito se repete em P2 e P5 ($p < 0,05$) (Figura 15 – B).

Figura 15 – Comportamento materno: Lamber/acariciar.

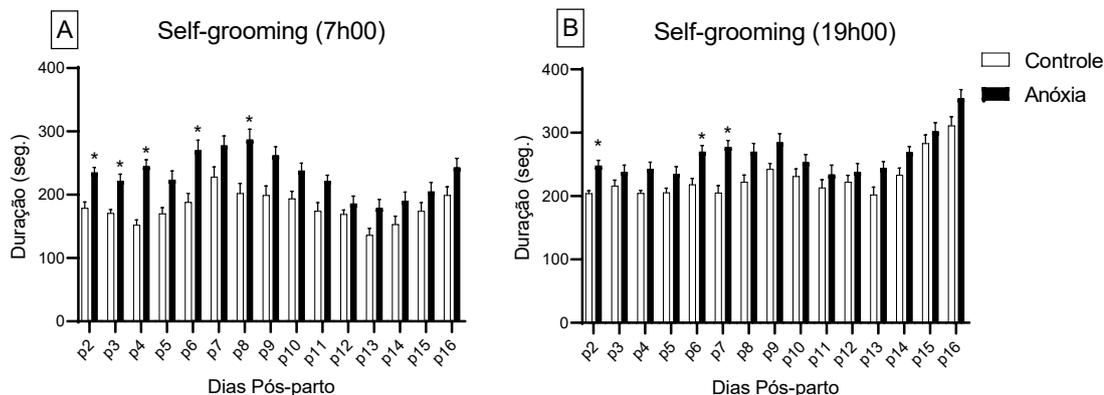


Tempo total em segundos do comportamento de lamber/acariciar **A**. Período Matutino (7h00). **B**. Período Noturno (19h00). Os dados representados em média \pm EPM. Teste T não-pareado, pós-teste *Sidak-Bonferroni*. * $p < 0,05$. $n = 10$ por grupo experimental.

4.1.5 Self-grooming

No período matutino (7h00), primíparas do grupo anóxia apresentaram aumento no tempo total neste comportamento em P2, P3, P4, P6 e p8 ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 16 - A). No período noturno (19h00), o efeito se repete em P2, P4, P5, P6 e P7 ($p < 0,05$) (Figura 16 – B).

Figura 16 – Comportamento materno: Self-grooming.

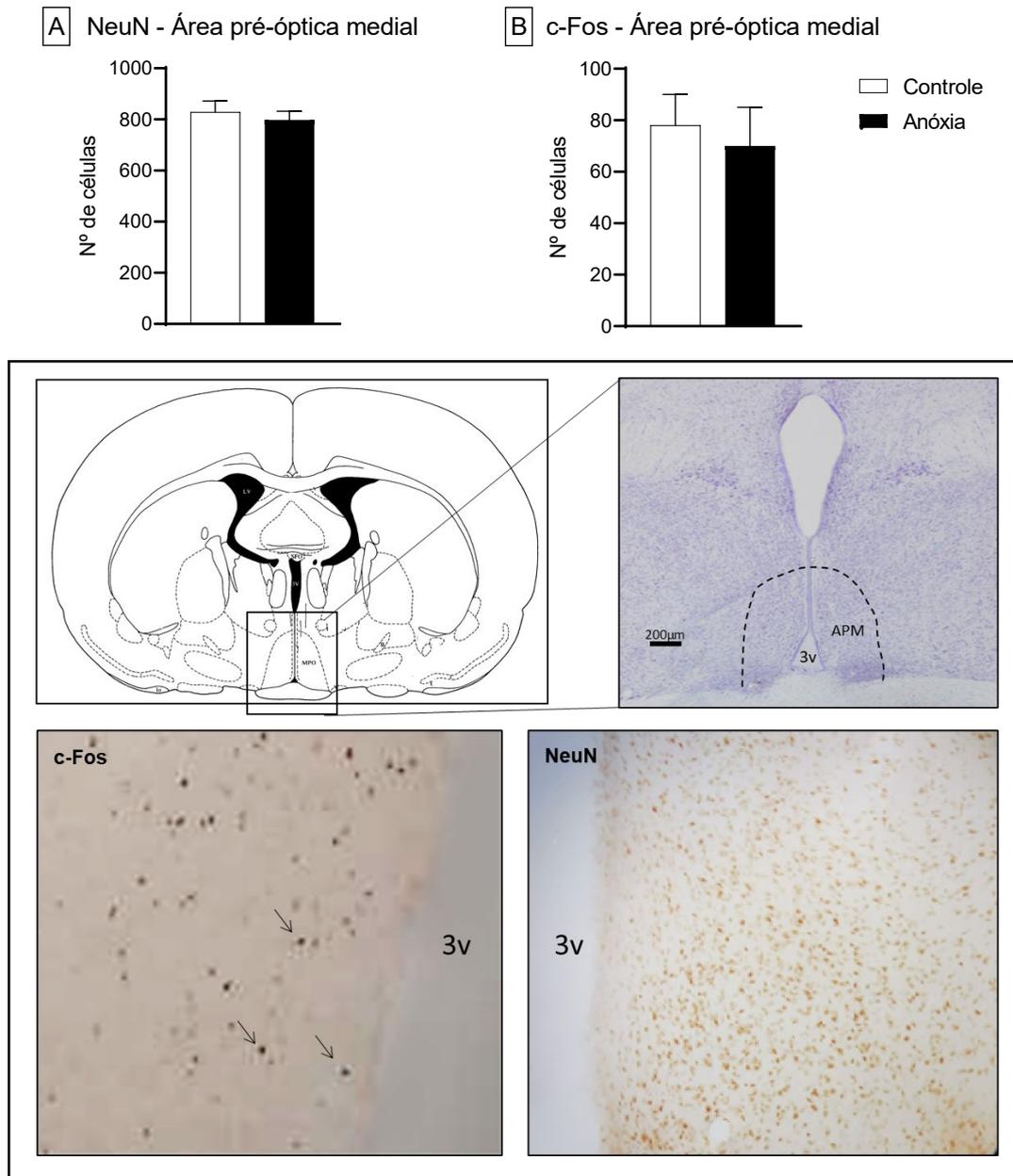


Tempo total em segundos do comportamento de *Self-grooming*. **A.** Período Matutino (7h00). **B.** Período Noturno (19h00). Os dados representados em média \pm EPM. Teste T não-pareado, pós-teste *Sidak-Bonferroni*. * $p < 0,05$. $n = 10$ por grupo experimental.

4.2 Área pré-óptica medial – c-Fos e NeuN

Embora tenha sido possível observar diferenças a nível comportamental das ratas primíparas, não foi possível observar diferença na contagem de neurônios marcados por NeuN-IR [$t(18) = 1,79$, $p > 0,05$] (Figura 17 - A) e c-Fos-IR [$t(18) = 1,31$, $p > 0,05$] (Figura 17 - B) na área pré-óptica medial (APM) das fêmeas primíparas, cujo encéfalo foi coletado quando a prole atingiu P21.

Figura 17 – Quantificação de neurônios NeuN-IR e c-Fos na APM.

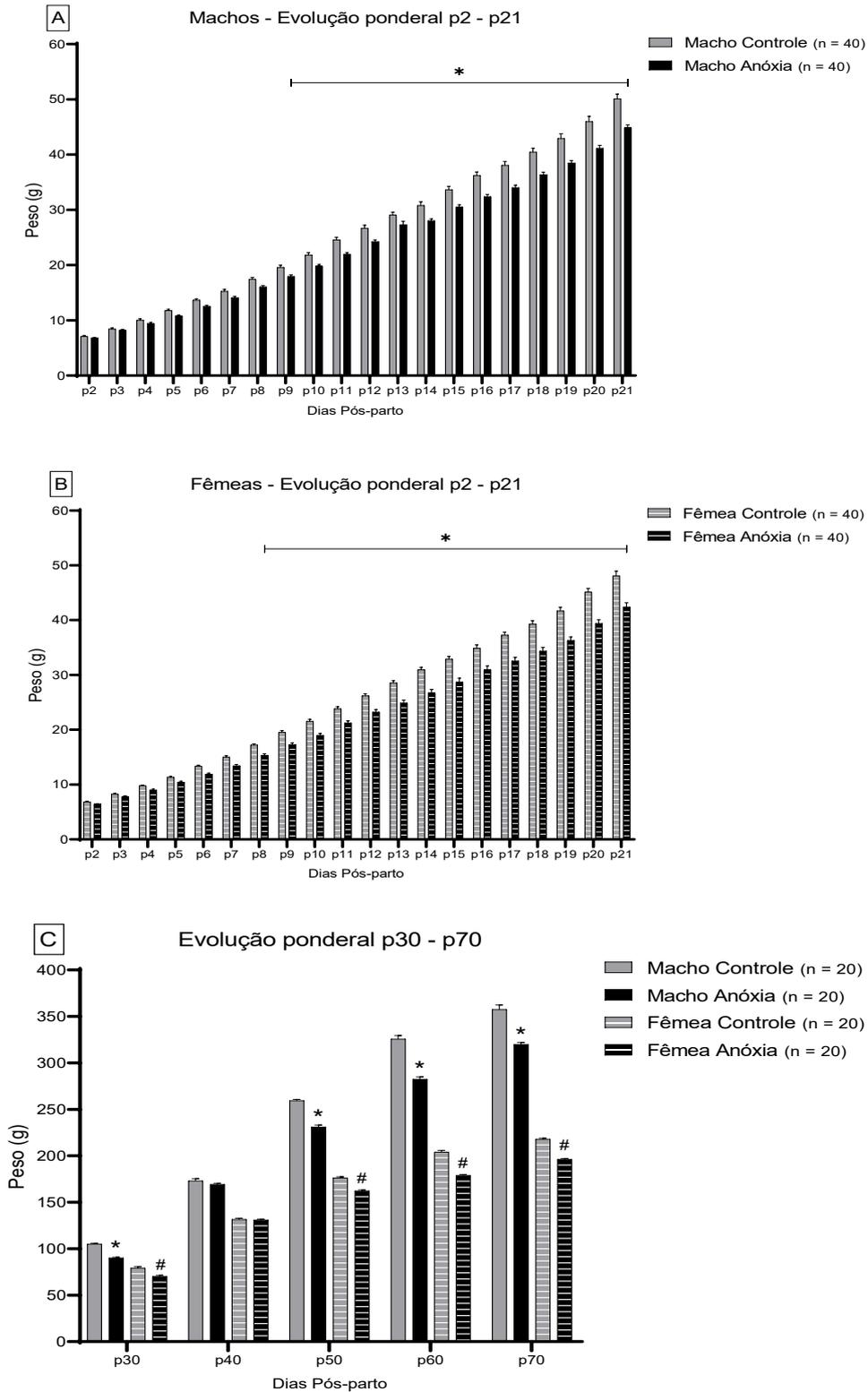


4.3 Alterações na prole

4.3.1 Evolução ponderal

Em relação ao desenvolvimento da prole de P2 até P21, é possível observar redução do peso corporal a partir de P10 no grupo MA em comparação ao grupo MC ($p < 0,05$) (Figura 18 – A). De P8 em diante, o grupo FA apresentou redução no peso corporal quando comparado ao FC ($p < 0,05$) (Figura 18 - B) [Grupo: $F(3, 3120) = 273,0$, $p < 0,0001$; Idade: $F(19, 3120) = 2957$, $p < 0,0001$; Interação: $F(57,3120) = 5,149$, $p < 0,0001$]. A partir de P15, o grupo CM apresentou o peso corporal mais elevado quando comparado ao grupo CF ($p < 0,05$). Em P30, P50, P60 e P70, houve diferença entre os grupos Controle e Anóxia, em ambos os sexos [Grupo: $F(3, 780) = 2887$, $p < 0,0001$; Idade: $F(4, 480) = 6260$, $p < 0,0001$; Interação: $F(12, 780) = 213,2$, $p < 0,0001$] – indivíduos do grupo Anóxia apresentam peso corporal inferior ao grupo Controle (Figura 18 - C).

Figura 18 – Evolução ponderal.

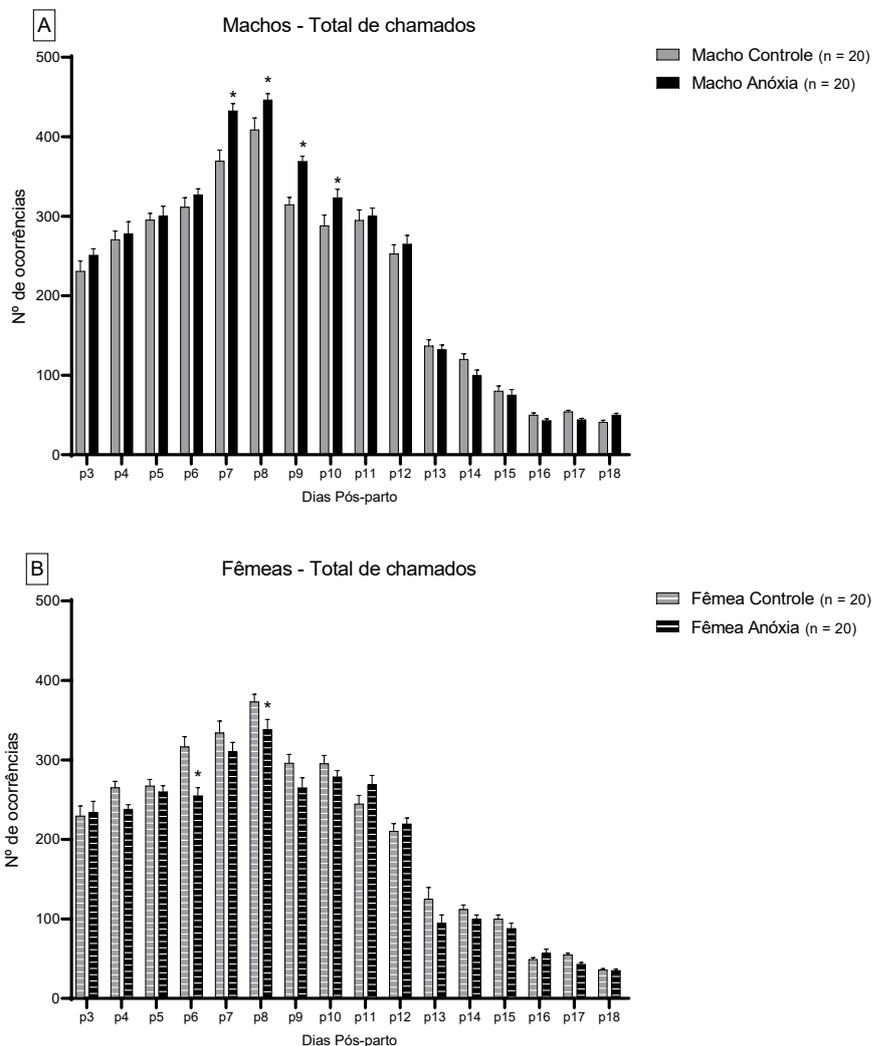


Peso corporal (gramas) da prole durante o período de lactação (P2-P21) em **A.** machos e **B.** fêmeas. **C.** Evolução ponderal P30 – P70. Os dados estão representados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias, *post-hoc Tukey*. * $p < 0,05$, MC x MA; # FC x FA

4.3.2 Vocalização ultrassônica da prole

Em relação ao número total de ocorrências VUS na frequência de 40 kHz/300 segundos, é possível observar aumento no grupo MA em comparação ao grupo MC em P7, P8, P9 e P10 ($p > 0,05$) (Figura 19 – A). O contrário foi observado no grupo FA em comparação ao grupo FC em P6 e P8 ($p < 0,05$) (Figura 19 – B).

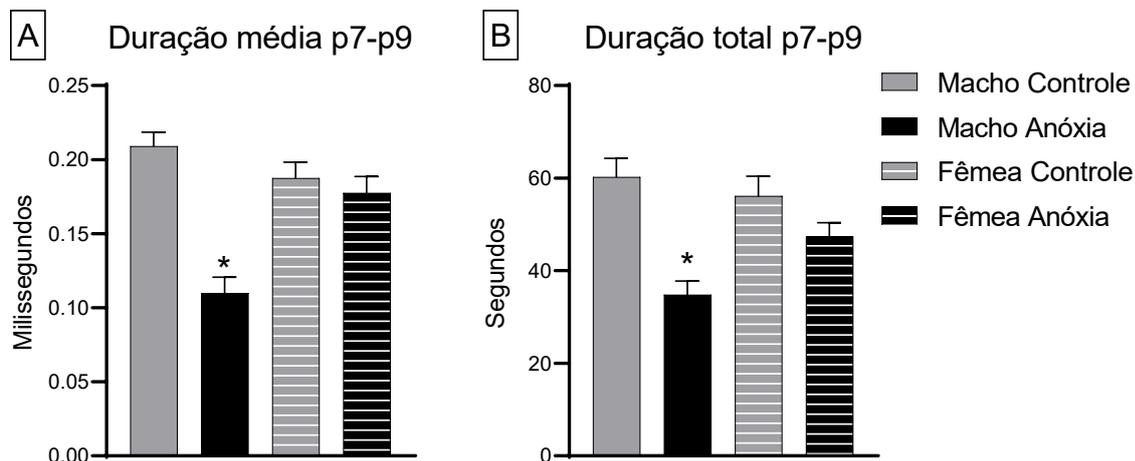
Figura 19 – Total de chamados (40 kHz).



Quantidade de eventos registrados da vocalização ultrassônica dos filhotes (40 kHz) ao longo do período de amamentação (P3-P18), 300 segundos de quantificações diárias. **A.** Machos. **B.** Fêmeas. Considerando tanto sexo, como tratamento para análises estatísticas. Os dados estão representados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias, *post-hoc Tukey*. * $p < 0,05$. Grupo: $F(3, 2496) = 56,37$, $p < 0,0001$; Idade: $F(15, 2496) = 646,0$, $p < 0,0001$; Interação: $F(3, 2496) = 56,37$, $p < 0,0001$.

Ao utilizar a média do tempo total e tempo médio das VUS em P7, P8 e P9, foi possível observar redução na duração média e total das VUS do grupo MA [F(3,76) = 16,52, $p < 0,0001$; F(3, 76) = 9,647, $p < 0,0001$, respectivamente] (Figura 20 – A, B).

Figura 20 – Duração média e total das VUS em P7-P9



Média da duração média e duração total das VUS de P7-P9. **A.** Duração média. **B.** Duração total. Quantidade de eventos registrados das VUS dos filhotes (40 kHz) de P7-P9. Considerando tanto sexo, como estímulo para análises estatísticas. Os dados representados em média \pm EPM. ANOVA de uma via, *post-hoc Tukey*. * $p < 0,05$. $n = 20$ por grupo experimental.

5. DISCUSSÃO

Ratas primíparas do grupo anóxia apresentaram comportamentos diferenciados em comparação ao grupo controle. Os resultados dos comportamentos maternos observados indicam negligência materna com filhote anoxiados, nos parâmetros de primeiro agrupamento, agrupamento total, amamentação, e lambe/acariciar nos primeiros dias após a injúria (P2, P3, P4, P5). Fato este que constitui agravo dado que corresponde ao período crítico para o desenvolvimento, no qual houve uma redução dos comportamentos direcionados a prole. Embora tenha sido observado a nível etológico, não foi possível observar diferença na atividade neuronal (c-Fos-IR) e na quantidade de neurônios maduros (NeuN-IR) na APM das ratas primíparas ao comparar os grupos experimentais (Anóxia x Controle).

Em relação aos dados obtidos da quantificação dos chamados de separação, relevantes para iniciar o comportamento materno, dependendo do estágio de maturação do neonato, foi possível observar aumento da quantidade de vocalizações

no grupo macho anóxia (P7, P8, P9 e P10) e redução no grupo fêmea anóxia (P6 e P8). Ao considerar que o pico de quantificação dessas VUS é entre P7 e P9 (BRANCHI; SANTUCCI; ALLEVA, 2006), os resultados encontrados levam a forte significância biológica. É interessante ressaltar a redução na duração média e total da VUS no grupo MA. Esta pode ser uma das causas relacionadas ao aumento da quantidade de chamados no grupo.

