

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Ana Caroline Silveira

**ESTUDO DOS EFEITOS DE UMA DIETA COM AZEITE DE OLIVA SOBRE O
CUIDADO MATERNO, O COMPORTAMENTO E BIOMARCADORES NO
HIPOCAMPO DE RATAS SUBMETIDAS À SEPARAÇÃO MATERNA**

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Silveira, Ana Caroline

Estudo dos efeitos de uma dieta com azeite de oliva sobre o cuidado materno, o comportamento e biomarcadores no hipocampo de ratas submetidas à separação materna / Ana Caroline Silveira. -- 2021.

65 f.

Orientadora: Rachel Krolow Santos Silva Bast.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Azeite de oliva. 2. Cuidado materno. 3. Comportamento emocional . I. Santos Silva Bast, Rachel Krolow, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ana Caroline Silveira

**ESTUDO DOS EFEITOS DE UMA DIETA COM AZEITE DE OLIVA SOBRE O
CUIDADO MATERNO, O COMPORTAMENTO E BIOMARCADORES NO
HIPOCAMPO DE RATAS SUBMETIDAS À SEPARAÇÃO MATERNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Bioquímica.

Orientador(a): Prof^ª Dr^ª Rachel Krolow S.S. Bast

Porto Alegre

2021

Sumário

Parte I	6
Resumo	7
Abstract	8
Lista de abreviaturas e siglas	9
1. Introdução	10
1.1 Período gestacional e pós-parto.....	10
1.1.1 Alterações fisiológicas e hormonais durante o período gestacional e após-parto....	10
1.1.2 Cuidado materno no pós-parto.....	11
1.1.3 Intervenções ambientais no período gestacional e lactacional.....	12
1.1.4 Estresse pós-natal e as consequências sobre o comportamento e o hipocampo.....	14
1.2 Azeite de oliva na gestação e lactação: Uma estratégia nutricional para programar o metabolismo e o comportamento materno.....	17
2. Justificativa	20
3. Objetivo Geral	21
3.1 Objetivos específicos.....	21
Parte II	22
4. Metodologia	23
4.1 Aspectos éticos.....	23
4.2 Desenho experimental.....	23
4.3 Dietas.....	25
4.4 Intervenção neonatal.....	25
4.5 Tarefas comportamentais.....	26
4.5.1 Observação do cuidado materno.....	26
4.5.2 Inconsistência comportamental.....	27
4.5.3 Campo Aberto.....	27
4.5.4 Reconhecimento do local do objeto.....	28
4.5.5 Nado Forçado.....	28
4.6 Ciclo estral.....	29
4.7 Eutanásia dos animais.....	29
4.8 Preparo das amostras.....	29
4.9 Avaliação do imunocontéudo de proteínas por Western blotting.....	30
4.10 Determinação dos níveis de BDNF.....	30
4.11 Análises estatísticas.....	31
Parte III	32
5. Resultados	33
5.1 Consumo alimentar e peso corporal.....	33
5.2 Cuidado Materno.....	34
5.3 Inconsistência comportamental.....	37
5.4 Comportamento ansioso e memória.....	38

5.5 Comportamento depressivo.....	41
5.6 Marcadores bioquímicos.....	43
6. Discussão.....	45
7. Conclusão.....	51
8. Perspectivas.....	52
9. Referências.....	53
ANEXO A - Carta de aprovação do comitê de ética	64
ANEXO B - Tabela com a análise do azeite de oliva utilizado.....	65

Parte I

Resumo

O período gestacional e lactacional é extremamente sensível a fatores ambientais, como a nutrição materna e o estresse. Esses fatores podem influenciar na saúde da mãe e da prole. O estresse da separação materna induz a ruptura do vínculo mãe e filhote, desencadeando comportamento depressivo e ansioso nas mães, intervindo no cuidado materno e consequentemente no desenvolvimento da prole. Diante disso, o consumo de dietas ricas em antioxidantes e ácidos graxos monoinsaturados, como o azeite de oliva, têm demonstrado efeitos benéficos sobre distúrbios neurológicos e alterações metabólicas, sendo associado à reduções no risco de desenvolvimento de depressão pós-parto, além de reduzir o efeito do estresse sobre as células e melhorar a função cognitiva. Assim, o objetivo foi avaliar os efeitos do consumo de azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o cuidado materno, o comportamento emocional e os níveis de marcadores bioquímicos no hipocampo dorsal de mães que sofreram separação da prole. Ratas Wistar no primeiro dia de gestação foram alocadas em 2 grupos: ração padrão + óleo de soja (OS) e ração padrão + azeite de oliva (AO). Após o nascimento, os grupos foram subdivididos em: Intacto OS; Intacto AO; Separado OS e Separado AO. A separação materna (SM) ocorreu do dia pós-natal 1 ao 10, por 3 horas/dia. Após o desmame dos filhotes, as mães passaram por testes comportamentais de campo aberto, memória de curto-prazo no teste de novo local do objeto e nado forçado. Também foram avaliadas proteínas do metabolismo energético envolvidas com a plasticidade, o hormônio ocitocina e seu receptor e os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo dorsal. A separação materna aumentou o cuidado materno de forma fragmentada, induziu comportamentos dos tipos ansioso e depressivo e ainda prejudicou a memória de curto-prazo das mães. Além disso, foi capaz de diminuir o imunocontéudo das proteínas: sirtuína-1 (SIRT-1), ocitocina e do receptor de ocitocina no hipocampo dorsal das mães. As ratas que consumiram dietas com azeite de oliva aumentaram a frequência do comportamento materno ativo de forma consistente e aumentaram os níveis de BDNF no hipocampo. O azeite de oliva também conseguiu prevenir os comportamentos de amamentação com o dorso arqueado, do tipo ansioso e o prejuízo da memória nas mães que foram submetidas à SM. Os resultados demonstram que a nutrição e a separação materna influenciam no comportamento emocional, na memória e em marcadores bioquímicos. E esses achados mostram que o consumo de azeite de oliva pode ser utilizado como uma estratégia para atenuar ou até prevenir os prejuízos ocasionados pela separação materna no período pós-parto.

Palavras-chave: azeite de oliva; separação materna; cuidado materno; hipocampo dorsal.

Abstract

The gestational and lactational period is extremely sensitive to environmental factors such as maternal nutrition and stress. These factors can influence the health of the mother and offspring. The stress of maternal separation induces the rupture of the mother-infant bond, triggering depressive and anxious behavior in mothers, intervening in maternal care and, consequently, in the development of the offspring. Therefore, the consumption of diets rich in antioxidants and monounsaturated fatty acids, such as olive oil, have shown beneficial effects on neurological disorders and metabolic changes, being associated with reductions in the risk of developing postpartum depression, in addition to reducing the effect of stress on cells and improve cognitive function. Thus, the objective was to evaluate the effects of olive oil consumption during pregnancy and lactation on maternal care, emotional behavior and levels of biochemical markers in the dorsal hippocampus of mothers who suffered separation from their offspring. Wistar rats on the first day of gestation were allocated into 2 groups: standard diet + soybean oil (SO) and standard diet + olive oil (OO). After birth, the groups were subdivided into: Intact SO; Intact OO; Separate SO and Separate OO. Maternal separation (SM) occurred from postnatal day 1 to 10, for 3 hours/day. After the pups were weaned, the mothers underwent open-field behavioral tests, new object location in short-term memory tests, and forced swimming. Proteins of energy metabolism involved with plasticity, the hormone oxytocin and its receptor, and levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the dorsal hippocampus were also evaluated. Maternal separation increased maternal care in a fragmented way, induced anxious and depressive behavior and impaired the mothers' short-term memory. Furthermore, it was able to decrease the immunocontent of proteins: sirtuin-1, oxytocin and the oxytocin receptor in the dorsal hippocampus of the mothers. Female rats consuming an olive oil diet consistently increased the frequency of active maternal behavior and increased BDNF levels in the hippocampus. Olive oil was able to prevent the behavior of nurturing the offspring with the arched back, the anxious type and memory impairment in mothers who underwent MS. The results showed that maternal nutrition and separation influence emotional behavior, memory and biochemical markers. These findings showed that the consumption of olive oil can be used as a strategy to alleviate or even prevent the damage caused by maternal separation in the postpartum period.

Keywords: olive oil; maternal separation; maternal care; dorsal hippocampus.

Lista de abreviaturas e siglas

DPN: Dia pós-natal

HPA: Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

SM: Separação materna

AO: Azeite de oliva

OS: Óleo de soja

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

SIRT-1: Sirtuína-1

IL1 β : Interleucina-1 β

IL10: Interleucina-10

1. Introdução

1.1 Período gestacional e pós-parto

1.1.1 Alterações fisiológicas e hormonais durante o período gestacional e após-parto

Em mamíferos, durante o período gestacional e o pós-parto, uma série de adaptações fisiológicas, comportamentais e neuroendócrinas estão ocorrendo no organismo materno. No cérebro, a proliferação e sobrevivência de células do hipocampo permanecem estáveis durante a gravidez em ratas mães, porém, alterações começam a ficar evidentes a partir do pós-parto, onde há uma supressão da neurogênese e alterações na plasticidade neural via remodelação dendrítica de neurônios piramidais do hipocampo (Slattery e Hillerer, 2016; Medina; Workman, 2018; Eid et al., 2019). O estudo de Hillerer e colaboradores (2014) mostrou que nas primeiras semanas após o parto as ratas apresentaram uma diminuição do peso cerebral e no volume do hipocampo. Outros estudos associaram essas alterações no hipocampo com uma redução transitória nas habilidades cognitivas das ratas durante o pós-parto. Essas alterações foram confirmadas pois ratas grávidas e no pós-parto submetidas à tarefa do labirinto aquático de Morris, mostraram um comprometimento na memória espacial (Darnaudéry et al., 2007). No período após o parto, as ratas mães não necessitam de comportamentos dependentes do hipocampo, uma vez que elas necessitam apenas permanecer próximas do ninho para nutrir e aquecer os seus filhotes.

Com relação às alterações neuroendócrinas, é importante enfatizar que flutuações dos níveis séricos de hormônios peptídicos hipofisários (como a prolactina e ocitocina) e hormônios esteróides sexuais (estrogênios e progesterona) irão programar o fenótipo materno para a manutenção fisiológica e comportamental durante e após a gravidez (Rosenblatt; Mayer; Giordano, 1988; Russell; Douglas; Ingram, 2001; Brunton e Russell, 2008; Mulligan-Saville e Graham, 2016). Estas alterações neuroendócrinas também estão interligadas a mudanças diretas no encéfalo materno, visto que altos níveis séricos de estradiol e progesterona, como é observado, principalmente, na segunda metade da gestação, afetam a neuroplasticidade no hipocampo, aumentando a densidade de espinhos dendríticos (Kinsley et al., 2006; Sheppard; Choleris; Galea, 2019).

Durante a gestação e a lactação ocorrem alterações no eixo HPA. O ritmo circadiano, o hormônio adrenocorticotrófico (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; Russel; Douglas, 2008). Os estímulos da amamentação pelos filhotes também alteram a reatividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, 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). Interessante também relatar que, durante o período perinatal, as ratas são hiporresponsivas ao estresse (Johnstone et al., 2000; Neumann, 2001). O eixo HPA, responsável por estimular a liberação de corticosterona (hormônio do estresse), durante a gestação e lactação, responde de forma atenuada ao estresse, protegendo a mãe e a prole dos efeitos adversos. No entanto, se a exposição a estressores for de forma crônica é possível que durante o período perinatal os animais possam ficar mais vulneráveis aos efeitos adversos (Brummelte e Galea, 2010). Assim, muitas são as alterações neuroendócrinas e comportamentais que as ratas mães sofrem durante o período gestacional e no pós-parto. Essas alterações podem ser influenciadas diretamente pela exposição a estressores crônicos, que podem refletir em mudanças comportamentais e fisiológicas nas mães e isso comprometer o cuidado com seus filhotes.

1.1.2 Cuidado materno no pós-parto

Inúmeras espécies desempenham o cuidado parental, sobretudo o cuidado materno (Rosenblatt & Snowdon, 1996). No entanto, somente em mamíferos as mães exercem uma complexidade comportamental que influencia diretamente no neurodesenvolvimento e no estabelecimento das relações sociais da prole (Francis e Meaney, 1999; Numan, 2016). As alterações hormonais associadas ao final da gestação e ao parto atuam no sistema nervoso central (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 após-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 (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 e 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 e Meaney, 1999; Champagne, 2001; Meaney, 2001; Champagne, 2003; Okabe, 2012; Murgatroyd e 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).

