

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ANA CAROLINE SILVEIRA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DE UMA DIETA SUPLEMENTADA COM AZEITE DE  
OLIVA SOBRE O COMPORTAMENTO MATERNO E EMOCIONALIDADE DE  
RATAS SUBMETIDAS À SEPARAÇÃO MATERNA**

**Porto Alegre, 2018**

**ANA CAROLINE SILVEIRA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DE UMA DIETA SUPLEMENTADA COM AZEITE DE OLIVA SOBRE O COMPORTAMENTO MATERNO E EMOCIONALIDADE DE RATAS SUBMETIDAS À SEPARAÇÃO MATERNA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Bioquímica na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rachel Krolow  
Co-orientadora: MSc. Alessandra Gonçalves Machado

**Porto Alegre, 2018**

**ANA CAROLINE SILVEIRA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DE UMA DIETA SUPLEMENTADA COM AZEITE DE OLIVA SOBRE O COMPORTAMENTO MATERNO E EMOCIONALIDADE DE RATAS SUBMETIDAS À SEPARAÇÃO MATERNA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel (a) em Ciências Biológicas com ênfase em Bioquímica na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Aprovado em:** 10 de dezembro de 2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Carlos Eduardo Schnorr - CUC

---

Dr<sup>a</sup>. Cristie Noschang - UFRGS

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rachel Krolow - UFRGS (orientadora)

## RESUMO

**Introdução:** A relação mãe-filho é extremamente importante para o desenvolvimento do sistema nervoso central. Nos primeiros estágios de vida a mãe exerce um comportamento que visa proteger, nutrir, aquecer e promover o contato físico necessário até que os filhotes possam sobreviver sozinhos. A separação materna pode induzir a ruptura dessa ligação, desencadeando comportamento depressivo nas mães e intervindo no cuidado materno e desenvolvimento da prole. Além disso, a condição nutricional durante a gestação e lactação também afeta diretamente o desenvolvimento intra-uterino dos filhotes e influencia no comportamento desencadeado pelas mães no período pós-natal. O uso de dietas ricas em antioxidantes e ácidos graxos monoinsaturados, como o azeite de oliva, têm mostrado benefícios à saúde. Nesse sentido, o uso de uma dieta com azeite de oliva poderia trazer benefícios ao sistema nervoso central, podendo contribuir para uma maior qualidade no cuidado materno. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de uma dieta com azeite de oliva durante o período gestacional e lactacional sobre o comportamento materno e a emocionalidade de mães que sofreram separação da prole. **Metodologia:** Foram adquiridas 38 ratas Wistar primíparas no primeiro dia gestacional, que foram inicialmente divididas em dois grupos: (1) mães alimentadas com ração padrão + óleo de soja e (2) mães alimentadas com ração padrão + azeite de oliva. Após o nascimento da prole, esses grupos foram subdivididos em 4 grupos experimentais: (1) Intacto OS; (2) Intacto AO; (3) Separado OS e (4) Separado AO. O consumo alimentar, o peso corporal e o ciclo estral foram monitorados. Do dia pós-natal 1 até o dia pós-natal 10 ocorreu simultaneamente a separação materna e a avaliação do comportamento materno. Para a separação materna, os filhotes foram mantidos em uma incubadora à 34°C durante 3 horas por dia, e a observação do comportamento materno ocorreu em 5 sessões por dia nos horários das 06h, 10h, 13h, 17h30 e 20h com observações de 3 em 3 min, totalizando 25 observações por sessão. Os parâmetros avaliados foram a frequência de lambidas e a frequência da postura de amamentação com o dorso arqueado. Também foram avaliados a atividade locomotora e o comportamento emocional das mães, através dos testes de campo aberto, corredor alimentar e nado forçado. **Resultados:** Os resultados foram analisados por Anova de Medidas repetidas ou Anova de duas vias quando indicado, sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ . As mães submetidas à separação materna aumentaram a frequência de lambidas na prole e a postura de amamentação com dorso arqueado principalmente às 17h30, no entanto esse cuidado foi de forma inconsistente. As ratas que receberam azeite de oliva aumentaram a frequência de lambidas na prole de forma consistente. Além disso, o consumo de azeite de oliva preveniu o aumento da postura de amamentação com dorso arqueado induzido pela separação materna às 17h30 e ao longo dos dias de observação. Mães submetidas à separação materna apresentaram um comportamento depressivo, que não foi prevenido pelo consumo de azeite de oliva. Assim, o consumo de uma dieta com azeite de oliva foi capaz de agir sobre parâmetros do comportamento materno, aumentando o cuidado materno de forma mais homogênea e não alterou a emocionalidade dessas ratas, sugerindo um possível papel neuroprotetor e uma estratégia para proteger as ratas mães no pós-parto dos efeitos da separação materna.

**Palavras-chave:** gestação; relação mãe-filho; separação materna; cuidado materno; azeite de oliva; depressão.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACTH:** Hormônio adrenocorticotrópico

**BDNF:** Fator neurotrófico derivado do cérebro

**CCAC:** *Canadian Council on Animal Care*

**CONCEA:** Conselho nacional de controle de experimentação animal

**DBCA:** Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins de ensino ou de pesquisa científica

**HPA:** Eixo Hipotálamo - Pituitária - Adrenal

**MUFAS:** Ácidos graxos monoinsaturados

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PN:** Pós - natal

**SNC:** Sistema Nervoso Central

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Fundamentação teórica.....</b>	<b>9</b>
2.1 Díade mãe-filho.....	9
2.2 Cuidado Materno.....	9
2.3 Ruptura do vínculo entre mãe e filho.....	11
2.3.1 Separação Materna.....	12
2.4 Nutrição Materna.....	14
2.5 Azeite de Oliva.....	15
2.5.1 Efeitos do azeite de oliva no SNC e metabolismo periférico.....	15
<b>3. Justificativa.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Objetivo.....</b>	<b>18</b>
4.1 Objetivos específicos.....	18
<b>5. Metodologia.....</b>	<b>19</b>
5.1 Aspectos Éticos.....	19
5.2 Cálculo do tamanho amostral.....	19
5.3 Animais.....	20
5.4 Dietas.....	21
5.5 Intervenção neonatal.....	22
5.6 Testes comportamentais.....	22
5.6.1 Observação do comportamento materno.....	22
5.6.2 Inconsistência comportamental.....	23
5.6.3 Campo aberto.....	24
5.6.4 Corredor alimentar.....	24
5.6.5 Nado forçado.....	25
5.7 Ciclo estral.....	25
5.8 Eutanásia.....	25
5.9 Análises Estatísticas.....	26
<b>6. Resultados.....</b>	<b>27</b>
6.1 Consumo alimentar e peso corporal.....	27
6.2 Cuidado Materno.....	29
6.3 Atividade locomotora e comportamento emocional.....	34
<b>7. Discussão.....</b>	<b>39</b>
<b>8. Conclusão.....</b>	<b>45</b>
<b>9. Perspectivas.....</b>	<b>46</b>
<b>10. Referências.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>
ANEXO A - Tabela com a análise do percentual de ácidos graxos presente no azeite de oliva utilizado.....	59
ANEXO B - Tabela de registro das observações do comportamento materno.....	60

## **1. Introdução**

Inúmeras espécies desempenham o cuidado parental, sobretudo o cuidado materno. E essa relação mãe - filhote é extremamente importante para o desenvolvimento da prole, principalmente nas fases iniciais da vida. No entanto, essa relação é suscetível a interferências tanto de caráter ambiental quanto nutricional, assim, intervenções ocorridas durante essa fase, como a separação materna, podem ocasionar a ruptura dessa ligação, comprometendo a qualidade do cuidado desenvolvido pelas mães no período pós-natal e o desenvolvimento dos filhotes (Diehl et al., 2007; Couto - Pereira et al, 2016). Alguns estudos mostram que a separação materna acarreta em uma série de alterações comportamentais e emocionais nessas mães, induzindo o comportamento depressivo (Boccia et al., 2007). Também tem sido proposto que o cuidado materno desencadeado durante o período neonatal predispõe os filhotes a diversas condições que modulam o desenvolvimento e a maturação do Sistema Nervoso Central (SNC) e ainda prepara a prole para responder ao ambiente, programando a resposta do eixo Hipotálamo - Pituitária - Adrenal (HPA) ao estresse (Liu et al, 1997). Dessa forma, as alterações ocasionadas pela ruptura do vínculo entre mãe e filho afetam o desenvolvimento dos filhotes, sendo que alguns prejuízos perduram até a idade adulta e aumentam a vulnerabilidade para diversos transtornos.

Em relação aos humanos, o comportamento depressivo no pós-parto também pode ser determinante para a baixa qualidade do cuidado materno. Alguns dados recentemente publicados estimam que 26,3% das mulheres brasileiras apresentam sintomas de depressão pós-parto. E ainda, de acordo com uma pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) 5,8% dos brasileiros apresentam quadros de depressão e 9,3% de ansiedade, e assim, poderíamos correlacionar o cuidado materno defasado no início da vida e a elevada prevalência de transtornos de ordem psiquiátrica. Inclusive, existem campanhas que buscam estimular esse vínculo entre mãe e filho principalmente nos primeiros mil dias de vida, que é onde ocorre o maior desenvolvimento do sistema nervoso, do sistema imunológico e a formação dos hábitos alimentares (Villares, 2016).

Como já mencionado anteriormente, o estado nutricional das mães durante a gestação e a lactação também promove forte influência no desenvolvimento dos filhotes, já que modula

o ambiente intra-uterino, condiciona o aporte de nutrientes que a prole absorve e ainda pode influenciar no comportamento desempenhado pelas mães. Diante disto, é crescente a busca por alimentos que tragam benefícios ao metabolismo periférico e ao sistema nervoso central, como o azeite de oliva.

O uso de dietas compostas por azeite de oliva, como a Dieta do Mediterrâneo, vem sendo associadas a maior saúde, longevidade e também mostram benefícios ao cérebro. Estudos apontam para a melhora da função cognitiva e atraso na progressão da doença de Alzheimer (Scarmeas et al., 2009; Gu et al., 2010), atuando também na profilaxia de doenças neurodegenerativas, na melhora da função mitocondrial dos neurônios e ainda reduz os efeitos do estresse sobre as células (Zheng et al., 2015). Esses benefícios estão sendo associados à alta porcentagem de ácido oléico, um ácido graxo monoinsaturado conhecido por desempenhar um importante papel antioxidante e neuroprotetor. Assim, alguns estudos demonstram que o uso de dietas compostas por ácido oléico beneficiam o sistema nervoso central, melhorando o desempenho cognitivo e aumentando os níveis plasmáticos e encefálicos de BDNF, uma proteína responsável por estimular a formação de células neurais (Solfrizzi et al., 2006; Naqvi et al., 2011; Paes, et al., 2015). Diante do exposto acima, este estudo propõe investigar se o consumo de uma dieta composta por azeite de oliva poderia melhorar a qualidade do cuidado materno e a emocionalidade de mães que foram separadas dos seus filhos.



## **2. Fundamentação teórica**

### **2.1 Díade mãe-filho**

Ainda que muitas espécies de vertebrados e até alguns táxons de invertebrados desempenham alguma forma de cuidado parental (Rosenblatt e Snowdon, 1996), somente em mamíferos as mães exercem uma complexidade comportamental que influencia diretamente no neurodesenvolvimento e no estabelecimento das relações sociais da prole. Os dois comportamentos pró-sociais comumente encontrados nesses animais incluem: as interações sexuais de curta duração que ocorrem durante o acasalamento, e o elo social mais duradouro: a formação da díade mãe-filho (Francis and Meaney, 1999; Numan, 2016).

O desenvolvimento do vínculo entre a mãe e a prole consiste de um processo de duas etapas: um processo de reconhecimento e um processo de atração permanente (Numan, 2015). O processo de reconhecimento envolve mudanças nos mecanismos neurais que promovem a atração e o cuidado materno ao invés da rejeição, enquanto o processo de atração permanente é o resultado da plasticidade cerebral, que causam uma atração duradoura entre as mães e seus filhos, componente essencial do vínculo em todos os mamíferos (Numan, 2015). Durante a gestação e a lactação ocorrem alterações no eixo HPA. O ritmo circadiano, o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e os padrões de secreção de glicocorticóides estão alterados, com isso ocorre uma atenuação das respostas do eixo a uma ampla variedade de estressores físicos e psicológicos, levando à supressão da responsividade ao estresse após a metade da gestação até o final da lactação (Brunton et al., 2008). Os estímulos da amamentação pelos filhos também alteram a reatividade do eixo HPA, diminuindo a ativação de regiões cerebrais que respondem ao estresse. Logo, a interação física com os filhotes produz um efeito ansiolítico temporário das mães (Aguggia et al., 2013).

### **2.2 Cuidado Materno**

As alterações hormonais associadas ao final da gestação e ao parto atuam no SNC para diminuir o medo e a aversão dos estímulos relacionados à prole no pós-parto, além de aumentar a atratividade e estimular o início imediato do comportamento materno. Após o

estabelecimento do comportamento, ainda nas primeiras horas do pós-parto a fase hormonal gradualmente diminui e a manutenção da responsividade materna até o desmame torna-se independente do controle hormonal, sendo mantido pela estimulação sensorial dos filhotes (Rosenblatt, 1994; Numan et al., 2006; Okabe, et al., 2012). Logo, o comportamento materno não é um processo unitário, mas sim um complexo que consiste em componentes comportamentais estimulados por determinantes sensoriais e neurais (Stern, 2001), que pode ter fornecido a base neural básica para os outros tipos de relações sociais fortes, além da união de pares em mamíferos, incluindo humanos (Numan, 2015).

A relação mãe e filho é uma relação dinâmica e recíproca: tanto a mãe como o filhote estão equipados com uma motivação inata em relação ao outro, portanto, os estímulos derivados de um regulam o comportamento e a fisiologia do outro (Aguggia et al., 2015). Diante disso, a díade mãe e filho tem sido foco de diversos estudos que buscam explicações sobre parâmetros emocionais e comportamentais em ambos os lados. O cuidado materno envolve a expressão consistente e coordenada de uma série de comportamentos, e variações nesses comportamentos podem ter impactos profundos no SNC e no comportamento da prole (Nephew, 2013). Tem sido proposto que o comportamento das mães prepara a prole para responder ao ambiente, programando as respostas do eixo HPA ao estresse (Liu et al., 1997). Além disso, é através de variações do cuidado materno que espécies com desenvolvimento altricial percebem e respondem às adversidades ambientais (Francis and Meaney, 1999).

Os filhotes provenientes de mães que desempenham um cuidado materno de qualidade mostraram redução nas respostas de corticosterona ao estresse agudo (Liu et al., 1997), aumento na aprendizagem espacial e memória (Liu et al., 2000), redução do medo (Caldji et al., 1998) e aumento na sociabilidade e comportamento reprodutivo (Starr-Phillips, 2014). Além disso, alguns estudos mostram que o cuidado materno é transmitido de forma estável entre as gerações, onde a prole feminina herda o comportamento da mãe através da expressão gênica de receptores de ocitocina ou então de maneira não-genômica (Francis and Meaney, 1999; Champagne, 2001; Meaney, 2001; Champagne, 2003; Okabe, 2012; Murgatroyd and Nephew, 2013). Essa transmissão intergeracional do comportamento materno é vista em roedores, primatas e humanos, podendo estar por trás de mudanças adaptativas do eixo HPA

(Champagne, 2001). Em espécies que desenvolveram o cuidado biparental, mesmo após a perda do parceiro o investimento materno é robusto o suficiente para não comprometer o cuidado desempenhado por essas mães, ainda que a emocionalidade tenha sido afetada (Bosch et al., 2018).

### **2.3 Ruptura do vínculo entre mãe e filho**

As condições ambientais refletem na qualidade do cuidado materno e podem induzir a ruptura da relação mãe-filho, acarretando em prejuízos comportamentais e emocionais em ambos os lados (Boccia et al., 2007; Lajud et al., 2012; Aguggia et al., 2013; Banqueri et al., 2017 ). Durante as condições ambientais desfavoráveis ocorrem adaptações comportamentais, endócrinas, metabólicas e cardiovasculares que programam a reatividade ao estresse. Essas alterações são adaptativas e servem para melhorar a habilidade do organismo em ajustar a homeostasia e aumentar as chances de sobrevivência, induzindo o estado de vigília e aumentando a detecção de possíveis ameaças. No entanto, a exposição crônica ao estresse pode induzir a hiperatividade do eixo HPA, levando à alterações em marcadores biológicos e aumentando a vulnerabilidade desses indivíduos em desenvolver transtornos relacionados ao estresse (Harkness et al., 2015). Em mães, esses transtornos podem comprometer a qualidade do cuidado materno e o vínculo com o filho, favorecendo o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, como depressão e ansiedade (Champagne et al., 2006; Murgatroyd et al., 2015).