A evolução ponderal da prole anóxia foi afetada em ambos os sexos, já que fêmeas e machos anóxia apresentaram redução no peso corporal quando comparados aos seus respectivos controles. Este resultado está de acordo com a maioria das pesquisas da literatura que indicam redução no ganho de peso corporal em indivíduos submetidos a anóxia (IUVONE; GELOSO; DELL'ANNA, 1996; TAKADA et al., 2011b; MOTTA-TEIXEIRA et al., 2016; MILLAR et al., 2017). Como foi observado redução no tempo total de amamentação do grupo anóxia, esta pode ser uma das causas na redução no ganho de peso corporal deste grupo. É interessante relatar a redução da amamentação ao longo da maturação e independência alimentar da prole. Esta redução ocorre naturalmente e é regulada pela fêmea – relação com hipertermia. A temperatura corporal da mãe é um fator regulador da quantidade de comportamentos maternos despendidos (JANS; LEON, 1983). Filhotes que apresentam erupção dos incisivos, conseguem comer, aumentam a eficácia na sucção, logo, reduzem o tempo de amamentação durante o desenvolvimento (BRIDGES, 1984; OLAZÁBAL et al., 2013b; ALVISI et al., 2016; KONISHI; SO; VASCONCELOS, 2013; YOSHIMURA, 2018).

Em relação ao peso corporal dos animais em ambos os grupos (Controle x Anóxia), tanto os machos quanto as fêmeas do grupo Anóxia apresentaram menor ganho de peso corporal a partir de P10 e P8, respectivamente, que corrobora com o resultado da maioria dos estudos que utilizam modelos com animais de déficit de oxigênio encontrados na literatura, que também observaram menor ganho de peso corporal em indivíduos submetidos ao insulto (IUVONE; GELOSO; DELL'ANNA, 1996; TAKADA et al., 2011b; MOTTA-TEIXEIRA et al., 2016; MILLAR et al., 2017). É interessante ressaltar que a redução no parâmetro de amamentação pode estar diretamente relacionada à redução do peso corporal, pois uma vez que a mãe despende menos tempo amamentando os filhotes anoxiados, é esperado que o ganho de peso destes seja menor quando comparados aos controles. Cruz-Ochoa et al.

(2019) evidenciaram que a redução no ganho de peso corporal do grupo anóxia se mantém até a idade adulta (P90) em ambos os sexos.

Ao comparar os resultados obtidos no presente projeto e o projeto piloto, é possível afirmar que a metodologia de quantificação do comportamento materno foi adequada, posto que é observada redução destes comportamentos ao longo do período de desenvolvimento da prole enquanto ela adquire independência alimentar e física (CAPONE; BONSIGNORE; CIRULLI, 2005). Em relação aos resultados do projeto piloto referentes a VUS, foi possível observar aumento na quantidade de vocalizações nos dias P7, P8 e P9 em todos os grupos experimentais, período este que é observado a maior quantidade de VUS em filhotes (BRANCHI; SANTUCCI; ALLEVA, 2006). Também foi observado aumento no registro de vocalizações no grupo MA.

Os resultados observados das VUS geram algumas hipóteses de porque este parâmetro está modificado. Ao considerar que P7-P9 é o período de maior quantidade de ocorrências das VUS (BRANCHI; SANTUCCI; ALLEVA, 2001, 2006), ao extrair a média e total do tempo das VUS neste período, é possível discutir variações nestes dados. Das causas relacionadas aos dados observados: Retardo no desenvolvimento do aparelho fonador (retardo no desenvolvimento somático) (BRUNELLI et al., 2015); assim como pela observação de diferença entre sexos em relação ao estímulo anóxico – machos são mais afetados do que fêmeas (KUMAR et al., 2017, 2019); variações no comportamento materno podem desencadear alterações nos estímulos advindos da prole (i.e. VUS) (BRANCHI; SANTUCCI; ALLEVA, 2006; FRANCES CHAMPAGNE, JOSIE DIORIO, SHAKTI SHARMA, 2010). Por fim, os substratos neurais relacionados a vocalização podem ter sido afetados em decorrência da anóxia (NYAKAS; BUWALD; LUITEN, 1996; EL-KHODOR; BOKSA, 1997; CAPUTA et al., 2005; TAKADA et al., 2016).

O presente estudo observou que a AN altera o padrão comportamental de lambar/acariciar a prole em P2, P3, P4, P6 e P9 no período matutino, e em P2 e P5 no período noturno. Não foram encontrados na literatura estudos publicados sobre o CM cuja prole tenha sido exposta ao déficit de oxigênio, entretanto é possível dizer que há variação natural da quantidade de comportamento de lambar/acariciar despendido a filhotes de diferentes sexos (e.g. machos são mais acariciados

comparado a fêmeas) (MOORE, 1984), e a filhotes cujas mães estiveram alocadas em ambiente enriquecido (CHAMPAGNE et al., 2003a). Esses dados apontam, então, que diferentes variáveis podem modelar o CM de forma positiva ou negativa. A quantidade de lambar/acariciar que a prole recebe tem efeitos persistentes, sendo que filhotes de mães que apresentam déficit neste comportamento são mais susceptíveis a fatores estressantes (CHAMPAGNE et al., 2003b).

O comportamento de Autolimpeza (*Self-grooming*) da mãe está diretamente envolvido com a manutenção da higiene, bem como a termorregulação e até eventos de comunicação social. Este comportamento é utilizado como parâmetro em estudos translacionais, pois quando acentuado, pode estar relacionado a transtornos de ansiedade tanto em roedores como em humanos (KALUEFF et al., 2016). Neste estudo, as mães cuja prole sofreu AN apresentam por mais tempo tal comportamento, o que pode evidenciar elevado nível de estresse e ansiedade nestas quando comparadas às mães do grupo controle, possivelmente por encontrar a prole debilitada e incapaz de contrabalancear os fatores estressantes que afetam os neonatos.

Devido ao pico energético de vocalizações emitidas pelos filhotes (40 kHz), vários autores utilizam microfones ultrassensíveis ajustados para detectar essa frequência de vocalização. Entretanto, ao utilizar o registro de amplo espectro das vocalizações, ISE & OHTA (2009) reportaram que filhotes em P10 à P17 eram capazes de vocalizar em picos que variam entre 5 kHz e 130 kHz. Logo, a prole de ratos é capaz de emitir VU em uma ampla gama de espectros, o que evidência maior complexidade dos chamados de separação do que considerado previamente (ISE; OHTA, 2009; BOULANGER-BERTOLUS et al., 2017). Embora essa abordagem seja valiosa e tenha proporcionado vasta compreensão dos contextos etologicamente relevantes para a produção de VU em roedores, também dificulta a comparação do desenvolvimento do padrão de vocalizações. Com objetivo de estudar tais questões, BOULARGER-BERTOLUS et al. (2017) utilizaram modelo de estímulo aversivo (choque nas patas) ao longo de diferentes fases do desenvolvimento e compararam a VU em resposta ao estímulo em três idades diferentes: infância (P12-P15), juventude (P22-P24) e adultos (P75). Isto permitiu descrever a existência de duas classes de VU em ratos infantis: uma correspondente aos chamados de separação (40 kHz) – amplamente descrita na literatura -, que apresenta semelhanças com a VU

juvenil e adulta, e uma classe nova (frequência de 66 kHz), mal caracterizada até agora, que parece ser específica da infância. Adicionalmente, utilizou-se contexto adverso “natural” e relevante a prole, pela exposição dos filhotes a mães negligentes (i.e. limitação da amamentação, mães adversas aos neonatos). Ambos os estímulos induziram a respostas semelhantes de VU da prole infantil. Vocalizações na faixa de 66 kHz também foram observadas em neonatos isolados, descrevendo uma frequência pouco estudada nos chamados de separação (BOULANGER-BERTOLUS et al., 2017). Fica em aberto a hipótese de que outras frequências de vocalizações podem ser alteradas mediante o insulto anóxico. Diferentes frequências das vocalizações da prole não foram quantificadas devido a limitação no equipamento de registro (microfone ajustado para captar a frequência de 40 kHz).

Como descrito por VASCONCELOS (2013), ratas mães tendem a padrões de comportamentos realizados em sequência ao longo de determinado tempo específico. Assim, os estímulos advindos da prole, ou do ambiente, podem ter condicionado as mães às variações comportamentais encontradas. Embora outros fatores possam ter interferido no padrão de vocalização dos neonatos (e.g. temperatura, estresse), pois foi observado que a AN alterou esse padrão materno, e que possivelmente interferiu negativamente nas consequências da AN no desenvolvimento sensoriomotor, somático e cognitivo da prole.

CAPÍTULO 2: Efeitos da anóxia neonatal sobre a orientação da atenção

1. INTRODUÇÃO

A atenção pode ser descrita como processo ativo que focaliza a mente em uma de suas muitas possibilidades sensoriais ao selecionar os estímulos essenciais para a manutenção da espécie (LUCK; VECERA, 2002). Uma das definições mais utilizadas sobre a Atenção foi proposta por William James (*Principles of Psychology*):

“Everyone knows what attention is. It is the taking possession by the mind, in clear and vivid form, of one out of what seem several simultaneously possible objects or trains of thought. Focalization, concentration, of consciousness are of its essence. It implies withdrawal from some things to deal effectively with others” (James, 1890).

O direcionamento da atenção pode ser orientado no espaço e não estar necessariamente acompanhado por resposta de orientação manifesta da cabeça ou dos olhos. Isso tem sido referido como atenção encoberta (do inglês, “*Covert*”), sendo orientada por pistas externas - exógenas, ou orientada diretamente para uma localização espacial específica, pelo uso de pistas cognitivas (endógenas).

Em roedores, a AN está relacionada também a danos nos sistemas dopaminérgicos, evidenciados por menor densidade de células encontrados na substância negra (JOHNSON et al., 1994). É interessante ressaltar que, em ratos adultos nascidos por cesariana e/ou acometidos pelo insulto anóxico, há considerável aumento da liberação de DA pelo Núcleo acumbente (NA) em resposta ao estresse (EL-KHODOR; BOKSA, 1997, 1998). Foi estabelecida relação entre desordens atencionais e a AN, embasada pelo aumento da atividade motora em indivíduos submetidos ao insulto anóxico (MIGUEL et al., 2015; MILLAR et al., 2017).

Na literatura, estudos evidenciam o papel regulador de funções motoras e límbicas dos sistemas dopaminérgicos. A contribuição da dopamina (DA) no controle do processo atencional pode ser ilustrado nos casos de crianças com Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH). Entretanto, suas contribuições diretas ainda não foram completamente estabelecidas (NIEOULLON, 2002; BOUTROS et al., 2017). A frequência desta patologia acomete aproximadamente 1% da população de crianças, caracterizada pela hiperatividade, comportamentos impulsivos e não coordenados, combinando déficits de atenção e alerta (BALDUINI et al., 2000; MIGUEL et al., 2015). Embora a etiologia da TDAH continue incerta, fatores ambientais e hereditários estão relacionados a incidência desta condição. Alguns

fatores de risco durante a gravidez também foram identificados, tais como: mães anêmicas, prematuridade, baixo-peso ao nascimento, e casos de Encefalopatia Hipóxico-Isquêmica (EHI) – Anóxia neonatal. (MIGUEL et al., 2015).

Uma gama de estudos pré-clínicos sugere que eventos estressantes durante o período de desenvolvimento da prole estão diretamente relacionados ao desenvolvimento de alterações psicológicas e desordens psiquiátricas, como a depressão, ansiedade, e mesmo disfunções cognitivas. Em crianças, o alto índice de depressão, estresse pós-traumático, déficit de atenção e hiperatividade, e outras desordens comportamentais de longa duração também foram reportados (HOLUBOVÁ et al., 2018). HOLUBOVÁ et al. (2018) investigaram os efeitos do estresse na fase de desenvolvimento neonatal e suas implicações a longo prazo. Para tal, vinte e quatro (24) ratas fêmeas foram acasaladas e vinte quatro (24) de seus filhotes machos foram utilizados para formar três grupos (n = 8, por grupo): Controle (C), Materno – Estresse Social e Materno (MES) - Estresse Social e Físico (MESF). As proles de cada grupo, em P70 (dias pós-parto), foram submetidas ao teste do Campo Aberto (do inglês, *Open-field*). Os resultados apontam para uma redução na manutenção da atenção a um estímulo nos grupos que foram submetidos a estresses durante as primeiras fases do seu desenvolvimento neonatal.

Modelos animais vêm sendo utilizados para avaliar a atenção no contexto de privação de oxigênio. SMITH et al. (2014) utilizaram a tarefa do Tempo de Reação de 5-escolhas seriadas (do inglês, *5-choice serial reaction time task*) para estudar os possíveis danos a longo prazo da atenção visual em indivíduos anóxiados (P100-P140). Esta tarefa consiste em treinar animais a responder a estímulo visual direcionando o focinho ao orifício indicado para receber recompensa (e.g. açúcar), quando realizado corretamente a sequência apresentada nos 5 orifícios presentes em uma das paredes laterais da gaiola experimental. Foi possível observar redução na performance do grupo anóxia quando comparado ao grupo controle (SMITH et al., 2014). BOUTROS et al. (2017) estudaram o efeito do estresse no período neonatal na performance de ratos *Wistar* na Tarefa do tempo de reação de 5-escolhas seriadas (do inglês, *5-choice serial reaction time task*). Inesperadamente, entretanto, os ratos expostos a separação materna e/ou a exposição ao álcool na juventude apresentaram uma melhora na sua performance atencional, como é indicado pela diminuição da omissão, quando comparado aos grupos controle (BOUTROS et al., 2017)

Outro possível teste a ser utilizado é a **Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção**, validado por POSNER (1980), que permite estudar de maneira independente os efeitos da orientação da atenção exógena e endógena, sendo as pistas periféricas e centrais – preditivas e não preditivas. Para implementação desta tarefa, participantes são apresentados a um ponto fixo. O primeiro estímulo, geralmente uma pista, é apresentado após algum tempo. A pista consiste na mudança de luminosidade de um dos orifícios (pontos) laterais; após intervalo, o segundo estímulo é apresentado – alvo, em um dos orifícios laterais. Este pequeno intervalo entre o surgimento da pista e o alvo é caracterizado como assincronia para início do estímulo (SOA, do inglês *Stimulus Onset Asynchrony*), sendo as pistas preditivas (sinalizam o alvo), ou não preditivas (não sinalizam o alvo) (CHICA et al., 2014). Para validar o modelo animal desta tarefa em diferentes SOA's, MAROTE & XAVIER (2011) observaram que ratos respondiam de forma mais efetiva ao SOA de 800 ms, considerado válido também como efeito de orientação voluntária da atenção em humanos, o que permite a aplicação desta tarefa para estudar os diferentes mecanismos de orientação da atenção em roedores, pois constitui modelo animal para estudo de danos na atenção visual (MAROTE; XAVIER, 2011).

Elucidar as bases neurais relacionadas à orientação da atenção, tanto em condições normais, quanto em situações aversivas, pode enriquecer nossa compreensão dos danos a longo prazo decorrentes da AN em relação às diferentes formas de orientação da atenção. Sendo assim, este estudo pretende avaliar os efeitos da AN sobre o desenvolvimento de características análogas às do TDAH em ratos adultos acometidos pelo insulto por meio da Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção.

2. OBJETIVOS

Explorar alterações da prole adulta submetida a AN na performance da Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção.

2.1 Objetivo específico

- a) Avaliar a hipótese de que a prole adulta submetida a AN apresenta alterações na Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção e eventual efeito relacionado ao sexo.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção

A avaliação da atenção visual, pela Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção, proposta por POSNER (1980) em humanos, e validada em ratos por MAROTE & XAVIER (2011), consiste em um monitor de vídeo em que o animal deve manter o olhar fixo a um ponto localizado no centro da tela e, posteriormente, responder a um estímulo-alvo que será apresentado à direita ou à esquerda da linha horizontal do ponto central. Pistas podem preceder o estímulo-alvo em variados intervalos de tempo – sendo elas válidas ou inválidas, direcionando a atenção. A latência entre o surgimento da pista e o alvo (“*stimulus onset asynchrony*”, SOA, do inglês), de maneira aleatória, permite avaliar aspectos temporais em relação ao direcionamento da atenção e impede a antecipação do voluntário em relação ao momento do aparecimento do alvo.

Considerando que o experimento pode ser realizado com pistas preditivas (orienta a atenção) e pistas não preditivas (não orienta a atenção), utilizadas para avaliar os diferentes mecanismos de orientação da atenção, as proles obtidas do experimento realizado no capítulo 1 foram submetidas a Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção formando os seguintes grupos experimentais (n ideal = 12, por grupo):

- a) Machos Controle: Preditivo (MCP) e Não preditivo (MCNP);
- b) Machos Anóxia: Preditivo (MAP) e Não preditivo (MANP);
- c) Fêmeas Controle: Preditivo (FCP) e Não preditivo (FCNP);
- d) Fêmeas Anóxia: Preditivo (FAP) e Não preditivo (FANP);

Para obter o efeito de validade da precisão da resposta, os 8 grupos experimentais são divididos em subgrupos (n = 6, por subgrupo) de tentativas Válidas (pista orienta ao alvo) e Inválidas (pista não orienta ao alvo), totalizando 96 animais.

Quando os animais atingiram a idade de 70 dias (P70), estes foram condicionados ao treinamento prévio.

Todos os experimentos foram realizados no Biotério do Laboratório de Neurociência e Comportamento (IB/USP), em colaboração com Professor Doutor Gilberto Fernando Xavier e Doutorando Mateus Torres Cruz.

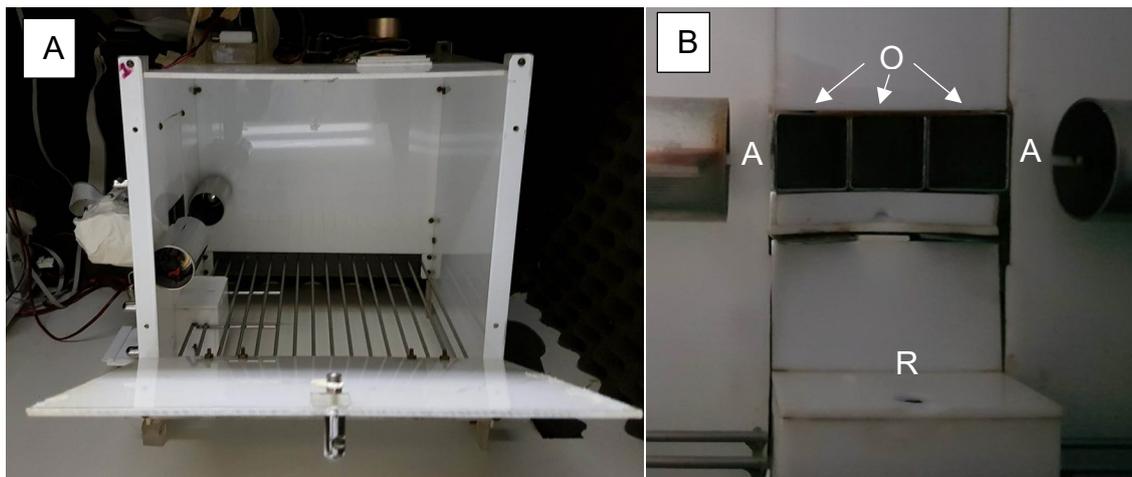
3.2 Condicionamento

Os indivíduos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno medindo 30 x 40 x 18 cm, em salas com sistema de temperatura constante ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de luz de 12h, claro e escuro (07h00 – 19h00). Uma dieta com restrição alimentar foi necessária a partir de uma semana antes do início dos experimentos, mantida até o fim dos experimentos – o intuito da dieta é estimular os indivíduos a realizar a tarefa para serem recompensados. Os animais tiveram acesso a comida durante 3 horas, 15 minutos após o final dos testes. Água disposta *ad libitum*.