1.1.3 Intervenções ambientais no período gestacional e lactacional

A influência do ambiente, como exposição a estressores e a nutrição das mães, durante o período gestacional e lactacional, podem influenciar na liberação hormonal, na plasticidade, na neurogênese e no comportamento, prejudicando os cuidados exercidos com a prole. Assim,

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 e Nephew, 2013). As consequências comportamentais da ruptura deste vínculo 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 e 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 materno, 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.

Outra exposição ambiental que pode programar o metabolismo das mães é a nutrição durante a gestação. Essa programação metabólica pode desencadear diferentes desfechos na saúde das mães e no desenvolvimento dos filhotes. O período de gravidez e o pós-parto requer, para as mães, uma dieta variada e um aumento da ingestão alimentar, assim como mudanças no sistema digestório para facilitar a absorção de nutrientes com o intuito suprir as necessidades energéticas das altas demandas metabólicas que surgem durante essa fase, caracterizada, como já citado, pelas mais diferentes alterações na fisiologia do organismo materno. Um estudo recente em humanos observou que mulheres grávidas que consumiam frequentemente leite em suas dietas e com uma menor frequência consumiam vegetais, tiveram um aumento na probabilidade de ter um parto prematuro (Lu et al., 2018), em contrapartida, a alta aderência de uma dieta rica em vegetais, frutas, legumes, nozes, produtos lácteos, peixes e azeite de oliva foi associada a diminuição de sintomas de depressão pós-parto (Chatzi et al., 2011).

Outro estudo, agora em ratos, demonstrou que uma dieta rica em lipídios atenuou a ansiedade e o comportamento depressivo no pós-parto em mães que passaram por separação de sua ninhada durante a lactação (Maniam e Morris, 2010), mostrando, dessa forma, que modificações nos componentes da dieta materna podem trazer efeitos benéficos para as mães. Como exposto acima, é importante considerar que o período gestacional e o pós-parto em roedores é extremamente vulnerável à intervenções ambientais, podendo desencadear diferentes desfechos na saúde das mães e isso refletir diretamente no desenvolvimento da prole.

1.1.4 Estresse pós-natal e as consequências sobre o comportamento e o hipocampo

Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram que o estresse no período pós-natal traz prejuízos cognitivos e emocionais que desencadeiam transtornos psiquiátricos nas mães e comprometem diretamente a relação entre mãe e filho. Estudos clínicos mostraram que o sofrimento psicológico materno é uma das complicações mais comuns durante a gestação e a amamentação, podendo acometer até 25% das mulheres no pós-parto (Kingston et al., 2015). Formas diferentes de sofrimento psicológico, que conseqüentemente podem aumentar o nível

de estresse nessas mães, foram associados a um maior risco de sintomatologia depressiva e ansiosa no primeiro ano pós-parto (Adynski et al., 2019), podendo perdurar por um longo período na vida dessas mulheres (Horwitz et al., 2009). Condições financeiras desfavoráveis e a presença de intercorrências no puerpério também foram associadas ao aumento nos índices de ansiedade materna (Faisal-Cury e Menezes, 2007).

O comportamento depressivo no período pós-parto também pode ser determinante para a baixa qualidade do cuidado materno. E diante disso, as estimativas nacionais chamam atenção, pois apontam que 26,3% das mulheres brasileiras apresentam sintomas de depressão pós-parto (Thema-Filha et al., 2016), índice que aumentou para, aproximadamente, 38,8% durante o estresse gerado pela pandemia de SARS-CoV-2, sendo 14,3% dessas mulheres com ideação suicida (dados retirados de uma pesquisa com 184 mulheres realizada por Galleta e colaboradores (2022)). E ainda, de acordo com os dados publicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) 5,4% dos brasileiros apresentam quadros de depressão e 9,3% de ansiedade, sendo a maior taxa do mundo. A alta prevalência de transtornos de ordem psiquiátrica pode ser relacionada com intercorrências na díade mãe-filho geradas por inúmeros estressores ambientais que influenciam o bem-estar materno e prejudicam o cuidado desempenhado por essas mães, afetando até a próxima geração.

Em estudos pré-clínicos, um potente modelo de estresse é a separação materna. O protocolo ocorre durante os primeiros dias de vida da prole, e os filhotes são retirados do ninho e mantidos em uma incubadora aquecida a 32°C por um determinado tempo. A separação materna por longos períodos tem sido descrita como um modelo de ruptura do vínculo entre mãe e filho e indução do comportamento depressivo nas mães (Cryan et al., 2002; Eklund et al., 2009; Sung et al., 2010; von Poser Toigo et al., 2012). Alguns estudos mostraram que as ratas mães que passaram por seguidas e diárias separações de seus filhotes apresentaram um maior comportamento do tipo ansioso na tarefa de labirinto em cruz elevado, um teste comportamental bem conhecido e frequentemente utilizado como um instrumento de medição confiável do comportamento semelhante à ansiedade, além de um prejuízo na memória de curta e longa duração (Aguggia et al., 2013; Carobrez e Bertoglio, 2005). Acrescentando a esses achados, o estudo de Graham, (2018) mostrou que o estresse no período pós-parto pode gerar consequências duradouras nos sistemas neurais e comportamentais relacionados com a aprendizagem e memória de medo em ratas mães. Quando os protocolos de separação materna diária de curta e longa duração são comparados, os resultados mostram que as mães separadas da prole por longos períodos apresentaram maior comportamento do tipo ansioso e

comportamento semelhante à depressão, além de maior anedonia (incapacidade de sentir prazer em atividades normalmente agradáveis) em um teste de preferência por sacarose (Maniam e Morris, 2010), sugerindo que o tempo de separação também pode exercer efeitos sobre o comportamento das mães e refletir na prole via cuidado materno (Champagne et al., et al., 2003; Couto-Pereira et al., 2016).

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). Além disso, 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). A privação dos filhotes durante horas também induziu aumento na concentração plasmática de corticosterona (Maniam e Morris, 2010).

O hipocampo é dividido em duas partes: porção dorsal e porção ventral. A maioria dos estudos defende que o hipocampo dorsal está implicado na memória e na navegação espacial e que a região ventral medeia comportamentos relacionados à emoção e estresse. No entanto, essa divisão clássica vem sendo questionada (Strange et al., 2014). Estudos têm demonstrado que o hipocampo dorsal é mais vulnerável aos efeitos do estresse, como os ocasionados por separação materna (Ruiz et al., 2018; Criado-Marrero et al., 2019) e estresse crônico leve (Abe-Higuchi et al., 2016; Khan et al., 2019a). Essa estrutura cerebral, localizada no lobo temporal, está envolvida com aprendizagem, formação e consolidação de memórias, além de ser relacionada com a resposta ao estresse também parece ser afetada e estar sob forte influência de adversidades ambientais durante o período do puerpério (Bartsch e Wulff, 2015). Também foi visto que ratas mães submetidas a repetidas exposições diárias a eventos estressantes no período pós-natal apresentaram um acréscimo relativo no peso cerebral e no volume do hipocampo, coincidindo com o aumento do número de células em proliferação nessa mesma estrutura horas após a exposição ao estressor, revertendo a diminuição da neurogênese que ocorre no hipocampo de ratas lactantes (Hillner et al., 2014; Slattery e Hillner, 2016). Estudos também mostraram efeitos do estresse durante a gestação e lactação sobre características morfológicas (remodelação dendrítica e sináptica) de neurônios em todo cérebro materno, incluindo, além do hipocampo, estruturas como o córtex pré-frontal e núcleo accumbens, todas envolvidas com cognição, aprendizagem e memória (Slattery e Hillner, 2016). Esses resultados sugerem que os protocolos de separação materna por longos períodos

alteram parâmetros neuroquímicos, e essas alterações podem comprometer a qualidade do cuidado materno, a emocionalidade e a memória das mães.

1.2 Azeite de oliva na gestação e lactação: Uma estratégia nutricional para programar o metabolismo e o comportamento materno

A nutrição materna de qualidade é extremamente importante para influenciar a saúde da mãe e promover o desenvolvimento adequado da prole. Nesse sentido, dietas que contenham componentes que atuam como fatores neuroprotetores podem servir como estratégias eficazes de tratamento ou na profilaxia para distúrbios causados pelo estresse durante o período pós-parto. Um alimento que está sendo utilizado com intuito de melhorar a cognição e a memória, assim como, melhorar o perfil lipídico é o azeite de oliva. 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). O azeite de oliva é a principal fonte de gordura primária nas dietas tradicionais do Mediterrâneo, e ao mesmo tempo, vem se destacando e recebendo atenção de estudos clínicos e pré-clínicos devido aos seus efeitos benéficos sobre distúrbios neurológicos e suas propriedades antioxidantes, possivelmente relacionados à sua composição química rica em fenóis (compostos orgânicos que apresentam um grupo hidroxila ligado a um carbono insaturado de um hidrocarboneto aromático) e ácidos graxos monoinsaturados (Angeloni et al., 2017; Tripoli et al., 2005).

A árvore oliveira (*Olea europaea*) sintetiza mais de 30 compostos fenólicos que se encontram principalmente nas folhas e nos próprios frutos, servindo de defesa contra patógenos e conferindo sabor desagradável e desestimulante para a predação de insetos. Estes polifenóis encontram-se nas frações lipídicas e aquosas do azeite (Casamenti e Stefani, 2017). Produzido a partir de métodos de prensagem do fruto, o azeite de oliva virgem é composto por uma fração de glicerol (90-99% do fruto), representado por ácidos graxos monoinsaturados (MUFAS). Dentre eles, temos o ácido oleico (C18:1), que representa de 70% a 80% dos MUFAS presentes no azeite de oliva. 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 ao SNC (Cheng et al., 2008; Medina et al., 2010; Perveen et al., 2013; Paes et al., 2015; Cândido et al., 2017; Chen et al., 2018; Magtanong et al., 2019; Acosta-Montañó et al., 2019; Ravaut et al., 2020). Já a fração não glicerol, compondo 0,4% a 5% da azeitona, é onde

se encontram os compostos fenólicos (Tripoli et al., 2005). Os polifenóis presentes no azeite de oliva também beneficiam a saúde, atuando como antioxidantes e cardioprotetores (Visioli et al., 2002). O uso dessa gordura pode promover modificações na estrutura da membrana celular e assim trazer benefícios à saúde.

Um estudo mostra que o consumo de dietas ricas em ácidos graxos monoinsaturados pode estar relacionado com um aumento dos níveis plasmáticos e encefálicos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Pase et al., 2015). O BDNF, por meio de complexas cascatas de sinalização, está envolvido com a proliferação neuronal e a plasticidade sináptica dependente de atividade, como é o caso da potenciação de longa duração (LTP), que é entendido como o aumento da eficácia sináptica excitatória. Essas alterações sinápticas estão envolvidas com a aprendizagem e a retenção 10 de memórias (Leal; Bramham; Duarte, 2017). Além disso, baixos níveis de BDNF estão associados a doenças neurodegenerativas e depressão (Fehér et al., 2009). Logo, o consumo de azeite de oliva devido a sua composição química rica em MUFAS, que podem aumentar os níveis de BDNF, surge como uma alternativa interessante de alimentos com propriedades neuroprotetoras para tratar eventuais danos causados pelo estresse no encéfalo de mamíferos.

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. Alguns estudos demonstram que o consumo de azeite de oliva melhorou a função cognitiva, e isto pode ser atribuído às alterações em biomoléculas envolvidas no metabolismo energético, nos marcadores de estresse oxidativo e nos fatores neurotróficos. 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). Além desses efeitos observados, um estudo comparou as propriedades nutricionais e aromáticas do leite 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 melhorou as propriedades nutricionais do leite (Castellani et al., 2017). Diante do que foi exposto acima, este estudo propõe investigar se o consumo de uma dieta com azeite de oliva durante o período gestacional e lactacional poderia alterar o cuidado materno, a emocionalidade e os biomarcadores hipocâmpais de mães que foram separadas dos seus filhos.

2. 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, este 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, como o azeite de oliva, na alimentação de mães durante o período gestacional e lactacional, na tentativa de diminuir a incidência e a gravidade de doenças neuropsiquiátricas.

3. Objetivo Geral

Investigar se o consumo de uma dieta com azeite de oliva durante o período gestacional e lactacional poderia influenciar na qualidade do cuidado materno, no comportamento e nos biomarcadores do hipocampo dorsal de mães que sofreram separação da prole.