Alguns estudos têm demonstrado que mães expostas ao estresse crônico durante o período lactacional apresentam aumento da ansiedade e anedonia, alteração na expressão de genes e proteínas, comportamento depressivo e menor responsividade materna (Murgatroyd and Nephew, 2013; Murgatroyd et al., 2015). A ruptura da relação mãe-filho além de induzir aumento da ansiedade e depressão pós-parto nas mães e comprometer a qualidade do cuidado materno exercido por elas, também influencia diretamente no desenvolvimento neurocomportamental da prole (Murgatroyd and Nephew, 2013). Em roedores os primeiros dias de vida correspondem ao período de hiporresponsividade ao estresse, onde esses animais ficam mais suscetíveis a eventos ambientais, como estímulos estressores e cuidado materno defasado (Henriques, et al., 2014). Essas variações no comportamento materno,

principalmente nas frequência de lambidas e amamentação ativa, regulam o desenvolvimento de respostas endócrinas, emocionais e cognitivas ao estresse (Champagne et al., 2003), além de influenciar na interação social de ambos os sexos e no comportamento de ansiedade na vida adulta (Francis and Meaney, 1999; Mogi, et al., 2011; Okabe et al., 2012; Starr - Phillips, 2014).

As consequências comportamentais da ruptura do vínculo entre mãe e filho também foram descritas em outras espécies. Em cães, por exemplo, o desmame precoce mostrou correlação com o aparecimento de alterações comportamentais, como agressão excessiva e ansiedade crônica (Okabe et al., 2012). Já em humanos, dados observacionais revelaram que mães ansiosas eram menos acolhedoras e positivas em relação aos seus filhos, além de serem menos produtivas e desengajadas durante as interações sociais (Francis and Meaney, 1999; Whaley et al., 1999; Woodruff-Borden et al., 2002) e essas características afetam o desenvolvimento cognitivo e socioemocional das crianças (Glasheen et al., 2010).

De modo geral, esses estudos propõem que as psicopatologias diagnosticadas em adultos podem ter um gatilho nos primeiros estágios de vida. Dessa forma, modelos experimentais contribuem para o entendimento da dinâmica comportamental do cuidado materno exercido no período pós-natal, e como questões envolvidas na emocionalidade dessas mães influenciam no neurodesenvolvimento, na programação do metabolismo periférico e aumentam a vulnerabilidade dos filhotes. O comprometimento do vínculo entre mãe e filho está fortemente relacionado com o estado emocional das mães, e assim, estudos que induzem a ruptura dessa relação possibilitam a investigação de alterações neurobiológicas que ocorrem em ambos os lados e colaboram com o desenvolvimento de medidas preventivas, e não apenas paliativas.

### **2.3.1 Separação Materna**

A separação materna por longos períodos de tempo tem sido descrita como um modelo de indução do comportamento depressivo nas mães (Cryan et al., 2002; Eklund et al., 2009; Sung et al., 2010; von Poser Toigo et al., 2012). Tem sido proposto que esse tipo de intervenção no período neonatal prejudica a relação mãe-prole e altera o cuidado materno. Estudos mostram que mães submetidas à longas separações dos seus filhos demoram mais

tempo na recuperação da ninhada e demonstram uma tendência em aumentar a latência do primeiro contato quando os filhotes são devolvidos para a caixa moradia, podendo indicar um atraso no reconhecimento da prole (Aguggia et al., 2013). Essas mães também demonstraram redução da proliferação celular e aumento da apoptose no hipocampo, estrutura que desempenha papel crucial nos processos de memória, levando ao comprometimento da memória de curto e longo prazo (Sung et al, 2010; Aguggia et al., 2013).

Nos testes de natação forçada, mães que passaram por protocolos de longa separação exibiram aumento da imobilidade e diminuição das tentativas de fuga, características associadas ao comportamento depressivo (Boccia et al., 2007; Sung et al, 2010). A privação dos filhotes durante horas também induziu aumento na concentração plasmática de corticosterona (Maniam and Morris, 2010), redução na atividade da bomba sódio - potássio e redução nos níveis de óxido nítrico no hipocampo (von Poser Toigo et al., 2012). A separação também induziu inconsistência do comportamento materno (Couto-Pereira et al, 2016) e aumento agudo no cuidado materno apenas em horários específicos do dia (Pryce et al, 2001; Macrí et al., 2004; Couto-Pereira et al, 2016). Esses resultados sugerem que protocolos de separação materna por longos períodos de tempo alteram parâmetros neuroquímicos, e assim comprometem a qualidade do cuidado materno e a emocionalidade das mães. Além disso, durante a primeira semana pós-parto se as mães forem separadas de seus filhotes e não tiverem permissão para interagir com eles, a responsividade materna declina e o cuidado materno é negligenciado (Okabe et al., 2012).

Em filhotes, a separação materna têm sido descrita como um indutor de alterações comportamentais na prole adulta. Em alguns estudos foi observada maior vulnerabilidade ao estresse pós-traumático e maior comportamento do tipo ansioso e depressivo (Diehl et al., 2007; Diehl et al., 2011; Diehl et al., 2014; Zalosnik et al., 2014; Markostamou et al., 2016). Também tem sido descrito que longas separações durante o período neonatal aumentam a sensibilidade a dor (por estimulação térmica), deterioram a aprendizagem associativa, afetam a memória, diminuem a neurogênese no hipocampo, diminuem a secreção do hormônio do crescimento e aumentam a secreção de corticosterona (Kuhn et al., 1990; Hulshof et al., 2011; Lajud et al., 2012; Vilela et al., 2017; Banqueri et al., 2017). Além disso, longas separações

também provocam alterações no comportamento alimentar da prole adulta, levando ao maior consumo de alimentos mais doces (Ramos et al., 2017; Souza et al., 2018) . Todos esses estudos mostram que intervenções no período crítico do desenvolvimento induzem à prejuízos que perduram até a idade adulta, podendo aumentar a vulnerabilidade dos filhotes em desenvolver psicopatologias.

## **2.4 Nutrição Materna**

A nutrição materna exerce forte influência no desenvolvimento da prole, então mudanças sutis no ambiente intrauterino podem ter implicações a longo prazo. Ainda nas fases iniciais da gestação, a formação e função da placenta são diretamente influenciados por fatores nutricionais das mães. A placenta é um anexo embrionário que desempenha a função de fazer o intercâmbio de substâncias entre mãe e filho. É através dela que os fetos realizam as trocas gasosas, eliminam resíduos e recebem o aporte de nutrientes que necessitam durante o desenvolvimento. O estado nutricional das mães induz alterações epigenéticas na placenta, afetando os fenótipos dos fetos e dos filhos após o nascimento (Taniguchi et al, 2018). Rincel e colaboradores (2016), mostraram que o consumo materno de uma dieta com alto teor de lipídios preveniu totalmente os fenótipos de ansiedade dos filhos e das mães que sofreram separação materna, além de melhorar a qualidade do cuidado materno no período neonatal. Na prole, a desnutrição intra-uterina associado ao consumo de dietas ricas em gordura após o nascimento foi fortemente relacionada com o aumento de peso e adiposidade, comprometimento da neurogênese e da funcionalidade neuronal, alteração da sensibilidade à glicose e resistência à leptina e à insulina (Yura et al., 2005; Breton, 2013). Além disso, a ingestão de dietas desequilibradas durante o final da gestação elevou os níveis de cortisol e a pressão arterial nos filhos adultos (Herrick et al., 2003; Reynolds et al., 2007 ).

Em relação ao consumo de ácido oleico durante a gestação, um estudo publicado no ano de 2017 comparou as propriedades nutricionais e aromáticas do leite e derivados em vacas leiteiras. Neste estudo, o grupo controle recebeu dieta convencional, enquanto o grupo experimental recebeu dieta convencional suplementada com o bagaço de azeitona seco, subproduto da extração do azeite de oliva. A suplementação com o bagaço da azeitona não

alterou a produção e a composição do leite, mas alterou o teor de proteínas, modificou o teor de ácidos graxos e reduziu os índices aterogênicos e trombogênicos. Então, segundo esses resultados, a suplementação melhora as propriedades nutricionais do leite (Castellani et al., 2017).

## **2.5 Azeite de Oliva**

Extraído das azeitonas através de prensagem mecânica, o azeite de oliva traz inúmeros benefícios à saúde humana. Em meados de 1820 imigrantes europeus introduziram no Brasil a oliveira (*Olea europaea*) e nos últimos anos, o cultivo desta espécie adquiriu especial relevância em todo o mundo devido aos benefícios que o consumo de azeite de oliva traz ao SNC e ao metabolismo periférico (Castro et al, 1997; Cardoso, 1997). O azeite de oliva é a fonte de gordura primária das dietas tradicionais do Mediterrâneo, conhecidas por melhorarem a saúde e a longevidade. O uso dessa gordura pode promover modificações na estrutura da membrana celular e assim trazer benefícios à saúde.

A composição do azeite de oliva corresponde a 95% da fração de glicerol, representada por ácidos graxos monoinsaturados (MUFAS) e 5% de fração não glicerol, caracterizada por compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, que atuam na prevenção do ranço oxidativo (Cicerale et al., 2010). A estrutura química deste ácido graxo monoinsaturado é composta por uma cadeia longa de carbono e hidrogênio com um ácido carboxílico na extremidade. A ligação dupla fica entre os carbonos 9 e 10 da cadeia carbonada, caracterizando como um ácido graxo ômega 9, também conhecido como ácido oleico. De acordo com os achados na literatura, têm sido demonstrado que o consumo de MUFAS é capaz de trazer benefícios ao sistema cardiovascular, metabolismo periférico e SNC. Os polifenóis presentes no azeite de oliva também beneficiam a saúde, atuando como antioxidantes e cardioprotetores (Visioli et al., 2002).

### **2.5.1 Efeitos do azeite de oliva no SNC e metabolismo periférico**

Estudos epidemiológicos e clínicos apontam que o uso de dietas ricas em azeite de oliva melhoram a função cognitiva e retardam a progressão da doença de Alzheimer (Scarneas

et al., 2009; Gu et al., 2010). De acordo com Zheng e colaboradores (2015), o azeite de oliva atua na profilaxia de doenças neurodegenerativas, melhora a função mitocondrial dos neurônios e ainda reduz os efeitos do estresse sobre as células. Vários marcadores biológicos são sensíveis à atuação dos compostos químicos presentes no azeite de oliva. Alguns estudos demonstram que o consumo de dietas com azeite de oliva melhoram a função cognitiva, e isto pode ser atribuído à alterações em biomoléculas envolvidas no metabolismo energético, nos marcadores de estresse oxidativo e nos fatores neurotróficos. Em estudos experimentais foi observado que o consumo de dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados, como o azeite de oliva, está associado ao aumento nos níveis plasmáticos e encefálicos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Paes et al., 2015). O BDNF é uma proteína que estimula a formação de novas células cerebrais e pode diminuir os efeitos negativos do estresse no cérebro, uma vez que baixos níveis dessa neurotrofina estão associados com doenças neurodegenerativas e depressão (Fehér et al., 2009). A literatura também propõe que o ácido oleico, presente em alta porcentagem no azeite de oliva, combate a lipotoxicidade hepática induzida por ácidos graxos saturados e contribui para o desenvolvimento do oócito e início do embrião (Fayezi et al., 2018; Chen et al., 2018). Estudos epidemiológicos mostram que o consumo de dietas compostas por azeite de oliva estão associadas à redução do risco de desenvolver depressão pós-parto e protegem contra o desenvolvimento de sintomas depressivos na velhice (Chatzi et al., 2011; Pagliai et al., 2018).



### **3. Justificativa**

O cuidado materno desempenhado durante o período pós-parto é fundamental para o desenvolvimento da prole, preparando os filhotes para responder aos desafios do ambiente. Intervenções ocorridas durante essa fase podem alterar a emocionalidade tanto das mães quanto dos filhos, podendo desencadear o comportamento depressivo. Nesse sentido, o cuidado materno pode ser impactado pelo comportamento depressivo e prejudicar a maturação de áreas encefálicas responsáveis pelo comportamento emocional e cognitivo. Considerando todos os aspectos apresentados e o fato de que estudos em modelos animais contribuem para o aprendizado de diversos parâmetros, esse trabalho foi elaborado com o objetivo de buscar alternativas não-farmacológicas para atenuar ou até prevenir os prejuízos ocasionados pela separação materna, através da inserção de um alimento de fácil acesso na alimentação de mães durante o período gestacional e lactacional. Dessa forma, a suplementação com azeite de oliva na dieta das mães pode diminuir a incidência e a gravidade de doenças neuropsiquiátricas.

#### **4. Objetivo**

Investigar se o consumo de uma dieta com azeite de oliva durante o período gestacional e lactacional poderia afetar a qualidade do cuidado materno e a emocionalidade de mães que sofreram separação da prole.

##### **4.1 Objetivos específicos**

- Oferecer dietas com óleo de soja e azeite de oliva para ratas Wistar primíparas durante o período gestacional e lactacional;
- Monitorar o consumo e o ganho de peso das mães durante a gestação e lactação, assim como o ciclo estral após cada teste comportamental;
- Avaliar os efeitos do consumo de azeite de oliva sobre o comportamento materno de mães submetidas à separação de seus filhotes;
- Avaliar o desempenho comportamental das mães submetidas ou não à separação, estudando a atividade locomotora e o comportamento depressivo, através dos testes comportamentais de campo aberto, corredor alimentar e nado forçado;

## **5. Metodologia**

### **5.1 Aspectos Éticos**

Todos os experimentos com os animais foram conduzidos seguindo os cuidados preconizados pelas diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008 e as diretrizes do CONCEA, em relação à experimentação animal (Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA) e eutanásia (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA), indicadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), bem como normativas internacionais como o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do “Canadian Council on Animal Care (CCAC). Número de aprovação CEUA/UFRGS: 35372.

### **5.2 Cálculo do tamanho amostral**

Este trabalho faz parte de um projeto maior, então é importante salientar que neste estudo foram utilizados apenas as genitoras. Assim, os experimentos realizados possuem 2 variáveis: dieta e separação materna, totalizando 4 grupos experimentais. O tamanho amostral foi determinado de acordo com o programa Minitab®. Os números utilizados para o cálculo neste programa foram mensurados a partir de estudos em referências especializadas nesse tema, em trabalhos publicados utilizando essas técnicas e em nossa experiência prévia (Silveira et al., 2013; Ferreira et al., 2015; Couto-Pereira et al., 2016). Desse modo, foi determinado o número de animais utilizados para realização das tarefas citadas nesse estudo como está descrito abaixo:

Considerando um desvio padrão ao redor de 35%, utilizando-se uma diferença entre os grupos de 44%, poder de 0,8 e significância de 0,05, o tamanho amostral determinado pelo programa foi de 14 animais por grupo para a realização dos testes comportamentais de campo aberto, corredor alimentar e nado forçado, resultando em um poder real de 82%. Para obter o total de animais previsto, tendo em conta uma taxa de sucesso na viabilidade das ninhadas estimada em cerca de 70% para o Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica e um

número médio de 4 machos e 4 fêmeas por ninhada, serão necessárias 60 ninhadas com 60 genitoras. Até o presente momento foram utilizadas em torno de 9 a 11 genitoras por grupo, sendo necessário aumentar o tamanho amostral em algumas tarefas comportamentais.