3.3 Sistema para avaliação da atenção

Foi utilizada câmara medindo 26 x 26 x 26 cm, sendo que em uma das paredes dessa câmara há 3 orifícios quadrados distribuídos de forma adjacente e horizontal, com 2,5 cm de lado e 4.5 cm de profundidade, localizados no centro da parede, 7,5 cm acima do assoalho e bebedouros acoplados à 1,8 cm. Esses orifícios apresentam diferentes níveis de iluminação (Diodos emissores de luz, LEDs), lâmpadas embutidas controladas via microcomputador. Na entrada de cada um dos orifícios, uma célula fotossensível é conectada à 0,5 cm, capaz de captar a presença do animal por meio de sensores infravermelhos sempre que o animal posicionar o focinho no sensor. Um mecanismo de ingestão de líquidos é alocado 5,7 cm abaixo do orifício central, bem como um mecanismo controlado via computador para adicionar 20 μl de uma solução de 10% sacarose como reforço a resposta correta. A câmara é iluminada por luz branca posicionada na região central do teto. Há dois alto-falantes posicionados ao lado dos orifícios - emitem sons (pistas) para indicar o local do aparecimento do alvo, sendo o tempo de apresentação da pista de 100 ms. O aparato é monitorado por sistema computadorizado que permite medir e controlar os eventos (descritos a seguir, Fases Experimentais – 4.4) com a precisão de milissegundos (Figura 21).

Figura 21 – Aparato utilizado para o Teste de Orientação Encoberta da Atenção.



A. – Aparato utilizado para o Teste de Orientação Encoberta da Atenção; **B.** Orifícios (O), alto-falantes (A) e reforço (R). Fonte: HELOU, 2019.

3.4 Fases Experimentais:

a) Fase 1 – Apresentação da recompensa (*Reward presentation*): Um bebedouro de 100 ml contendo uma solução de sacarose 10% é disponibilizado em cada uma das gaiolas dos ratos durante 5 dias experimentais.

b) Fase 2 – Livre disponibilidade (*Free availability*): Os animais são inseridos na câmara experimental em grupos de 3 a 4 animais e o equipamento de liberação da recompensa é ativado a cada 3 segundos. Esta fase (apenas um dia experimental) tem a duração de 30 minutos e a função de introduzir os animais à recompensa na câmara.

c) Fase 3 – Condicionamento clássico (*Autoshaping*): Os animais são inseridos individualmente nas câmaras experimentais. Cada vez que o animal focinha qualquer um dos orifícios, o mecanismo de recompensa é ativado. Cada sessão, desta fase, dura 30 minutos, após o que os animais são promovidos para a próxima etapa assim que ativarem o sistema de recompensa pelo menos 200 vezes. Há intervalo entre tentativas (*Inter-trial interval, ITI*) de 250 ms que é mantido durante todo o experimento.

d) Fase 4 – Orifício-central/Orifício-lateral (*Central-hole Lateral-Hole*): Ao início de cada tentativa, a luz do orifício central permanece acesa até que o animal focinhe o orifício iluminado. Logo após focinhar o orifício central, a luz se apaga e, em seguida,

a luz de um dos orifícios laterais é acessa. Focinhar o orifício lateral iluminado ativa o sistema de recompensa. Nesta fase, não há tempo limite para focinhar o orifício lateral, e nada ocorre caso os indivíduos focinhem qualquer um dos orifícios apagados. As sessões têm a duração de 60 minutos e os animais promovidos para a próxima fase após realizarem 5 tentativas consecutivas tendo recebido a recompensa pelo menos 100 vezes durante a sessão.

e) Fase 5 – Inserção de SOA's e pistas (*SOA's and Cue insetion*): É adicionado um intervalo entre o focinhar o orifício central e o surgimento do alvo. O intervalo inicial é de 100 ms, com aumento gradual de 50 ms toda a vez que o animal responde corretamente 6 tentativas consecutivas, até o máximo de 1500 ms; esse intervalo é gradualmente reduzido de 50 ms, até alcançar 150 ms, caso o indivíduo cometa 3 erros consecutivos. Durante esta fase, é adicionado o Erro de Comissão (focinhar orifício lateral não iluminado), fazendo com que a luz da câmara experimental se apague por um período de 5 segundos (*Time-out*). Cada sessão é iniciada com o SOA final do indivíduo na sessão anterior. Pistas são adicionadas de acordo com cada grupo experimental. Os grupos são separados em pistas preditivas (100% válidas) e não preditivas (50% válidas, 50% inválidas). As sessões têm duração de 60 minutos e os animais são promovidos quando completam 3 sessões consecutivas com o SOA máximo e acurácia (porcentagem de respostas corretas) igual ou superior a 75%.

f) Fase 6 – Inclusão de erros (*Error Inclusion*): Durante esta fase, são adicionados o Erro de Antecipação (indivíduo insere focinho no orifício central antes ou até os primeiros 100 ms do início da apresentação do alvo), e o Erro de Omissão (não responde ao estímulo alvo em até 1000 ms após a apresentação do mesmo). Em qualquer erro, um *Time-out* de 5 segundos é ativado. O tempo de duração do alvo nessa fase é de 300 ms. Todas as tentativas utilizam o SOA máximo de 1200 ms. As sessões têm duração de 60 minutos e os animais são promovidos à próxima fase quando alcançam acurácia maior ou igual a 75% (ver 3.5 Tipos de erros quantificados).

g) Fase 7 Inserção de diferentes SOA's (*Insertion of mixed SOA's*): Os SOA's de 200 ms, 400 ms, 800 ms e 1200 ms, foram distribuídos de forma aleatória, 20% de *Catch Trials* - não há alvo, caso os animais mantenham o focinho no orifício central pelo período de 1500 ms, o sistema de recompensa é ativado. Durante as sessões iniciais,

o tempo de iluminação do alvo é de 300 ms. As sessões têm duração de 60 minutos e os animais são promovidos à próxima fase quando alcançam acurácia maior ou igual a 75% em 3 sessões consecutivas. Posteriormente o tempo de iluminação do alvo é reduzido para 100 ms; após duas sessões consecutivas com a acurácia igual ou superior a 75%, os indivíduos são promovidos para a próxima fase.

h) Fase 8 – Limiar de detecção de luminescência (*Targed light luminace's threshold detection*): Para definir o limiar de detecção de luminância da luz alvo, a iluminação do alvo é reduzida gradualmente em 10 lux por sessão até que os animais apresentem uma acurácia inferior a 75% com o menor lux registrado por indivíduo. Caso a acurácia permaneça inferior a 75%, a sessão seguinte irá aumentar 5 luxes da iluminação do alvo. Assim que forem definidos os valores mais baixos de intensidade da luminância da luz alvo com acurácia igual ou superior a 75%, essa intensidade luminosa é considerada o limiar de detecção e foi utilizada para a fase de Treinamento e Teste (Fase 9).

i) Fase 9 Treinamento e Teste (*Training and Test*): A fase de Treinamento e Teste foram alternadas em dias consecutivos. Durante a Fase de Treinamento, 100% das tentativas são válidas para o grupo preditivo; para o grupo não preditivo, apenas 50% das tentativas são válidas. Os testes diferem do treinamento em relação a porcentagem da validade das tentativas no grupo preditivo, de 100 % de tentativas válidas para 80% válidas e 20% invalidas; enquanto o grupo não preditivo permanece com a mesma porcentagem de validade das tentativas. É dado o fim do experimento quando realizadas ao menos 5 sessões de Teste.

3.5 Tipos de erros quantificados

Durante a Tarefa, diferentes tipos de erros foram automaticamente registrados pelo computador, estes são:

Erro 1 – Omissão 1: O animal não insere o focinho no orifício central dentro do tempo para iniciar a tentativa. Indicador de inatividade;

Erro 2 – Antecipação 1: Insere o focinho no orifício lateral quando deveria inserir o focinho no orifício central;

Erro 3 – Antecipação 2: Remove o focinho do orifício central durante o SOA;

Erro 4 – Antecipação 3: Remove o focinho do orifício central até 80 ms depois do aparecimento do alvo;

Erro 5 – Omissão 2: Inicia a tentativa, mas não responde a iluminação de nenhum dos orifícios laterais;

Erro 6 – Omissão 3: Responde 1000 ms depois do aparecimento do alvo;

Erro 7 – Comissão 1: Insere o focinho no orifício central quando deveria inserir em um dos orifícios laterais;

Erro 8 – Comissão 2: Insere o focinho no orifício lateral errado;

3.6 Eutanásia, Perfusão e Coleta do Material Biológico

A eutanásia, perfusão e coleta dos encéfalos da prole submetida a Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção foram realizadas segundo o protocolo usual do laboratório.

Uma hora após a última sessão de testes, os indivíduos são profundamente anestesiados – injeção intraperitoneal de Xilazina (10mg/kg) e Ketamina (60 mg/kg), foi administrado o pré-anestésico acepromazina (2,5 mg/kg) para reduzir o estresse do animal. Quando profundamente anestesiado, isto é, o animal não apresenta mais os reflexos patelar e palpebral, é iniciada a cirurgia de perfusão transcardíaca, seguida de dissecação do encéfalo. O procedimento de Perfusão e Coleta do Material Biológico está descrito no capítulo 1 – 3.6 Eutanásia, Perfusão e Coleta do Material Biológico.

3.7 Análises estatísticas

A porcentagem de respostas corretas relativas ao total do número de tentativas em cada uma das condições de tempo entre a pista/alvo (SOA) e a validade das pistas foi obtida para cada sessão. As pontuações das sessões de testes foram utilizadas para calcular a porcentagem de respostas corretas em tentativas válidas menos a porcentagem de respostas corretas em tentativas inválidas para cada uma das

condições descritas, denominado efeito de validade para a precisão da resposta (do inglês, “*Validity effect for response accuracy*”). O tempo médio de reação e tempo médio de movimento das tentativas corretas ao considerar a validade das pistas e tempo entre pista/alvo (SOA) foram obtidos individualmente por rato/sessão. Também foram calculados os efeitos válidos para o tempo de reação, correspondente ao tempo médio individual de tentativas válidas menos o tempo médio individual de tentativas inválidas. Todos os erros descritos no treinamento prévio foram individualmente retirados de cada sessão. Foi feita a média dos resultados individuais ao longo das 5 sessões de teste e os resultados analisados através da Análise de Variância para Medidas Repetidas (ANOVA) de duas vias, pós-teste *Tukey’s* para comparação entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas dentro do intervalo de confiança de 95%, ou seja, $p < 0,05$. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa STATISTICA 12.0 (StatSoft®) e o *GraphPad® Prism Software, Inc*, versão 8.4.2 para confecção dos gráficos.

3.8 Dificuldades Experimentais

Em média, apenas 60% dos animais conseguem aprender a tarefa no período de 6 a 8 meses - a realizar todas as fases experimentais prévias ao teste propriamente dito, com treinamento dos animais ao menos 5 vezes na semana (aprox. 120 - 160 sessões de treino). Existem apenas 6 caixas experimentais no Laboratório de Neurociência e Comportamento (IB/USP), onde essa parte da pesquisa foi desenvolvida. Assim é possível treinar 18 animais por lote experimental (13h00-17h00), 6 animais/hora, mais uma hora para higienização das gaiolas experimentais após cada sessão.

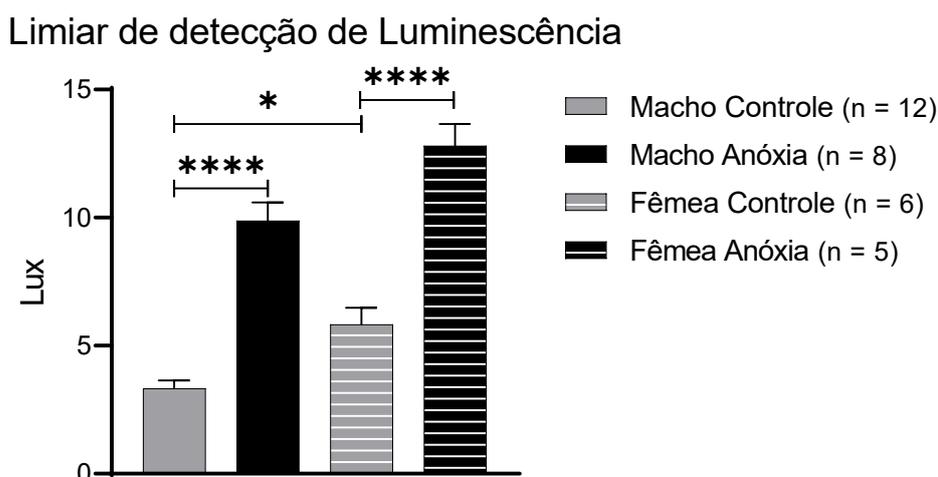
Até o momento, foram treinados 32 animais, mas apenas 9 animais (3 MCNP, 3 MANP, e 3 FANP) completaram a tarefa, o que inviabilizou o término do experimento até o final do mestrado. Este será concluído em etapa futura. Dos 12 MC, 8 MA, 6 FC e 5 FA que realizaram o treinamento da tarefa até a fase 8 – limiar de detecção de luminescência, o valor de lux que cada grupo experimental reagiu positivamente foi utilizado para comparar os grupos experimentais em relação a sensibilidade de detecção de luminosidade.

4. RESULTADOS

4.1 Limiar de Detecção de Luminescência

Durante a fase 8 do treinamento experimental, os animais são treinados a responder a menor quantidade de lux necessária e acertar ao menos 75% das tentativas. Ao definir e comparar a limiar mínimo de detecção de luminescência (em lux), as análises estatísticas indicaram aumento significativo na quantidade de lux em ambos os sexos do grupo Anóxia [Grupo F (1, 27) = 123,9, $p < 0,0001$], bem como foi observada diferença significativa entre os sexos [Sexo: F (1, 27) = 19,98, $p < 0,001$]. O grupo fêmea foi significativamente menos sensível a luminosidade que o grupo macho ($p < 0,05$), sem interação entre fatores [Interação: F (1, 27) = 0,12, $p > 0,05$] (Figura 22).

Figura - 22 Limiar de detecção de luminescência.



Valor mínimo de detecção de luminescência em lux. ANOVA de duas vias, pós-teste *Tukey*. Idade: P230-P250. Os dados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

4.2 Tarefa de orientação encoberta da Atenção

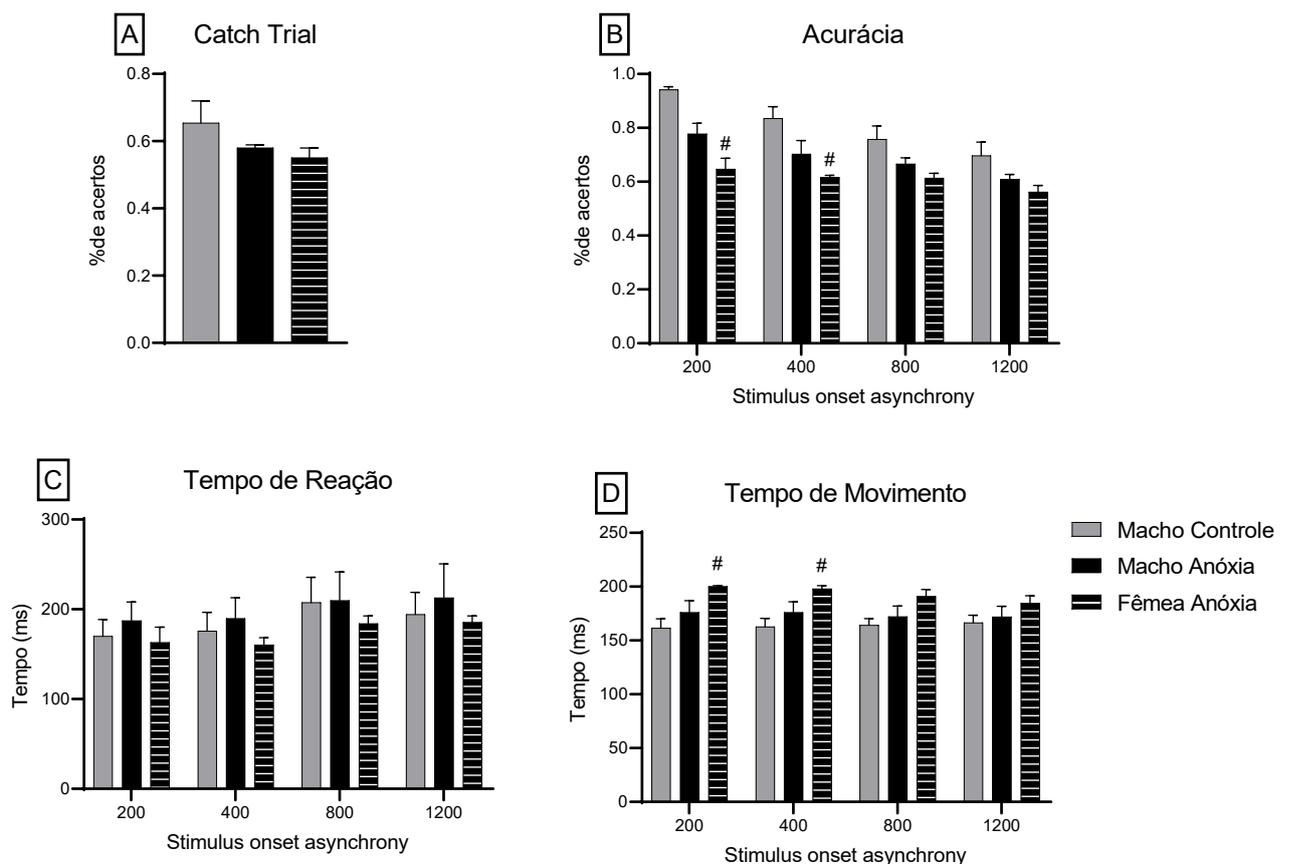
Foi possível finalizar a tarefa em apenas 6 machos controle, 3 machos anóxia e 3 fêmeas anóxia. Os seguintes resultados, embora estatisticamente significativos, podem não refletir de maneira confiável sua significância biológica pelo *n* pequeno.

As *Catch Trials* servem como reforço aos animais para se manterem na tarefa (reforço de sacarose é liberado quando os animais mantem o focinho no orifício central

durante o período de 1500 ms). Estes dados servem apenas como estatística descritiva dos resultados obtidos (Figura 23 – A).

Ao considerar as tentativas Válidas, é possível observar redução da acurácia do grupo FA quando comparado ao grupo MC nos SOA's de 200 e 400 [Grupo: $F(2, 24) = 33,26$, $p < 0,0001$; SOA: $F(3, 24) = 12,16$, $p < 0,0001$; Interação: $F(6, 24) = 1,16$, $p > 0,05$] (Figura 23 - B). Não foi possível observar diferenças significativas no parâmetro de Tempo de Reação [Grupo: $F(2, 24) = 1,41$, $p > 0,05$; SOA: $F(3,24) = 1,217$, $p > 0,05$; Interação: $F(6, 24) = 0,03$, $p > 0,05$] (Figura 23 – C). O Tempo de Movimento foi maior no grupo FA quando comparado ao grupo MC nos SOA's de 200 e 400 [Grupo: $F(2,24) = 15,32$, $p < 0,0001$; SOA: $F(3,24) = 0,28$, $p > 0,05$; Interação: $F(6, 24) = 0,35$, $p > 0,05$] (Figura 23 – D).