3.1 Objetivos específicos

- Verificar o consumo das dietas e o ganho de peso durante o período gestacional e lactacional;
- Avaliar o cuidado materno das mães;
- Avaliar a atividade motora, o comportamento do tipo ansioso e depressivo das mães;
- Avaliar a memória de curta-prazo das mães;
- Verificar o imunoc conteúdo de proteínas relacionadas com a plasticidade e com o metabolismo energético no hipocampo dorsal das mães;
- Verificar o imunoc conteúdo de ocitocina e receptor de ocitocina no hipocampo dorsal das mães;
- Avaliar os níveis de BDNF no hipocampo dorsal das mães;
- Verificar o ciclo estral.

Parte II

4. Metodologia

4.1 Aspectos éticos

Todos os tratamentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa institucional (CEUA-UFRGS #37804) e seguiram a Lei Brasileira de Uso de Animais (Lei Federal 11.794/2008) e as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Mamíferos em Neurociências e Pesquisas Comportamentais (Conselho Nacional de Pesquisa, 2003).

4.2 Desenho experimental

Ratas Wistar primíparas foram adquiridas no primeiro dia gestacional do Centro de Reprodução e Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da UFRGS - Porto Alegre/Brasil, e alocadas primeiramente em dois grupos experimentais: (1) mães alimentadas com ração padrão do biotério + óleo de soja (OS) e (2) mães alimentadas com ração padrão do biotério + azeite de oliva (AO). O consumo alimentar foi avaliado a cada dois dias e uma vez por semana os animais foram pesados para determinação do ganho de peso corporal durante o período gestacional e lactacional. 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 (DPN 21). As caixas moradia eram confeccionadas em Plexiglas (65 x 25 x 15 cm), as quais foram mantidas em ambiente controlado com ciclos claro-escuro de 12h/12h, à temperatura constante de 22°C +/- 1°C, com água *ad libitum* e dietas oferecidas de acordo com o consumo. Nos últimos dias de gestação as fêmeas foram avaliadas diariamente para a determinação da data do nascimento, que ocorre aproximadamente no dia gestacional 21. O dia de nascimento dos filhotes foi considerado como dia pós-natal zero (DPN 0). Após o nascimento dos filhotes, as mães de ambos os grupos iniciais (1 e 2) foram subdivididas para o protocolo de separação materna (SM), totalizando quatro grupos experimentais: (1) mães intactas alimentadas com ração padrão + óleo de soja (Intacta OS), (2) mães intactas alimentadas com ração padrão + azeite de oliva (Intacta AO), (3) mães separadas alimentadas com ração padrão + óleo de soja (Separada OS) e (4) mães separadas alimentadas com ração padrão + azeite de oliva (Separada AO) (Tabela 1). A SM ocorreu do dia pós-natal 1 ao 10, simultaneamente com a avaliação do cuidado materno. Os filhotes foram desmamados no dia pós-natal 21, e então no DPN 25 tiveram início os testes comportamentais para avaliação da emocionalidade e cognição materna, que seguiram até, aproximadamente, o dia pós-natal 38. Ao término dos testes, as ratas foram mortas por

decapitação e o hipocampo dorsal foi dissecado para avaliações de parâmetros bioquímicos. O desenho experimental está representado na figura 1.

Tabela 1. Grupos experimentais

ANTES DO NASCIMENTO	Ratas alimentadas com ração padrão do biotério acrescida de 4% de óleo de soja
	Ratas alimentadas com ração padrão do biotério acrescida de 4% de óleo de soja
APÓS O NASCIMENTO	Mães intactas alimentadas com ração padrão do biotério acrescida de 4% de óleo de soja (Intacto OS)
	Mães intactas alimentadas com ração padrão do biotério acrescida de 4% de azeite de oliva (Intacto AO)
	Mães separadas alimentadas com ração padrão do biotério acrescida de 4% de óleo de soja (Separado OS)
	Mães separadas alimentadas com ração padrão do biotério acrescida de 4% de azeite de oliva (Separado AO)

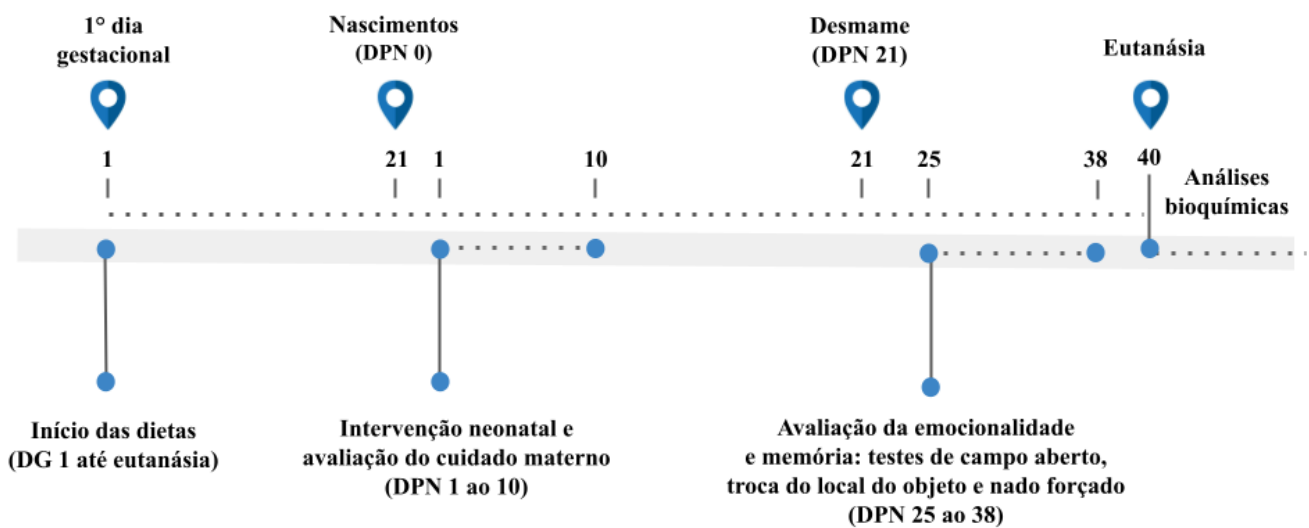


Figura 1: Linha do tempo do desenho experimental.

4.3 Protocolo das dietas

As dietas foram oferecidas do primeiro dia gestacional até o dia da eutanásia. Com relação à composição, tanto a dieta com óleo de soja quanto a dieta com azeite de oliva foram preparadas utilizando o farelo da ração padrão oferecida aos animais pelo biotério (Nuvilab®) acrescidas de 4% de óleo de soja ou 4% de azeite de oliva (Qosa et al., 2015), de acordo com os grupos experimentais. As dietas oferecidas continham o mesmo percentual de calorias, como mostrado na tabela 2. 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 mEqO₂/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).

Tabela 2. Composição nutricional de 100g de dieta oferecida às ratas

Quilocalorias (Kcal)	Gordura (g)	Carboidratos (g)	Proteínas (g)
325,2	7,8	42,5	21,1

4.4 Intervenção neonatal

O dia de nascimento dos filhotes foi considerado como dia pós-natal 0 (DPN 0) e as ninhadas foram padronizadas em 8 filhotes de ambos os sexos por mãe. As mães com suas respectivas ninhadas foram divididas em intactas (sem intervenção) e separadas (separação materna), mantendo as dietas oferecidas durante o período gestacional. O protocolo de separação materna (SM) seguiu durante os 10 primeiros dias de vida da prole (DPN 1 até DPN 10), 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 32°C durante três horas por dia. A SM teve início imediatamente após o término da sessão de observação do cuidado materno das 13 horas. Cada ninhada teve o seu próprio recipiente dentro da incubadora e foi manipulada sempre com a mesma luva. As mães permaneceram nas caixas moradia na mesma sala da incubadora para permitir a troca de

vocalizações com os filhotes. A maravalha da caixa moradia foi trocada por maravalha limpa pela pesquisadora responsável, sem perturbar a zona do ninho. Os grupos intactos foram preservados de manipulações durante todo o período de amamentação e, assim como os grupos da separação materna, foram manejados apenas pela experimentadora para a troca da maravalha e reposição das dietas e água. Os filhotes foram desmamados aos 21 dias de vida (DPN 21) e utilizados em outros projetos do grupo de pesquisa.

4.5 Tarefas comportamentais

4.5.1 Observação do cuidado materno

As observações do cuidado materno ocorreram simultaneamente com o protocolo de separação materna, conforme descrito por Champagne et al., 2003. A partir do primeiro dia pós-natal (DPN 1) até o décimo (DPN 10) 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 (10h00, 13h00 e 17h30) e duas durante o ciclo escuro (06h00 e 20h00), conforme representado na figura 2. Cada sessão teve uma 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 baixo, 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.

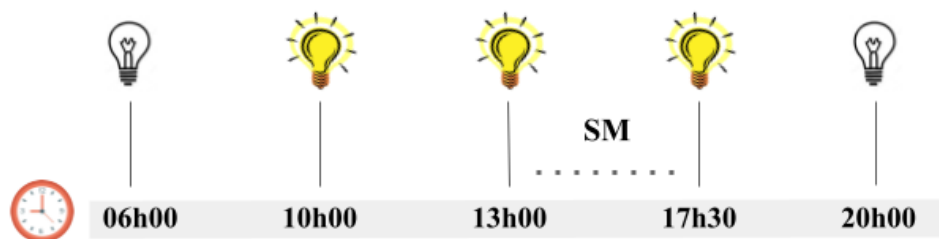


Figura 2: Horários das sessões de observação do cuidado materno

4.5.2 Inconsistência comportamental

A qualidade do cuidado materno foi analisada 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 foram consideradas devido ao risco de obter um resultado falso positivo, (2) comportamento de lambe os filhotes, (3) recolhida de filhotes, (4) construção do ninho, (5) mãe no ninho, (6) mãe fora do ninho, (7) mãe se alimentando ou bebendo água.

4.5.3 Campo Aberto

O teste do campo aberto consiste de uma arena contendo uma área central, aversiva para os ratos, e representa um modelo amplamente utilizado para a avaliação da atividade motora e de comportamentos relacionados à ansiedade (Prut e Belzung, 2003). O aparato é de madeira com assoalho preto (50 x 50 cm, altura 50 cm). Com o auxílio do programa de avaliação de imagens ANY-MAZE[®], a atividade locomotora, o tempo no centro e o tempo na periferia do aparato foram avaliadas durante 10 minutos, após o animal ser colocado no centro da arena. A intensidade luminosa no centro do campo aberto foi de 50 lux.

4.5.4 Reconhecimento do local do objeto

Com protocolo adaptado de Barker et al., (2007) a tarefa foi realizada em dois dias, sendo o primeiro dia para habituação ao aparato e o segundo dia para exploração dos objetos. No dia de habituação cada rata permaneceu no aparato (o mesmo utilizado no teste de campo aberto) durante 10 minutos, a fim de que pudesse explorá-lo livremente. No segundo dia ocorreram duas exposições dos animais aos objetos: a sessão de treino e a sessão de teste. Na sessão de treino dois objetos iguais foram fixados nas arenas, com a mesma distância entre eles e as paredes laterais, onde os animais puderam explorar durante 5 minutos. Foi contabilizado como tempo de exploração toda vez que a rata cheirou, tocou ou aproximou-se a menos de 2 cm do objeto. A segunda exposição ocorreu 1 hora após a sessão de treino, quando houve a troca de lugar de um dos objetos anteriormente fixados, ou seja, o objeto A permaneceu na mesma posição enquanto o objeto B foi realocado para um novo lugar dentro da arena. Os animais foram colocados novamente nas arenas durante 5 minutos, onde foi observado o tempo de exploração dedicado a cada objeto. Estima-se que os ratos explorem igualmente os objetos durante as sessões de treino e, em caso de aprendizagem, durante a sessão de teste devem explorar mais o objeto realocado. O tempo total de exploração de ambos locais dos objetos foi calculado. Os resultados foram expressos como um índice de discriminação (%), definido como o tempo gasto explorando o novo local do objeto/tempo total de exploração de ambos os locais do objeto x 100. A preferência por um dos locais do objeto foi previamente descartada (dados não mostrados).