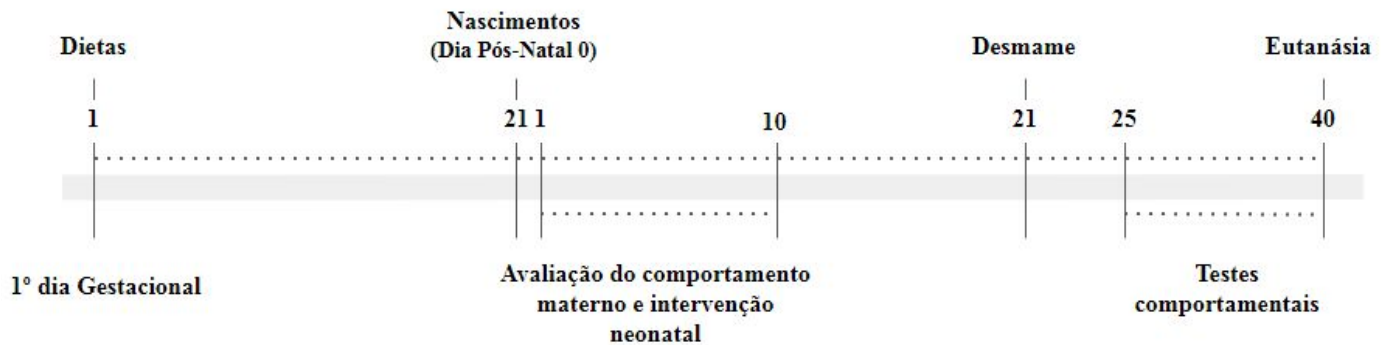
As ninhadas com menos de 4 filhotes foram excluídas do estudo. Esses filhotes foram eutanasiados através do uso de um algodão embebido com anestésico inalatório (isoflurano), que foi colocado em um recipiente fechado juntamente com os animais, evitando o contato direto com o anestésico através de uma separação física. Os animais permaneceram nessas condições até a confirmação da morte.

### **5.3 Animais**

Foram adquiridas 38 ratas Wistar primíparas ainda no primeiro dia gestacional do centro de Reprodução e Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da UFRGS - Porto Alegre/Brasil. Foram reunidas duas fêmeas por caixa moradia e imediatamente alocadas em dois grupos experimentais: (1) Intacto OS: mães alimentadas com ração padrão + óleo de soja (n = 18) ou (2) Intacto AO: mães alimentadas com ração padrão + azeite de oliva (n = 20). As ratas foram pesadas uma vez por semana para determinar o ganho de peso durante o período gestacional e lactacional, e o consumo das dietas foi avaliado a cada dois dias. No 18º dia gestacional as fêmeas foram individualizadas nas caixas moradia e mantidas assim até o dia do desmame dos filhotes, que ocorreu no dia pós-natal 21. As caixas moradia eram confeccionadas em Plexiglas (65 x 25 x 15 cm), as quais foram mantidas em ambiente controlado (luzes acesas entre 07:00h e 19:00h, temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , água *ad libitum* e dietas oferecidas de acordo com o consumo das mães).

Nos últimos dias de gestação as fêmeas foram avaliadas diariamente para a determinação da data do nascimento, que ocorre aproximadamente no 21º dia de gestação. O dia de nascimento dos filhotes foi considerado como dia pós-natal zero (PN0). Após o nascimento, as mães de ambos os grupos foram subdivididas para o protocolo de separação materna. Assim, os grupos experimentais foram: (1) Intacto OS (n = 9); (2) Intacto AO (n = 11); (3) Separado OS (n = 9) e (4) Separado AO (n = 9), totalizando 4 grupos experimentais. Os filhotes foram desmamados no dia pós-natal 21, e então no dia 25 tiveram início os testes

comportamentais. A atividade locomotora e o comportamento depressivo foram avaliados através dos testes de campo aberto, corredor alimentar e nado forçado. Os testes comportamentais seguiram até o dia pós-natal 40, com intervalo de 2 dias entre cada protocolo. O desenho experimental está representado na imagem abaixo (Fig.1).



**Fig.1:** Desenho experimental.

#### 5.4 Dietas

As dietas foram oferecidas do primeiro dia gestacional até o dia pós-natal 40, quando foi realizada a decapitação desses animais. Com relação à composição, tanto a dieta com óleo de soja quanto a dieta com azeite de oliva foram preparadas utilizando farelo da ração padrão fornecida aos animais pelo biotério (Nuvilab®), acrescidas de 4% de óleo de soja ou de oliva (Qosa et al., 2015) para os respectivos grupos experimentais. As dietas oferecidas para os grupos experimentais continham o mesmo percentual de calorias, como mostrado na tabela 1. O azeite de oliva utilizado neste projeto foi fornecido em parceria com a Embrapa Clima Temperado, localizada na cidade de Pelotas / RS - Brasil. As análises físico-químicas mostraram uma acidez livre de 0,2%, índice de peróxidos 4,34 mEqO<sub>2</sub>/Kg, absorvância UV de 232nm: 1,54 ; 270nm: 0,106; ΔK: 0,0005 e umidade de 0,09%. O azeite fornecido era um blend de 4 cultivares, sendo eles: Manzanilla, Koroneiki, Coratina e Frantoio (todos da região de Pinheiro Machado / RS). A análise do percentual de ácidos graxos da amostra encontra-se no anexo A.

**Tabela 1:** Composição nutricional de 100g das dietas oferecidas aos animais.

<b>CALORIAS (Kcal)</b>	<b>GORDURA (g)</b>	<b>CARBOIDRATOS (g)</b>	<b>PROTEÍNAS (g)</b>
<b>325,2</b>	<b>7,8</b>	<b>42,5</b>	<b>21,1</b>

## **5.5 Intervenção neonatal**

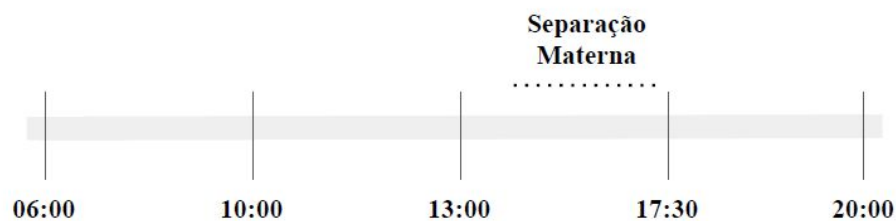
O dia de nascimentos dos filhotes foi considerado como pós-natal zero (PN0). As ninhadas foram padronizadas em oito filhotes por mãe e aleatoriamente alocados em uma das intervenções neonatais: (1) Intacto: sem intervenção até o desmame e (2) Separação Materna. O protocolo de separação materna seguiu durante os 10 primeiros dias de vida da prole (PN1 até PN10), conforme Couto - Pereira et al., 2016. As mães foram gentilmente separadas das ninhadas e em seguida todos os filhotes foram retirados do ninho e mantidos em uma incubadora aquecida a 34°C durante 3 horas por dia, entre as sessões de observação das 13h e 17h30 (Fig.2). As mães permaneceram nas caixas moradia alocadas na mesma sala da incubadora, possibilitando a troca de vocalizações com os filhotes. Os grupos intactos foram preservados de manipulações durante todo o período de amamentação e, assim como os grupos da separação materna, foram manejados apenas pelo experimentador para a troca da maravalha ao redor do ninho e reposição das dietas e água. Os filhotes foram desmamados aos 21 dias de vida (PN21) e utilizados em experimentos posteriores.

## **5.6 Testes comportamentais**

### **5.6.1 Observação do comportamento materno**

As observações do comportamento materno ocorreram simultaneamente com o protocolo de intervenção neonatal (PN1 até PN10), conforme descrito por Champagne et al., 2003. Ao todo, observamos o comportamento de 38 mães (Intacto OS: n = 9, Separado OS: n = 9, Intacto AO: n = 11; Separado AO: n = 9). A partir do primeiro dia pós-natal (PN1) até o décimo dia (PN10) as ninhadas foram observadas na própria sala de alojamento do Biotério,

sem qualquer tipo de perturbação. As observações ocorreram 5 vezes ao dia, correspondendo a três sessões no ciclo claro (10h, 13h e 17h30) e duas durante o ciclo escuro (06h e 20h), conforme representado na figura. 2. Cada sessão teve a durabilidade de 72 minutos e durante este período, a cada três minutos, o observador registrou em uma planilha os comportamentos exibidos pelas mães, totalizando 25 registros por sessão (125 observações por dia para cada mãe). Os comportamentos observados foram: comportamento de lambar, amamentação em cada uma das 3 posturas (mãe com o dorso pouco arqueado, bem arqueado ou amamentando de lado/de costas), também avaliamos a ausência ou presença da mãe no ninho (não amamentando), a recolhida de filhotes, construção do ninho e a frequência com que as mães se alimentavam ou bebiam água. É importante ressaltar que muitos comportamentos ocorrem de maneira simultânea, e todos foram devidamente registrados na planilha (Anexo B). A frequência de cada comportamento foi quantificada e registrada em um banco de dados de acordo com os horários das sessões e os dias de observação.



**Fig.2:** Horários das sessões de observação do comportamento materno.

### 5.6.2 Inconsistência comportamental

A qualidade do comportamento materno foi analisado através de um escore de inconsistência comportamental estabelecido por Ivy et al., 2008 e seguindo a adaptação de Couto-Pereira et al., 2016. As planilhas dos registros de observação foram analisadas sessão por sessão a cada dia, e sempre que as mães mudaram de comportamento entre uma observação e outra (a cada três minutos), atribuímos o valor de 1. Os valores atribuídos às alternâncias de comportamento foram somados e divididos por 24 (número máximo de

transições possíveis entre as 25 observações de cada sessão). Assim, originamos um escore de inconsistência comportamental, que varia entre 0 e 1. Quanto mais alto o escore, maior a fragmentação e inconsistência do comportamento materno. Foram consideradas transições entre os seguintes comportamentos: (1) amamentação: de acordo com Couto-Pereira et al, 2016, variações entre as diferentes posturas de amamentação não serão consideradas devido ao risco de obter um resultado falso positivo, (2) comportamento de lambar, (3) recolhida de filhotes, (4) construção do ninho, (5) mãe no ninho, (6) mãe fora do ninho, (7) mãe se alimentando ou bebendo água.

### **5.6.3 Campo aberto**

A tarefa do campo aberto foi realizado em uma arena contendo uma área central, aversiva para os ratos, e representa um modelo amplamente utilizado para a avaliação da atividade locomotora (Prut and Belzung, 2003). O aparato consiste de uma arena de madeira com assoalho preto (50 x 50 cm, altura 50 cm). Com o auxílio do programa de avaliação de imagens ANYMAZE®, o número de cruzamentos entre linhas foi avaliado durante 10 minutos após o animal ser colocado no aparato. A intensidade luminosa no centro do campo aberto foi de 50 lux.

### **5.6.4 Corredor alimentar**

Foi realizada a avaliação do consumo de rosquinhas de cereal doces ricas em carboidratos simples (Froot Loops®). Os animais foram habituados a esse tipo de alimento durante 5 dias, sendo que neste período eram mantidos em restrição alimentar (recebendo 80% do consumo regular de ração). No sexto dia foi realizado o teste, onde as mães puderam consumir à vontade suas respectivas dietas nas 24 horas anteriores. Foram avaliados a latência para chegar aos cereais, a latência para a primeira mordida e a quantidade de cereal ingerido. Os animais permaneceram durante três minutos nos aparatos, tendo livre acesso às rosquinhas. A quantidade de cereal oferecida aos animais foi padronizada em 10 rosquinhas para cada um, e o peso inicial e final dos cereais foram calculados para avaliação do consumo em gramas (Silveira et al., 2006).



### **5.6.5 Nado forçado**

A tarefa foi realizada em duas etapas. Na primeira exposição os animais foram colocados durante 15 minutos em um cilindro (20 x 70 cm, com água a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) sem área de escape, assim o animal é forçado a nadar para tentar fugir. A segunda exposição ocorreu 24h após a primeira e com tempo máximo de 5 minutos. Ao final do experimento as ratas foram secas com toalhas e recolocadas nas caixas-moradia. Em ambas as sessões os parâmetros avaliados foram: (1) tempo de nado, (2) latência para o primeiro episódio de imobilidade e (3) tempo de imobilidade (Porsolt et al., 1977; Porsolt et al., 1978; Hargreaves et al., 2005).

### **5.7 Ciclo estral**

Após cada teste comportamental houve a avaliação do ciclo estral, a fim de monitorar qualquer anomalia na ciclagem das fêmeas. As ratas foram retiradas da caixa-moradia e gentilmente manuseadas para que fiquem calmas e não se machuquem durante o procedimento. Então, com o auxílio de uma micropipeta, foi introduzido e imediatamente recuperado 50  $\mu\text{l}$  de solução fisiológica (0,9%) na entrada da vagina do animal. A amostra foi colocada em lâmina de vidro e imediatamente analisada em microscópio óptico para determinação da fase do ciclo estral: Diestro, Proestro, Estro e Metaestro (Freeman, 1994).

### **5.8 Eutanásia**

Neste projeto analisamos somente parâmetros comportamentais, entretanto as mães foram eutanasiadas para a dissecação de estruturas que serão utilizadas em análises posteriores. A eutanásia ocorreu aproximadamente no 40º dia pós-natal, onde os animais foram rapidamente decapitados com guilhotina sem uso de anestesia. Justifica-se este tipo de procedimento pela necessidade de não interferir na liberação de neurotransmissores, já que as estruturas serão utilizadas posteriormente. As estruturas disseçadas foram imediatamente congeladas a  $-80^\circ\text{C}$ .

## **5.9 Análises Estatísticas**

Os resultados foram analisados pelo programa SPSS Statistics 22.0 e representados em gráficos através do programa Prisma 5. Os dados paramétricos com distribuição normal foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas ou então de uma ou duas vias, dependendo dos fatores estudados. E quando necessário, as análises foram seguidas de teste post-hoc Tukey. Os valores foram representados através da média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Os níveis de significância foram aceitos como diferentes quando os valores de p foram menores ou iguais a 0,05.

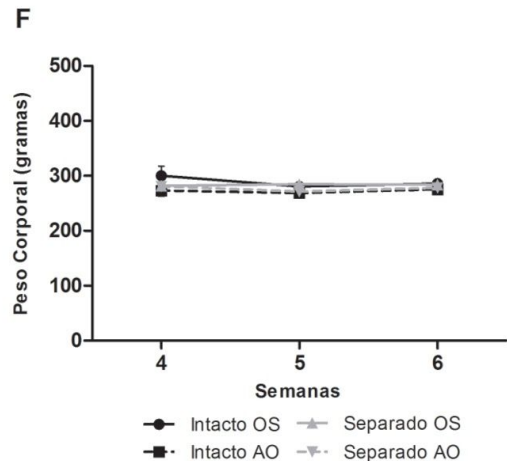
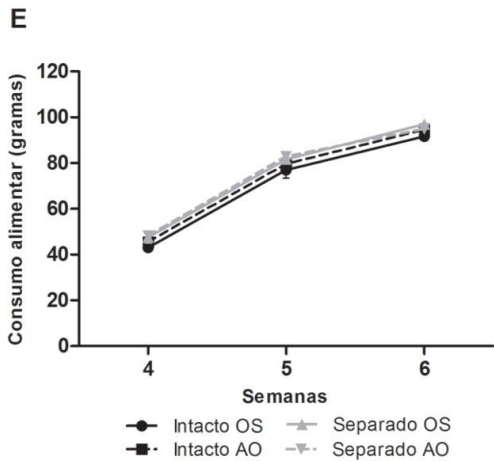
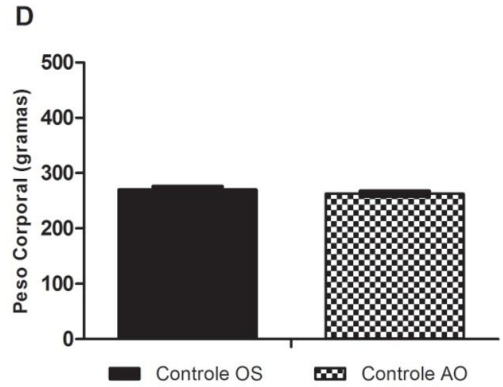
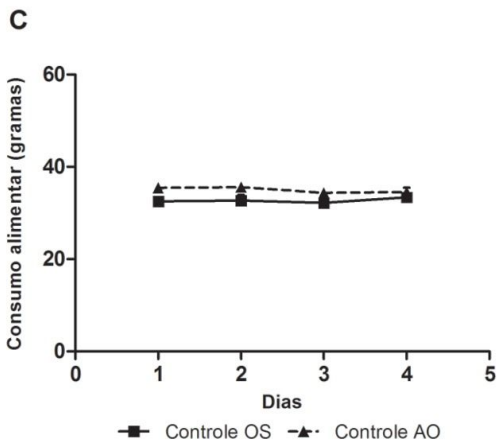
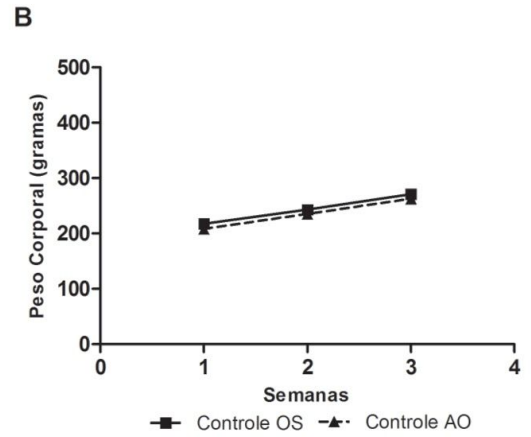
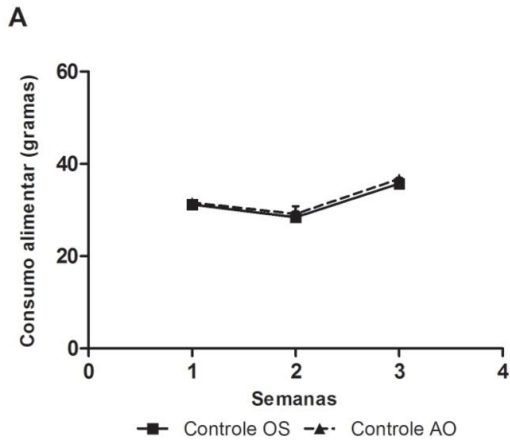
## 6. Resultados