Figura 23 – Resultados parciais da Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção

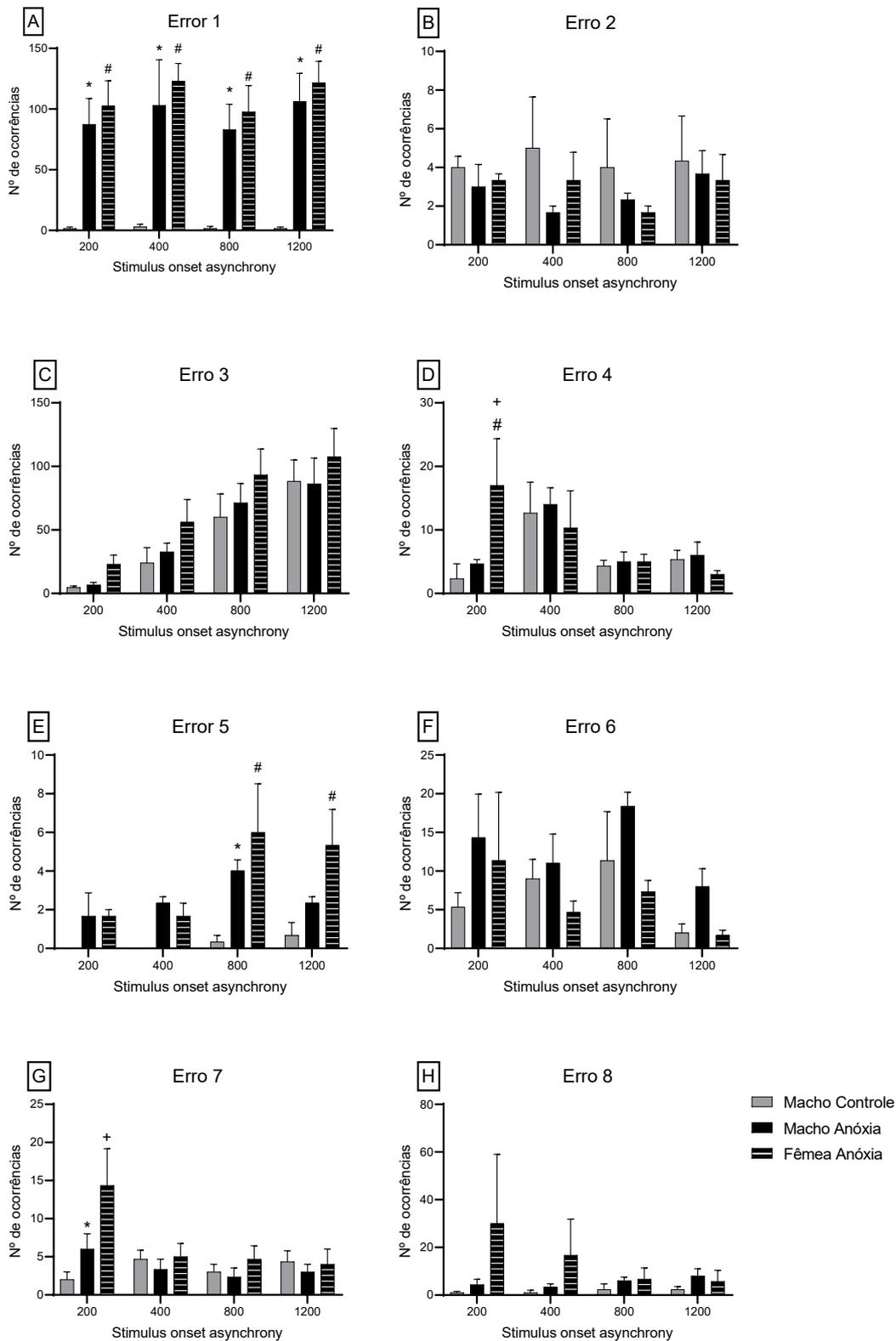


Resultados parciais das tentativas válidas. **A.** Catch Trials. **B.** Acurácia: Porcentagem de acertos durante as 5 sessões de teste, 600 tentativas por sessão, considerando os diferentes SOA's, e os diferentes grupos. **C.** Tempo de reação entre o surgimento do alvo e a retirada do focinho do orifício central durante as 5 sessões de teste, 600 tentativas por sessão. **D.** Tempo de movimento entre a retirada do focinho do orifício central e a inserção do focinho do orifício onde foi apresentado o alvo. Os

dados estão representados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias, pós-teste *Tukey*. Idade: P250-P270. SOA = *stimulus onset asynchrony*. Macho Controle (n = 6); Macho Anóxia (n = 3); Fêmea Anóxia (n = 3). $p < 0,05$, #CM vs. AF.

Os dados obtidos relativos aos erros quantificados durante a Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção foram analisados e seus resultados resumidos nos gráficos a seguir (Figura 24). É possível observar diferenças significativas nos resultados encontrados para o Erro 1 (omissão 1) em todos os SOA's, quando comparados os grupos Controle e Anóxia, o que evidência maior número de erros de omissão cometidos pelos indivíduos anoxiados em ambos os sexos [Grupo: $F(2, 24) = 39,07$, $p < 0,0001$; SOA: $F(3, 24) = 0,57$, $p > 0,05$; Interação: $F(6, 24) = 0,13$, $p > 0,05$]. O Erro 4 (Antecipação 3) apresentou diferença no SOA de 200 ms, quando comparados os grupos MC x FA e MA x FA – maior número de erros de antecipação no grupo FA [Grupo: $F(2, 24) = 3,3$, $p > 0,05$; SOA: $F(3, 24) = 3,39$, $p < 0,05$; Interação: Interação $F(6, 24) = 1,79$, $p > 0,05$], também observado nos SOA's de 800 e 1200 ms no Erro 5 (omissão 2), diferença de MC x MA e MC x FA [Grupo: $F(2, 24) = 11,35$, $p < 0,001$; SOA: $F(3, 24) = 3,55$, $p < 0,05$; Interação: $F(6, 24) = 1,25$, $p > 0,05$]. O Erro 7 (comissão 1) apresenta diferenças significativas no SOA de 200 ms, MC x MA e MC x FA, maior número de erros de comissão no grupo Anóxia [Grupo: $F(2, 24) = 3,95$, $p < 0,05$; SOA: $F(3, 24) = 2,63$, $p > 0,05$; Interação: Interação $F(6, 24) = 2,26$, $p > 0,05$].

Figura 24 – Erros quantificados durante a Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção.



A. Erro 1: Omissão 1. **B.** Erro 2: Antecipação 1. **C.** Erro 3: Antecipação 2. **D.** Erro 4: Antecipação 3. **E.** Erro 5: Omissão 2. **F.** Erro 6: Omissão 3. **G.** Erro 7: Comissão 1. **H.** Erro 8: Comissão. Os dados estão representados como média \pm EPM. ANOVA de duas Vias, *post-hoc Tukey*, $p < 0,05$. Idade: P250-P270. SOA = *stimulus onset asynchrony*. CM = Controle Macho (n = 3); AM = Anóxia Macho (n = 3); AF = Anóxia Fêmea (n = 3). $p > 0,05$: *CM vs. AM; #CM vs. AF; +AM vs. AF.

5. DISCUSSÃO

Embora não tenha sido possível finalizar todos os experimentos e grupos experimentais do capítulo 2, discutiremos as tendências encontradas nos resultados analisados. Dentre as premissas utilizadas na TOEA, a validade das pistas entre os grupos permite estudar mecanismos preditivos e não preditivos da orientação da atenção. Como nenhum animal do grupo pistas preditivas foi finalizado, todos os dados discutidos são referentes a orientação exógena da atenção, posto que os animais não são orientados majoritariamente pelas pistas (orientação endógenas).

Nos dados observados do limiar de detecção de luminescência, é possível observar um aumento significativo da quantidade de lux necessária para os indivíduos do grupo anóxia em ambos os sexos. Interessantemente, também foi encontrado uma diferença entre o grupo Macho Controle e Fêmea Anóxia, este sendo maior que o grupo dos machos. É importante discutir a ausência “natural” de sensibilidade à luz de ratos Wistar, por serem albinos, mas vale ressaltar que a diferença entre sexo possa estar ligada a fatores genéticos, bem como foi possível observar que o insulto anóxico prejudicou a sensibilidade à luz destes animais, o que pode ser explicado pelo desenvolvimento inadequado causado pela anóxia na retina deste animais (KISS et al., 2007, 2009). O aumento na quantidade de erros quantificado ao longo da TOEA no grupo Anóxia em ambos os sexos, pode estar relacionado a aumento na ansiedade (PRESS et al., 1983; MIGUEL et al., 2015) e efeito da negligência materna (MAJDAK et al., 2016), e a soma desses fatores constitui agravo para os insultos desencadeados pela anóxia.

Não foi possível obter informações do grupo FC, entretanto, ao comparar os grupos de MA e FA, alguns erros foram significativamente maiores no grupo das fêmeas, o que sugere uma redução no desempenho da TOEA em fêmeas. Comparações entre MC e FC são necessárias para confirmar esta hipótese (Projeto em andamento). É possível observar aumento no limiar de detecção de luminescência no grupo FC comparado ao grupo MC, o que reforça a hipótese de que as fêmeas têm uma performance reduzida em relação aos machos na TOEA.

É observado que a redução de lambar/acariciar eleva os níveis de reatividade ao estresse em machos, onde são encontrados elevados níveis de CRF no núcleo paraventricular do hipotálamo (CURLEY; CHAMPAGNE, 2016). Aumento das respostas relacionadas a medo em filhotes de low-LG dams pode estar envolvido na

alteração da expressão de subunidades do receptor do ácido gamma-aminobutírico A (GABA_AR) na amígdala e locus coeruleus (CURLEY; CHAMPAGNE, 2016).

Em suma, os presentes resultados reforçam a hipótese de que a AN causa danos a longo prazo relacionados a déficits atencionais e controle inibitório de erros. Estes resultados confirmam, a luz de outros trabalhos publicados (MIGUEL et al., 2015), a hipótese deste estudo, de que a AN é um fator ambiental que pode contribuir para o desenvolvimento de transtornos similares ao Déficit de Atenção com Hiperatividade.

6. CONCLUSÃO

1. Foi possível observar redução no comportamento materno em ratas primíparas cujas proles foram submetidas a anóxia neonatal;
2. Ratas primíparas das proles anoxiadas apresentaram aumento no tempo dedicado no comportamento de Auto limpeza (*Self-grooming*) que indica maior nível de estresse;
3. Indivíduos de ambos os sexos submetidos a AN apresentaram redução no ganho de peso corporal ao longo do período de amamentação e idade adulta quando comparados aos respectivos controles;
4. Foi possível observar diferenças significativas no padrão de vocalização da prole do grupo macho anóxia quando comparado ao grupo macho controle, com redução no tempo médio e total das VUS e aumento da quantidade (número de ocorrências).
5. Indivíduos do grupo anóxia apresentaram prejuízos na performance da TOEA e limiar de detecção de luminescência, com fêmeas mais afetadas do que os machos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caráter interpretativo dos dados obtidos, tendo em mente as hipóteses concebidas previamente à realização do projeto, permitiu elucidar algumas questões e levantar novas hipóteses. A prole submetida à anóxia foi capaz de alterar os comportamentos direcionados à ela. A redução do comportamento materno direcionado à prole anóxia sugere agravo aos efeitos deletérios da privação de oxigênio. O ganho de peso corporal reduzido dos indivíduos anóxia pode estar relacionado a redução na quantidade de amamentação durante o período de lactação, bem como as alterações encontradas na VUS da prole podem ser moduladoras do CM. Não obstante, as diferenças observadas entre os sexos reiteram a necessidade de considerar ambos os sexos nos estudos experimentais, a fim de que possam ser elaboradas estratégias e procedimentos adequados a cada sexo, se aplicável, para minimizar os efeitos da injúria.

Os resultados parciais obtidos da Tarefa de Orientação Encoberta da Atenção, conquanto não concluídos, se mostraram instigantes, uma vez que os dados obtidos, na redução da performance do grupo anóxia e sua diferença relacionada ao fator sexo suscitam a importância de continuar a investigação, comparando também a performance de machos e fêmeas controle na TOEA.

Por fim, toda a significância estatística não necessariamente implica em significância biológica. É imprescindível que todo o pesquisador, ao ler os resultados apresentados neste trabalho, tenham clara distinção entre os conceitos. Toda a replicação e dúvida é indispensável.

8. REFERÊNCIAS

ALVISI, R. D. et al. Suckling-induced Fos activation and melanin-concentrating hormone immunoreactivity during late lactation. **Life Sciences**, v. 148, p. 241–246, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.038>>.

BALDUINI, W. et al. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. **Brain research**, v. 859, n. 2, p. 318–25, 24 mar. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719080>>. Acesso em: 1 fev. 2020.

BERNIER, A. et al. Mother-Infant Interaction and Child Brain Morphology: A Multidimensional Approach to Maternal Sensitivity. **Infancy**, v. 24, n. 2, p. 120–138, 1 mar. 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/infa.12270>>. Acesso em: 26 fev. 2019.

BOERO, G. et al. Combined effect of gestational stress and postpartum stress on maternal care in rats. **Physiology & Behavior**, v. 184, n. October 2017, p. 172–178, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.11.027>>.

BOULANGER-BERTOLUS, J. et al. Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

BOUTROS, N. et al. Effects of early life stress and adolescent ethanol exposure on adult cognitive performance in the 5-choice serial reaction time task in Wistar male rats. p. 1549–1556, 2017.

BRANCHI, I.; SANTUCCI, D.; ALLEVA, E. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. v. 125, p. 49–56, 2001.

BRANCHI, I.; SANTUCCI, D.; ALLEVA, E. Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by infant rodents. **Current protocols in toxicology**, v. Chapter 13, p. Unit13.12, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045127>>.

BRIDGES, R. S. A Quantitative Analysis of the Roles of Dosage, Sequence, and Duration of Estradiol and Progesterone Exposure in the Regulation of Maternal Behavior in the Rat *. **Endocrinology**, v. 114, n. 3, p. 930–940, mar. 1984. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-114-3-930>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

BRUNELLI, S. A. et al. Variations in maternal behavior in rats selected for infant ultrasonic vocalization in isolation. **Hormones and Behavior**, v. 75, p. 78–83, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.08.007>>.

CAPONE, F.; BONSIGNORE, L. T.; CIRULLI, F. Methods in the analysis of maternal behavior in the rodent. **Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines (editor-in-chief) ... [et al.]**, v. Chapter 13, p. Unit13.9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045113>>.

CAPUTA, M. et al. Perinatal asphyxia, hyperthermia and hyperferremia as factors inducing behavioural disturbances in adulthood: A rat model. **Behavioural Brain Research**, v. 163, n. 2, p. 246–256, 8 set. 2005.

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

CHAMPAGNE, F. A. et al. Natural Variations in Maternal Care Are Associated with Estrogen Receptor α Expression and Estrogen Sensitivity in the Medial Preoptic Area. **Endocrinology**, v. 144, n. 11, p. 4720–4724, nov. 2003b. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2003-0564>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

CHICA, A. B. et al. The Spatial Orienting paradigm: How to design and interpret spatial attention experiments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 40, p. 35–51, 2014.

CROSKERRY, P. G. et al. An inexpensive system for continuously recording maternal behavior in the laboratory rat. **Physiology and Behavior**, v. 16, n. 2, p. 223–225, 1976.

CURLEY, J. P.; CHAMPAGNE, F. A. Influence of maternal care on the developing brain: Mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 40, p. 52–66, 2016. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0091302215300091/1-s2.0-S0091302215300091-main.pdf?_tid=b2df4d51-c6fe-42c4-8767-de8764aaac3b&acdnat=1522925627_c7e22e3a8b6b5f9bafac3e0f3b211af4>. Acesso em: 5 abr. 2018.

DULAC, C.; O'CONNELL, L. A.; WU, Z. Neural control of maternal and paternal behaviors. **Science**, v. 345, n. 6198, p. 765–770, 2014.

EL-KHODOR, B. F.; BOKSA, P. Long-term reciprocal changes in dopamine levels in prefrontal cortex versus nucleus accumbens in rats born by caesarean section compared to vaginal birth. **Experimental Neurology**, v. 145, n. 1, p. 118–129, 1997.

EL-KHODOR, B. F.; BOKSA, P. Birth insult increases amphetamine-induced behavioral responses in the adult rat. **Neuroscience**, v. 87, n. 4, p. 893–904, 1998.

FELDMAN, R. The neurobiology of mammalian parenting and the biosocial context of human caregiving. **Hormones and Behavior**, v. 77, p. 3–17, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0018506X15300878>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

FELDMAN, R.; BAKERMANS-KRANENBURG, M. J. Oxytocin: a parenting hormone. **Current Opinion in Psychology**, v. 15, p. 13–18, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.02.011>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

FRANCES CHAMPAGNE, JOSIE DIORIO, SHAKTI SHARMA, and M. J. M. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. **Hormones and Behavior**, v. 124, n. 1, p. 29–38, 2010. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1992.tb34343.x%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2010.07.012%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3080614&tool=pmcentrez&render_type=abstract%5Cnhttp://www.sciencedirect.com/science/article/>.

FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care and the development of stress

- responses. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 9, n. 1, p. 128–134, 1999.
- FUNAYAMA, C. A. R. Anoxia Neonatal e sequelas neurológicas. Ed. Átomo, 2005.
- GLYNN, L. M.; HOWLAND, M. A.; FOX, M. Maternal programming: Application of a developmental psychopathology perspective. **Development and psychopathology**, v. 30, n. 3, p. 905–919, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30068423>>. Acesso em: 25 jul. 2019.
- GROW, J.; BARKS, J. D. E. **Pathogenesis of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant: Current concepts****Clinics in Perinatology**Elsevier, , 1 dez. 2002. .
- HEISLER, J. M. et al. The Attentional Set Shifting Task: A Measure of Cognitive Flexibility in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, p. 2–7, 2015. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/51944/the-attentional-set-shifting-task-measure-cognitive-flexibility>>.
- HEUN-JOHNSON, H.; LEVITT, P. Early-Life Stress Paradigm Transiently Alters Maternal Behavior, Dam-Pup Interactions, and Offspring Vocalizations in Mice. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, n. July, p. 1–18, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2016.00142/abstract>>.
- HOFER, M. A.; BRUNELLI, S. A.; SHAIR, H. N. Potentiation of isolation-induced vocalization by brief exposure of rat pups to maternal cues. **Developmental Psychobiology**, v. 27, n. 8, p. 503–517, 1994.
- HOFFMAN, G. E.; SMITH, M. S.; VERBALIS, J. G. **c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems****Frontiers in Neuroendocrinology**, 1993. .
- HOLUBOVÁ, A. et al. Long-term early life adverse experience impairs responsiveness to exteroceptive stimuli in adult rats. **Behavioural Processes**, v. 149, n. August 2017, p. 59–64, 2018.
- HURN, P. D.; VANNUCCI, S. J.; HAGBERG, H. **Adult or perinatal brain injury: Does sex matter?****Stroke**, fev. 2005. .
- ISE, S.; OHTA, H. Power spectrum analysis of ultrasonic vocalization elicited by maternal separation in rat pups. **Brain Research**, v. 1283, p. 58–64, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.003>>.
- IUVONE, L.; GELOSO, M. C.; DELL'ANNA, E. Changes in open field behavior, spatial memory, and hippocampal parvalbumin immunoreactivity following enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. **Experimental Neurology**, v. 139, n. 1, p. 25–33, 1996.
- JANS, J. E.; LEON, M. Determinants of mother-young contact in Norway rats. **Physiology and Behavior**, v. 30, n. 6, p. 919–935, 1983.
- JOHNSON, M. et al. Effect of neonatal hypoxia-ischemia on nigro-striatal dopamine receptors and on striatal neuropeptide Y, dynorphin A and substance P concentrations in rats. **Developmental Brain Research**, v. 83, n. 1, p. 109–118, 1994.
- KALUEFF, A. V. et al. **Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience****Nature Reviews Neuroscience**, 17 jan. 2016. . Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn.2015.8>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

KELLER, S. M.; ROTH, T. L. Environmental influences on the female epigenome and behavior. **Environmental Epigenetics**, v. 2, n. 2, p. dvw007, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/eep/article-lookup/doi/10.1093/eep/dvw007>>.

KISS, P. et al. Changes in open-field activity and novelty-seeking behavior in periadolescent rats neonatally treated with monosodium glutamate. **Neurotoxicity Research**, v. 12, n. 2, p. 85–93, 2007.

KISS, P. et al. Effects of perinatal asphyxia on the neurobehavioral and retinal development of newborn rats. **Brain Research**, 2009.

KOHL, J. et al. Functional circuit architecture underlying parental behaviour. **Nature** **2018**, p. 1, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-018-0027-0>>.

KOHL, J.; DULAC, C. Neural control of parental behaviors. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 116–122, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.002>>.

KONISHI, A.; SO, R.; YOSHIMURA, B. Mother-infant separation among mothers with mental illness: An exploratory observational study in Japan. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 32, p. 1–4, 2018. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S1876201817304136/1-s2.0-S1876201817304136-main.pdf?_tid=0af85dc8-b532-49a5-a23f-e387c2060088&acdnat=1522062248_0e8c0c3991f69c7fe7e1d0bc051b4726>. Acesso em: 26 mar. 2018.

KUMAR, A. J. et al. Sex differences in somatic and sensory motor development after neonatal anoxia in Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, 2017.