4.5.5 Nado Forçado

A tarefa foi realizada em duas etapas. Na primeira sessão cada animal permaneceu durante 15 minutos em um cilindro com água a 25°C. A segunda sessão ocorreu 24 horas após a primeira, e consistiu no mesmo procedimento, mas com apenas 5 minutos de duração. Durante a tarefa os animais são obrigados a nadar para tentar fugir, pois não há área de escape. Ao final de cada sessão, as ratas foram secadas com toalhas e recolocadas nas caixas moradia. Os parâmetros avaliados foram: tempo de escalada (período em que o animal tenta, literalmente, escalar as paredes do cilindro), tempo de nado (período em que o animal continua com comportamento ativo, buscando saídas na parte inferior do cilindro e rodando a superfície), tempo de imobilidade (período em que o animal boia com o nariz na superfície da

água com movimentos sutis das patas e/ou cauda apenas para não afundar) e latência para o primeiro episódio de imobilidade. Na primeira sessão, esses parâmetros foram avaliados em três blocos de 5 minutos. A interpretação clássica é que a imobilidade está relacionada com a desistência e reflete um estado do tipo depressivo, já que a imobilidade é diminuída com a administração de fármacos antidepressivos (Porsolt et al., 1977; Porsolt et al., 1978; Hargreaves et al., 2005).

4.6 Avaliação do ciclo estral

Após cada teste comportamental houve a avaliação do ciclo estral para monitorar a distribuição das ratas nas diferentes fases. Para realizar o procedimento as ratas foram retiradas da caixa-moradia e gentilmente manuseadas. Então, com o auxílio de uma micropipeta, foi introduzido e imediatamente recuperado 50 µl 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, dividido em Diestro, Proestro, Estro e Metaestro (Freeman, 1994).

4.7 Eutanásia dos animais

Os animais foram rapidamente decapitados por guilhotina sem uso de anestesia, devido à realização dos experimentos de *Western Blotting* e Elisa. Justifica-se este tipo de procedimento pela necessidade de não interferir na liberação de neurotransmissores, evitando comprometer os resultados obtidos (Karmarkar; Bottun; Tischkau, 2010).

4.8 Preparo das amostras

O hipocampo dorsal das mães intactas e separadas foi dissecado seguindo coordenadas estereotáxicas conforme Paxinos e Watson, 1997. As amostras foram imediatamente congeladas a -80°C para posterior utilização nas análises bioquímicas de *Western Blotting* e Elisa.

4.9 Avaliação do imunoconteúdo de proteínas por *Western blotting*

A detecção de proteínas nas amostras de hipocampo dorsal foi realizada através de imunodeteção, conforme Arcego et al., 2016. O hipocampo foi homogeneizado em tampão de lise gelado (pH 7,9): KCl 10 mM, Hepes 10 mM, EDTA 0,6 mM, NP40 a 1% e NP40 a 1% e coquetel inibidor de protease a 1% e centrifugados a $1000 \times g$ por 10 min. Concentrações iguais de proteína (40 μg /faixa de proteína total, determinadas usando um kit comercial BCA Protein Assay [Thermo Scientific, EUA]) foram pipetadas nos géis de acrilamida NuPAGE® 4-12%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas (XCell SureLock® MiniCell, Invitrogen) para membranas de nitrocelulose (1 hora a 50 volts em tampão de transferência [Trizma 48 mM, glicina 39 mM, 20% de metanol e dodecil sulfato de sódio a 0,25%]). A membrana foi incubada por 2 horas em solução bloqueadora (leite em pó desnatado a 5% m/v). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite a 4 ° C em solução contendo os anticorpos primários específicos para as proteínas: sirtuína 1, interleucina-1 β , interleucina-10, sinaptofisina, PSD95, receptor de ocitocina, ocitocina e β -actina. As membranas foram lavadas com Tween-TBS (TTBS) e incubadas com anticorpos secundários específicos (anti-*mouse* ou anti-*rabbit*, escolhidos de acordo com o anticorpo primário). A imunorreatividade foi detectada pela emissão de luz por quimioluminescência (ECL - *enhanced luminol-based chemiluminescent substrate*, Pierce™ Thermo Scientific, Rockford, EUA), usando um detector de imagem digital (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences) e analisada usando o Image Studio Lite Software 5.2. Os resultados foram expressos como a razão entre a intensidade da proteína de interesse e a da anti- β -actina na mesma membrana.

4.10 Determinação dos níveis de BDNF por técnica de ELISA

Os níveis de BDNF no hipocampo dorsal foram medidos usando kit de ensaio ELISA (BDNF, Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos), de acordo com as especificações do fabricante. As fatias de hipocampo foram homogeneizadas por um tampão de lise pH 7,9 contendo: 137mM NaCl, 2,5 M KCl, 10 mM Hepes, 0,6 mM EDTA, 1% SDS, 10 % glicerol e 1% PIC e a dosagem total de proteínas foi medida usando o kit comercial BCA Protein Assay [Thermo Scientific, EUA]. Os dados foram expressos como pg BDNF/mg de proteína.

4.11 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados através da análise de variância (ANOVA) de duas vias utilizando separação materna e dieta como fatores. Para os resultados de consumo calórico, peso corporal e alguns parâmetros do cuidado materno foi utilizado ANOVA de medidas repetidas e a correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada quando necessário (considerando a violação da suposição de esfericidade, como mostra o teste de Mauchly). Todas as análises foram realizadas com o software SPSS 22.0 e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Parte III

5. Resultados

5.1 Azeite de oliva e separação materna não alteram o consumo calórico e o 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 foi avaliado 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. Durante o período gestacional 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 ao período gestacional, foi observado que o consumo aumentou ao longo das semanas de maneira semelhante entre os grupos ($F [2,100] = 37,133, p < 0,001$; Figura 3A: semanas 1 a 3), sem diferenças significativas de consumo entre as diferentes dietas ($p > 0,05$). Com relação ao peso corporal, durante o mesmo período, foi verificado que todos animais aumentaram de peso independente da dieta oferecida ($F [1,34,65,44] = 866,35 p < 0,001$; Figura 3B: semanas 1 a 3). Considerando os dias restantes da semana do 18º até o 21º dia de gestação, período caracterizado pelo isolamento das ratas prenhes que antecede o nascimento da prole, não houve diferenças estatísticas com relação ao consumo alimentar e o peso corporal ($p > 0,05$; dados não mostrados).

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, considerado como dia pós-natal 0 (DPN 0), 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 (DPN 1) e seguiram até o 10º dia pós-natal (DPN 10). O desmame dos filhotes ocorreu no DPN 21. Durante o período de lactação, o consumo alimentar aumentou ao longo do tempo de forma semelhante em todos os grupos ($F [1,65,82,39] = 780,63, p < 0,001$; Figura 3A:

semanas 4 a 6). Com relação ao peso corporal durante o mesmo período, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$; Figura 3B: semanas 4 a 6).

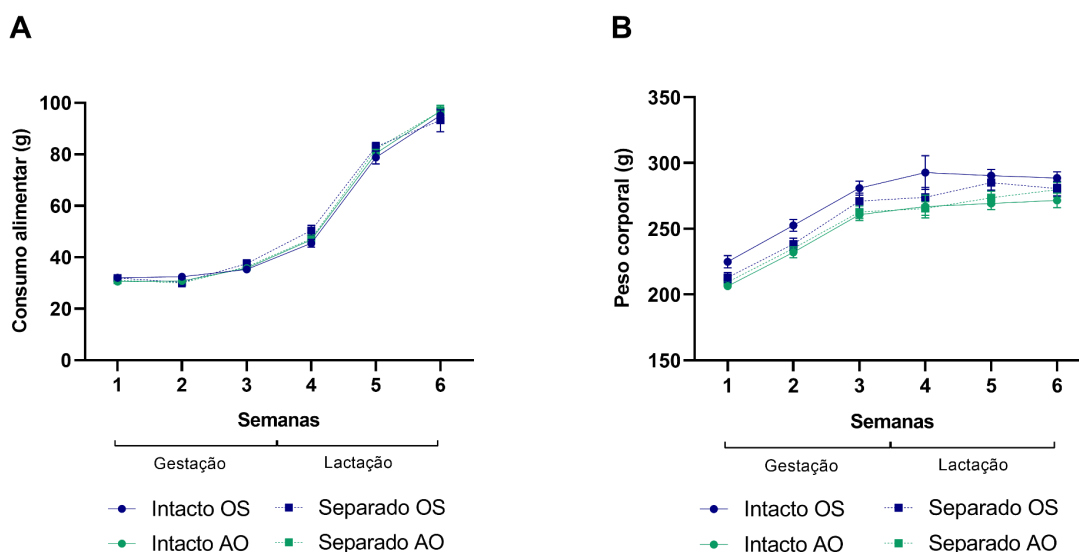


Figura 3: Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o consumo alimentar e o peso corporal de mães submetidas à separação materna. **A)** Consumo alimentar durante o período gestacional (semanas 1 a 3) e lactacional (semanas 4 a 6), $n= 13$ /grupo. A anova de medidas repetidas mostrou um aumento no consumo alimentar ao longo das semanas que correspondem ao período gestacional ($p<0,001$), assim como nas semanas que correspondem ao período lactacional ($p<0,001$), sem diferenças significativas entre os grupos. **B)** Peso corporal durante o período gestacional (semanas 1 a 3) e lactacional (semanas 4 a 6), $n= 13$ /grupo. Durante o período gestacional todos os animais aumentaram de peso igualmente, independente da dieta oferecida ($p<0,001$). Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal durante o período lactacional ($p>0,05$).

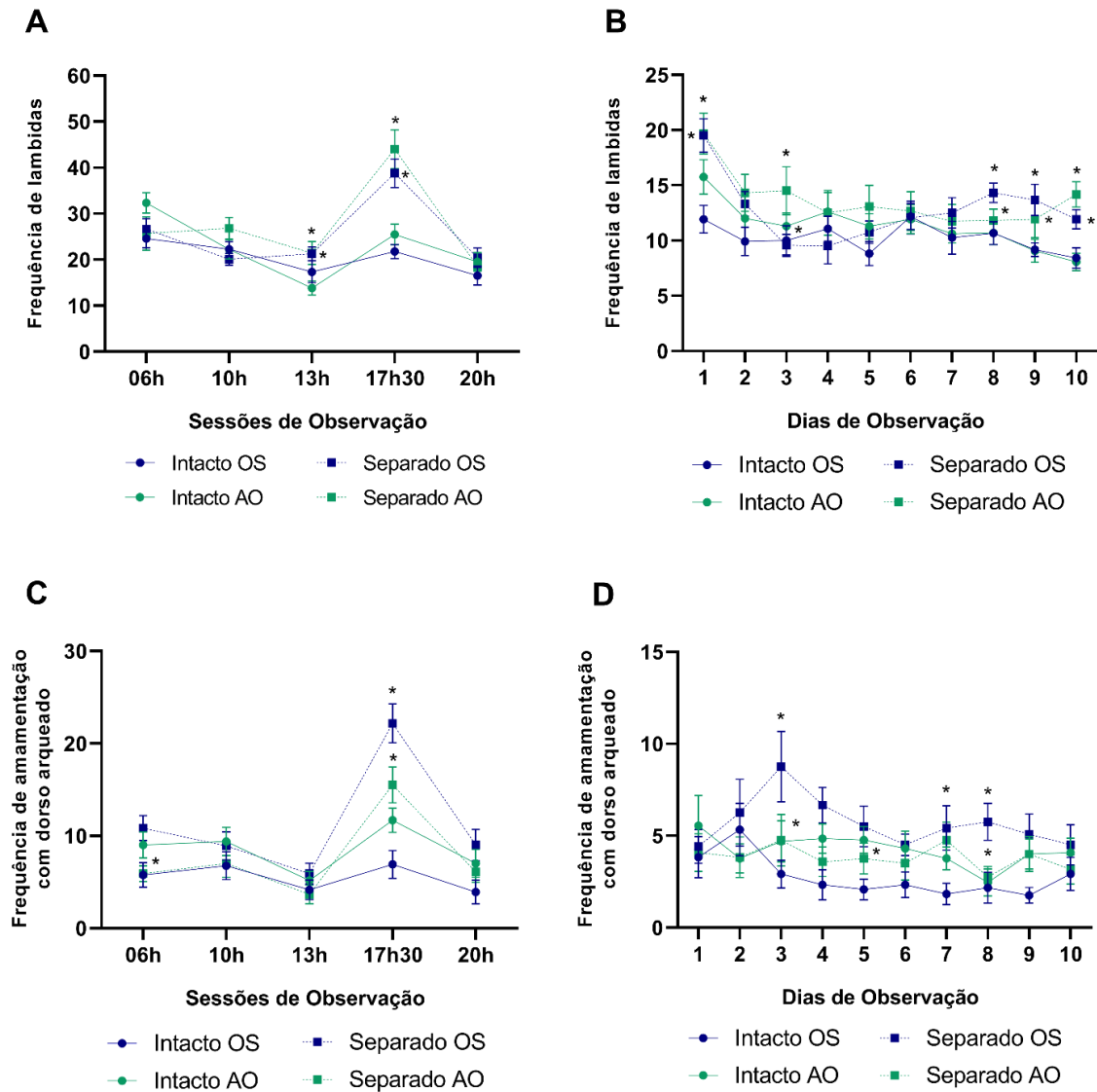
5.2 Azeite de oliva e separação materna aumentam o cuidado materno