### 6.1 Consumo alimentar e peso corporal

Durante o período gestacional, referente ao dia 1 até o dia 18 de gestação, as ratas estavam agrupadas de 2 a 3 nas caixas moradia e o consumo alimentar médio da caixa foi avaliado durante durante 3 semanas. É importante mencionar que para a determinação do consumo na terceira semana consideramos, excepcionalmente, a média de três dias, já que foi durante esse período que as ratas prenhes foram individualizadas para aguardar o nascimento dos filhotes. Do primeiro até o 18º dia de gestação, as ratas foram divididas em dois grupos experimentais: (1) Intacto OS: mães alimentadas com ração padrão + óleo de soja e (2) Intacto AO: mães alimentadas com ração padrão + azeite de oliva. Com relação a análise estatística do consumo alimentar, referente a esse período gestacional, foi observado que o consumo aumentou ao longo das semanas de maneira semelhante entre os grupos ( $F [2,34] = 24,295$ ,  $p < 0,001$ ; Figura 3A), sem diferenças significativas de consumo entre as diferentes dietas oferecidas ( $p > 0,05$ ). Com relação ao peso corporal, durante o mesmo período, foi verificado que todos animais aumentaram de peso independente da dieta oferecida ( $F [2,72] = 634,044$ ,  $p < 0,001$ ; Figura 3B). Considerando os dias restantes da semana do 18º até o 21º dia de gestação, período caracterizado pelo o isolamento das ratas prenhes que antecede o nascimento da prole, não houve diferenças estatísticas com relação ao consumo alimentar e o peso corporal ( $p > 0,05$ ; Figuras 3C e 3D).

Após o nascimento dos filhotes, os dois grupos iniciais (1 e 2) foram subdivididos em intactos ou separação materna, totalizando 4 grupos experimentais: (1) mães e filhotes intactos, expostos a ração padrão com óleo de soja, (2) mães e filhotes intactos, expostos a ração padrão com azeite de oliva; (3) mães e filhotes que sofreram separação materna e que foram expostos a ração padrão com óleo de soja, (4) mães e filhotes que sofreram separação materna e que foram expostos a ração padrão com azeite de oliva. No dia de nascimento dos filhotes, considerado como dia pós-natal 0 (PN0), as ninhadas foram padronizadas aleatoriamente em 8 filhotes de ambos os sexos por mãe. Os protocolos de cuidado materno e separação materna tiveram início no dia seguinte (PN1) e seguiram até o 10º dia pós-natal

(PN10). Os filhotes foram desmamados no dia pós-natal 21 (PN21). Durante o período de lactação, o consumo alimentar aumentou ao longo do tempo de forma semelhante em todos os grupos ( $F [2,68] = 957,437, p < 0,001$ ; Figura 3E). Com relação ao peso corporal durante o mesmo período, não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ; Figura 3F).



**Figura 3:** Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva e da separação materna sobre o consumo alimentar (gramas) e o peso corporal (gramas) de ratas durante o período gestacional e lactacional. Do dia 1 até o dia 18 de gestação, as ratas foram divididas em dois grupos experimentais: (1) Intacto OS (n = 18) ou (2) Intacto AO (n = 20). A Anova de Medidas repetidas mostrou um aumento no consumo alimentar ( $p < 0,001$ ; Figura 3A) e no peso corporal ( $p < 0,001$ ; Figura 3B) ao longo do período de observação. A partir do dia 18 até o dia 21 de gestação, a Anova de Medidas repetidas não mostrou diferenças estatísticas com relação ao consumo alimentar ( $p > 0,05$ ; Figura 3C) ao longo dos dias, e a Anova de duas vias também não mostrou efeito significativo no peso corporal ( $p > 0,05$ ; Figura 3D). Após o nascimento dos filhotes e durante o período lactacional, os animais foram subdivididos em 4 grupos experimentais: (1) Intacto OS (n = 9); (2) Intacto AO (n = 11); (3) Separado OS (n = 9) e (4) Separado AO (n = 9) e a Anova de Medidas repetidas mostrou que o consumo alimentar aumentou ao longo do tempo de forma semelhante em todos os grupos ( $p < 0,001$ ; Figura 3E). Durante o período lactacional, não foi encontrado diferenças significativas no peso corporal ( $p > 0,05$ ; Figura 3F).

## 6.2 Cuidado Materno

A avaliação do cuidado materno ocorreu no dia pós-natal 1 (PN1) até o dia PN10 e as ninhadas foram observadas 5 vezes ao dia, em horários pré-determinados (6h, 10h, 13h, 17:30h, 20h), durante 10 dias consecutivos. As análises dos resultados, referente aos comportamentos observados, mostram diferenças significativas com relação à separação materna e o consumo de azeite de oliva na frequência de lambidas e na frequência da postura de amamentação com o dorso arqueado.

Com relação à frequência de lambidas, foi observado um aumento ao longo das horas de observação ( $F [4,136] = 28,558$ ,  $p < 0,001$ ; Figura 4). Houve também uma interação entre o horário das sessões e a separação materna, indicando um aumento da frequência de lambidas das mães separadas na prole ao longo das horas ( $F [4,136] = 13,794$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 4A). Esse comportamento foi observado com maior frequência nas sessões das 13h ( $F [1,34] = 5,016$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 4A) e 17h30 ( $F [1,34] = 4,221$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 4A). Quando analisado o mesmo cuidado materno ao longo dos 10 dias, foi verificado um efeito do tempo ( $F [9,306] = 6,100$ ,  $p < 0,001$ ; Figura 4B) e uma interação entre tempo e separação materna ( $F [9,306] = 2,29$ ,  $p < 0,02$ ; Figura 4B), ambos os efeitos indicando um aumento no comportamento de lambidas da mãe na prole. Esse aumento nas lambidas induzido pela separação materna foi mais evidente no dia 8 ( $F [1,34] = 6,163$ ,  $p < 0,02$ ; Figura 4B), dia 9 ( $F [1,34] = 12,346$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 4B) e dia 10 ( $F [1,34] = 23,219$ ,  $p < 0,001$ ; Figura 4B). Adicionalmente, no dia

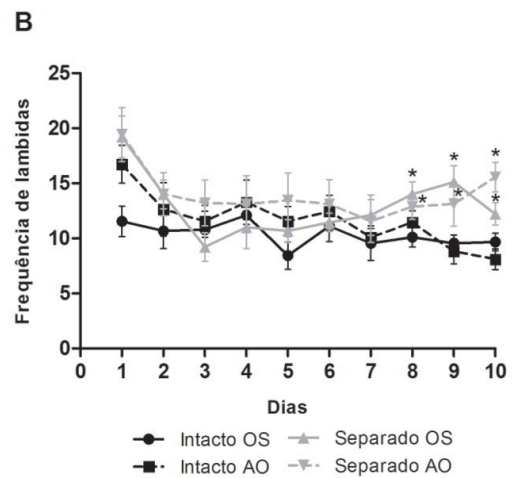
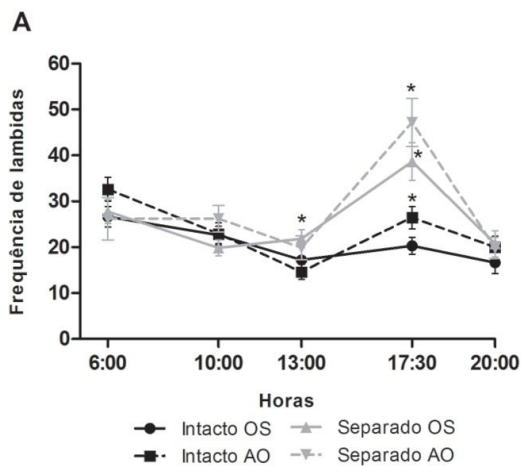
10 de observação foi verificada uma interação entre separação materna e dieta com azeite de oliva ( $F [1,34] = 5,571, p < 0,03$ ; Figura 4B), indicando um aumento na frequência de lambidas na prole induzido pelos dois fatores. Quando foi analisada a média total de lambidas durante todos os períodos de observação, as mães submetidas à separação materna aumentaram a frequência de lambidas na prole ( $F [1,34] = 6,799, p < 0,02$ ; Figura 4C).

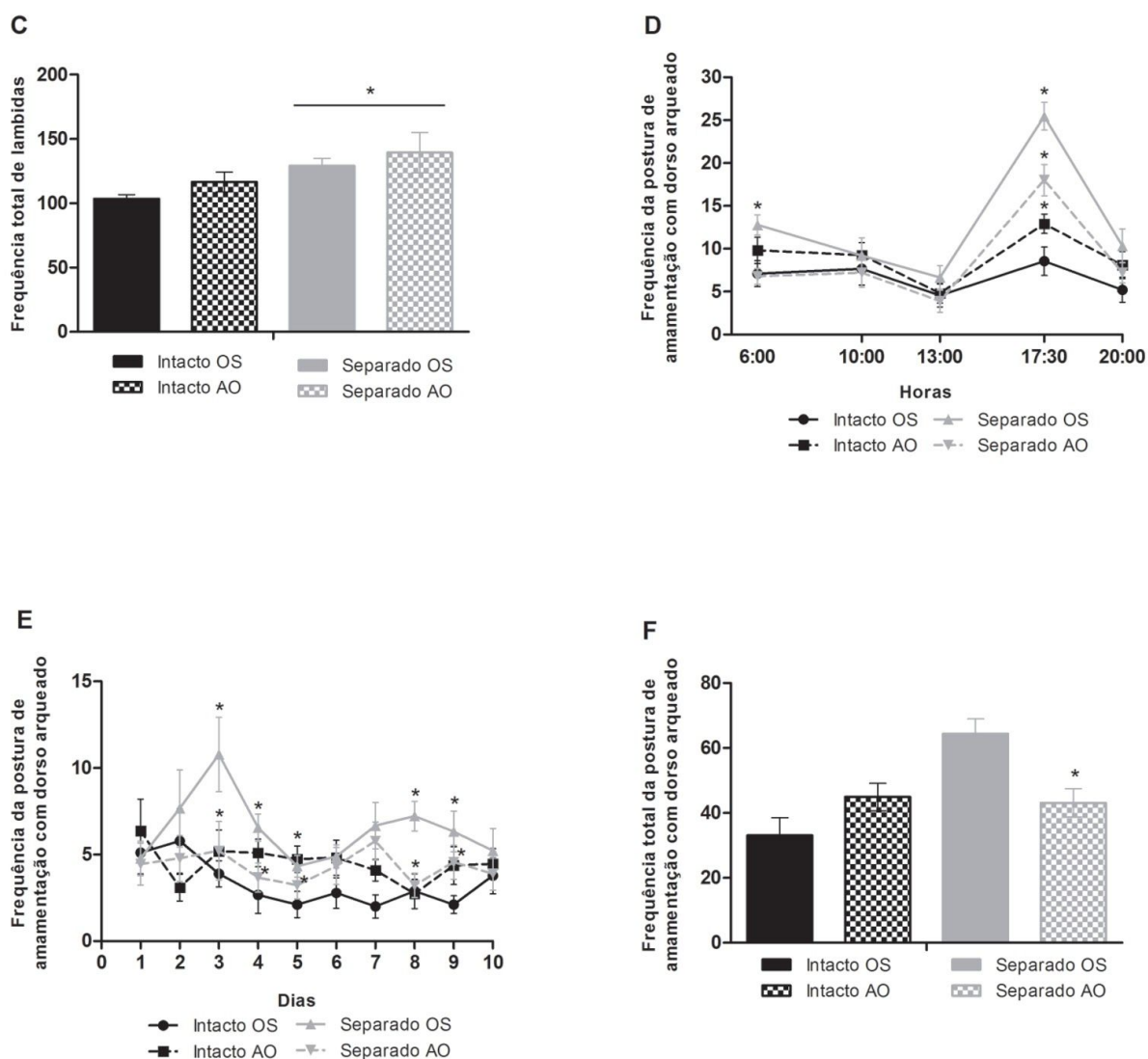
Outro cuidado materno que apresentou diferenças significativas foi a postura de amamentação com dorso arqueado. Nesse parâmetro foi observado que ao longo das horas de avaliação houve um aumento do comportamento materno em todos os grupos experimentais ( $F [1,34] = 23,219, p < 0,001$ ; Figura 2D). Além disso, houve uma interação entre as horas de observação e a separação materna ( $F [4,136] = 11,703, p < 0,001$ ; Figura 2D), indicando que ao longo das horas, as mães submetidas à separação materna aumentaram a frequência da postura de amamentação com dorso arqueado em relação aos seus respectivos controles. Dentro desse parâmetro de avaliação, às 17h30 ( $F [1,34] = 50,721, p < 0,001$ ; Figura 2D) esse comportamento foi significativamente maior. Interessante que tanto as 6 horas ( $F [1,34] = 10,555, p < 0,01$ ; Figura 2D) e às 17h30 ( $F [1,34] = 14,614, p < 0,01$ ; Figura 2D) houve uma interação entre separação materna e dieta padrão com azeite de oliva, esse resultado indicou que as mães separadas na presença de uma dieta com azeite de oliva reduziram o comportamento de postura de amamentação com o dorso arqueado.

Analisando o mesmo tipo de cuidado materno durante 10 dias, foi verificado um aumento na postura de amamentação com dorso arqueado ao longo dos dias ( $F [1,34] = 10,555, p < 0,01$ ; Figura 2E). Especificamente nos dias: 3 ( $F [1,34] = 5,041, p < 0,05$ ; Figura 2E), 4 ( $F [1,34] = 9,155, p < 0,01$ ; Figura 2E), 5 ( $F [1,34] = 6,304, p < 0,02$ ; Figura 2E), 8 ( $F [1,34] = 4,916, p < 0,05$ ; Figura 2E) e 9 ( $F [1,34] = 4,072, p < 0,05$ ; Figura 2E), foi observada uma interação entre separação materna e dieta padrão com azeite de oliva, indicando que as mães separadas submetidas à uma dieta com azeite de oliva, reduziram essa postura de amamentação ao longo dos dias. Quando analisado a média de todos os dias observados, houve um aumento do cuidado materno induzido pela separação materna ( $F [1,34] = 10,238, p < 0,01$ ). Houve uma interação entre separação materna e dieta padrão com azeite de oliva ( $F [1,34] = 12,882, p < 0,002$ ; Figura 2F), indicando que as mães submetidas à separação

materna e que recebiam dieta com azeite de oliva reduziram a postura de amamentação com dorso arqueado.