KUMAR, A. J. et al. Behavioral, cognitive and histological changes following neonatal anoxia: Male and female rats' differences at adolescent age. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 73, p. 50–58, 1 abr. 2019.

KUNDAKOVIC, M.; CHAMPAGNE, F. A. Early-life experience, Epigenetics, and the developing brain. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 1, p. 141–153, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/npp.2014.140>>.

LAHVIS, G. P.; ALLEVA, E.; SCATTONI, M. L. Translating Mouse Vocalization: Prosody and Frequency Modulation. **Genes Brain Behavior**, v. 10, n. 1, p. 4–16, 2011.

LAWN, J. E.; COUSENS, S.; ZUPAN, J. **4 Million neonatal deaths: When? Where? Why?** *Lancet* Elsevier Limited, , 5 mar. 2005. .

LECKMAN, J. F.; HERMAN, A. E. Maternal behavior and developmental psychopathology. **Biological Psychiatry**, v. 51, n. 1, p. 27–43, 2002.

LIN, R.; LI, Y.; LUO, M. A Neural Circuit Driving Maternal Behaviors. **Neuron**, v. 98, n. 1, p. 6–8, 2018.

LUCK, S. .; VECERA, S. P. **Attention Handbook of Experimental Psychology**, 2002.

LV, H. et al. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy-related biomarkers in serum and cerebrospinal fluid. **Clinica Chimica Acta**, 2015.

MAJDAK, P. et al. The impact of maternal neglect on genetic hyperactivity. **Behavioural Brain Research**, v. 313, p. 282–292, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.033>>.

MARIANA PEREIRA A; * A. F. Neuroanatomical and neurochemical basis of parenting: Dynamic coordination of motivational, affective and cognitive processes. [s.d.] Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0018506X15300398/1-s2.0-S0018506X15300398-main.pdf?_tid=cdd267b5-d702-42cd-8ba0-66156f8ddaeb&acdnat=1524578639_3edf18a7850d591b31dad7fe05b8af99>. Acesso em: 24 abr. 2018.

MAROTE, C. F. O.; XAVIER, G. F. Endogenous-like orienting of visual attention in rats. **Animal Cognition**, v. 14, n. 4, p. 535–544, 2011.

MEANEY, M. J. MATERNAL CARE, GENE EXPRESSION, AND THE TRANSMISSION OF INDIVIDUAL DIFFERENCES. 2001.

MIGUEL, P. M. et al. Neonatal Hypoxia-Ischemia Induces Attention-Deficit Hyperactivity Disorder-Like Behavior in Rats *J. L.* v. 129, n. 3, p. 309–320, 2015.

MILLAR, L. J. et al. Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. v. 11, n. May, p. 1–36, 2017.

MOGI, K. et al. Mutual mother-infant recognition in mice: The role of pup ultrasonic vocalizations. **Behavioural Brain Research**, v. 325, p. 138–146, 15 maio 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432816305629>>. Acesso em: 9 abr. 2018.

MOLTZ, H.; BOBBINS, D. MATERNAL BEHAVIOR OF PRIMIPAROUS AND MULTIPAROUS RATS. v. 60, n. 3, p. 417–421, 1965.

MOORE, C. L. Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. **Developmental Psychobiology**, v. 17, n. 4, p. 347–356, 1984.

MOTTA-TEIXEIRA, L. C. et al. Spatial learning and neurogenesis: Effects of cessation of wheel running and survival of novel neurons by engagement in cognitive tasks. **Hippocampus**, v. 26, n. 6, p. 794–803, 2016.

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

NAGASAWA, M. et al. Oxytocin and mutual communication in mother-infant bonding. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 6, n. February, p. 1–10, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnhum.2012.00031/abstract>>.

NIEOULLON, A. Dopamine and the regulation of cognition and attention. **Progress in neurobiology**, v. 67, n. 1, p. 53–83, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126656>>.

NUMAN, M. Neural basis of maternal behavior in the rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 13, n. 1–2, p. 47–62, 1988a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306453088900066>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

NUMAN, M. Neural basis of maternal behavior in the rat.

Psychoneuroendocrinology, v. 13, n. 1–2, p. 47–62, 1988b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0306453088900066>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

NUMAN, M. et al. Expression of c-fos, fos B, and egr-1 in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis during maternal behavior in rats. **Brain Research**, v. 792, n. 2, p. 348–352, 1998.

NUMAN, M. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, v. 5, n. 4, p. 163–190, 2006a.

NUMAN, M. Hypothalamic Neural Circuits Regulating Maternal Responsiveness Toward Infants. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, v. 5, n. 4, p. 163–190, 18 dez. 2006b. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1534582306288790>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

NUMAN, M.; FLEMING, A.; LEVY, F. Maternal Behavior. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 1921–1993.

NUMAN, M., INSEL, T. R. The neurobiology of parental behavior. **New York: Springer-Verlag**, 2003

NUMAN, M.; NUMAN, M. J. Expression of Fos-like immunoreactivity in the preoptic area of maternally behaving virgin and postpartum rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, n. 2, p. 379–394, 1994.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 46–64, 2009a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.10.002>>.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 46–64, jan. 2009b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091302208000496>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

NUMAN, M.; WOODSIDE, B. Maternity: Neural mechanisms, motivational processes, and physiological adaptations. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, n. 6, p. 715–741, 2010. Disponível em: <<http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/a0021548>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

NUMAN, M.; YOUNG, L. J. Neural mechanisms of mother–infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications. **Hormones and Behavior**, v. 77, p. 98–112, 2016. Disponível em: <https://ac.els-cdn.com/S0018506X15001038/1-s2.0-S0018506X15001038-main.pdf?_tid=19b5ed05-e908-4cd8-b90e-c2bc1f195b9b&acdnat=1524578679_05106efb67362883f831f33ef19fb019>. Acesso em: 24 abr. 2018.

NYAKAS, C.; BUWALD, B.; LUITEN, P. G. M. Hypoxia and brain development. **Progress in Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 1–51, maio 1996.

OLAZÁBAL, D. . et al. The content of dopamine, serotonin, and their metabolites in the neural circuit that mediates maternal behavior in juvenile and adult rats. **Brain Research Bulletin**, v. 63, n. 4, p. 259–268, maio 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923004000693>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

OLAZÁBAL, D. E. et al. New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1860–1874, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.003>>.

OLAZÁBAL, D. E. et al. New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 8, p. 1860–1874, 1 set. 2013b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763413000997>>. Acesso em: 16 abr. 2018.

PAXINOS & WATSON. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. London: **Elsevier**, 2007.

PEDERSEN, C. A. et al. Oxytocin Activation of Maternal Behavior in the Rata. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 652, n. 1, p. 58–69, jun. 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1992.tb34346.x>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

PEREIRA, M.; FERREIRA, A. Neuroanatomical and neurochemical basis of parenting: Dynamic coordination of motivational, affective and cognitive processes. **Hormones and Behavior**, v. 77, p. 72–85, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0018506X15300398>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

PÉREZ-TORRERO, E.; RUBIO-NAVARRO, L. Maternal Behavior Their Adjustments and Implicated Factors. **Journal of Behavioral and Brain Science**, v. 5, n. 5, p. 40–55, 2015. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/jbbs%0Ahttp://dx.doi.org/10.4236/jbbs.2015.52004%0Ahttp://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>>.

PORTFORS, C. V. Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 46, n. 1, p. 28–34, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17203913>>.

POSNER, M. I. Orienting of attention. **The Quarterly journal of experimental psychology**, v. 32, n. 1, p. 3–25, 1980.

PRESS, E. B. et al. Hyperactivity in rats following postnatal anoxia. v. 7, p. 379–382, 1983.

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 511–533, 2000.

RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Annals of Neurology**, v. 9, n. 2, p. 131–

141, 1981.

ROSENBLATT, J. Psychobiology of maternal behavior: contribution to the clinical understanding of maternal behavior among humans. **Acta Pædiatrica**, v. 83, n. 1, p. 3–8, 1994.

ROSENBLATT, J. S. Nonhormonal Basis of Maternal Behavior in the Rat. **Science**, v. 156, n. 3781, p. 1512–1513, 16 jun. 1967. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.156.3781.1512>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

ROSENBLATT, J. S. Outline of the evolution of behavioral and nonbehavioral patterns of parental care among the vertebrates: Critical characteristics of mammalian and avian parental behavior. **Scandinavian Journal of Psychology**, v. 44, n. 3, p. 265–271, 2003.

SAMAIYA, P. K. et al. Neonatal anoxia leads to time dependent progression of mitochondrial linked apoptosis in rat cortex and associated long term sensorimotor deficits. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 52, n. May, p. 55–65, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.05.005>>.

SCHWARZ, J. M.; SHOLAR, P. W.; BILBO, S. D. Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. 6, p. 948–963, mar. 2012.

SHAHROKH, D. K. et al. Oxytocin-Dopamine Interactions Mediate Variations in Maternal Behavior in the Rat. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2276–2286, maio 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2009-1271>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

SMITH, A. L. et al. Sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia : Insights from a clinical meta-analysis and a rodent model of induced hypoxic ischemic brain injury. **Experimental Neurology**, v. 254, p. 54–67, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.01.003>>.

STACK, E. C. et al. A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. **Behavioural brain research**, v. 131, n. 1–2, p. 17–36, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11844569%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844569>.

STACK, E. C.; NUMAN, M. The temporal course of expression of c-Fos and Fos B within the medial preoptic area and other brain regions of postpartum female rats during prolonged mother-young interactions. **Behavioral Neuroscience**, v. 114, n. 3, p. 609–622, 2000.

STOLZENBERG, D. S.; CHAMPAGNE, F. A. Hormonal and non-hormonal bases of maternal behavior: The role of experience and epigenetic mechanisms. **Hormones and Behavior**, v. 77, p. 204–210, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.07.005>>.

TAKADA, S. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 1, p. 62–69, 15 maio 2011a. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027011001567#fig0005>>. Acesso em: 3 maio. 2018.

TAKADA, S. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 1, p. 62–69, 15 maio 2011b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165027011001567#fig0005>>. Acesso em: 12 abr. 2018.

TAKADA, S. H. et al. Hippocampal cell death following neonatal anoxia: Functional consequences on spatial memory at adulthood. **Abstracts / Int. J. Devl Neuroscience**, v. 47, p. 1–131, 2015a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.04.179>>.

TAKADA, S. H. et al. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience**, 2015b.

TAKADA, S. H. et al. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. **Behavioural Brain Research**, 2016.

TAKAHASHI, N.; KASHINO, M.; HIRONAKA, N. Structure of rat ultrasonic vocalizations and its relevance to behavior. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, p. 1–7, 2010.

TANAKA, H. et al. Effect of neonatal hypoxia on the development of intraspinal serotonergic fibers in relation to spinal motoneurons. **Brain and Development**, v. 32, n. 4, p. 268–274, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2008.12.009>>.

TEN, V. S. et al. Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. **Behavioural Brain Research**, v. 145, n. 1–2, p. 209–219, 17 out. 2003.

VANNUCCI, R. C.; TOWFIGHI, J.; VANNUCCI, S. J. Secondary energy failure after cerebral hypoxia-ischemia in the immature rat. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 2004.

VASCONCELOS, R. G. Efeitos da influência da anóxia neonatal no comportamento materno e no desenvolvimento somático e sensório-motor de ratos wistar. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013.

Wiesner, B. P.; SHEARD, N. M. Maternal Behavior in the rat. **Ed. Edinburgh Oliver & Boyd**, 1933.

WU, Z. et al. Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 325–330, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature13307>>.

ZHAO, C.; LI, M. C-Fos identification of neuroanatomical sites associated with haloperidol and clozapine disruption of maternal behavior in the rat. **Neuroscience**, v. 166, n. 4, p. 1043–1055, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.023>>.

APÊNDICE

RESULTADOS PROJETO PILOTO

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos durante o prévio estágio no Laboratório de Neurociências do Departamento de Anatomia do ICB/USP em colaboração com o Laboratório de Comportamento Materno da FMVZ/USP. Ao longo do desenvolvimento do projeto piloto utilizando 5 fêmeas e suas respectivas proles para obtenção dos dados descritos a seguir. Os seguintes dados serviram para auxiliar no processo de delineamento experimental, bem como analisar a viabilidade do estudo.

Os dados das quantificações dos comportamentos direcionados à prole obtidos no presente projeto piloto, quando submetidos à ANOVA, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos analisados – três (3) Mães cuja prole foi submetida à anóxia neonatal (Grupo Anóxia) e duas (2) Mães cuja prole não foi submetida a Anóxia Neonatal (Grupo Controle). É interessante ressaltar que o $N = 5$ utilizado é considerado pequeno para inferências quanto ao comportamento materno, entretanto, a diferença observada no fator Sessão ($p > 0,0001$) para os parâmetros de Agrupamento total (*Grouping*), Agrupamento individual (*Retriving*) e Cifose maternal (*Arched back nursing*) mostrou que em ambos os grupos o cuidado materno diminuiu ao passo que a prole adquire maturidade metabólica e comportamental, validando a metodologia utilizada para a quantificação do comportamento materno. Os parâmetros de Visitas à prole e Construção do ninho (*Nest building*) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos fatores avaliados: Grupo, Sessão e a interação entre os mesmos ($p > 0,05$).

Os mesmos dados foram submetidos ao teste T de *Student* (Utilizando as médias dos grupos experimentais) e Kruskal-Wallis apresentaram os seguintes resultados: Para a Cifose materna (*Arched back nursing*) (Figura apêndice 1), Agrupamento total (*Grouping*) (Figura apêndice 2), Visitas à prole (Figura apêndice 3) e Construção de Ninho (*Nest building*) (Figura apêndice 4) não houve diferença estatisticamente significativa, porém, para os parâmetros de Agrupamento individual (*Retriving*) (Figura apêndice 5), em p5, o grupo controle agrupou os filhotes mais lentamente quando comparado ao grupo anóxia ($p = 0,006$), bem como o parâmetro de vocalizações da prole (Figura apêndice 6) na faixa de 40 kHz – *Separation calls* (LAHVIS; ALLEVA; SCATTONI, 2011), em p7, os indivíduos machos do grupo anóxia

vocalizaram com maior frequência quando comparados aos outros grupos experimentais ($p = 0,007$). É interessante ressaltar que o maior número de vocalizações desses indivíduos ocorre do sexto ao oitavo (p6 à p8) dias pós-parto (NAGASAWA et al., 2012).

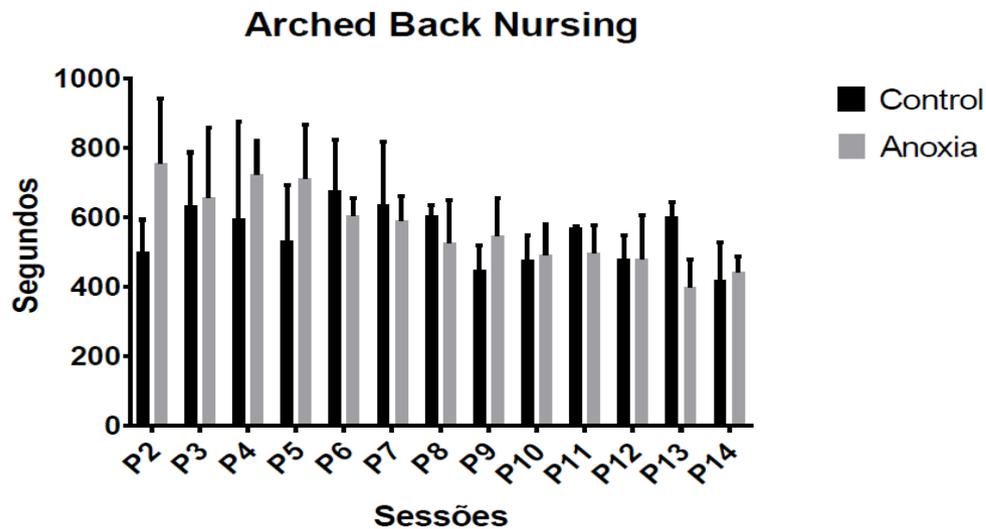


Figura anexo 1. Histograma do comportamento de cifose materna em segundos durante o registro em vídeo de 30 minutos por dia no período matutino. Grupo Controle e Anóxia (mães primíparas com neonatos anoxiados no segundo dia pós parto – P2). Gráfico elaborado utilizando média \pm EPM.

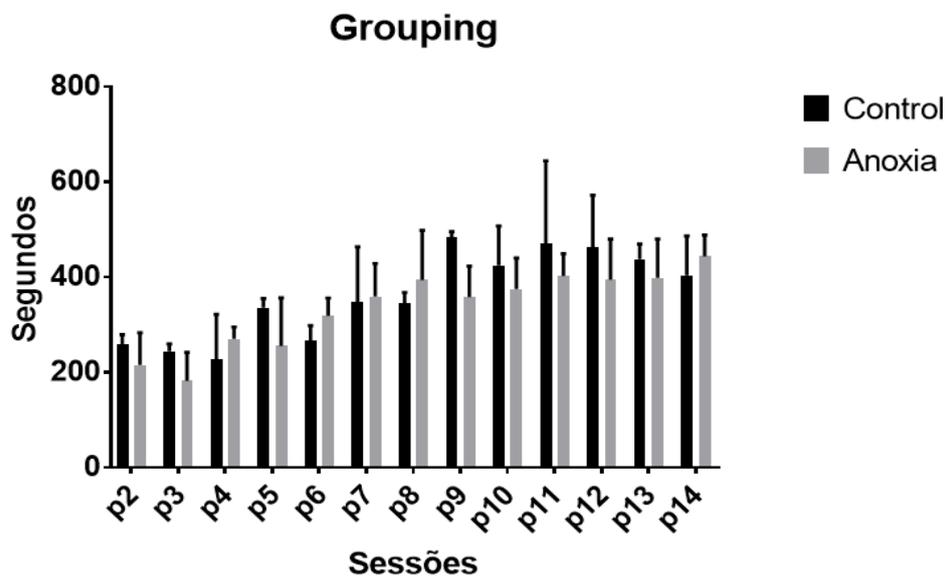


Figura anexo 2. Histograma do comportamento de agrupamento total dos filhotes em segundos durante o registro em vídeo de 30 minutos por dia no período matutino. Grupo Controle e Anóxia (mães primíparas com neonatos anoxiados no segundo dia pós parto – P2). Gráfico elaborado utilizando média \pm EPM.

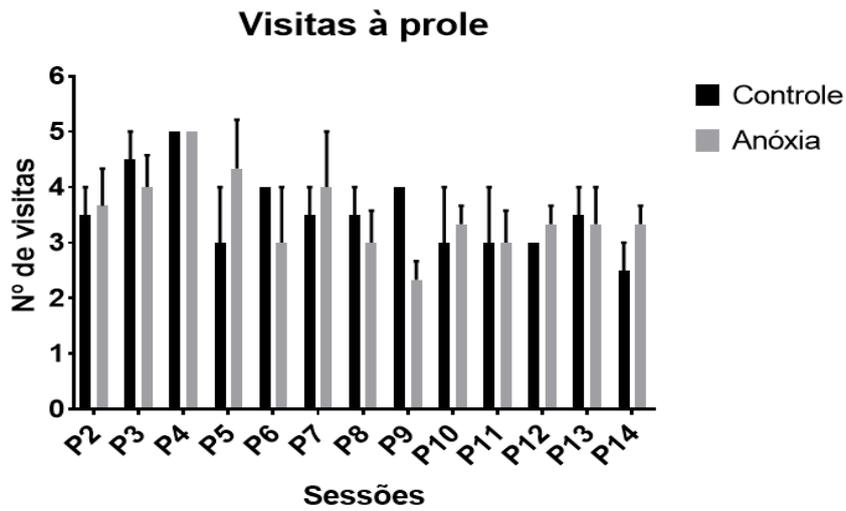


Figura anexo 3. Histograma do comportamento de visitas à prole, número de visitas durante o registro em vídeo de 30 minutos por dia no período matutino. Grupo Controle e Anóxia (mães primíparas com neonatos anoxiados no segundo dia pós parto – P2). Gráfico elaborado utilizando média ± EPM.