A avaliação do cuidado materno ocorreu do DPN 1 até o DPN 10 e as ninhadas foram observadas 5 vezes ao dia, em horários pré-determinados e que corresponderam à três sessões no ciclo claro (10h00, 13h00 e 17h30) e duas sessões no ciclo escuro (06h00 e 20h00). As análises dos resultados mostram diferenças significativas com relação à separação materna e ao consumo de azeite de oliva na frequência de lambidas na prole e na frequência da amamentação com dorso arqueado. Com relação à frequência de lambidas, foi observado um aumento em determinadas horas de observação ($F [3,110] = 36,90$, $p<0,001$; Figura 4A). 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 ($F [3,110] = 15,744$,

$p < 0,01$; Figura 4A). Esse comportamento foi observado com maior frequência nas mães separadas em comparação com as mães intactas nas sessões das 13h ($F [1,45] = 8,053$, $p < 0,01$; Figura 4A) e 17h30 ($F [1,45] = 36,725$, $p < 0,001$; Figura 4A). Quando analisado o mesmo cuidado materno ao longo dos 10 dias, foi verificado um efeito do tempo ($F [6,638] = 8,308$, $p < 0,01$; Figura 4B) e uma interação entre tempo e separação materna ($F [6,638] = 2,660$, $p < 0,02$; 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 1 ($F [1,45] = 13,293$, $p < 0,01$; Figura 4B), 8 ($F [1,45] = 5,68$, $p < 0,05$; Figura 4B), dia 9 ($F [1,45] = 8,581$, $p < 0,01$; Figura 4B) e dia 10 ($F [1,45] = 25,811$, $p < 0,001$; Figura 4B). No terceiro dia de observação foi verificada um efeito da dieta com azeite de oliva ($F [1,45] = 4,376$, $p < 0,05$; Figura 4B), indicando um aumento na frequência de lambidas em comparação aos animais que receberam ração padrão com óleo de soja. 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 ($F [1,45] = 9,684$, $p < 0,05$; Figura 4E).

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 ($F [4,180] = 36,119$, $p < 0,001$; Figura 4C). Além disso, houve uma interação entre as sessões de observação e a separação materna ($F [4,180] = 11,710$, $p < 0,001$; Figura 4C), 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 ($F [1,45] = 30,25$, $p < 0,01$; Figura 4C) esse comportamento foi significativamente maior. Interessante que na sessão das 6 horas ($F [1,45] = 10,302$, $p < 0,01$; Figura 4C) e na sessão das 17h30 ($F [1,45] = 10,907$, $p < 0,01$; Figura 4C) houve uma interação entre separação materna e 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 os 10 dias, foi verificado um aumento na postura de amamentação arqueada nas mães que foram submetidas à SM, especificamente nos dias: 3 ($F [1,45] = 4,692$, $p < 0,05$; Figura 4D), 7 ($F [1,45] = 6,744$, $p < 0,05$; Figura 4D) e 8 ($F [1,45] = 5,806$, $p < 0,05$; Figura 4D). Adicionalmente, foi observada uma interação entre separação materna e dieta padrão com azeite de oliva no dia 3 ($F [1,45] = 4,510$, $p < 0,05$; Figura 4D), no dia 5 ($F [1,45] = 7,082$, $p < 0,05$; Figura 4D) e no dia 8 ($F [1,45] = 4,205$, $p < 0,05$; Figura 4D), indicando que as mães separadas submetidas a uma

dieta com azeite de oliva reduziram as frequências deste comportamento. Quando analisada a média de todos os dias observados, houve um aumento do cuidado materno induzido pela separação ($F [1,45] = 6,976$ $p < 0,01$; Figura 4F). Também houve uma interação entre separação materna e dieta padrão com azeite de oliva ($F [1,45] = 12,186$, $p < 0,01$; Figura 4F), indicando que as mães submetidas à separação materna e que consumiram dietas com azeite de oliva reduziram as frequências de amamentação com dorso arqueado.



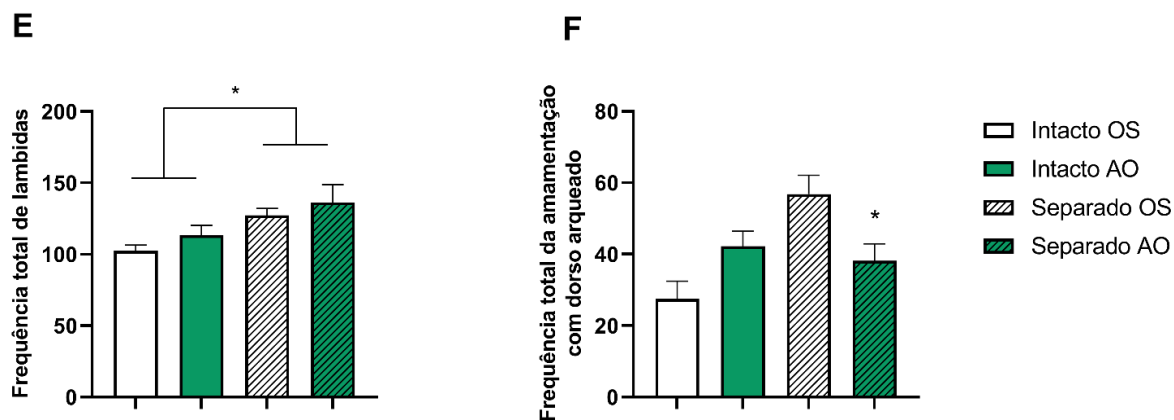


Figura 4: Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o cuidado materno de mães submetidas à separação materna. As observações do cuidado materno ocorreram nos horários das 06h00, 10h00, 13h00, 17h30 e 20h00, durante 10 dias consecutivos (DPN 1 ao 10). **A)** Frequência de lambidas durante as sessões de observação, n=12/grupo. A anova de medidas repetidas mostrou que houve um aumento da frequência de lambidas nas sessões das 13h00 e 17h30 nas mães que passaram por separação materna em comparação às mães intactas ($p < 0,001$). **B)** Frequência de lambidas ao longo dos 10 dias de observação do cuidado materno, n=12/grupo. Houve um aumento na frequência de lambidas da mãe na prole induzido pela SM nos dias 1,8,9 e 10 ($p < 0,05$). Os dados também mostram uma interação entre a frequência de lambidas e o consumo de azeite de oliva no dia 3 ($p < 0,05$). **C)** Frequência da amamentação com dorso arqueado durante as sessões de observação, n= 12/grupo. Ocorreu uma interação entre as sessões de observação e a separação materna, principalmente nas sessões das 06h e 17h30, onde as mães separadas aumentaram as frequências em relação aos seus respectivos controles ($p < 0,01$). **D)** Frequência de amamentação com dorso arqueado ao longo dos 10 dias de observação do cuidado materno, n=12/grupo. Houve um aumento nas frequências nos dias 3,7 e 8 induzido pela SM ($p < 0,05$), e em contrapartida as mães do grupo SAO reduziram as frequências de amamentação com dorso arqueado nos dias 3,5 e 8 ($p < 0,05$). **E)** Média total da frequência de lambidas, n=12/grupo. A anova de duas vias mostrou que a média total de lambidas na prole foi maior nos grupos separados do que nos grupos intactos, independente da dieta consumida ($p < 0,05$). **F)** Média total da frequência de amamentação com dorso arqueado, n= 12/grupo. Os dados mostram uma interação entre separação materna e dieta com azeite de oliva, onde as mães do grupo SAO reduziram significativamente as frequências da amamentação arqueada em comparação ao grupo SOS ($p < 0,01$).

5.3 Separação materna aumenta o escore de inconsistência comportamental

Com a finalidade de verificar a qualidade do cuidado materno, o escore de inconsistência comportamental foi avaliado conforme sugerido por Ivy et al., 2008 e adaptado por Couto-Pereira et al., 2016. De acordo com a análise, foi observado um aumento no escore

de inconsistência entre as sessões ($F [2,89,130,1] = 56,18, p < 0,001$; Figura 5A) e uma interação entre as horas de observação e a separação materna ($F [2,89,130,1] = 11,415, p < 0,001$; Figura 5A). Principalmente às 17h30 o aumento do escore de inconsistência foi maior nas mães separadas ($F [1,45 = 38,209, p < 0,001$; Figura 5A). Além disso, as mães submetidas à separação materna mostraram um aumento no escore total de inconsistência ($F [1,45] = 5,512, p < 0,05$; Figura 5B).

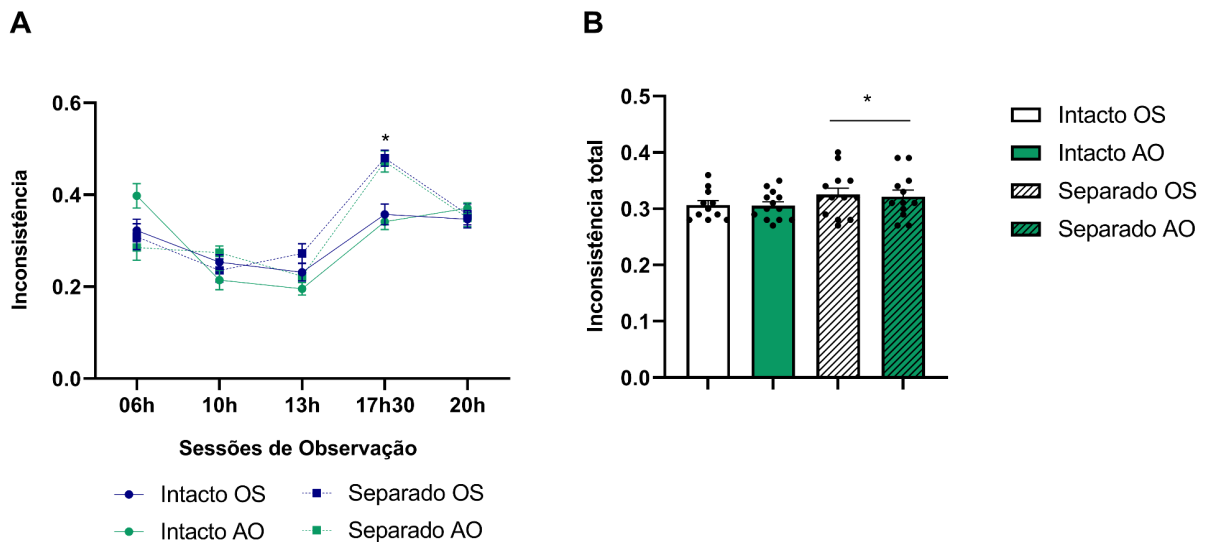


Figura 5: Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre a inconsistência comportamental de mães submetidas à separação materna. **A)** Inconsistência comportamental durante as sessões de observação, $n=12$ /grupo. A anova de medidas repetidas mostrou uma interação entre as horas de observação e separação materna. Na sessão das 17h30 a inconsistência foi significativamente maior nos grupos SOS e SAO ($p < 0,001$). **B)** Inconsistência comportamental total, $n=12$ /grupo. Houve um aumento no escore total de inconsistência comportamental nas mães que foram submetidas à separação, indicado por anova de duas vias ($p < 0,05$).

5.4 Azeite de oliva previne o comportamento ansioso e o prejuízo da memória nas mães que passaram pela separação materna

Na tarefa do campo aberto foi observado uma interação entre dieta e SM no tempo de permanência no centro ($F [1,40] = 4,758, p < 0,05$; Figura 6A) e no número de entradas ($F [1,40] = 4,100, p = 0,05$; Figura 6C), indicando que mães submetidas à separação e que consumiram azeite de oliva permanecem por mais tempo e aumentam o número de entradas no centro do

aparato. Com relação ao tempo na periferia (Figura 6B) e o número de cruzamentos no aparato (Figura 6D) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

O teste de reconhecimento do local do objeto avalia a memória de curta duração. Nesta tarefa comportamental, um dos dois objetos foi movido para um novo local. Baseado no cálculo do índice de discriminação foi possível observar uma interação entre dieta e SM ($F[1,37] = 5,370$, $p<0,05$, Figura 7A), indicando que as mães que consumiram azeite de oliva e foram submetidas à SM apresentaram um aumento no índice de discriminação. Esse resultado mostrou que o azeite de oliva preveniu o prejuízo da memória de curta-duração induzido pela SM.