Com a finalidade de verificar a qualidade do cuidado materno, o escore de inconsistência comportamental foi avaliado conforme sugerido por Ivy et al. (2008). De acordo com a análise, foi observado um aumento no escore de inconsistência ao longo das horas de observação ( $F [4,136] = 49,355, p < 0,001$ ) e uma interação entre horas de observação e separação materna ( $F [4,136] = 8,509, p < 0,001$ ). Principalmente às 17h30 o aumento do escore de inconsistência foi maior nas mães separadas ( $F [1,34] = 36,465, p < 0,001$ ). Ao longo dos 10 dias de observação também foi verificado um aumento no escore de inconsistência ( $F [4,136] = 6,544, p < 0,001$ ). No entanto, não houve diferenças significativas entre os fatores estudados com relação aos 10 dias de observação ( $p > 0,05$ ). Além disso, as mães submetidas à separação materna mostraram um aumento no escore total de inconsistência ( $F [1,34] = 6,462, p < 0,02$ ).

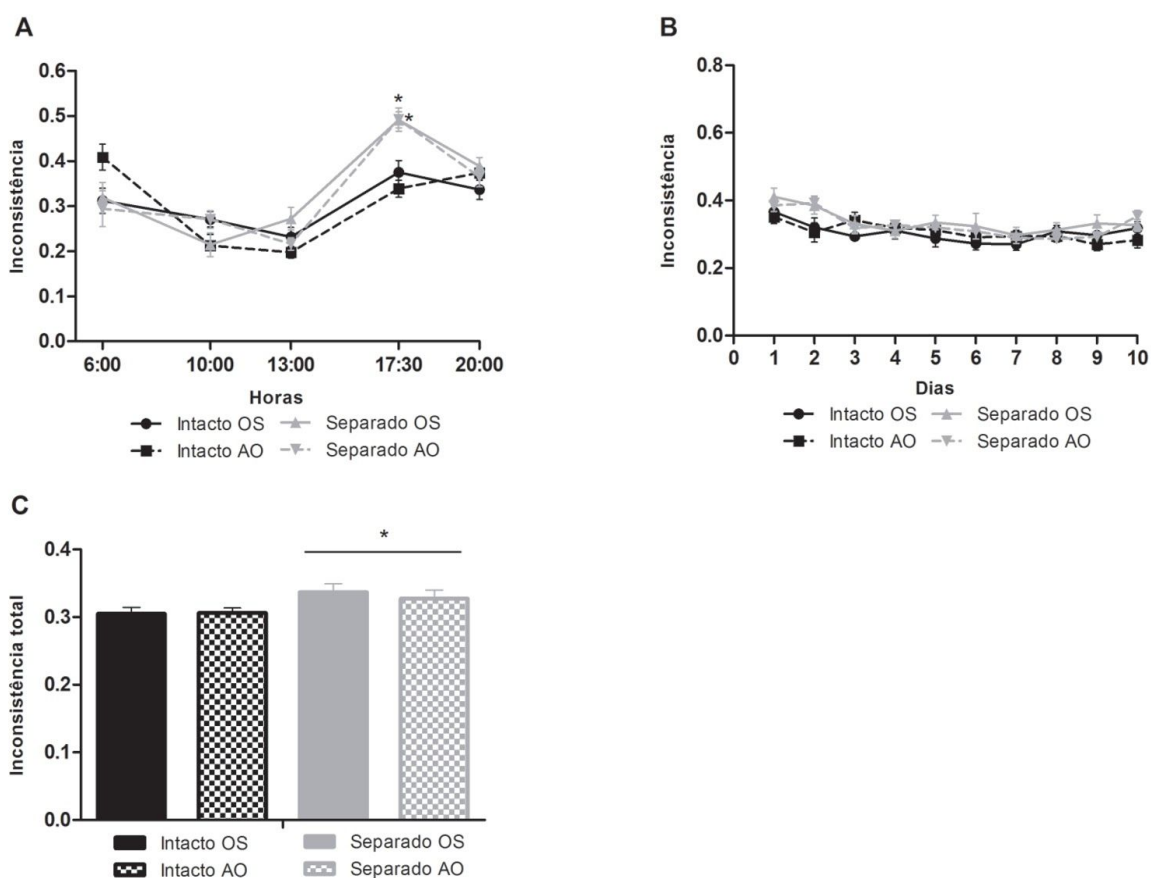




**Figura 4:** Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva e da separação materna sobre o cuidado materno. Do dia pós-natal 1 (PN1) até o dia PN10, as ninhadas foram subdivididas em 4 grupos experimentais: (1) Intacto OS (n = 9); (2) Intacto AO (n = 11); (3) Separado OS (n = 9) e (4) Separado AO (n = 9), as observações ocorreram em horários pré-determinados (6h, 10h, 13h, 17h30, 20h), durante 10 dias consecutivos. A Anova de Medidas repetidas mostrou um aumento na frequência de lambidas ( $p < 0,001$ ; Figura 4A) e um aumento na frequência da postura de amamentação com dorso arqueado ( $p < 0,001$ ; Figura 4D). Além disso, foi observada uma interação entre as horas de observação e a separação materna na frequência de lambidas ( $p < 0,01$ ; Figura 4A) e na frequência da postura de amamentação com dorso arqueado ( $p < 0,001$ ; Figura 4D). Anova de duas vias indicou que às 13 horas os grupos separados aumentaram o comportamento de lambidas ( $p < 0,05$ ; Figura 4A) e às 17h30 houve um aumento na frequência de lambidas tanto nos grupos separados ( $p < 0,001$ ; Figura 4A) quanto nos que receberam azeite de oliva na sua dieta ( $p < 0,05$ ; Figura 4A). A separação materna aumentou a postura de amamentação às 17h30 ( $p < 0,001$ ; Figura 4D). Às 6 horas ( $p < 0,01$ ; Figura 4D) e às 17h30 ( $p < 0,01$ ; Figura 4D)



houve uma interação entre separação materna e dieta padrão com azeite de oliva na postura de amamentação. Ao longo dos 10 dias, a Anova de medidas repetidas mostrou um efeito do tempo aumentando a frequência de lambidas ( $p < 0,001$ ; Figura 4B) e a postura de amamentação ( $p < 0,01$ ; Figura 4E). Anova de duas vias indicou que foi mais evidente o aumento das lambidas nos dias 8 ( $p < 0,02$ ; Figura 4B), 9 ( $p < 0,01$ ; Figura 4B) e 10 ( $p < 0,001$ ; Figura 4B), e no dia 10 houve uma interação entre separação materna e dieta padrão com azeite de oliva ( $p < 0,03$ ; Figura 4B). Já na postura de amamentação, houve uma interação entre separação materna e azeite de oliva nos dias: 3 ( $p < 0,05$ ; Figura 4E), 4 ( $p < 0,01$ ; Figura 4E), 5 ( $p < 0,02$ ; Figura 4E), 8 ( $p < 0,05$ ; Figura 4E) e 9 ( $p < 0,05$ ; Figura 4E). Anova de duas vias mostrou que a média total de lambidas ( $p < 0,02$ ; Figura 4C) e a média total da postura de amamentação com o dorso arqueado ( $p < 0,01$ ; Figura 4F) aumentaram nas mães que sofreram separação materna. Houve também uma interação entre separação materna e dieta padrão com azeite de oliva ( $p < 0,002$ ; Figura 2F).



**Figura 5:** Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva e da separação materna sobre a inconsistência do cuidado materno. Do dia pós-natal 1 (PN1) até o dia PN10, as ninhadas foram subdivididas em 4 grupos experimentais: (1) Intacto OS ( $n = 9$ ); (2) Intacto AO ( $n = 11$ ); (3) Separado OS ( $n = 9$ ) e (4) Separado AO ( $n = 9$ ) e foram observadas nos horários pré-determinados (6h, 10h, 13h, 17h30, 20h), durante 10 dias consecutivos. A Anova de medidas repetidas mostrou um aumento da inconsistência induzido pela separação materna ao longo

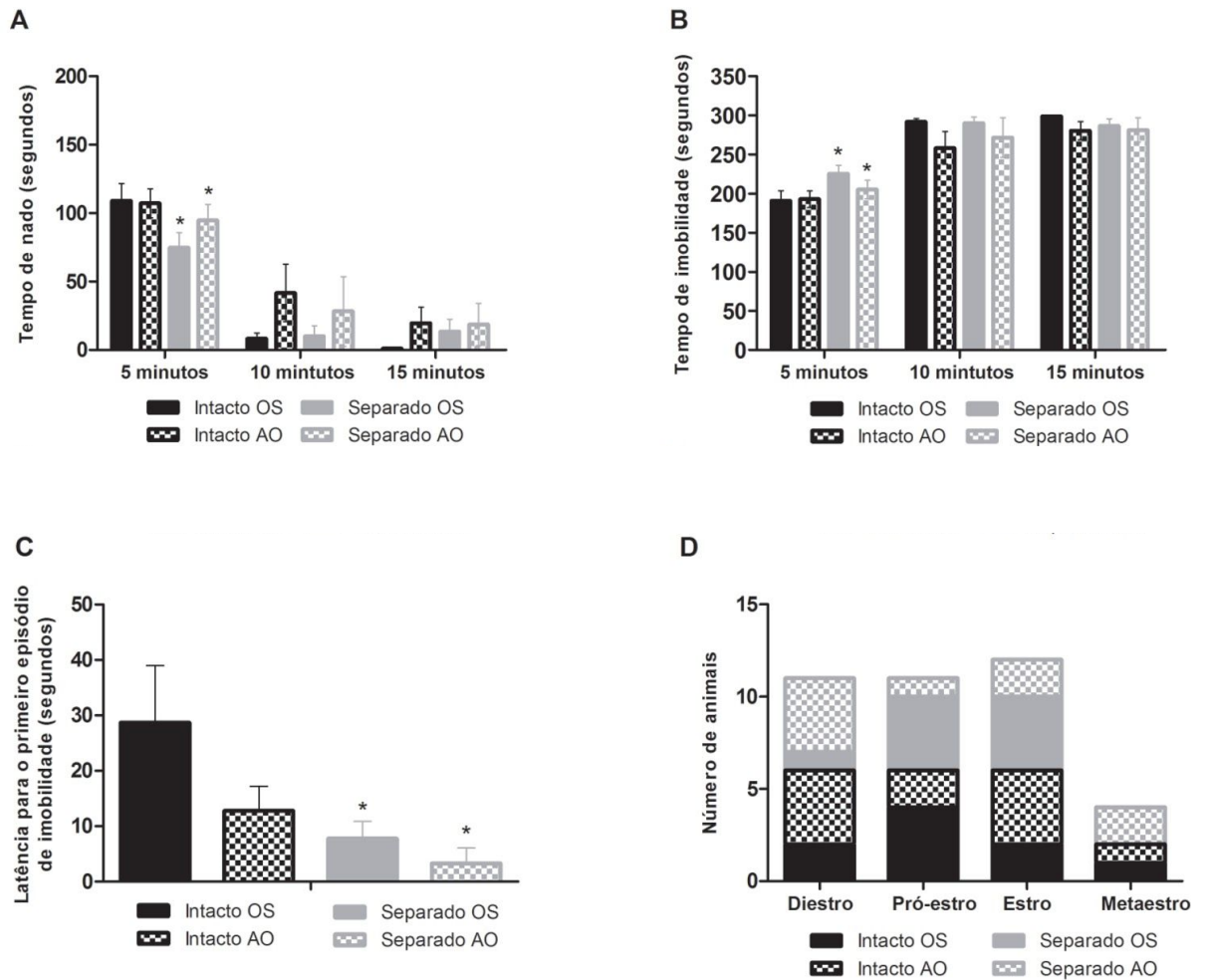
das horas ( $p < 0,001$ ; Figura 5A), principalmente às 17h30 ( $p < 0,001$ ; F figura 5A), e ao longo dos dias ( $p < 0,001$ ; Figura 5B). A anova de duas vias mostrou um aumento no escore total de inconsistência nas mães que foram submetidas à separação materna ( $p < 0,02$ ; Figura 5D).

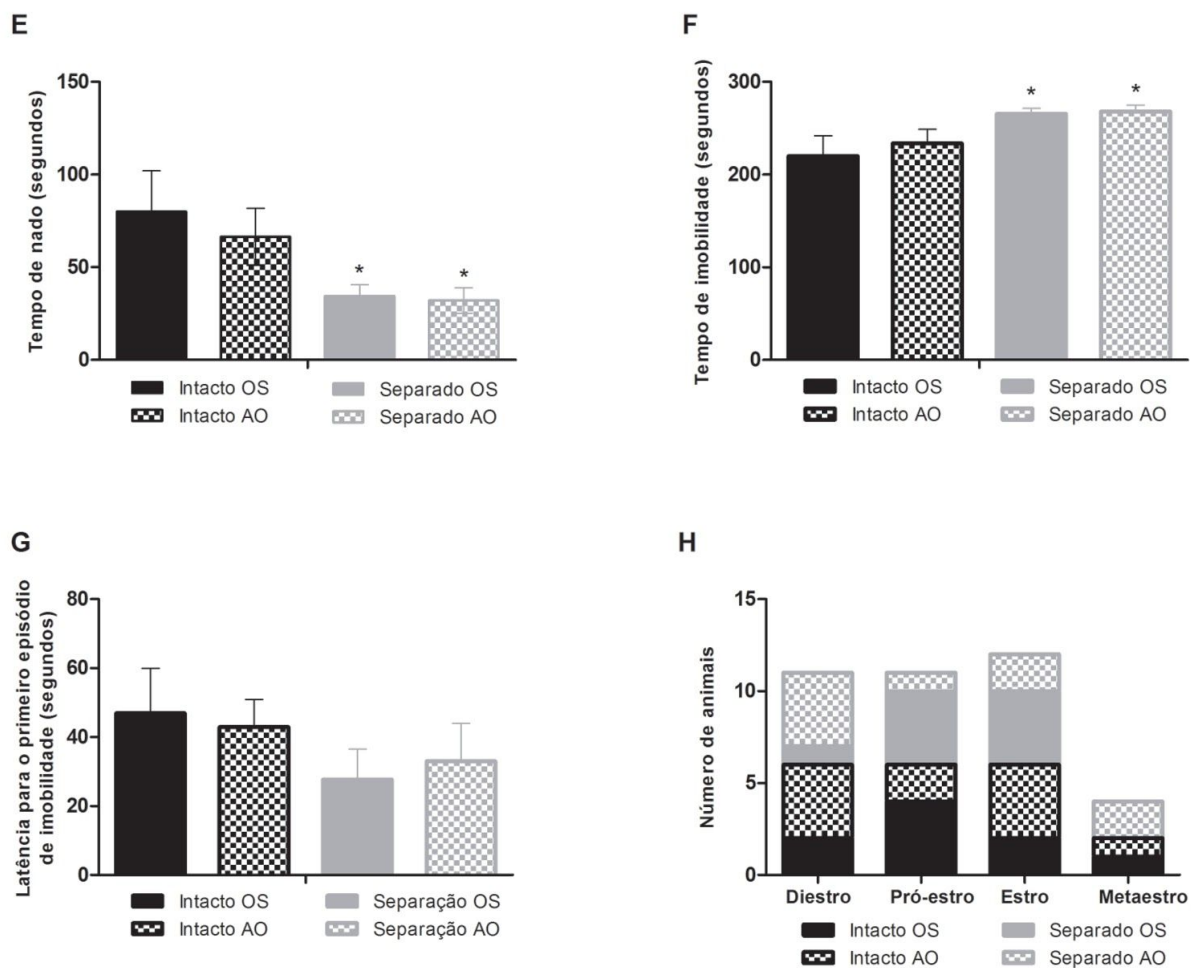
### 6.3 Atividade locomotora e comportamento emocional

A atividade locomotora foi avaliada através do número de cruzamentos realizados na tarefa do campo aberto por 10 minutos. Não houve diferenças significativas entre os grupos estudados com relação a esse parâmetro avaliado ( $p > 0,005$ ), dados não mostrados. Para verificar o comportamento emocional, foi avaliado o comportamento do tipo depressivo através da tarefa do nado forçado de Porsolt. Essa tarefa foi verificada através de uma exposição de 15 minutos e 24 horas após por mais uma exposição de 5 minutos. Nos 5 minutos iniciais da primeira exposição, foi verificado uma redução no tempo de nado ( $F [1,34] = 4,107$ ,  $p = 0,05$ ; Figura 6A), uma redução na latência para o primeiro episódio de imobilidade ( $F [1,34] = 6,704$ ,  $p < 0,02$ ; Figura 6C), e um aumento no tempo de imobilidade nas mães submetidas à separação materna ( $F [1,34] = 4,107$ ,  $p = 0,05$ ; Figura 6B). No segundo dia a Anova de duas vias mostrou que as ratas submetidas à separação materna reduziram o tempo de nado ( $F [1,34] = 7,705$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 6E), não alteraram a latência para o primeiro episódio de imobilidade ( $p > 0,05$ ; Figura 6G) e aumentaram o tempo de imobilidade ( $F [1,34] = 7,705$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 6F). O ciclo estral foi determinado após a tarefa do nado forçado tanto no primeiro dia (Figura 6D) quanto no segundo dia (Figura 6H) de experimento.