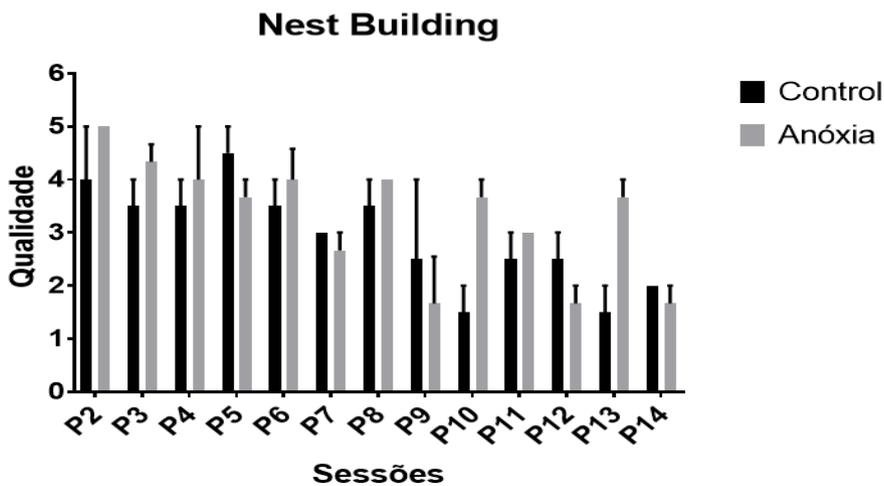


Figura anexo 4. Histograma do comportamento de construção do ninho, valor qualitativo de 0 à 5, após o registro em vídeo de 30 minutos por dia no período matutino. Grupo Controle e Anóxia (mães primíparas com neonatos anoxiados no segundo dia pós parto – P2). Gráfico elaborado utilizando média ± EPM.

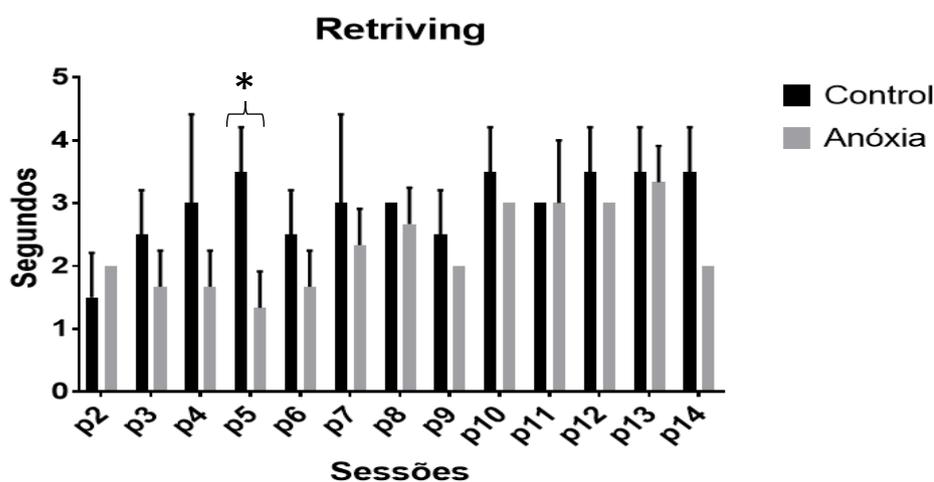


Figura anexo 5. Histograma do comportamento de agrupamento individual dos filhotes em segundos durante o registro em vídeo de 30 minutos por dia no período matutino. Grupo Controle e Anóxia (mães primíparas com neonatos anoxiados no segundo dia pós parto – P2). Gráfico elaborado utilizando média \pm EPM.

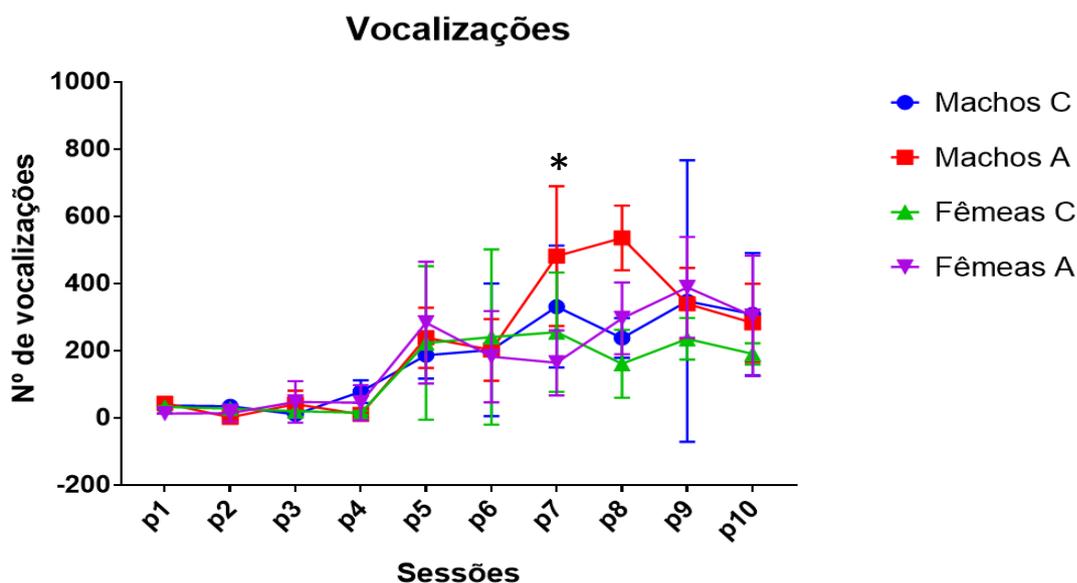


Figura anexo 6. Gráfico em linhas representando o número de vocalizações da prole na faixa de 40 kHz durante o registro de 300 segundos, período matutino, utilizando 2 filhotes de cada sexo por mãe/dia (n=20). Gráfico elaborado utilizando média \pm EPM. Legenda: Macho c – Machos controle; Machos A – Macho Anóxia; Fêmeas C – Fêmeas Controle; Fêmeas A – Fêmeas Anóxia.

Em ratas, uma gama de alterações ocorre no seu sistema nervoso durante a transição de nulíparas para primíparas ou múltiparas, relacionadas aos comportamentos maternos (SHAHROKH et al., 2010). Durante a prenhez, o encéfalo

materno sofre diversas alterações plásticas devidas ações hormonais, bem como a própria interação mãe-filhote após o nascimento, constituindo uma resposta adaptativa para o aprendizado de uma nova situação – maternidade (NUMAN, 1988b).

A ocitocina e o estrógeno são essenciais para o início dos comportamentos voltados à prole, sendo que o aumento do estrógeno circulante durante todas as fases do desenvolvimento desses comportamentos é mediado – parcialmente – por sistemas ocitocinérgicos, posto que o estrógeno aumenta a afinidade dos receptores de ocitocina (BRIDGES, 1984). (PEDERSEN et al. (1992), após fazer a infusão de ocitocina diretamente na área pré-óptica medial (MPA), observaram que houve um aumento na expressão do comportamento materno.

Muitas variáveis são consideradas em estudos que envolvam o comportamento materno, por exemplo, a variabilidade pode depender da linhagem dos ratos, em particular em linhagens que possuem diferentes comportamentos relacionados à ansiedade (MEANEY, 2001).

Como o comportamento maternal é intrínseco desses animais – mamíferos no geral (KUNDAKOVIC; CHAMPAGNE, 2015; FELDMAN; BAKERMANS-KRANENBURG, 2017), condições externas podem não exercer influência direta sobre esses comportamentos – que são primordiais para a sobrevivência da prole.

VASCONCELOS (2013) levanta a hipótese de que: “ratas parecem convergir para um padrão de comportamentos realizados em sequência por um determinado período, o que indicaria, por exemplo, que estímulos emitidos pelo filhote ou pelo ambiente, poderiam condicioná-las a esse padrão de comportamento.” Logo, estudar a relação dos estímulos sonoros emitidos pela prole pode auxiliar na elucidação da interação Mãe-filhote.

Como não foi possível realizar o registro de vídeo junto ao registro das vocalizações (ruído – poluição sonora e impossibilidade física devido ao local onde se encontram os equipamentos), os dados obtidos das vocalizações serão utilizados como parâmetro para indicar danos cognitivos no sistema de comunicação da prole. A frequência de vocalizações na faixa de 40 kHz emitidas pela prole possui relação direta com o reagrupamento dos filhotes, servindo de estímulo para a mãe (TAKAHASHI; KASHINO; HIRONAKA, 2010).

Foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o Comportamento Materno em diferentes espécies de mamíferos com o intuito de elaborar uma revisão

analisando esse comportamento ao longo da evolução desse grupo, assim como sumarizar as diferentes maneiras de avaliação, estudo e classificação do Comportamento Materno – inato, cíclico e instintivo, ressaltando os diferentes recursos para o desenvolvimento desse comportamento, sendo esses a Sincronia, Regulação, Simbiose, Ligação e Desenvolvimento Ontogênico da relação Mãe-Filhote. Conceitos extraídos de (ROSENBLATT, 1994; TEN et al., 2003; CAPONE; BONSIGNORE; CIRULLI, 2005).

ANEXO A

Tabela anexo A - Métodos de quantificação do comportamento materno em ratos

Autor (ano)	Título	Método de Quantificação	Assunto	Análise Estatística dos Dados	Resultado
Jay S. ROSENBLATT (1967)	Nonhormonal Basis of Maternal Behavior in the Rat	Filhotes de 5 a 10 dias de idade eram condicionados em frente as mães. A latência dos seguintes comportamentos foi quantificada: Reagrupamento; Agachamento (Cifose); Lamber; Construção de Ninhos. Cada registro durou 30 minutos.	Três grupos de fêmeas nulíparas Charles River de 80 a 120 dias de idade foram testadas: Quatorze (14) fêmeas intactas (Controle), onze (11) fêmeas ovariectomizadas, onze (11) hypophysectomized. Dois grupos de machos foram testados: Treze (13) intactos (Controle), Doze (12) castrados.	Teste do Qui-quadrado	A média da latência para o início dos comportamentos direcionados a prole em fêmeas nulíparas foi maior que 5 dias em todos os grupos. Corroborando o fato de Wiesner & Sheard (1), que utilizaram apenas 4 dias de exposição aos filhotes, falharam em encontrar um valor significativo da proporção de fêmeas sensibilizadas. A latência para reagrupamento, crouching, e lamber não foram afetadas pela ovariectomia, mas a retirada da glândula pituitária causou uma significativa redução para o início dos comportamentos de reagrupamento e lamber. Em síntese, há respostas básicas do Comportamento Materno que não dependem de hormônios ou sexo para seu surgimento.
Alison S. FLEMING and Jay S. ROSENBLATT (1974)	Maternal behavior in the virgin and lactating rat	Mães foram condicionadas em gaiolas experimentais (para observação) dois dias antes da exposição inicial a proles de outras mães (Foster-pups) entre 5 e 10 dias de idade. Inicialmente, esses indivíduos eram inseridos a gaiola experimental - canto frontal esquerdo - e o registro era feito por um período de 15-30 minutos, dependendo do grupo experimental. Os filhotes foram deixados com a fêmea durante 24 horas, posteriormente sendo removidos (retornados as prolegritoras por 48 horas) e 15 minutos depois substituídos por uma nova ninhada. Este procedimento foi repetido até o grupo experimental iniciar o comportamento materno ou por 15 dias - caso não haja o full maternal behavior. Os comportamentos observados seguem: Reagrupamento; Cheirar os filhotes (Pup sniffing); Amamentação; Construção de ninho; Nivel de atividade; Quadrante do ninho; Deitada; Cifose; Dormindo; Acareando; Comendo; e Investigando. A latência de todos os parâmetros comportamentais foram tabuladas.	Nulíparas e Lactantes foram testadas	A maioria das análises estatísticas é referente a frequência, duração total por observação, ou a latência para início dos comportamentos direcionados a prole - Friedman análise de variância de duas vias, post hoc Wilcoxon.	O Comportamento materno em nulíparas e lactantes foi quantitativamente similar após alguns dias de testes. Diferenças qualitativas e quantitativas mais detalhadas apresentaram uma variação significativa.
Harold I. SIEGEL and Jay S. ROSENBLATT (1975)	Hormonal Basis of Hysterectomy-Induced Maternal Behavior during Pregnancy in the Rat	Um grupo de 3 a 5 filhotes adotivos - 3 a 8 dias de idade, foram apresentados para todos os grupos experimentais 48 horas após a cirurgia. Os testes de quantificação do Comportamento Materno começaram entre 12h00 e 13h00, o teste consiste em expor as fêmeas aos filhotes adotivos colocando-os no canto oposto ao ninho da fêmea testada (ver Rosenblatt, 1967). Durante os primeiros 15 minutos, o comportamento era quantificado, seguido de reagrupamento de 15 em 15 minutos durante as próximas 4 horas. Os filhotes adotivos permanecem com as mães durante a noite. Pela manhã, os filhotes são trocados por novos filhotes da mesma idade. Este procedimento foi repetido até que a fêmea reagrupasse todos os filhotes para o ninho e adossasse a posição de amamentação (Cifose), caso a fêmea não respondesse aos filhotes em até 5 dias, o teste era encerrado. Para os parâmetros do comportamento materno que foram quantificados, ver Fleming & Rosenblatt (1974).	Tratamento com Estradiol e Progesterona em ratas que passaram por histerectomia e ovariectomia (HO) nos dias 10, 13, 16 e 19 de gravidez foi testado para averiguar sua capacidade em reduzir a latência do surgimento dos comportamentos maternos.	A análise não paramétrica Kruskal-Wallis foi utilizada para determinar a significância estatística da latência para inícios dos comportamentos maternos entre os grupos. O Mann-Whitney U foi realizado para comparar pares de grupos em relação a latência ao longo dos 5 dias de teste. O testes de Fisher e Chi-Quadrado foram utilizados quando os dados justificavam uma comparação entre as proporções dos animais que responderam a prole nos primeiros dias de teste (dia 1, 2, e 3). Em todos os testes, foram feitas análises bicaudais (Two-tailed).	Uma única injeção de 20 µg/kg ou 100 µg/kg de estradiol benzoate impedidamente após a HO, tanto isolada, quanto seguida de injeção de 0,5 mg de progesterona, restabelece o comportamento materno. Em todos os estágios da gravidez, as baixas doses de estradiol foram igualmente efetivas, independentemente da progesterona, para restaurar as respostas maternas.
Robert S. BRIDGES and Harvey H. Feder (1978)	Inhibitory Effects of Various Progestin and Deoxy corticosterone on the Rapid Onset of Maternal Behavior Induced by Ovariectomy-Hysterectomy During Late Pregnancy in Rats	If subject retrieved at least two pups and grouped all the three pups during 1 hour test session, the individual was called maternal and assigned a score equivalent to the day that it responded maternally to the three test pups. A avaliação dos comportamentos começou 22-24 horas após a HO, aproximadamente 10h00. A qualidade do ninho foi pontuada: 1 - Pobre, 2 - Justo, 3 - Bom, 4 - Excelente (ver artigo para descrição detalhada). Posteriormente, 3 filhotes - 3-8 dias de idade, foram condicionados na gaiola com a fêmea. O Reagrupamento dos filhotes foi observado por 15 minutos e checado por 1 minutos após 30, 45 e 60 minutos. Os filhotes foram deixados com a fêmea até às 10h00 do dia seguinte - neste momento, o ninho era novamente pontuado e os filhotes previamente condicionados com a fêmea eram trocados por novos filhotes da mesma idade para o início da segunda sessão de observação. A fêmea era considerada materna quando reagrupasse ao menos 2 filhotes e agrupado todos os filhotes no período de 1 hora após a primeira exposição aos mesmos.	Estudar os efeitos inibitórios da progesterona, 5-alfa-dihidroprogesterona, 17-alfa-hidroprogesterona, e desoxicorticosterona em relação ao início da expressão dos comportamentos maternos durante a prenhez tardia em fêmeas HO.	Kruskal-Wallis de uma via e Mann-Whitney U statistic. (Ver Siegel, 1956).	Os resultados sugerem que a progesterona durante o final da gravidez inibe o surgimento dos comportamentos direcionados a prole.
Robert S. BRIDGES (1984)	A Quantitative Analysis of the Roles of Dosage, Sequence, and Duration of Estradiol and Progesterone Exposure in the Regulation of Maternal Behavior in the Rat	A quantificação dos comportamentos maternos teve início 1 dia após a retirada dos implantes em todos os grupos experimentais. Os testes comportamentais começaram às 09h30 e 11h00, diariamente. A qualidade dos ninhos foi pontuada (Ver artigo para descrição detalhada). O método utilizado foi o mesmo de BRIDGES & FEDER (1978), diferindo no tempo e parâmetros quantificados. Foram pontuados os seguintes comportamentos: Reagrupamentos, Cifose, Pup-killing (ver BRIDGES & FEDER, 1978), durante o período de 1 hora.	Administração de doses fisiológicas de Estradiol e Progesterona.	Análise de variação Duncan's Multiple T test, para a post-hoc foi utilizado o teste do Chi-quadrado e Fisher. Todos os testes foram de duas vias.	O comportamento materno em nulíparas foi estimulado pelo Estradiol e Progesterona; os comportamentos foram intensificados em relação diretamente proporcional a duração da exposição aos esteróides. O impacto principal do artigo foi desenvolver um modelo de estudo dos comportamentos maternos associado a processos endócrinos e biológicos (i.e. Efeitos da exposição a longo prazo dos hormônios nos eventos bioquímicos, funções sensoriais, e estruturas anômicas (ver artigo para descrição detalhada).
MYERS, M. M.; SQUIRE, S. A. B. J. M.; SHINDELDECKER, R. D.; HOFER, M. A. (1989)	Maternal behavior of SHR Rats and its Relationship to Offspring Blood Pressures	O início das observações foi realizada após o primeiro dia pós-parto, continuada até o vigésimo dia pós parto (de PD1 a PD20). Cada ninhada foi observada duas vezes ao dia, em sessões de 45 minutos - 09h00 e 15h00. As gaiolas não foram perturbadas até o início das observações. O progresso dos comportamentos de cada mãe foi observado durante 5 segundos, 10 vezes a cada 5 minutos. Os comportamentos observados foram registrados em uma lista (20 dias/2 sessões/10 observações por sessão). Os seguintes comportamentos foram quantificados: 1 - Mães no ninho, 2 - Mães em contato com qualquer filhote, 3 - Mãe em contato com mais da metade da prole, 4 - Mãe com os olhos abertos ou fechados, 5 - Mãe lambendo ou acareando filhote, 6 - Mãe carregando filhote, 7 - Mãe manipulando maravalha fora do ninho, 8 - Mãe manipulando maravalha no ninho, 9 - Mãe comendo, 10 - Mãe bebendo, 11 - Mãe Self-grooming, 12 - Mãe explorando, 13 - Mãe explorando com a cabeça levantada, 14 - Amamentação em posição de cifose (Arched-back nursing), 15 - Amamentação detida sobre os filhotes (Blanket-nursing), 16 - Amamentação Passiva - detida de lado (Passive nursing). Em PD12, foi realizado o Teste de Reagrupamento (Retriving test); os filhotes eram removidos da gaiola por um período de 5 minutos e posteriormente retornados a gaiola com a mãe no quadrante oposto ao ninho. A mãe foi observada durante 5 minutos registrando os seguintes comportamentos: 1 - Latência para carregar o primeiro filhote, 2 - Latência para reagrupar o primeiro filhote, 3 - Latência para reagrupar todos os filhotes, 4 - Remover filhote reagrupado do ninho, 5 - Carregar filhotes pela gaiola por intervalo prolongado antes de colocá-lo no ninho, 6 - Manipulação extensiva da maravalha do ninho.	Estudar a diferença entre Ratos espontaneamente hipertensivos (do inglês, Spontaneously hypertensive rats, SHR) e Ratos Kyoto Wistar (WKY).	O número de ocorrência de cada parâmetro foi somado (blocos de 5 dias - período de lactação); Análise de variância (ANOVA) foi utilizado utilizando SAS-GLM (General linear model) module.	Ratos SHR permaneceram mais em posição de amamentação com a coluna arqueada (Cifose) quando comparado a amamentação passiva. Ratos SHR reagruparam a prole mais rápido quando comparado a linhagem WKY.
Francois A. CHAMPAGNE; Darlene D. FRANCIS; Adam MAR; Michael J. MEANEY (2003)	Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development	Os comportamentos das mães foram observados 5 vezes diariamente nos primeiros dias pós parto (até PD6-8) durante 72 minutos, 3 períodos matutinos (10h00, 13h00, 17h00) e 2 períodos noturnos (18h00, 21h00). Durante cada período de observação, foi feito o registro dos comportamentos a cada 3 minutos (25 observações/período x 5 vezes ao dia = 125 observações/mãe/dia) - o observador registou os comportamentos ocorrendo no instante de cada observação. Os parâmetros quantificados foram os mesmos de MYERS et al. (1989).	Mães High licking-Grooming (LG) vs. Mães Low (LG).	Mães High LG foram definidas utilizando a frequência da pontuação de Lamber/Acarear e Amamentação com a coluna arqueada, quando o Desvio Padrão destas era maior que 1 acima da média. Mães Low LG foram definidas quando a pontuação de Lamber/Acarear e Amamentação com a coluna arqueada era maior que 1 abaixo da média. Para calcular a distribuição normal dos dados, foi realizado a análise estatística Kolmogorov-Smirnov. Para análise individual dos dados, foi realizado uma Análise de variância (efeito Grupo e Dias).	Há uma variação natural na frequência de Lamber/Acarear e Amamentação com a coluna arqueada nos primeiros 6-8 dias pós-parto. Para descrição detalhada dos resultados, ver artigo.
Francois CHAMPAGNE; Josie DIORIO; Shakti SHARMA; Michael J. MEANEY (2010)	Naturally occurring variations in the maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors	Metodologia similar a MYERS et al. (1989). Para teste de resposta maternal (Maternal responsiveness Test), ver artigo.	Compare the effects of high licking/grooming mothers on the neurodevelopment and the maternal behavior of the pups. Estudar os efeitos de Mães High LG no desenvolvimento neural e comportamento materno dos filhotes.	Ver análise estatística de CHAMPAGNE et al. (2003).	A indução do comportamento materno (Sensibilização) em ratas nulíparas expostas a mães High LG foi significativamente menor quando comparadas a mães Low LG. Em fêmeas aleatoriamente selecionadas, houve uma correlação negativa entre a latência para o início dos comportamentos maternos no paradigma de sensibilização (Sensitization paradigm), assim como na frequência de filhotes LG durante a lactação. Fêmeas que apresentaram uma resposta materna maior em relação aos filhotes possuem níveis elevados de receptores de ocitocina na área pré-óptica medial, soto lateral, núcleo central da amígdala, núcleo paraventricular do hipotálamo, e núcleo leito da estria terminalis. A administração intracerebroventricular de antagonistas de receptores de ocitocina em mães no terceiro dia pós-parto (PD3) eliminou completamente as diferenças de Lamber/Acarear, indicando que diferentes níveis de receptores ocitocinérgicos estão funcionalmente e diretamente relacionados ao comportamento materno.
Anna R. ZUENA; Manuela ZINNI; Chiara GIULI; Carlo CINQUE; Giovanni S. ALENIA; Alessandro GIULIANI; Assia CATALANI; Paola CASOLINI; Roberto COZZOLINO (2016)	Maternal exposure to environmental enrichment before and during gestation influences behaviour of rat offspring in a sex-specific manner	O comportamento de cada mãe foi observado de PD2 a PD11, durante 60 minutos, 5 vezes ao dia. As sessões foram realizadas às 09h00, 09h00, 12h00, 14h00, e 20h00. Para cada sessão, o comportamento individual das fêmeas foi registrado a cada 4 minutos (75 observações/dia). Os comportamentos quantificados foram os seguintes: 1 - Mãe lambendo ou acareando qualquer filhote, 2 - Amamentação com a coluna arqueada (Cifose), 3 - Amamentação passiva (detida de lado ou sobre os filhotes), 4 - Amamentação total (Passiva + Cifose), 5 - Construção do ninho.	Investigar as possíveis alterações no comportamento e desenvolvimento nervoso da prole cujas as mães foram expostas ao Enriquecimento Ambiental.	Análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) de duas vias (Acondicionamento x Dias, dias como medida repetida) seguido de Fisher's LSD post-hoc, quando apropriado. Quando não observado diferenças estatisticamente significativas, análises individuais do Student's T test foram realizadas para comparação direta. Ver SINCLAIR (1988) para maiores detalhes.	Mães expostas ao enriquecimento ambiental apresentaram uma redução na frequência total de amamentação nos primeiros 2 dias de lactação e um aumento nos comportamentos de Lamber/Acarear. Foi possível observar um efeito relacionado ao sexo da prole: a habilidade de aprenderem foi aperfeiçoado apenas nas fêmeas, comportamentos de interação social e ansiedade foram aumentados nos machos.