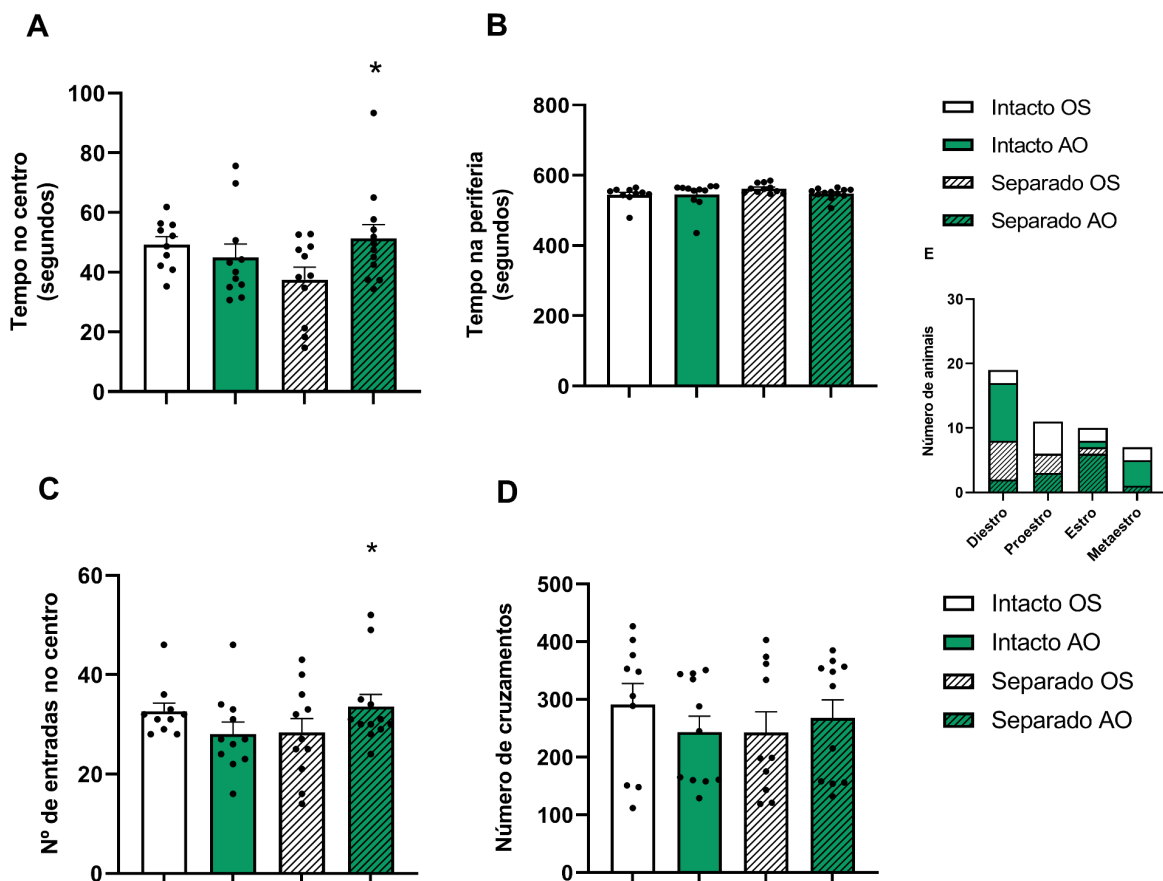


Figura 6: Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o comportamento do tipo ansioso em mães submetidas à separação materna. Os testes comportamentais tiveram início após o desmame dos filhotes, aproximadamente no DPN 25. **A)** Tempo de permanência dos animais no centro do aparato, $n= 10$ a 12 /grupo. A anova de duas vias mostrou uma interação entre SM e o consumo de azeite de oliva ($p<0,05$). **B)** Tempo de permanência na periferia do aparato, $n= 10$ a 12 /grupo. Não foram encontradas diferenças significativas no tempo de permanência na periferia entre os grupos ($p>0,05$). **C)** Número de entradas

no centro do aparato, n= 10 a 12/grupo. A anova de duas vias mostrou uma interação entre separação materna e dieta padrão com azeite de oliva ($p < 0,05$). **D)** Número de cruzamentos, n= 10 a 11/grupo. Não houve diferenças significativas no número de cruzamentos das linhas entre os animais dos diferentes grupos experimentais ($p > 0,05$). **E)** Monitoramento das fases do ciclo estral. Não foram constatadas anomalias na ciclagem das ratas que participaram do teste de campo aberto.

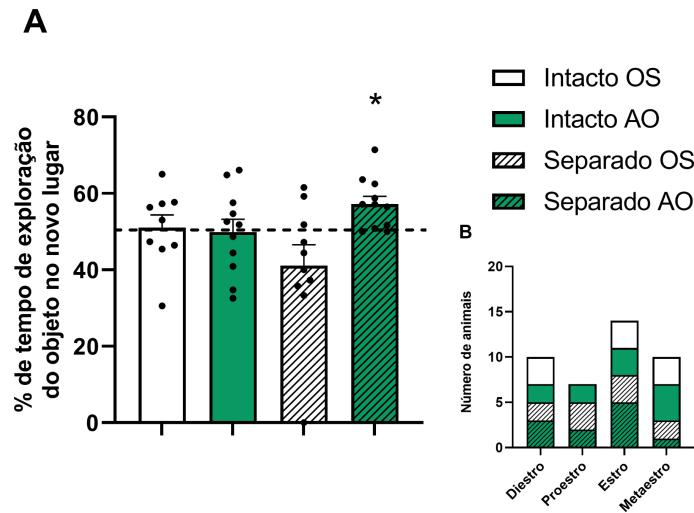


Figura 7: Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre a memória de curta-duração de mães submetidas à separação materna. Os testes comportamentais tiveram início após o desmame dos filhotes, aproximadamente no DPN 25. **A)** Reconhecimento do local novo do objeto, expresso em % do tempo de exploração do objeto no novo lugar, n= 9 a 11/grupo. A anova de duas vias mostrou que houve uma interação entre azeite de oliva e separação materna no índice de discriminação do lugar do objeto, indicando que mães separadas que consumiram dietas com azeite de oliva exploram por mais tempo o objeto realocado em comparação ao objeto que permaneceu no mesmo lugar na rodada teste ($p < 0,05$). **B)** Monitoramento das fases do ciclo estral. Não foram constatadas anomalias na ciclagem das ratas que participaram da tarefa.

5.5 Separação materna induz comportamento depressivo nas mães

Para analisar o comportamento do tipo depressivo foi avaliada a tarefa do nado forçado de Porsolt. Foi verificado que no primeiro bloco de 5 minutos do dia 1, a SM aumentou o tempo de imobilidade ($F [1,42] = 7,558, p < 0,01$; Figura 8A), induziu uma tendência em diminuir a latência para o primeiro episódio de imobilidade ($F [1,42] = 4,01, p = 0,059$; Figura 8B) e diminuiu o tempo de escalada ($F [1,42] = 15,082, p < 0,001$; Figura 8C).

No segundo dia da tarefa foi observado uma tendência da dieta ($F [1,42] = 3,799, p = 0,058$; Figura 8D) e um efeito da SM ($F [1,42] = 7,666, p < 0,01$; Figura 8D) aumentando o tempo de imobilidade. Além disso, a SM também diminuiu a latência para o primeiro episódio de imobilidade ($F [1,42] = 7,042, p < 0,05$; Figura: 8E) e o tempo de escalada ($F [1,42] = 5,696, p < 0,05$; Figura 8F). Os dados referentes ao tempo de nado de ambos os dias da tarefa não foram mostrados, já que as tentativas de fuga do cilindro são representadas pelo tempo de escalada. O ciclo estral foi determinado após cada dia de tarefa e uma figura representativa da distribuição das fases mostra que a maioria das ratas estavam em diestro e estro (Figuras 8G e 8H).

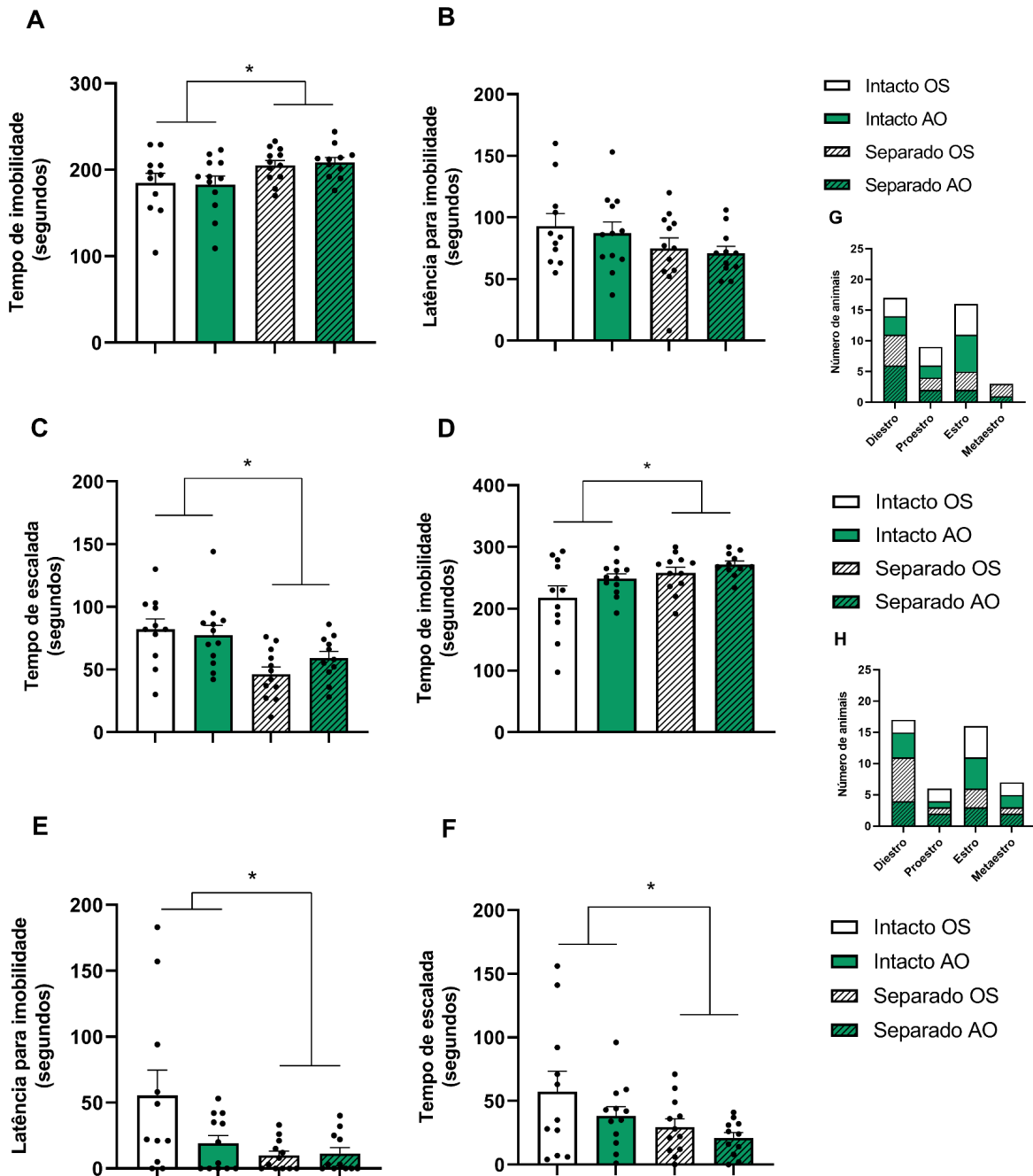
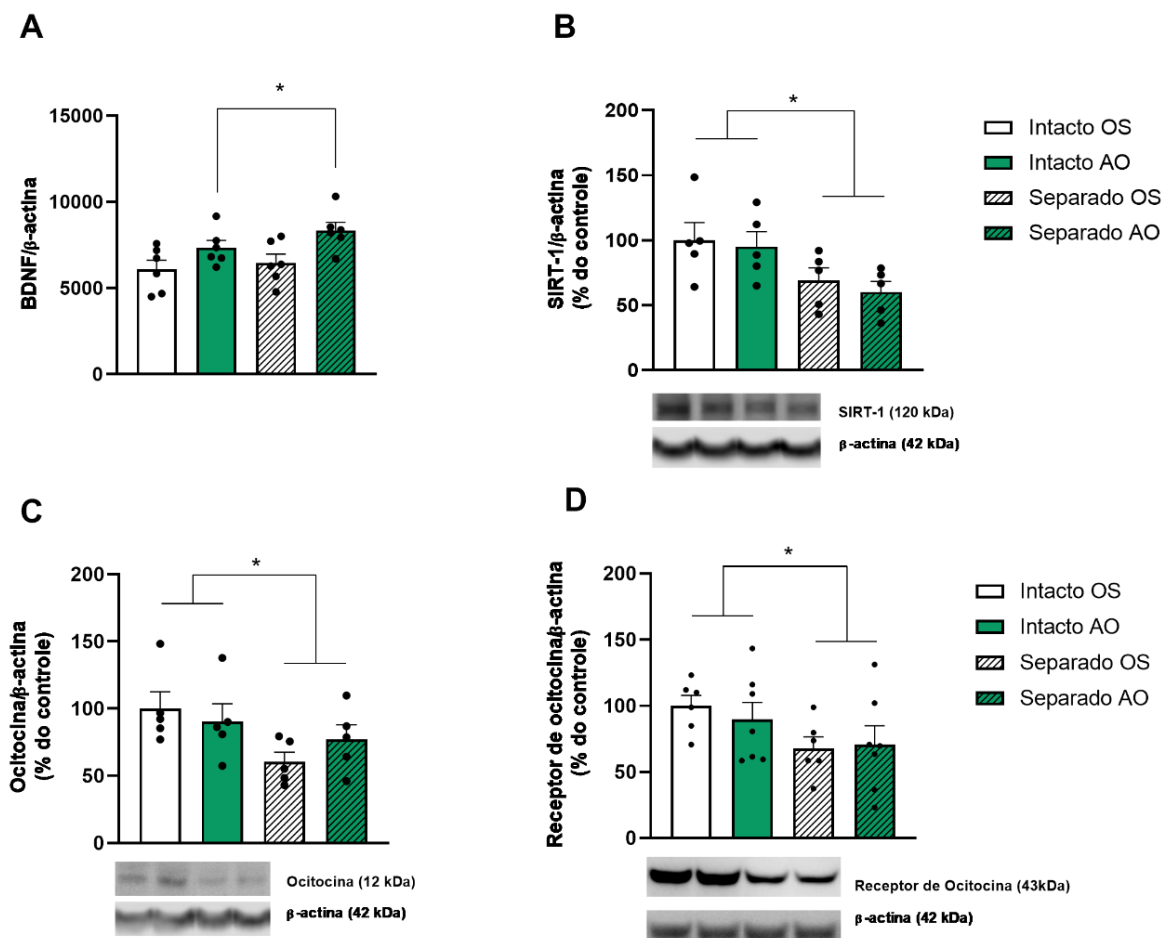