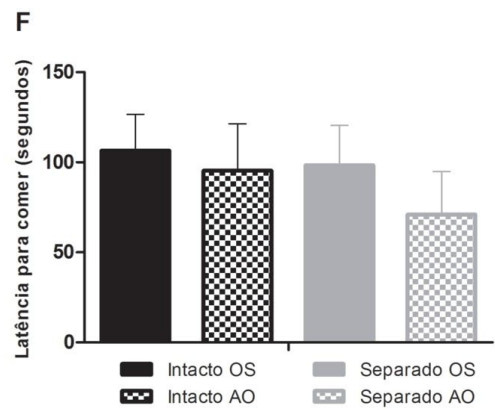
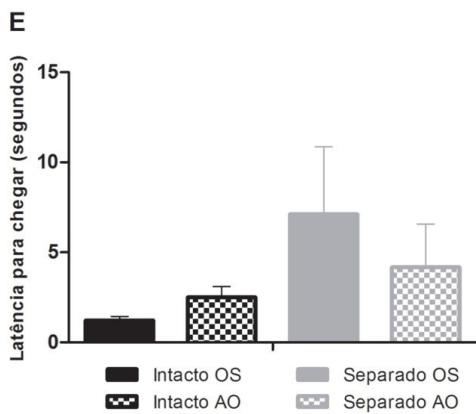
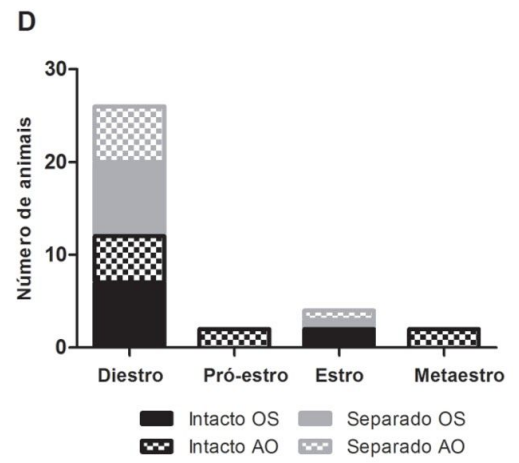
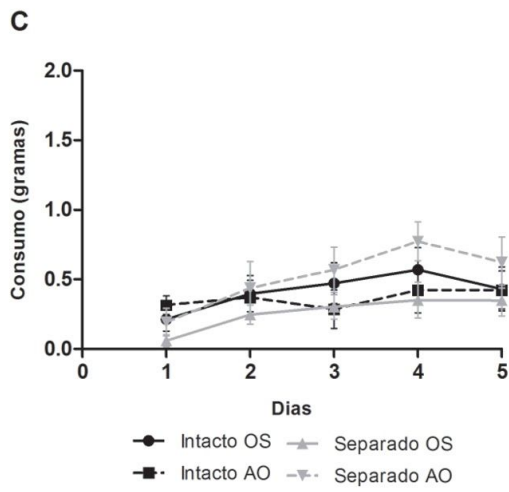
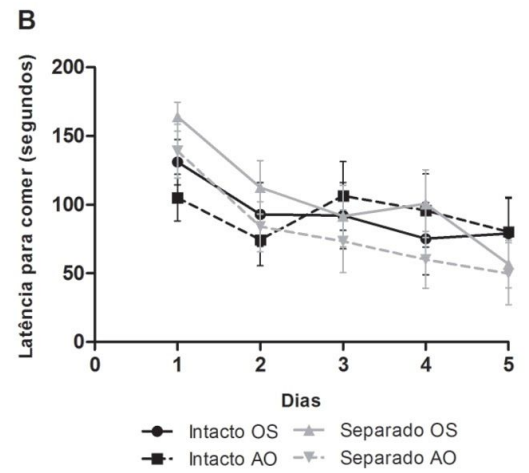
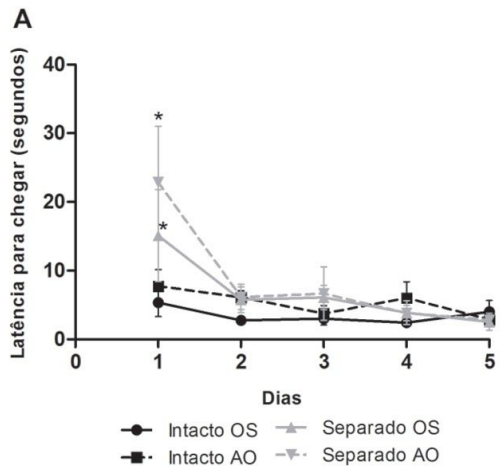
A motivação para buscar alimentos palatáveis pode estar relacionada com as características do comportamento depressivo. Para isso, foi avaliado o corredor alimentar que mostrou que durante os dias de aprendizado os animais mostram uma redução na latência para chegar no alimento ( $F [4,112] = 8,730$ ,  $p < 0,01$ ), uma redução na latência para dar a primeira mordida no alimento ( $F [4,112] = 9,041$ ,  $p < 0,01$ ) e um aumento no consumo do alimento doce ( $F [4,112] = 13,934$ ,  $p < 0,01$ ). Também foi observado um aumento na latência para chegar no alimento nas mães separadas ( $F [1,28] = 5,341$ ,  $p < 0,03$ ), principalmente no primeiro dia do treino ( $F [1,28] = 5,761$ ,  $p < 0,03$ ). Não houve diferenças significativas nos mesmos parâmetros avaliados no dia do teste, onde os animais estavam previamente alimentados ( $p > 0,05$ ; Figuras 7E, 7F e 7G). O ciclo estral foi determinado após cada dia do treino da tarefa do corredor

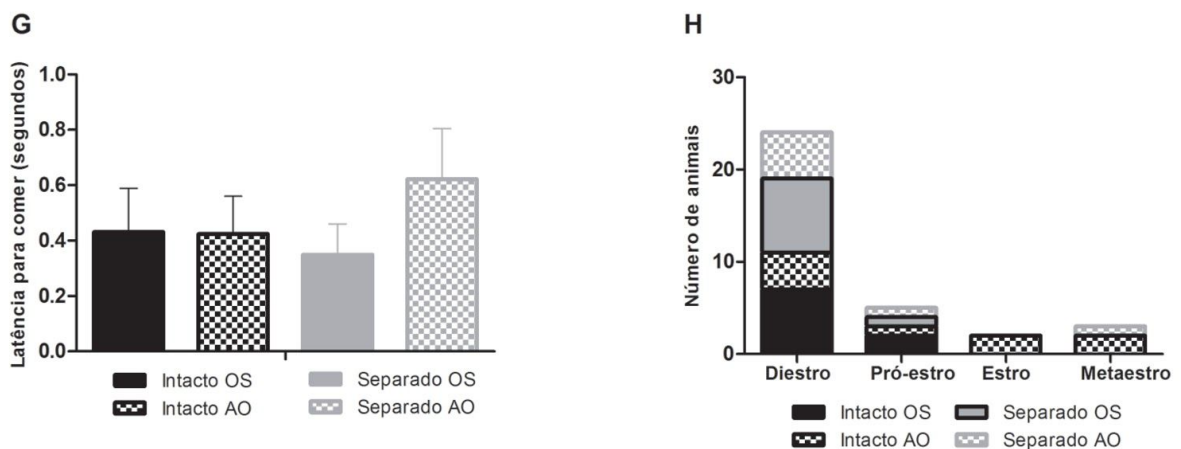
alimentar. A figura 7D, mostra a distribuição das ratas em diferentes fases do ciclo estral no primeiro dia de treino e a figura 7H mostra a distribuição das ratas em diferentes fases do ciclo estral no dia do teste.





**Figura 6:** Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva e da separação materna sobre o comportamento do tipo depressivo. A partir do dia pós-natal 25, as mães divididas nos 4 grupos experimentais: (1) Intacto OS (n = 9); (2) Intacto AO (n = 11); (3) Separado OS (n = 9) e (4) Separado AO (n = 9) foram submetidas à tarefa do nado forçado em dois dias consecutivos. No primeiro dia de exposição os dados estão mostrados em blocos de 5 minutos. Neste dia, a Anova de duas vias mostrou que a separação materna reduziu o tempo de nado ( $F [1,34] = 4,107, p=0,05$ ; Figura 6A), reduziu a latência para o primeiro episódio de imobilidade ( $F [1,34] = 6,704, p<0,02$ ; Figura 6C) e aumentou o tempo de imobilidade ( $F [1,34] = 4,107, p=0,05$ ; Figura 6B), apenas nos primeiros 5 minutos. No segundo dia a Anova de duas vias mostrou que as ratas submetidas à separação materna reduziram o tempo de nado ( $F [1,34] = 7,705, p<0,01$ ; 6E), não alteraram a latência para o primeiro episódio de imobilidade ( $p>0,05$ ; Figura 6G) e aumentaram o tempo de imobilidade ( $F [1,34] = 7,705, p<0,01$ ; figura 6F). O ciclo estral foi determinado após a tarefa do nado forçado tanto no primeiro dia (Figura 6D) quanto no segundo dia (Figura 6H) de experimento.





**Figura 7:** Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva e da separação materna sobre o comportamento alimentar. A partir do dia pós-natal 25, as mães divididas nos 4 grupos experimentais: (1) Intacto OS ; (2) Intacto AO; (3) Separado OS e (4) Separado AO (tamanho amostral de 7 a 9 ratas por grupo) foram submetidas à tarefa do corredor alimentar. A Anova de medidas repetidas mostrou que ao longo dos dias de treino as ratas diminuíram a latência para chegar no alimento ( $F [4,112] = 8,730, p < 0,01$ ; Figura 7A) reduziram a latência para dar a primeira mordida ( $F [4,112] = 9,041, p < 0,01$ ; Figura 7B) e aumentaram o consumo ao longo dos dias de treino ( $F [4,112] = 13,934, p < 0,01$ ; Figura 7C). Foi observado um aumento na latência nas mães separadas, principalmente no primeiro dia ( $F [1,28] = 5,761, p < 0,03$ ; Figura 7A). No dia do teste não houve diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ; Figuras 7E, 7F e 7G). A figura 7D, mostra a distribuição das ratas em diferentes fases do ciclo estral no primeiro dia de treino e a figura 7H mostra a distribuição das ratas em diferentes fases do ciclo estral no dia do teste.

## 7. Discussão

Alguns estudos mostram que a exposição aos estímulos estressores durante a gestação e o período pós-parto podem prejudicar a díade mãe-filho (Marais et al., 2008; Kurata et al., 2009; Sung et al., 2010; Couto-Pereira et al., 2016), e isso pode estar associado ao surgimento de desordens do humor em diferentes estágios do desenvolvimento tanto na mãe quanto na prole (Misdrahi et al., 2005; Boccia et al., 2007; Sung et al., 2010; Diehl et al., 2011, 2014). Nos dias que se aproximam ao parto e no período pós-parto as ratas estão em intensas adaptações comportamentais e bioquímicas que contribuirão para estimular o comportamento materno. No entanto, uma intensa exposição ao estresse, como a separação materna nos 10 primeiros dias de vida pós-natal, pode induzir um comportamento depressivo das mães e impactar efetivamente o cuidado com a prole (Caldji et al., 2000; Newport et al., 2002; Lippmann et al., 2007).

Nesse sentido, a proposta deste estudo foi investigar se o consumo de uma dieta suplementada com azeite de oliva durante o período gestacional e lactacional poderia prevenir as consequências induzidas pela separação materna sobre o comportamento das mães. Assim, os principais achados mostraram que a separação materna aumentou o cuidado materno de forma fragmentada e induziu um comportamento depressivo nas mães. Os resultados também mostraram que as ratas que consumiram uma dieta com azeite de oliva aumentaram as frequências do comportamento materno ativo, e que esse aumento foi de forma consistente. No entanto, quando as ratas passaram pelo estresse da separação dos seus filhotes no período neonatal, a dieta com azeite de oliva não foi capaz de prevenir a inconsistência do cuidado induzida pela separação materna. O aumento agudo da postura de amamentação com o dorso arqueado também é uma das consequências da separação materna, e nossos resultados mostram que as ratas que receberam as dietas suplementadas com azeite de oliva atenuaram esse aumento. É importante destacar que não houve diferenças significativas com relação ao consumo das dietas oferecidas e o peso corporal.

Nos roedores, o primeiro contato da mãe com seus filhotes ocorre dentro do contexto do ninho (Alberts et al., 1989; Stern, 1997), e imediatamente após o parto as mães iniciam o comportamento de cuidar da ninhada. O cuidado materno envolve a expressão consistente e

coordenada de uma série de comportamentos, realizando principalmente comportamentos de lambida e promovendo a nutrição dos filhotes. Assim, a qualidade do cuidado desempenhado pelas mães durante essas fases iniciais é determinante para o desenvolvimento e comportamento dos filhotes ao longo da vida (Liu et al., 2000; Singh-Taylor et al., 2015; Murgatroyd et al., 2015). A literatura mostra que filhotes provenientes de mães que desempenhavam maiores frequências de lambidas, apresentam maior sinaptogênese hipocampal e melhora no aprendizado e na memória quando adultos (Liu et al., 2000). Dentro desse contexto, intervenções durante o período neonatal podem influenciar a relação entre mãe e filho, afetando o desenvolvimento do sistema nervoso central e induzindo uma falha ou prejuízo no cuidado materno, podendo desencadear desfechos emocionais negativos nas mães e na prole (Kurata et al., 2009; Sung et al., 2010; Diehl et al., 2014; Zalosnik et al., 2014).

Nossos resultados mostraram que a separação materna aumentou a frequência de lambidas das mães nos filhotes, principalmente nas sessões das 13h e 17h30, e ao longo dos 10 dias de observação, destacando os dois últimos dias. Os filhotes eram retirados do ninho por volta das 14h30 e retornavam para as caixas moradia 3h depois, por volta das 17h30. Os resultados mostraram um aumento agudo no cuidado materno logo após o protocolo de separação, dados que vão de encontro com outros estudos publicados (Pryce et al., 2001; Macrí et al., 2004; Bodensteiner et al., 2012; Stamatakis et al., 2015; Couto-pereira et al., 2016). O comportamento materno ativo foi mais frequente principalmente nas sessões de observação que correspondiam à fase clara, dados também observados em outros estudos, mostrando que a postura de amamentação com o dorso arqueado e o comportamento de lambar são mais frequentes durante esse período (Champagne et al., 2003; Couto-pereira et al., 2016). Além do efeito da separação materna sobre o comportamento materno, o consumo de uma dieta com azeite de oliva também promoveu um aumento na frequência lambidas da mãe, principalmente nas observações das 17h30. Além disso, no último dia de observação do comportamento materno foi verificada uma interação entre separação materna e dieta com azeite de oliva, indicando um aumento na frequência de lambidas induzido pela dieta e pela separação materna.



Alguns estudos mostram que o aumento do cuidado materno torna os filhos mais resilientes aos prejuízos ocasionados por ambientes estressores (Liu et al., 1997; Champagne et al., 2003; Coutellier et al., 2008; van Hasselt et al., 2012; Singh-Taylor et al., 2015), entretanto, a literatura vem demonstrando diversos prejuízos no comportamento emocional e cognitivo nos animais que foram expostos ao estresse ocasionado pela separação materna durante os primeiros estágios da vida (Lajud et al., 2012; Diehl et al., 2011, 2014).