ANEXO B

Tabela anexo B - Dados da estatística inferencial para resultados significativos.

Período matutino (7 a.m.) - Controle x Anóxia						
Primeiro reagrupamento						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	7,24	16,81	1,14	8,393	18	0,000002
p3	9	16	1,581	4,427	18	0,004869
p4	15,5	52	4,05	9,013	18	<0,000001
p5	44,83	76	6,723	4,636	18	0,003074
p8	95,17	170,4	13,81	5,447	18	0,000534
p10	158	239,4	18,78	4,335	18	0,005973
Agrupamento						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p7	248,2	315,3	18,14	3,697	18	0,024481
p8	261,7	364,6	28,8	3,574	18	0,032063
p12	554,2	674,5	33,35	3,608	18	0,029768
Amamentação						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	949,4	662,8	38,46	7,451	18	0,00001
p3	1006	803	41,1	4,948	18	0,001559
p4	852,2	719,2	29,86	4,454	18	0,004593
p5	854,7	695,5	40,6	3,921	18	0,014932
p6	793,5	608,5	37,83	4,891	18	0,001763
p9	676,5	502	31,86	5,477	18	0,000502
p11	589	423,5	37,58	4,404	18	0,005125
p14	495,1	398,6	21,99	4,392	18	0,005264
Lamber/Acariciar						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	351	292,5	14,55	4,021	18	0,011964
p3	331,2	253	17,78	4,397	18	0,005207
p4	362	255,8	19,25	5,515	18	0,000463
p6	399	271	31,59	4,052	18	0,011151
p9	322,3	222	21,83	4,596	18	0,003356
Self-grooming						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	178,7	235	12,74	4,421	18	0,004935
p3	170,8	222	11,91	4,297	18	0,006489
p4	152,2	245	12,96	7,162	18	0,000017
p6	188	270,3	21,35	3,855	18	0,017249
p8	202,2	287,2	22,81	3,726	18	0,022944
Período noturno (7 p.m.) - Controle x Anóxia						
Primeiro reagrupamento						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	15	35	4,393	4,553	18	0,003695

p3	24,59	52	3,045	9,003	18	<0,000001
p5	66,5	98	8,418	3,742	18	0,022145
p6	75	111	8,602	4,185	18	0,008316
p7	125	166	11,67	3,514	18	0,036505
p8	137	188	12,29	4,151	18	0,008963
p11	250,3	323	10,55	6,887	18	0,000029
Agrupamento						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	123	196	7,645	9,549	18	<0,000001
p3	204	264	6,106	9,826	18	<0,000001
p4	233	343	14,31	7,686	18	0,000006
p5	294	439	21,56	6,725	18	0,00004
p6	375	497	21,97	5,554	18	0,000427
p8	398	532	35,82	3,741	18	0,022209
Lamber/Acariciar						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	253,5	209,2	12,15	3,649	18	0,027194
p5	299,2	256,3	11,42	3,75	18	0,02176
Self-grooming						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	204	248	9,581	4,592	18	0,003385
p6	218,3	270,3	13,42	3,876	18	0,016483
p7	205	277,7	15,23	4,771	18	0,002289
Controle - Matutino x Noturno						
Primeiro reagrupamento						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p3	9	24,59	2,443	6,381	18	0,000078
p4	15,5	48,6	4,235	7,816	18	0,000005
p7	88	125	9,351	3,957	18	0,013867
p10	158	249,4	18,78	4,867	18	0,001858
Agrupamento						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	44	123	8,815	8,962	18	<0,000001
p3	48,5	204	7,097	21,91	18	<0,000001
p4	155,2	233	17,43	4,463	18	0,004509
p5	189,6	294	26,69	3,912	18	0,015316
p6	274,8	375	25,08	3,996	18	0,012711
p8	261,7	398	37,96	3,591	18	0,031326
Amamentação						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	949,4	739,3	31,35	6,701	18	0,000042
p3	1006	722	33,73	8,43	18	0,000002
p4	852,2	695	31,49	4,992	18	0,001418
p5	854,7	704	43,48	3,465	18	0,041443
Lamber/Acariciar						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P

p2	351	253,5	12,4	7,864	18	0,000005
p3	331,2	234,5	13,07	7,395	18	0,000011
p4	362	255,2	13,6	7,854	18	0,000005
p5	382	299,2	22,21	3,73	18	0,023005
p6	399	296,5	24,39	4,203	18	0,008028
Self-grooming						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	178,7	253,5	12,34	6,063	18	0,000149
p3	170,8	234,5	8,995	7,078	18	0,00002
p4	152,2	255,2	9,082	11,34	18	<0,000001
p5	170,2	299,2	12,15	10,62	18	<0,000001
p6	188	296,5	17,81	6,093	18	0,00014
p8	202,2	282,8	18,77	4,298	18	0,006502
p9	199	262,3	18,71	3,385	18	0,049435
p12	169	236	16,32	4,105	18	0,009972
p13	136	229	20,45	4,548	18	0,003736
p14	153	240,6	21,67	4,042	18	0,011484
Anóxia - Matutino x Noturno						
Primeiro reagrupamento						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	16,81	35	3,847	4,728	18	0,002516
p3	16	52	2,408	14,95	18	<0,000001
p11	250,3	323	10,55	6,887	18	0,000029
Agrupamento						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	62	196	11,36	11,79	18	<0,000001
p3	67,83	264	6,387	30,71	18	<0,000001
p4	188,8	343	14,03	10,99	18	<0,000001
p5	247,4	439	18,04	10,62	18	<0,000001
p6	327,1	497	20,2	8,408	18	0,000002
p7	315,3	501	21,18	8,77	18	<0,000001
p8	364,6	532	25,91	6,46	18	0,000067
p9	392,5	513	33,9	3,555	18	0,033971
Amamentação						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p3	803	644	36,96	4,302	18	0,006435
Lamber/Acariciar						
Dia pós-parto	Média C	Média A	EP da diferença	Razão de T	GL	valor de P
p2	292,5	209,2	14,34	5,812	18	0,000249
Evolução ponderal p2-p21						
Comparações múltiplas - Tukey						
p8						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
FC vs. FA	17,24	15,34	0,2612 to 3,533	4,215	3120	0,0154
p9						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P

MC vs. MA	19,61	17,97	0,005112 to 3,277	3,646	3120	0,0489
FC vs. FA	19,56	17,29	0,6320 to 3,904	5,04	3120	0,0021
p10						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	21,81	19,83	0,3452 to 3,617	4,402	3120	0,0101
FC vs. FA	21,57	18,98	0,9601 to 4,232	5,769	3120	0,0003
p11						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	24,59	21,99	0,9635 to 4,235	5,776	3120	0,0003
FC vs. FA	23,86	21,24	0,9791 to 4,251	5,811	3120	0,0002
p12						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	26,69	24,28	0,7713 to 4,043	5,349	3120	0,0009
FC vs. FA	26,2	23,23	1,340 to 4,612	6,614	3120	<0,0001
p13						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	29,06	27,29	0,1387 to 3,410	3,943	3120	0,0273
FC vs. FA	28,57	24,9	2,040 to 5,311	8,167	3120	<0,0001
p14						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	30,79	28,03	1,121 to 4,393	6,127	3120	<0,0001
FC vs. FA	30,95	26,76	2,555 to 5,826	9,312	3120	<0,0001
p15						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	33,68	30,55	1,489 to 4,760	6,943	3120	<0,0001
MA vs. FA	30,55	28,74	0,1765 to 3,448	4,027	3120	0,023
FC vs. FA	32,88	28,74	2,508 to 5,780	9,208	3120	<0,0001
p16						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	36,23	32,41	2,193 to 5,464	8,507	3120	<0,0001
MA vs. FA	32,41	31,02	-0,2487 to 3,023	3,082	3120	0,1291
FC vs. FA	34,87	31,02	2,219 to 5,490	8,565	3120	<0,0001
p17						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	38,07	34,02	2,418 to 5,690	9,009	3120	<0,0001
MA vs. FA	34,02	32,55	-0,1687 to 3,103	3,26	3120	0,097
FC vs. FA	37,28	32,55	3,089 to 6,361	10,5	3120	<0,0001
p18						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	40,48	36,38	2,466 to 5,738	9,115	3120	<0,0001
MA vs. FA	36,38	34,36	0,3857 to 3,657	4,492	3120	0,0082
FC vs. FA	39,32	34,36	3,325 to 6,597	11,02	3120	<0,0001
p19						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	42,92	38,49	2,798 to 6,070	9,853	3120	<0,0001
MA vs. FA	38,49	36,29	0,5657 to 3,837	4,892	3120	0,0031

FC vs. FA	41,7	36,29	3,779 to 7,051	12,03	3120	<0,0001
p20						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	46,01	41,15	3,219 to 6,491	10,79	3120	<0,0001
MA vs. FA	41,15	39,4	0,1181 to 3,390	3,898	3120	0,03
FC vs. FA	45,16	39,4	4,125 to 7,396	12,8	3120	<0,0001
p21						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	50,11	44,93	3,543 to 6,815	11,51	3120	<0,0001
MC vs. FC	50,11	48,11	0,3556 to 3,627	4,425	3120	0,0096
MA vs. FA	44,93	42,42	0,8701 to 4,142	5,569	3120	0,0005
FC vs. FA	48,11	42,42	4,057 to 7,329	12,65	3120	<0,0001
Evolução ponderal p30-p70						
Comparações múltiplas - Tukey						
p30						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	105	90,21	7,874 to 21,75	7,772	780	<0,0001
MC vs. FC	105	79,43	18,65 to 32,53	13,43	780	<0,0001
MA vs. FA	90,21	70,31	12,96 to 26,84	10,44	780	<0,0001
FC vs. FA	79,43	70,31	2,182 to 16,06	4,786	780	0,0042
p40						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. FC	173,1	131,7	34,45 to 48,33	21,72	780	<0,0001
MA vs. FA	169,1	130,9	31,33 to 45,20	20,08	780	<0,0001
p50						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	259,4	231,2	21,22 to 35,10	14,77	780	<0,0001
MC vs. FC	259,4	176,3	76,15 to 90,03	43,6	780	<0,0001
MA vs. FA	231,2	162,2	62,09 to 75,97	36,22	780	<0,0001
FC vs. FA	176,3	162,2	7,156 to 21,03	7,396	780	<0,0001
p60						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	325,7	282,5	36,25 to 50,12	22,66	780	<0,0001
MC vs. FC	325,7	204	114,7 to 128,6	63,83	780	<0,0001
MA vs. FA	282,5	178,8	96,73 to 110,6	54,4	780	<0,0001
FC vs. FA	204	178,8	18,27 to 32,14	13,23	780	<0,0001
p70						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	357,6	319,9	30,80 to 44,68	19,8	780	<0,0001
MC vs. FC	357,6	218	132,7 to 146,5	73,25	780	<0,0001
MA vs. FA	319,9	196,3	116,6 to 130,5	64,82	780	<0,0001
FC vs. FA	218	196,3	14,74 to 28,61	11,37	780	<0,0001
Total de chamados (40 kHz)						
Comparações múltiplas - Tukey						
p4						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P

MA vs. FA	278,1	238,1	6,176 to 73,82	4,299	2496	0,0128
p5						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MA vs. FA	300,7	259,9	6,926 to 74,57	4,38	2496	0,0106
p6						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MA vs. FA	327	254,8	38,34 to 106,0	7,757	2496	<0,0001
FC vs. FA	316,6	254,8	27,98 to 95,63	6,643	2496	<0,0001
p7						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	369,3	432,5	-96,99 to -29,34	6,79	2496	<0,0001
MC vs. FC	369,3	333,9	1,593 to 69,24	3,807	2496	0,036
MA vs. FA	432,5	310,3	88,43 to 156,1	13,14	2496	<0,0001
p8						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	408,8	446,4	-71,41 to -3,760	4,04	2496	0,0224
MC vs. FC	408,8	373,3	1,760 to 69,41	3,825	2496	0,0347
MA vs. FA	446,4	338,5	74,09 to 141,7	11,6	2496	<0,0001
FC vs. FA	373,3	338,5	0,9264 to 68,57	3,735	2496	0,0414
p9						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	314,6	368,9	-88,16 to -20,51	5,84	2496	0,0002
MA vs. FA	368,9	264,9	70,18 to 137,8	11,18	2496	<0,0001
p10						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	288,2	323,3	-68,89 to -1,245	3,769	2496	0,0387
MA vs. FA	323,3	278,8	10,59 to 78,24	4,774	2496	0,0042
p11						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. FC	294,9	244,5	16,54 to 84,19	5,413	2496	0,0008
p12						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. FC	252,8	210,3	8,737 to 76,38	4,575	2496	0,0068
MA vs. FA	265	219,5	11,72 to 79,37	4,896	2496	0,0031
p13						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MA vs. FA	132,2	95	3,376 to 71,02	3,999	2496	0,0244
Duração média p7-p9						
Comparações múltiplas - Tukey						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	60,22	34,81	11,97 to 38,86	7,022	76	<0,0001
Duração total p7-p9						
Comparações múltiplas - Tukey						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	60,22	4,806	43,07 to 67,75	16,68	76	<0,0001