Figura 8: Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o comportamento do tipo depressivo em mães submetidas à separação materna. Os testes comportamentais tiveram início após o desmame dos filhotes, aproximadamente no DPN 25. **A)** Tempo de imobilidade no primeiro bloco de 5 minutos no dia 1, $n = 11$ a 12/grupo. A anova de duas vias mostrou que houve aumento no tempo de imobilidade nas ratas que passaram por separação materna. **B)** Latência para o primeiro episódio de imobilidade no dia 1, $n = 11$ a 12/grupo. A anova de duas vias mostrou que houve uma tendência em diminuir a latência para o primeiro episódio de imobilidade. **C)** Tempo de escalada no primeiro bloco de 5 minutos no dia 1, $n = 11$ a 12 por grupo. Os animais da separação materna reduziram o tempo de escalada ($p < 0,001$) **D)** Tempo de imobilidade no dia 2, $n = 11$ a 12/grupo. A SM induz aumento da imobilidade ($p < 0,01$) **E e F)** No segundo dia de tarefa os animais que

passaram por separação reduziram a latência para o primeiro episódio de imobilidade e o tempo de escalada (n= 11 a 12/grupo; $p < 0,05$). **G e H**) Monitoramento das fases do ciclo estral no dia 1 e dia 2. Não foram constatadas anomalias na ciclagem dos animais que participaram da tarefa.

5.6 Azeite de oliva e separação materna alteram marcadores bioquímicos no hipocampo das mães

Ambos fatores ambientais, dieta e estresse da separação materna, alteraram marcadores bioquímicos no hipocampo das mães. O consumo de azeite de oliva aumentou os níveis de BDNF (F [1,40] = 11,03, $p = 0,002$; Figura 9A). Já o estresse da SM induziu uma redução no imunocontéudo das proteínas SIRT-1 F [1,20] = 10,504, $p < 0,01$; Figura 9B), ocitocina F [1,16] = 5,662, $p < 0,05$; Figura 9C) e receptor de ocitocina (F [1,22] = 4,884, $p < 0,04$; Figura 9D). Não houve diferenças significativas com relação às outras proteínas analisadas ($p > 0,05$).



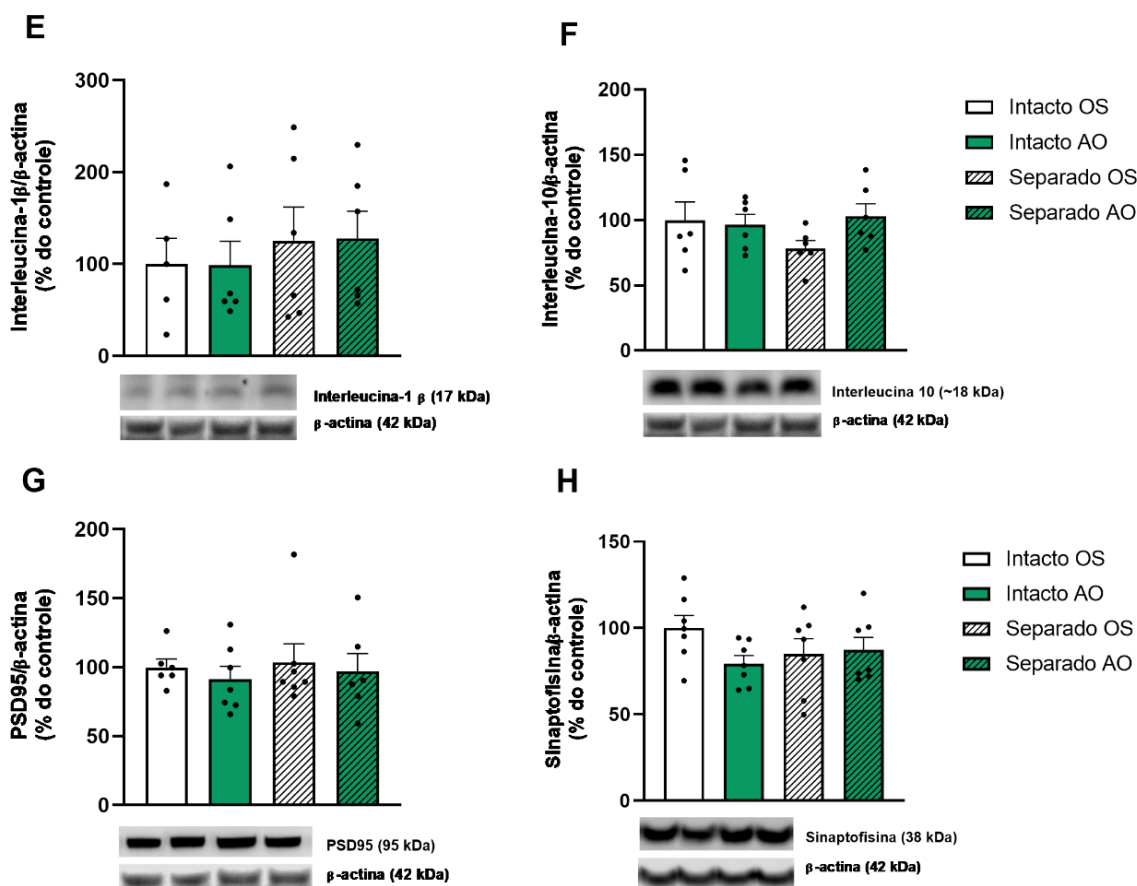


Figura 9: Efeito do consumo de uma dieta com azeite de oliva durante a gestação e lactação sobre o imunoconteúdo de proteínas envolvidas no metabolismo energético, resposta imune e plasticidade no hipocampo de mães submetidas à separação materna. **A)** BDNF, n= 6/grupo. A anova de duas vias mostrou um aumento nos grupos que consumiram azeite de oliva ($p=0,002$). **B)** SIRT-1, n= 5/grupo. Houve uma diminuição no imunoconteúdo de SIRT-1 em mães que passaram pela separação materna. **C)** Ocitocina, n= 5/grupo. As mães de ambos os grupos separados da prole apresentaram níveis mais baixos de ocitocina. **D)** Receptor de ocitocina, n= 6 a 7/grupo. Também houve diminuição no imunoconteúdo do receptor de ocitocina nos grupos separados, independente do tipo de dieta consumida. **E, F, G e H)** Não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos no imunoconteúdo de IL-1 β , IL-10, PSD95 e Sinaptofisina ($p>0,05$).

6. Discussão

O período gestacional e lactacional é extremamente sensível a fatores ambientais, uma vez que nesse período a rata está passando por constantes adaptações neuroendócrinas e comportamentais. A nutrição materna e o estresse fazem parte desses fatores, podendo influenciar na saúde da mãe e da prole, programando o metabolismo e o comportamento. Alguns estudos mostraram 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 distúrbios do humor tanto na mãe quanto na prole (Misdrahi et al., 2005; Boccia et al., 2007; Sung et al., 2010; Diehl et al., 2011, 2014). Nesse sentido, a proposta deste estudo foi investigar se o consumo de uma dieta com azeite de oliva durante o período gestacional e lactacional poderia prevenir as consequências induzidas pela separação materna sobre o comportamento emocional e marcadores bioquímicos no hipocampo dorsal das mães.

Os principais achados do presente estudo, mostraram que ambos os fatores não alteraram o consumo calórico e o peso corporal ao longo do tempo. Já a separação materna aumentou o cuidado materno de forma fragmentada, induziu um comportamento do tipo ansioso, depressivo e prejudicou a memória de curto-prazo das mães. Com relação aos achados bioquímicos, o estresse induzido pela SM foi capaz de diminuir o conteúdo das proteínas: SIRT-1, ocitocina e do receptor de ocitocina no hipocampo dorsal das mães. As ratas que consumiram uma dieta com azeite de oliva aumentaram a frequência do comportamento materno ativo de forma consistente e aumentaram os níveis de BDNF no hipocampo das mães. Interessante foi verificar que o azeite de oliva conseguiu prevenir os comportamentos de nutrir a prole com o dorso arqueado, do tipo ansioso e o prejuízo da memória nas mães que foram submetidas à SM.

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. Nossos resultados mostraram que a separação materna aumentou a frequência de lambidas das mães na prole, principalmente nas sessões das 13h00 e 17h30, e ao longo dos 10 dias de observação, destacando os últimos dias. Também foi observado que as mães submetidas à separação materna aumentaram a frequência da postura de amamentação com dorso arqueado, principalmente às 17h30 e ao longo dos 10 dias de observação. Os filhotes foram retirados do ninho por volta das 14h20 e retornaram para as caixas moradia 3h

depois, por volta das 17h20. 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 da dieta com azeite de oliva também promoveu um aumento na frequência de lambidas da mãe na prole, principalmente no dia 3. Também houve uma interação entre azeite de oliva e SM na postura de amamentação com dorso arqueado, indicando que as mães que consumiram azeite de oliva e foram submetidas à SM reduziram as frequências deste comportamento. A literatura mostra que filhotes provenientes de mães que desempenham maiores frequências de lambidas, apresentam maior sinaptogênese hipocampal e melhora no aprendizado e na memória quando adultos (Liu et al., 2000). 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). No entanto, o estresse causado pela separação materna durante os primeiros estágios da vida, mostrou prejuízos no comportamento emocional e cognitivo dos animais (Lajud et al., 2012; Diehl et al., 2011, 2014).