Baseado no exposto acima, investigamos se o aumento do cuidado materno induzido pela separação materna e pelo consumo de uma dieta com azeite de oliva foi de maneira consistente e de qualidade. Para isso, realizamos o escore de inconsistência comportamental de acordo com Ivy et al. (2008). Nesse estudo eles propuseram um escore comportamental para medir a qualidade do cuidado materno. Dessa forma, aplicamos o escore de inconsistência, conforme a adaptação de Couto-Pereira et al., 2016, e verificamos que as mães que sofreram separação dos filhotes apresentavam um cuidado materno inconsistente e fragmentado. Assim, mesmo que a separação materna tenha induzido um aumento na frequência de lambidas e da amamentação com o dorso arqueado, esse comportamento foi mais fragmentado e de pior qualidade. Resultados que novamente vão de encontro com a literatura (Ivy et al., 2008; Couto-pereira et al., 2016).

As ratas que receberam azeite de oliva durante a gestação e a lactação também aumentaram o cuidado materno, entretanto não demonstraram inconsistência no comportamento. Atualmente, alguns estudos vêm apontando que o consumo de azeite de oliva pode trazer benefícios para o metabolismo periférico e central, melhorando o perfil lipídico, diminuindo o desequilíbrio oxidativo e atuando na redução da hiperglicemia, assim como, melhorando a memória e as respostas ao estresse (Solfrizzi et al., 2006; Naqvi et al, 2011; Zeng et al., 2015; Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2016). A literatura também mostra que o uso de dietas com azeite de oliva durante a gestação atenuou disfunções placentárias e induziu uma programação intrauterina que permitiu uma redução no retardo do desenvolvimento fetal (Capobianco et al., 2018). Com relação aos nossos resultados, verificamos que as mães que consumiram azeite de oliva aumentaram a frequência de lambidas na prole de forma consistente e atenuaram o aumento agudo da amamentação com o dorso arqueado, induzido

pela separação materna. Esse cuidado materno consistente e de prevenção pode indicar que possivelmente a presença do azeite de oliva na dieta pode melhorar a qualidade do cuidado materno das mães que sofrem separação da prole. No entanto, mais estudos são necessários para conseguir atribuir o possível efeito do azeite de oliva sobre esse parâmetro de análise comportamental. Também é importante mencionar que ainda são poucos os estudos que ofereceram dietas suplementadas com azeite de oliva durante o período gestacional e lactacional. Além disso, nenhum estudo buscou analisar os efeitos dessa dieta sobre o cuidado materno, mostrando que nosso estudo é o primeiro que busca investigar se o consumo de azeite de oliva pode prevenir alterações comportamentais induzidas pela separação materna durante o período perinatal.

Na tentativa de compreender o porquê do cuidado materno ser inconsistente e de baixa qualidade nas mães que passaram por separação materna, também analisamos o comportamento emocional dessas ratas. Assim, foi realizada a tarefa de nado forçado, amplamente utilizado para medir o comportamento depressivo nos animais. Os resultados mostraram que nos primeiros 5 minutos de exposição as ratas submetidas à separação materna diminuíram o tempo do nado, reduziram a latência para o primeiro episódio de imobilidade e aumentaram o tempo total de imobilidade, indicando um comportamento depressivo. Ainda no primeiro dia de exposição, aos 10 e aos 15 minutos, esses animais apresentaram um comportamento adaptativo e buscaram estratégias para ficarem imóveis na água. A segunda exposição ocorreu 24 horas após a primeira, onde as ratas foram novamente colocadas na água, mas dessa vez o tempo total foi de apenas 5 minutos. Também foi observado que a separação materna reduziu o tempo de nado e aumentou o tempo de imobilidade, reforçando os resultados encontrados no primeiro dia de exposição. Para verificar se o aumento no tempo de imobilidade não poderia ser um comprometimento motor, foi realizada a tarefa do campo aberto, onde não foram observadas diferenças significativas com relação à atividade locomotora dessas ratas.

As ratas também foram submetidas a tarefa do corredor alimentar, com o objetivo de analisar outro parâmetro comportamental para verificar se a separação materna induz o comportamento depressivo. A tarefa do corredor alimentar avalia a motivação para buscar

alimentos novos e doces durante o estado de restrição alimentar e durante o estado alimentado do animal. Durante o primeiro dia de restrição alimentar, foi verificado que as mães que sofreram separação materna aumentaram a latência para buscar um alimento novo e doce, mesmo em restrição alimentar. Esse achado é interessante, pois pode identificar a falta de interesse ou de motivação para consumir alimentos palatáveis, característica que se assemelha ao comportamento depressivo.

Dentro do contexto da depressão, é importante chamar a atenção para o período do pós-parto. Muitas mulheres apresentam depressão durante essa fase da vida, e esse comportamento prejudica diretamente o vínculo com o filho (Bennett et al., 2004). Em modelos animais o estresse, como a separação materna, realizada durante o período do pós-parto, tem induzido um comportamento depressivo nas mães (Boccia et al., 2007; Sun et al., 2010), e como já mencionado anteriormente, essa alteração no comportamento emocional pode impactar o cuidado materno (Diehl et al., 2014; Zalosnik et al., 2014). Esses estudos estão de acordo com os nossos achados, mostrando que mães submetidas à separação da prole apresentam um cuidado materno de baixa qualidade e um comportamento depressivo. Adicionalmente, durante as tarefas comportamentais que avaliaram a atividade locomotora e o comportamento emocional das ratas, logo após a realização das tarefas verificamos a fase do ciclo estral de cada animal.

Um estudo mostrou que as fêmeas intactas apresentaram uma redução no comportamento depressivo (reduzindo a imobilidade) durante a fase do proestro, onde ocorre o pico de liberação do estradiol, quando comparado às outras fases do ciclo ou a ratos machos (Gogos et al., 2018). Nossas análises mostraram que as ratas apresentaram uma distribuição em todas as fases do ciclo, mesmo nas ratas separadas que apresentaram comportamento depressivo. As alterações no comportamento emocional induzidas pela separação materna, observadas neste estudo, não foram prevenidas pela dieta com azeite de oliva. No entanto, é importante ressaltar que o este trabalho apresenta algumas limitações com relação ao tamanho amostral, sendo necessário aumentar o número de animais por grupo para ter confiabilidade com relação à falta de efeitos do consumo de azeite de oliva sobre o comportamento emocional das mães. Contudo, nossos principais resultados mostraram que a separação

materna realizada no período pós-natal, de fato afeta o comportamento emocional das mães e perturba a relação com os filhos. Esse vínculo entre as mães e a sua prole, mediado pelo cuidado materno, fica fragmentado e inconsistente, mostrando que apesar do aumento do cuidado materno, esse cuidado era de baixa qualidade. O consumo de uma dieta com azeite de oliva mostrou alguns benefícios com relação ao cuidado materno. Foi verificado um aumento nas lambidas sem aumentar o escore de inconsistência, assim como a redução na frequência de amamentação com o dorso arqueado, principalmente quando os filhotes retornaram para as caixas-moradia. Esses achados apontam para um possível papel neuroprotetor do azeite de oliva, sugerindo que o uso desse alimento possa ser uma estratégia para reduzir o desenvolvimento de desordens nas mães. É importante ressaltar que mais estudos são necessários para compreender os efeitos de uma dieta com azeite de oliva sobre o cuidado materno e a emocionalidade das ratas.

## **8. Conclusão**

O presente estudo mostrou claramente que a separação materna no período neonatal induziu um cuidado materno fragmentado e de baixa qualidade, assim como, induziu também o comportamento depressivo nas mães. O consumo de uma dieta com azeite de oliva foi capaz de agir sobre parâmetros do cuidado materno, aumentando o cuidado materno de forma mais homogênea e não alterou a emocionalidade dessas ratas. Esses achados abrem uma nova linha de investigação no que tange o possível papel neuroprotetor do azeite de oliva para as mães durante o pós-parto. Assim, a introdução de hábitos alimentares mais saudáveis na dieta das mães pode prevenir desordens neuropsiquiátricas e evitar prejuízos neuroquímicos e comportamentais na prole.

## 9. Perspectivas

- Avaliar outros comportamentos desempenhados durante o cuidado materno, como o tempo de recuperação dos filhotes e o tempo de amamentação com a postura arqueada;
- Avaliar a memória das mães submetidas ou não à separação, através do teste de reconhecimento de objetos;
- Avaliar parâmetros relacionados ao perfil redox no hipocampo dorsal e ventral das mães;
- Analisar marcadores relacionados com a atividade do eixo HPA;
- Avaliar marcadores de plasticidade e neurogênese no hipocampo dorsal e ventral;

## 10. Referências

AGUGGIA J.P, SUÁREZ M.M, RIVAROLA M.A. Early maternal separation neurobehavioral consequences in mother rats. **Behavioral Brain Research**, v. 248, p. 25 - 31, julho, 2013.

ALBERTS JR, CRAMER CP. Handbook of Behavioral Neurobiology. **Plenum**, v. 9, p. 1 - 39, ed. Blass EM, 1989.

AYA - RAMOS L, CONTRERAS - VARGAS C, RICO JL, DUENÑAS Z. Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food & Function*, v. 8, p. 2592 - 2600, junho, 2017

BANQUERI M, MÉNDEZ M, ARIAS JL. Behavioral effects in adolescence and early adulthood in two length models of maternal separation in male rats. **Behavioral Brain Research**, v. 324, p. 77 - 86, maio, 2017.

BENNET HA, TADDIO A, KOREN G, EINARSON TR. Prevalence of depression during pregnancy: systematic review. **Obstetrics Gynecology**, v. 103, p. 698 - 709, 2004.

BOCCIA M.L, RAZZOLI M, VADLAMUDI S.P, TRUMBULL W, CALEFFIE C, PEDERSEN C.A. Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mother. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 1, p.65-71, janeiro, 2007.

BODENSTEINER K.J, GHIRALDI L.L, MINER S.S. Differential effects of short and long-term early maternal separation on subsequent maternal behavior in rats. **The Journal of General Psychology**, v. 139, n. 2, p. 78 - 99, abril, 2012.

BOSCH OL, POHL TT, NEUMANN ID, YOUNG LJ. Abandoned prairie vole mothers show normal maternal care but altered emotionality: Potential influence of the brain corticotropin-releasing factor system. *Behavioral Brain Research*, v. 341, p. 114 - 121, 2018.

BRETON C. The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. **Journal of Endocrinology**. v. 216, n. 2 p. 19 - 31, 2013.

BRUNTON PJ, RUSSEL JA, DOUGLAS AJ. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20,p. 764 - 776, 2008.

CALDJI C, TANNENBAUM B, SHARMA S, FRANCIS D, PLOTSKY PM, MEANEY M J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 95, n. 9, p. 5335 - 5340, abril, 1998.

CALDJI C, DIORIO J, MEANEY MJ. Variations in maternal care in infancy regulate the development of estress reactivity. **Biological Psychiatry**, v. 48, p. 1164 - 1174, 2000.

CAPOBIANCO E, GOMES RIBOT D, FORNES D, POWELL TL, LEVIEUX C, JANSSON T, JAWERBAUM A. Diet enriched with olive oil attenuates placental dysfunction in rats with gestational diabetes induced by intrauterine programming. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, e1800263, julho, 2018.

CARDOSO LGV. Características físico-químicas e avaliação do perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas em Minas Gerais. **Dissertação**, UFLA, 1997.

CASTRO C, GUERREIRO M, CALDEIRA F, PINTO P. Aspectos generales del setor oleícola em Portugal . **Fruticultura Profissional**, n. 88, 1997.

CASTELLANI F, VITALI A, BERNARDI N, MARONE E, PALAZZO F, GROTTA L, MARTINO G. Dietary supplementation with dried olive pomace in dairy cows modifies the composition of fatty acids and the aromatic profile in milk and related cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 8658 - 8669, novembro, 2017.

CHAMPAGNE F, DIORIO J, SHARMA S, MEANEY MJ. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. **PNAS**, v. 23, p. 12736 - 12741, outubro, 2001.

CHAMPAGNE FA, MEANEY MJ. Stress During Gestation Alters Postpartum Maternal Care and the Development of the Offspring in a Rodent Model. **Biological Psychiatry**, v. 59, p. 1227 - 1235, junho, 2006.

CHAMPAGNE F.A, FRANCIS D.D, MAR A, MEANEY M.J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359 - 371, agosto, 2003.

CHATZI L, MELAKI V, SARRI K, APOSTOLAKI I. Dietary patterns during pregnancy and the risk of postpartum depression: the mother–child ‘Rhea’ cohort in Crete, Greece. **Public Health Nutrition**, v. 14, p. 1663 - 1670, setembro, 2011.



CHEN X, LI L, LIU X, LUO R, LIA G, LIU J, CHENG J, LU Y, CHEN Y. Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. **Life Sciences**, v. 23, p. 291 - 304, junho 2018.

CICERALE S, LUCAS L, KEAST R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. **International Journal Molecular Sciences**, v. 11, p. 458 - 479, fevereiro, 2010.

CONTRERAS CM, MARTINEZ-MOTA L, SAAVEDRA M. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 22, p. 1121 - 1128, 1998.

COUTELLIER L, FRIEDRICH AC, FAILING K, WÜRBEL H. Variations in the postnatal maternal environment in mice: effects on maternal behaviour and behavioural and endocrine responses in the adult offspring. **Physiology & Behavior**, v. 93, p. 395 - 407, 2008.

COUTO-PEREIRA NS, FERREIRA CF, LAMPERT C, ARCEGO DM, TONIAZZO AP, BERNARDI JR, DA SILVA DC, VON POSER TOIGO E, DIEHL LA, KROLOW R, SILVEIRA, PP, DALMAZ C. Neonatal interventions differently affect maternal care quality and have sexually dimorphic developmental effects on corticosterone secretion. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 55, p. 72–81, outubro, 2016.

CRYAN JF, MARKOU A, LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Science**, v. 23, p. 238 - 245, 2002.

Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: **World Health Organization**; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

DIEHL L.A, SILVEIRA P.P, LEITE M.C, CREMA L.M, PORTELLA A.K, BILLODRE M.N, NUNES E. HENRIQUES T.P, FIDELIX-DA-SILVA L.B, HEIS M.D, GONÇALVES C.A, QUILLFELDT J.A, DALMAZ C. Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. **Brain Research**, v. 1144, n. 4, p. 107 - 116, maio, 2007.

DIEHL L.A, ALVARES L.O, NOSCHANG C, ENGELKE D, ANDREAZZA A.C, GONÇALVES C.A.S, QUILLFELDT J.A, DALMAZ C. Long-lasting effects of maternal

separation on an animal model of post-traumatic stress disorder: effects on memory and hippocampal oxidative stress. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 4, p. 700 - 707, abril, 2012.

DIEHL L.A, COUTO - PEREIRA N.S, LAUREANO D.P, BENITZ A.N.D, NOSCHANG C, FERREIRA A.G.K, SCHERER E.B, MACHADO F.R, HENRIQUES T.P, WYSE A.T.P, MOLINA V, DALMAZ C. Contextual fear conditioning in maternal separated rats: the amygdala as a site for alterations. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 2, p. 384 - 393. fevereiro, 2014.

EKLUND MB, JOHANSSON LM, UVNÄS-MOBERG K, ARBORELIUS L. Differential effects of repeated long and brief maternal separation on behavior and neuroendocrine parameters in Wistar dams. **Behavioral Brain Research**, v. 203, n. 1, p. 69 - 75, outubro, 2009

FEHÉR A, JUHÁSZ A, RIMANÓCZY A, KÁLMÁN J, JANKA Z. Association between BDNF Val66MET polymorphism and Alzheimer disease, dementia with Lewy bodies, and Pick disease. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 23, n. 3, p. 224 - 228, setembro, 2009.

FERREIRA CF, BERNARDI JR, SILVA DC, COUTO-PEREIRA NS, MOTA CS, KROLOW R, WEIS SN, PETTENUZZO L, KAPCSINSK F, SILVEIRA PP, DALMAZ C. Mitochondrial and Oxidative Stress Aspects in Hippocampus of Rats Submitted to Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency After Exposure to Early Stress. **Neurochemical Research**, 40, p. 1870 - 1878, setembro, 2015.

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, fevereiro 1999.

FREEMAN M. The Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. **The physiology of reproduction**, p. 613-658, janeiro, 1994.

FRYE CA, WALF AA. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. **Hormones Behavior**, v. 41, p. 306 - 315, 1998.

GLASHEEN C, RICHARDSON G, FABIO A. A systematic review of the effects of postnatal maternal anxiety on children. **Archives of Women's Mental Health**, v. 13, p. 61 - 74, fevereiro, 2010.