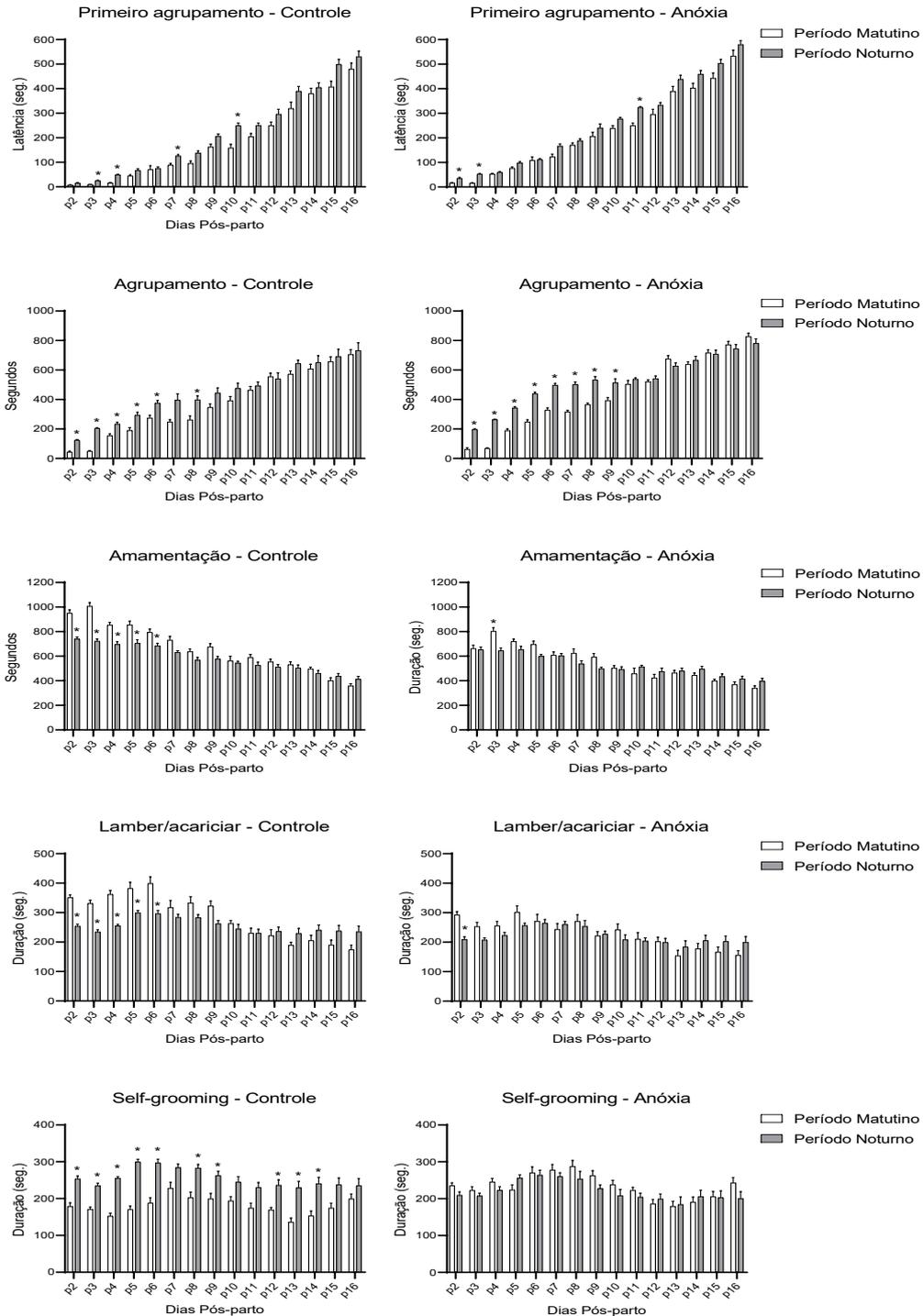
MA vs. FA	4,806	17,4	-24,94 to -0,2525	3,791	76	0,0437
FC vs. FA	60,13	17,4	30,39 to 55,07	12,86	76	<0,0001
Limiar de detecção de luminescência						
Comparações múltiplas - Tukey						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	3,333	9,875	-8,541 to -4,542	12,66	27	<0,0001
MC vs. FC	3,333	5,833	-4,690 to -0,3099	4,418	27	0,0207
MC vs. FA	3,333	12,8	-11,80 to -7,135	15,71	27	<0,0001
MA vs. FC	9,875	5,833	1,676 to 6,407	6,612	27	0,0004
MA vs. FA	9,875	12,8	-5,422 to -0,4279	4,533	27	0,0171
FC vs. FA	5,833	12,8	-9,619 to -4,314	10,17	27	<0,0001
Acurácia						
Comparações múltiplas - Tukey						
SOA 200						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	0,9417	0,7778	0,04163 to 0,2861	4,734	24	0,0073
MC vs. FA	0,9417	0,647	0,1724 to 0,4169	8,512	24	<0,0001
MA vs. FA	0,7778	0,647	0,008529 to 0,2530	3,778	24	0,0344
SOA 400						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	0,8352	0,7025	0,01038 to 0,2549	3,832	24	0,0317
MC vs. FA	0,8352	0,6163	0,09661 to 0,3411	6,322	24	0,0005
SOA 800						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. FA	0,7583	0,614	0,02207 to 0,2666	4,169	24	0,0185
SOA 1200						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. FA	0,6972	0,5619	0,01304 to 0,2576	3,908	24	0,0281
Erro 1						
Comparações múltiplas - Tukey						
SOA 200						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	1,667	87,33	-152,3 to -19,07	4,543	24	0,01
MC vs. FA	1,667	102,7	-167,6 to -34,40	5,356	24	0,0025
SOA 400						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	3	103	-166,6 to -33,40	5,303	24	0,0027
MC vs. FA	3	123	-186,6 to -53,40	6,364	24	0,0004
SOA 800						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	1,667	83	-147,9 to -14,74	4,313	24	0,0147
MC vs. FA	1,667	97,67	-162,6 to -29,40	5,091	24	0,004
SOA 1200						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	1,667	106,3	-171,3 to -38,07	5,551	24	0,0018

MC vs. FA	1,667	121,7	-186,6 to -53,40	6,364	24	0,0004
Erro 4						
Comparações múltiplas - Tukey						
SOA 200						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. FA	2,333	17	-26,56 to -2,777	4,357	24	0,0137
MA vs. FA	4,667	17	-24,22 to -0,4439	3,664	24	0,041
Erro 5						
Comparações múltiplas - Tukey						
SOA 800						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. MA	0,3333	4	-7,327 to -0,006502	3,538	24	0,0495
MC vs. FA	0,3333	6	-9,327 to -2,007	5,468	24	0,0021
SOA 1200						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. FA	0,6667	5,333	-8,327 to -1,007	4,503	24	0,0107
Erro 7						
Comparações múltiplas - Tukey						
SOA 200						
Grupos	Média 1	Média 2	95,00% CI da dif.	q	GL	valor de P
MC vs. FA	2	14,33	-19,35 to -5,319	6,21	24	0,0006
MA vs. FA	6	14,33	-15,35 to -1,319	4,196	24	0,0178

Legenda: GL = grau de liberdade; EP = erro padrão; MC = macho controle; MA = macho anóxia; FC = fêmea controle; FA = fêmea anóxia; p = dias pós-parto; P = valor de significância; SOA = Stimulus onset asynchrony.

ANEXO C

Comparação entre período matutino e noturno.



Período matutino x noturno: Os dados estão representados como média \pm EPM. Teste T não pareado, correção para comparações múltiplas Bonferroni-Dunn. * $p < 0,05$, matutino x noturno. Dados estatísticos ANEXO B.

ANEXO D

Atividades realizadas em paralelo ao projeto de mestrado.

1 – Projeto de Iniciação Científica (Matheus Cerussi de Souza) em colaboração a Prof^a. Dr^a Marucia Chacur. Artigo sendo redigido para publicação.

Title: Neonatal anoxia enhanced hyperalgesia and allodynia in female rats through astrocyte induced chronic inflammation and decrease motor neurons in the lumbar spinal cord

Abstract: Neonatal anoxia (NA) occurs due to a lack of oxygen supply, which results in long-term neurodevelopment deficits, harmful in preterm newborns. Chronic neuropathic pain (CNP), defined as “pain caused by a lesion or disease of the somatosensory system”, reach 7-10% of the population. To determine whether oxygen deprivation throughout early development increases the nociceptive sensibility, with long-term inflammatory feedback in the spinal cord (SC), Wistar rats (anoxia in 30h old, gas chamber, 100% nitrogen flux for 25 min.) were tested in P23 (postpartum day) and P90. Nociceptive paw withdraws reaction through Randal-Selitto test, Hargreaves test, and manual von Fray test were measured. Lumbar SC (L4-L6) motor neurons (MNs) counted and compared through their respective controls. In P70, Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression was evaluated in the SC. Our results showed an increase in nociceptive responses in both anoxia males and females. There was a decrease of MNs in adult anoxia female, with an upregulation of GFAP expression in the SC. We conclude that NA increased hyperalgesia and allodynia, in both ages and sex-related manner. Only adult anoxia female group presented a significant decrease in MNs (L4-L6), with an increase in GFAP expression in the SC. This result suggests that a chronic inflammatory process in the SC of oxygen-deprived rats may play a major role in the increase hyperalgesia and allodynia, also impacting their motor reflex responses.

2 – Artigo em colaboração com Dr^a Amrita Kumar (em processo de publicação).

Title: Sensorimotor development of male and female rats subjected to neonatal anoxia.

Authors: Amrita Jha Kumar^{1*}, Ammir Yacoub Helou¹, Gilberto Fernando Xavier², Maria Inês Nogueira¹

Affiliation:

1 Neuroscience Laboratory, Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 2415, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil. minog@usp.br

2 Department of Physiology, Institute of Biosciences, Universidade de São Paulo.
Rua do Matão 14,05508-900, São Paulo, SP, Brazil. gfxavier@usp.br

Running title: Sensory motor development of rats subjected to neonatal anoxia.

Number of text pages: 13

Number of Figures: 9

***Corresponding author:**

Amrita Jha Kumar, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes 2415,
Cidade Universitária, 09855-070, São Paulo, SP, Brasil. Phone: 55-11-30917401.

E-mail: ajha@usp.br

Abstract

To evaluate neonatal anoxia effects on complex early somatic, neurological and motor development in rats, we used an adapted and validated model. Previous studies of this lab have shown alterations in neurological reflexes and behavior of the suckling pups. The characterization of motor and cognitive dysfunctions following a neonatal brain injury is a prerequisite to investigate putative behavioural/physiological or pharmacological interventions. In addition, it is relevant to develop strategies to reduce social and health care costs of this wide global health condition. To this end, the present study, evaluated the sex differences in Wistar rats in neurological reflex, motor development and structure of some brain areas. It was observed different degrees of damage in development and brain histology according to sex and parameter evaluated. A variety of motor coordination reflexes, tested before weaning, were affected, male rat suffered the most. So far, the results indicate that neonatal anoxia caused neurobehavioral alterations, asymmetrical motor behaviour with brain damage, possibly related to cognitive impairments previously observed at adolescence. These neurological and motor alterations may represent a useful endpoint for studying the efficacy of potential strategies and treatments that may improve the developmental consequences of a perinatal asphyxia insult in humans.

Keywords: Perinatal asphyxia, neurological reflex, motor development, substantia nigra compact dorsal, corpus callosum, sex difference.

3 – Projeto de Iniciação Cientific (João Miguel Alvez Nunes) – Instituto Butantan em colaboração com Dr^a Karina Rodrigues Da Silva Banci. Elaboração de Atlas estereotáxico do encéfalo de cascavel (*Crotalus durissus*).

Título do projeto: Neuroplasticidade em serpentes: relação entre o uso espacial e o volume do córtex medial e dorsal de cascavel

Resumo: Muitos estudos relatam que a região hipocampal está relacionada à memorização, aprendizado e ao desenvolvimento de habilidades de uso espacial. Correlações neuro-ecológicas positivas entre o volume hipocampal e aspectos de ecologia espacial já foram reportados para mamíferos e aves. Em répteis-não-aves, os córtices medial e dorsal são considerados homólogos à formação hipocampal de mamíferos e aves. Os poucos trabalhos com Squamata (lagartos e serpentes) têm demonstrado uma correlação positiva entre uso intensivo do ambiente e o aumento na taxa de neurogênese e no volume do córtex. Porém, até o momento, não se tem informações sobre serpentes neotropicais. A cascavel (*Crotalus durissus*) é uma serpente com distribuição muito abrangente, e possui veneno de grande interesse médico e farmacológico. Por este motivo, estes animais são muitas vezes mantidos em cativeiros de produção e pesquisa. Contudo, a criação das serpentes em cativeiro intensivo acarreta diversos efeitos negativos à fisiologia normal do animal. Neste sentido, uma de nossas hipóteses a ser testada no presente projeto é que as serpentes criadas em cativeiro desde filhotes possuam menor volume cortical do que animais selvagens, uma vez que seu uso espacial é limitado. Além disso, sabe-se que o padrão geral em viperídeos é que os machos procurem pelas fêmeas no período reprodutivo, o que faz com que se desloquem mais. Portanto, nossa outra hipótese é de que machos selvagens possuam maior volume cortical do que fêmeas, o que não aconteceria com machos de cativeiro. Para responder essa questão, na fase inicial do projeto nos focamos em estabelecer protocolos metodológicos. Deste modo, estabelecemos protocolos de perfusão transcardíaca, dissecação, microtomia e coloração por Nissl. Isso nos permitiu visualizar as regiões de interesse (córtices medial e dorsal).

Figuras confeccionadas:



Fig. 1. Etapas de dissecação de encéfalo de *C. durissus*. I-estágio inicial; II- cortes nas membranas orais; III- pele rebatida; IV- crânio cortado e ossos retirados; V- abertura da caixa craniana e VI- encéfalo retirado

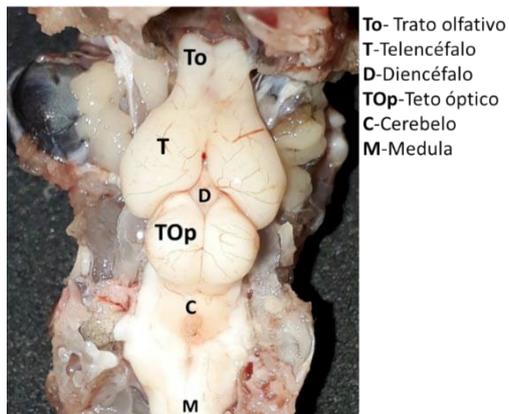


Fig. 2. Anatomia macroscópica do encéfalo de *C.durissus*.

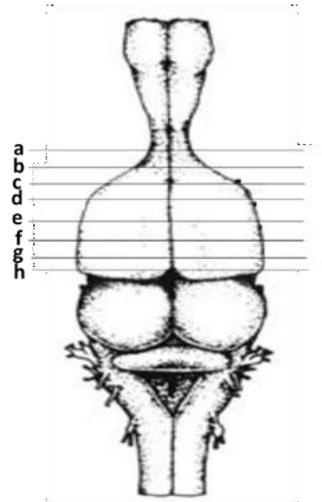
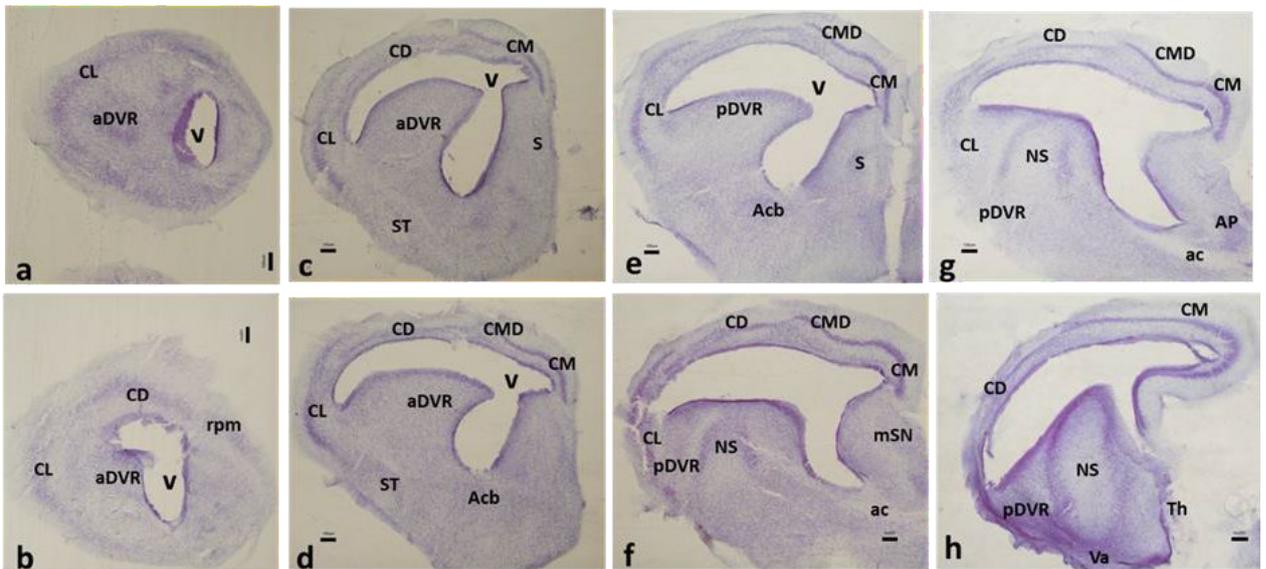
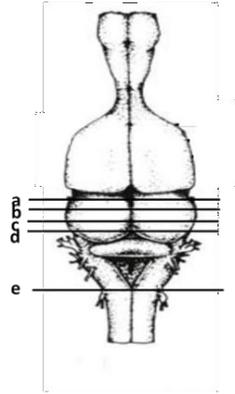
A**B**

Fig. 3: Cortes histológicas do telencéfalo de *C. durissus*, mostrando esquema de encéfalo de *C. durissus* com linhas transversais indicando os níveis de corte (em A), e série de cortes cerebrais (50 μ m) corados por pela técnica de Nissl, mostrando apenas o lado esquerdo do telencéfalo (em B). As letras no canto inferior esquerdo (em B) correspondem aos seus respectivos níveis de corte (em A). Barra preta corresponde a 100 μ m. Abreviações: Accubens (Acb); Área Preótica (AP); Comissura anterior (ac); Córtex lateral (CL); Crista ventricular anterior dorsal (aDVR); Córtex medial (CM); Córtex médio-dorsal (CMD); Córtex Dorsal (CD); Crista ventricular posterior dorsal (pDVR), Septum (S); Striatum (ST), Núcleo Sphericus (NS); Núcleo Amigdalóide ventral (Va); Núcleo medial septal (mSN); Região Retobulbal dorsomedial (rpm); Thalamus (Th) e Ventrículo (V).

(A)



(B)

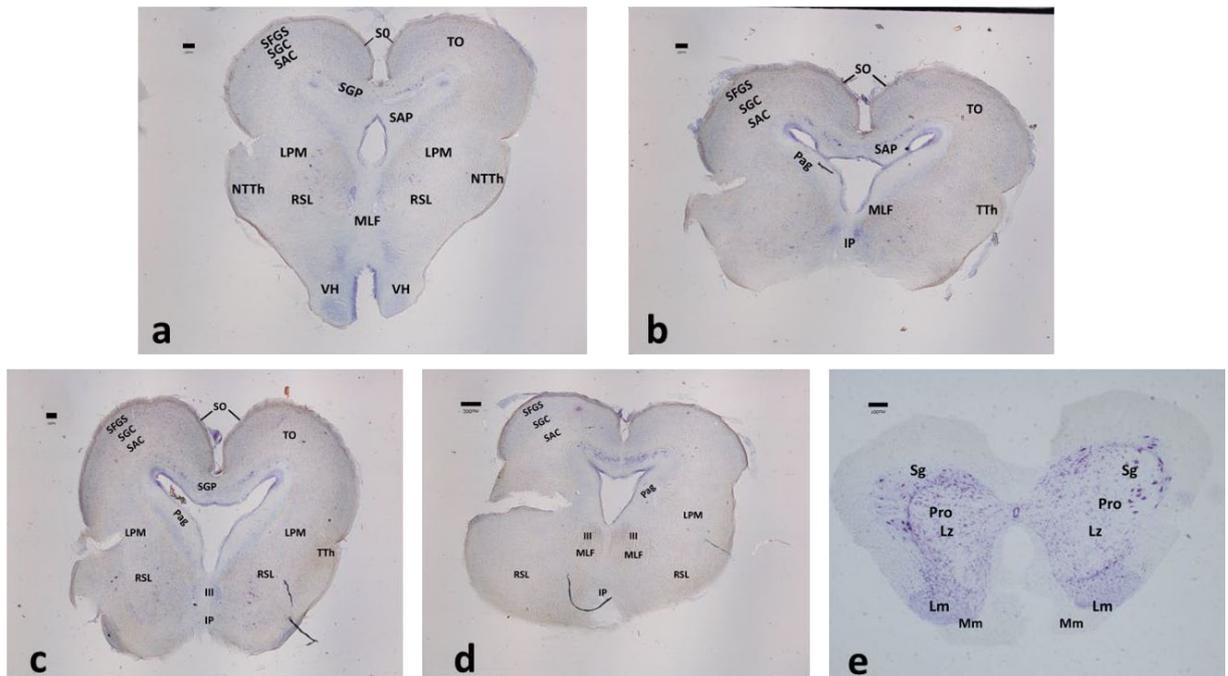


Fig. 4: Cortes histológicas do Teto óptico e medula, mostrando esquema de encéfalo de *C. durissus* com linhas transversais indicando os níveis de corte (em A), e série de cortes cerebrais (50μm) corados por pela técnica de Nissl, os dois hemisférios estão representados (em B). As letras no canto inferior esquerdo (em B) correspondem aos seus respectivos níveis de corte (em A). Barras pretas representam 100μm. Abreviações: Centro album stratum (SAC); Periventrículo stratum album (SAP); stratum fibrosum et griseum superficial (SFGS); centro stratum griseum (SGC);Tectum óptico (TO); Hypothalamus Ventral (VH); Trato Tectothalamico (TTh); Reticularis superioris pars lateralis (RSL); Nucleus lateralis profundus mesencephali (LPM); Medial longitudinal fascículos (MLF); Interpeduncular nucleus (IP); Ocuimotor nucleus (III); stratum opticum (SO); periaqueductal cinza (Pag);Zona intermediária (ZI); Coluna lateral de motoneurônios (Lm); Núcleo proprius (Pro); substância gelatinosa (Sg).