GOGOS A, MCCARTHY M, WALKER AJ, UDAWELA M, GIBBONS A, DEAN B, KUSLJIC S. Differential effects of chronic 17 $\beta$ -oestradiol treatment on rat behaviours relevant to depression. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 30, p. e12652, novembro, 2018.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE CF, MEDEIROS-DE-MORAES IM, OLIVEIRA FM, BURTH P, BOZZA PT, CASTRO FMV, SILVA AR, CASTRO-FARIA-NETO HC. Omega-9 oleic acid induces fatty acid oxidation and decreases organ dysfunction and mortality in experimental sepsis. **PlosOne**, v. 11, e.0153607, abril, 2016.

GU Y, NIEVES JW, STERN Y, LUCHSINGER JA, SCARMEAS N. Food combination and Alzheimer disease risk: a protective diet. **Arch Neurol**, v. 67, p.699 - 706, julho, 2010.

HARGREAVES GA, MCGREGOR IS, SACHDEV PS. Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation is antidepressant but not anxiolytic in rat models of anxiety and depression. **Psychiatry Research**, v. 1237, p. 113 - 121, 2005.

HARKNESS KL, HAYDEN EP. Stress sensitivity and stress sensitization in psychopathology: An introduction to the special section. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 124, n. 1, p. 1 - 3, 2015.

HENRIQUES TP, SZAWKA RE, DIEHL LA, DE SOUZA MA, CORRÊA CN, ARANDA BCC, SEBEN V, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JA, SILVEIRA PP, ALMEIDA RMM. Stress in Neonatal Rats with Different Maternal Care Backgrounds: Monoaminergic and Hormonal Responses. **Neurochemical Research**, v. 23, p. 2351 - 2359, dezembro, 2014.

HERRICK K, PHILLIPS DI, HASELDEN S, SHIELL AW, CAMPBELL-BROWN M, GODFREY KM. Maternal consumption of a high-meat, low-carbohydrate diet in late pregnancy: Relation to adult cortisol concentrations in the offspring. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 3554 - 3560, agosto, 2003.

HULSHOF HJ, NOVATI A, SGOIFO A, LUITEN PGM, DEN BOER JA, MEERLO P. Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. **Behavioral Brain Research**, v. 216, p. 552 - 560, janeiro, 2011.

IVY AS, BRUNSON KL, SANDMAN C, BARAM TZ. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. **Neuroscience**, v. 154, p. 1132 - 1142, maio, 2008.

KOKRAS N, DALLA C, SIDERIS AC, DENDI A, MIKAIL HG, ANTONIOU K, PAPADOPOULOU-DAIFOTI Z. Behavioral sexual dimorphism in models of anxiety and depression due to changes in HPA axis. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 436 - 445, 2012.

KUHN C.M, PAUK J, SCHANBERG S.M. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. **Developmental Psychobiology**, v. 23, n.5, p.395 - 410, julho, 1990.

KURATA A, MORINOBU S, FUCHIAMI M, YAMAMOTO S, YAMAWAKI S. Maternal postpartum learned helplessness (LH) affects maternal care by dams and responses to the LH test in adolescent offspring. **Hormones Behavior**, v. 56, p. 112 - 120, junho, 2009.

LAJUD N, Roque A, CAJERO M, GUTIÉRREZ - OSPINA, G, TOMER L: Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 3, p. 410-420, março, 2012.

LIPPMANN M, BRESS A, NEMEROFF CB, PLOTSKY PM, MONTEGGIA LM. Long-term behavioral and molecular alterations associated with maternal separation in rats. **European Journal Neuroscience**, v. 25, p. 3091 - 3098, 2007.

LIU D, DIORIO J, TANNENBAUM B, CALDJI C, FRANCIS D, FREEDMAN A, SHARMA S, PEARSON D, PLOTSKY PM, MEANEY MJ. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, p. 1659 - 1662, 1997.

LIU D, DIORIO J, DAY JC, FRANCIS DD, MEANEY MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience**, v. 3, p. 799 - 806, 2000.

MACRÍ S, MASON GJ, WÜRBEL H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 1017 - 1024, agosto, 2004.

MANIAM J, MORRIS MJ. Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subject to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. **Behavioral Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 72 - 79, março, 2010.

MARAIS L, VAN RENSBURG SJ, VAN ZYL JM, STEIN DJ, DANIELS WM. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after

subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. **Neuroscience Research**, v. 61, p. 106 - 112, 2008.

MARKOSTAMOU I, IOANNIDIS A, DANDI E, MANDYLA MA, NOUSIOPOULOU E, SIMEONIDOU C, SPANDOU E, TATA DA. Maternal separation prior to neonatal hypoxia-ischemia: Impact on emotional aspects of behavior and markers of synaptic plasticity in hippocampus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 52, p. 1 - 12, agosto 2016.

MEANEY M. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Neuroscience**, v. 24, p. 1161 - 1192, 2001.

MISDRAHI MC, PARDON F, PEREZ-DIAZ N, HANOUN C, COHEN-SALMON. Prepartum chronic ultramild stress increases corticosterone and estradiol levels in gestating mice: implications for postpartum depressive disorders. **Psychiatry Research**, v. 137, p. 123 - 130, 2005.

MOGI K, NAGASAWA M, KIKUSUI T. Developmental consequences and biological significance of mother-infant bonding. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, p. 1232 - 1241, julho 2011.

MURGATROYD CA, NEPHEW BC. Effects of early life social stress on maternal behavior and neuroendocrinology. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 2, p. 219 - 228, fevereiro, 2013.

MURGATROYD CA, PEÑA CJ, PODDA G, NESTLER EJ, NEPHEW BC. Early life social stress induced changes in depression and anxiety associated neural pathways which are correlated with impaired maternal care. **Neuropeptides**, v. 52, p. 103 - 111, agosto, 2015.

NAQVI AZ, HARTY B, MUKAMAL KJ, STODDART AM, VITTOLINS M, DUNN JE. Monounsaturated, trans, and saturated fatty acids and cognitive decline in women. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 59, n. 5, p. 837 - 843, maio, 2011.

NEPHEW B, MURGATROYD C. The role of maternal care in shaping CNS function. **Neuropeptides**, v. 47, n. 6, p. 371 - 378, dezembro, 2013.

NEWPORT DJ, STOWE ZN, NEMEROFF CB. Parental depression: animal models of and adverse life event. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, p. 1265 - 1283, 2002.

NUMAN M, FLEMING AS, LEVY F. **Maternal behavior**. In: Neill, JD, Physiology of Reproduction, vol.2, Academic Press, San Diego, p. 1921 - 1993.

NUMAN M. **Neurobiology of Social Behavior: Toward an Understanding of the Prosocial and Antisocial Brain**, Amsterdam, 2015.

NUMAN M, YOUNG L. Neural mechanisms of mother-infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications. **Hormones and Behavior**, n. 77, p. 98 - 112, janeiro, 2016.

OKABE S, NAGASAWA M, MOGI K, KIKUSUI T. The importance of mother-infant communication for social bond formation in mammals. **Animal Science Journal**, v. 38, p. 446 - 452, junho, 2012.

PAES CS, TEIXEIRA AM, ROVERSI K, DIAS VT, CALABRESE F, MOLTENI R, FRANCHI S, PANERAI AE, RIVA MA, BURGER ME. Olive oil - enriched diet reduces brain oxidative damages and ameliorates neurotropic factor gene expression in different life stages of rats. **Journal Nutritional Biochemistry**, v.26, n.11, p.1200 - 1207, junho, 2015.

PAGLIAI G, SOFI F, VANNETTI F, CAIANI S, PASQUINI G, MOLINO LOVA R, CECCHI F, SORBI S, MACCHI C. Mediterranean diet, food consumption and risk of late-life depression: The mugello study. **The Journal of Nutrition Health and Aging**, v. 22, p. 569 - 574, 2018.

PORSOLT RD., LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730 - 732, abril, 1977.

PORSOLT RD, ANTON G, BLAVET N, JALFRE M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379 - 391, fevereiro, 1978.

PRUT L, BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3 - 33, fevereiro, 2003.

PRYCE CR, BETTSCHEN D, FELDON J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 38, n. 4, p. 239 - 251, maio, 2001.

PRYCE, CR, BETTSCHEN D, NANZ-BAHR NI, FELDON J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on conditioned stimulus, context, and spatial learning and memory in adult rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 117, p. 883 - 893, 2003

QOSA H, MOHAMED LA, BATARSEH YA, ALQAHTANI S, IBRAHIM B, LEVINE H 3RD, KELLER JN, KADDOUMI A. Extra - virgin olive oil attenuates amyloid- $\beta$  and tau pathologies in the brains of TgSwDI mice. **Journal Nutritional Biochemistry**, v.26, n.12, p.1479 - 1490, dezembro, 2015.

SCARMEAS N, STERN Y, MAYEUX R, MANLY JJ, SCHUPF N, LUCHSINGER JA. Mediterranean diet and mild cognitive impairment. **Arch Neurol**, v., 66, p. 216 - 225, fevereiro, 2009.

RINCEL M, LÉPINAY AL, DELAGE P, FIORAMONTI J, THÉODOROU VS, LAYÉ S, DARNAUDÉRY M. Maternal high-fat diet prevents developmental programming by early-life stress. **Translational Psychiatry**, v. 6, e966, novembro, 2016.

ROSENBLATT JS. Psychobiology of maternal behavior: contribution to the clinical understanding of maternal behavior among humans. **Acta Paediatrica. Suppl.**, v. 397, p. 3 - 8, 1994.

ROSENBLATT JS, SNOWDON CT. Parental Care: Evolution, Mechanisms, and adaptive significance. **Academic Press**, v. 25, 1996

SILVEIRA P.P, DA SILVA B.C, AYRES C, PEDERIVA F.Q, PORTELLA A.K, LUCION A.B, DALMAZ C. Satiety assessment in neonatally handled rats. **Behavioral Brain Research**, v. 173, n.2, p.205 - 210, outubro, 2006.

SING-TAYLOR A, KOROSI A, MOLET J, GUNN BG, BARAM TZ. Synaptic rewiring of stress-sensitive neurons by early-life experience: a mechanism for resilience? **Neurobiology Stress** 1, p. 109 - 115, 2015.

SOLFRIZZI V, COLACICCO AM, D'INTRONO A, CAPURSO C, TORRES F, RIZZO C, CAPURSO A, PANZA F. Dietary intake of unsaturated fatty acids and age-related cognitive decline: a 8.5-year follow-up of the Italian longitudinal study on aging. **Neurobiology Aging**, v. 27, n. 11, p., 1694–1704, novembro, 2006.

SOUZA JA, SILVA MC, MATOS RJB, ALMEIRA LCA, BELTRÃO LC, SOUZA FL, CASTRO RM, SOUZA SL. Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. **Appetite**, v. 123, p. 114 - 119, abril, 2018.

STAMATAKIS A, KALPACHIDOU T, RAFTOGIANNI A, ZOGRAFOR E, TZANOU A, PONDIKI S, STYLIANOPOULOU F. Rat dams exposed repeatedly to a daily brief separation from the pups exhibit increased maternal behavior, decreased anxiety and altered levels of receptors for estrogens (ER, ER), oxytocin and serotonin (5-HT1A) in their brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 52, p. 212 - 228, fevereiro, 2015.

STARR-PHILLIPS, EM, BEERY AK. Natural variation in maternal care shapes adult social behavior in rats. **Developmental Psychobiology**, v. 56, n. 5, p. 1017 - 1026, julho, 2014.

STERN JM. Offspring-induced nurturance: animal-human parallels. **Developmental Psychobiology**, v. 31, p. 19 - 37, 1997.

STERN JM, LONSTEIN J. Chapter 19 Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. **Progress in Brain Research**, v. 133, p. 263 - 278, 2001.

SUNG YA, SHIN MS, CHO S, BAIK HH, JIN BK, CHANG HK, LEE EK, KIM CJ. Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. **Neuroscience**, v. 470, p. 86 - 90, fevereiro, 2010.

TANIGUCHI K, KAWAI T, HATA K. Placental development and nutritional environment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1012, p. 63 - 73, 2018.

VAN HASSELT FN, CORNELISSE S, ZHANG TY, MEANEY MJ, VELZING EH, KRUGERS HJ, JOËLS M. A. Adult hippocampal glucocorticoid receptor expression and dentate synaptic plasticity correlate with maternal care received by individuals early in life. **Hippocampus**, v. 22, p. 255–266, 2012.

VILARES JMM. Los mil primeros días de vida y la prevención de la enfermedad en el adulto. **Nutrición Hospitalaria**, v. 33, p. 8 - 11, 2016.

VILELA FC, VIEIRA JS, GIUSTI-PAIVA A, SILVA ML. Experiencing early life maternal separation increases pain sensitivity in adult offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 62, p. 8 - 14, novembro, 2017.

VISIOLI F, POLI A, GALLI C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. **Medicinal Research Reviews**. v., 22, n.1, p. 65 - 75, janeiro, 2002.



VON POSER TOIGO, E.P, DIEHL L.A, FERREIRA A.G.K, MACKENDANZ V, KROLOW R, BENITZ A.N.D, NOSCHANG C, HUFFELL A.P, SILVEIRA P.P, WYSE A.T.S, DALMAZ C. Maternal depression model: long-lasting effects on the mother following separation from pups. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 1, p. 126 - 133, janeiro, 2012.

WHALEY SE, PINTO A, SIGMAN M. Characterizing interactions between anxious mothers and their children. **American Psychological Association**, v. 67, p. 826 - 836, 1999.

WOODRUFF - BORDEN J, MORROW C, BOURLAND S, CAMBRON S. The behavior of anxious parents: examining mechanisms of transmission of anxiety from parent to child. **Journal of Clinical Child & Adolescent Psychology**, v. 31, p. 364 - 374, setembro, 2002.

ZALOSNIK MI, POLLANO A, TRUJILLO V, SUÁREZ MM, DURANDO PE. Effect of maternal separation and chronic stress on hippocampal-dependent memory in young adult rats: evidence for the match-mismatch hypothesis. **Stress**, v. 17, p. 445 - 450, 2014.

ZHENG A, LI H, CAO K, XU J, ZOU X, LI Y, CHEN C, LIU J, FENG Z, Maternal hydroxytyrosol administration improves neurogenesis and cognitive function in prenatally stressed offspring. **Journal Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 190 - 199, fevereiro, 2015.

## **ANEXOS**

**ANEXO A - Tabela com a análise do percentual de ácidos graxos presente no azeite de oliva utilizado.**

**Tabela 2:** Percentual de ácidos graxos presentes na amostra de azeite de oliva. Cedido pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas - RS/Brasil).

	%
Laurico C12:0	0,01
Mirístico C14:0	0,01
Palmítico C16:0	16,42
Palmitoleico C16:1	1,57
Heptadecanóico C17:0	0,06
Heptadecenóico C17:1	0,14
Esteárico C18:0	2,72
Oléico C18:1 cis	63,43
Oléico C18:1 trans	4,03
Linoleico C18:2	9,09
Linolénico C18:3	0,78
Araquídico C20:0	0,70
Eicosenóico C20:1	0,67
Behênico C22:0	0,23
Lignocérico C24:0	0,14
Σ Saturado	20,29
Σ Monoinsaturados	69,84
Σ Poliinsaturados	13,12

## ANEXO B - Tabela de registro das observações do comportamento materno.

Conforme Ivy et al., 2008

RATA: \_\_\_\_\_ HG - High crouch (amamentando c/ dorso bem arqueado) CN - Construção do ninho  
 Data do parto: \_\_\_\_\_ LW - Low crouch (amamentando c/ dorso pouco arqueado) OFF - Mãe fora do ninho/caixa  
 Ninho: \_\_\_\_\_ L - Lambendo filhotes SUP - Supine post. (amamentando de lado ou de costas) R - Recolhida de filhotes  
 D - Duplo ninho FFN - Filhotes fora do ninho  
 DATA: \_\_\_\_\_ DIAS PP: \_\_\_\_\_ WF - Água/Comida N - No ninho sem posição de amamentação

06:00	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
10:00	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
13:00	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
17:30	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
20:00	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12

DATA: \_\_\_\_\_ DIAS PP: \_\_\_\_\_

06:00	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
10:00	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
13:00	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
17:30	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12
20:00	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12