Baseado no exposto acima, investigamos se as alterações observadas no cuidado materno 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 foi proposto 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 na 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). O consumo de azeite de oliva durante a gestação e a lactação, também influenciou no cuidado materno, entretanto, não demonstrou inconsistência no comportamento. Atualmente, alguns estudos vêm apontando que o consumo de dietas com

azeite de oliva podem 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; Zheng 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 intra-uterina 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 sofreram da 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 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 e cognitivo dessas ratas. Para isso, foi realizada a tarefa de campo aberto, de reconhecimento do local do objeto e do nado forçado. Os resultados mostraram que a SM induziu um comportamento do tipo ansioso, depressivo e um prejuízo na memória de curto-prazo das mães. Vários estudos da literatura mostraram divergências sobre o comportamento ansioso induzido pela separação materna. Nesses estudos a espécie do rato, o protocolo da separação materna e a tarefa utilizada para avaliação da ansiedade mostraram diferentes resultados. Ratos da linhagem Wistar, com diferentes tempos (270 ou 180 minutos) e diferentes dias (21 ou 22) de separação materna, e utilizando o paradigma do labirinto em cruz elevado para análise comportamental, mostraram um aumento da ansiedade (Bousalham et al., 2013; Murgatroyd e Nephew, 2013). Já os estudos que utilizaram ratos *Wistar* ou *Long-Evans* com protocolos de separação materna de 15 minutos de 12 a 14 dias, mostraram que esses animais tiveram uma diminuição da ansiedade (Kalinichev; Easterling; Holtzman, 2000;

Stamatakis et al., 2015). Um estudo recente que avaliou o comportamento ansioso utilizando o campo aberto em camundongos da linhagem Balb submetidos ao protocolo de separação materna (15 ou 180 minutos por 5 dias), mostrou que os animais tiveram redução da ansiedade (Orso et al., 2018). Esses achados indicam que dependendo da linhagem, do tipo de protocolo de separação materna e o tipo de tarefa utilizada, podemos encontrar diferentes comportamentos relacionados com a ansiedade. Outros estudos também mostraram que a SM pode induzir comportamento do tipo ansioso, depressivo e prejuízo na memória das mães (Carobrez e Bertoglio, 2005; Maniam e Morris, 2010; Aguggia et al., 2013; Graham, 2018).

Interessante nos nossos achados foi encontrar que o consumo de azeite de oliva durante a gestação e a lactação foi capaz de prevenir o comportamento de ansiedade e o prejuízo na memória induzidos pela separação materna. 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. Outro estudo mostrou que uma dieta rica em lipídios atenuou a ansiedade no pós-parto em mães que passaram por separação de sua ninhada durante o período lactacional (Maniam e Morris, 2010). Alguns trabalhos que também utilizaram azeite de oliva, mostraram melhora na função mitocondrial dos neurônios, redução dos efeitos do estresse sobre as células, aumento na proliferação neuronal e na plasticidade sináptica, e melhora na memória dos animais (Zheng et al., 2015; Leal; Bramham; Duarte, 2017). Um estudo que acompanhou o desempenho cognitivo durante 8 anos de uma população verificou que aqueles indivíduos que tinham alto consumo de ácidos graxos monoinsaturados (ácido oleico) e polinsaturados apresentaram melhor desempenho cognitivo. Os autores relataram que esse efeito protetor pode ser atribuído ao papel dos ácidos graxos no SNC, que influenciam na manutenção da integridade das membranas neurais por agir na fluidez e transmissão sináptica (Solfrizzi et al., 2006 e 2008). Não encontramos efeito do consumo de azeite de oliva nas mães submetidas à SM na tarefa do nado forçado. Necessitamos realizar outras tarefas que avaliam o comportamento do tipo depressivo para verificar se o azeite de oliva pode apresentar alguma influência ou para excluir o potencial efeito do azeite de oliva sobre esse comportamento. Cabe ressaltar, que em todas as tarefas comportamentais as ratas apresentaram uma distribuição em todas as fases do ciclo estral .

A estrutura e a função do hipocampo são extremamente suscetíveis aos efeitos do ambiente (Arcego et al., 2018; Ruiz et al., 2018; Cui et al., 2020). O hipocampo dorsal é

vulnerável aos efeitos do estresse (Zhang et al., 2018; Criado-Marrero et al., 2019), e alterações nessa estrutura parecem estar envolvidas com a patogênese de doenças que alteram o comportamento emocional e a memória (Arcego et al., 2016; Khodamoradi et al., 2019; Cui; Cao; Lin, 2020). Alguns estudos mostraram que o estresse no início da vida é capaz de modular determinados marcadores bioquímicos nessa região encefálica das mães e da prole (Zuena et al., 2008; Sung et al., 2010; von Poser Toigo et al., 2012; Couto-Pereira et al., 2016; Ruiz et al., 2018; Cui et al., 2020; Machado et al., 2021). No nosso estudo, verificamos que a SM diminuiu o imunocontéudo da proteína SIRT-1 no hipocampo dorsal das mães. Adicionalmente, quando investigamos essa proteína na mesma região encefálica do cérebro dos filhotes, encontramos o mesmo efeito, ou seja, a SM também diminuiu o imunocontéudo de SIRT-1 nos machos na idade adulta (Machado et al., 2021). Um outro estudo que usou o protocolo de estresse crônico também verificou uma diminuição no imunocontéudo dessa proteína (Abe-Higuchi et al., 2016). A proteína sirtuína 1 (SIRT-1) é uma desacetilase dependente de NAD^+ , que atua manutenção do sistema neuronal e comportamental durante o envelhecimento natural, incluindo a plasticidade sináptica e os processos de memória (Lee et al., 2019). A falta de SIRT-1 prejudica as funções cognitivas, incluindo memória imediata e aprendizagem espacial (Michán et al., 2010; Herskovits e Guarente, 2014), bem como, sua inibição farmacológica leva a um aumento nos comportamentos semelhantes à depressão (Abe-Higuchi et al., 2016). Assim, acreditamos que o estresse da separação materna altera a proteína SIRT-1 tanto nas mães quanto na prole e que, possivelmente, essa proteína possa ser um alvo bioquímico para compreender a patogênese do comportamento emocional e da memória no hipocampo dorsal.

A separação materna também foi capaz de reduzir o imunocontéudo de ocitocina e do receptor de ocitocina no hipocampo dorsal das mães. O neuropeptídeo ocitocina é produzido nos núcleos supraóptico, paraventricular e núcleos acessórios do hipotálamo (Hou et al., 2016), e os neurônios ocitocinérgicos enviam projeções para várias regiões do cérebro, como o hipocampo e a amígdala (Dayi et al., 2015). Sua ação é mediada pela ligação dessa proteína em receptores específicos existentes na membrana plasmática de diferentes regiões encefálicas (Uhl-Bronner et al., 2005; Lee et al., 2009; Vaidyanathan e Hammock, 2017). Esse neuropeptídeo tem um papel importante sobre a plasticidade sináptica, o aprendizado, a memória e o comportamento do tipo ansioso e depressivo nos animais (Tomizawa et al., 2003; Lin et al., 2018; Joushi et al., 2021). Então, baseado na literatura, é possível que os efeitos da SM sobre a ocitocina e o receptor de ocitocina no hipocampo dorsal possa estar relacionado

com comportamento do tipo ansioso, depressivo e o prejuízo na memória nas mães que foram submetidas ao estresse da separação.

O consumo de azeite de oliva foi capaz de aumentar o imunocontéudo de BDNF no hipocampo dorsal das mães. E isso também foi visto em outro estudo, onde o consumo de azeite de oliva durante a gestação e lactação aumentou os níveis de BDNF no córtex pré-frontal da prole na idade adulta (Pase et al., 2015). Diferentes desordens psiquiátricas e neurodegenerativas têm mostrado associação com alterações na expressão gênica e no imunocontéudo do BDNF (Hashimoto et al., 2006; Féher et al., 2009). E isso ocorre porque essa neurotrofina está envolvida com várias ações importantes, como plasticidade sináptica, sobrevivência e diferenciação neuronal. Uma diminuição na expressão dessa proteína pode reduzir a plasticidade sináptica e prejudicar o aprendizado e a memória (Linnarsson et al., 1997; Zuena et al., 2008). Não encontramos alterações nas proteínas relacionadas com a plasticidade, no entanto, os efeitos do azeite de oliva sobre o comportamento materno, o comportamento do tipo ansioso e sobre a memória das mães, podem estar associados, em parte, com o aumento dos níveis de BDNF no hipocampo dorsal. Neste trabalho não encontramos efeitos do consumo de azeite de oliva sobre marcadores bioquímicos nas mães que passaram pelo estresse da separação de sua prole. Diante disso, mais estudos são necessários para encontrarmos quais mecanismos estão envolvidos, uma vez que, o azeite de oliva preveniu várias alterações comportamentais induzidas pelo estresse.

7. Conclusão

O presente estudo concluiu que:

- A separação materna aumentou o cuidado materno ativo, mas de forma inconsistente;
- A separação materna prejudicou o comportamento emocional e a memória;
- A separação materna diminuiu o imunoconteúdo da proteína SIRT-1, ocitocina e o receptor de ocitocina no hipocampo dorsal das mães;
- O consumo de azeite de oliva aumentou, em parte, o cuidado materno, mas de forma consistente;
- O consumo de azeite de oliva diminuiu a postura de amamentação com dorso arqueado nas mães submetidas à separação materna;
- O consumo de azeite de oliva preveniu o comportamento do tipo ansioso e o prejuízo na memória de curto-prazo nas mães submetidas à separação materna;
- O consumo de azeite de oliva aumentou os níveis de BDNF no hipocampo dorsal das mães.

Assim, os nossos resultados mostraram evidências que o consumo de azeite de oliva, durante a gestação e lactação, apresenta um potencial papel neuroprotetor. Esses achados abrem uma linha de investigação, indicando que a nutrição de qualidade das mães pode agir como estratégia terapêutica adjuvante para prevenir os efeitos do estresse no pós-parto, e assim trazer benefícios para a saúde da mãe e da prole.

8. Perspectivas

- Analisar os parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo dorsal das mães (amostras já coletadas para realização das dosagens);
- Avaliar o desenvolvimento da prole nos primeiros dias de vida (os animais já foram solicitados);
- Realizar a imunohistoquímica de marcadores de neurogênese no hipocampo das mães no dia do desmame e 20 dias após o desmame dos filhotes (amostras já coletadas, cérebros perfundidos e alguns já fatiados);
- Realizar a imunohistoquímica da região paraventricular do hipotálamo para verificar a marcação de ocitocina no dia do desmame dos filhotes; (já foram solicitados os animais);
- Investigar no dia pós-natal 21 os mesmos parâmetros bioquímicos avaliados após o desmame.

9. Referências

- ABE-HIGUCHI N., UCHIDA S., YAMAGATA H., HIGUCHI F., HOBARA T., HARA K., KOBAYASHI A, WATANABE T. Hippocampal Sirtuin 1 Signaling Mediates Depression-like Behavior. *Biol Psychiatry*, v. 80(11), p. 815-826, 2016.
- ADYNSKI, H. et al. Predictors of psychological distress in low-income mothers over the first postpartum year. *Research in Nursing & Health*, [s. l.], n. January, p. nur.21943, 2019.
- ACOSTA-MONTAÑO P., RODRÍGUEZ-VELÁSQUEZ E., IBARRA-LÓPEZ, E., FRAYDE-GÓMEZ, H., MAS-OLIVA, J., et al. Fatty Acid and Lipopolysaccharide Effect on Beta Cells Proteostasis and its Impact on Insulin Secretion. *Cells*, v. 13;8(8), p. 884, agosto 2019.
- 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, 2013.
- ANGELONI, Cristina et al. Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 1–27, 2017.
- ARCEGO DM, KROLOW R, LAMPERT C, TONIAZZO C, BERLITZ C, LAZZARETTI C, SCHMITZ F, RODRIGUES AF, WYSE AT, DALMAZ C. Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects. *Int J Dev Neurosci.*, v. 50, p. 16-25, 2016.
- ARCEGO DM, TONIAZZO AP, KROLOW R, LAMPERT C, BERLITZ C, DOS SANTOS GARCIA E, DO COUTO NICOLA F, HOPPE JB, GAELZER MM, KLEIN CP, LAZZARETTI C, DALMAZ C. Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. *Mol Neurobiol.* v. 55(4), p. 2740-2753, 2018.
- 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, 2017.
- BARKER G.R.I. et al. Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, v. 27(11); p. 2948 –2957, 2007.
- BARTSCH, T.; WULFF, P. The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, [s. l.], v. 309, n. August, p. 1–16, 2015.
- 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, 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, 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.

BRUMMELTE, Susanne; GALEA, Liisa A. M. Chronic corticosterone during pregnancy and postpartum affects maternal care, cell proliferation and depressive-like behavior in the dam. *Hormones and Behavior*, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 769–779, 2010.

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.

CÂNDIDO F.G., VALENTE F.X., GRZÉSKOWIAK Ł.M., MOREIRA A.P.B., ROCHA D.M.U.P., ALFENAS R. C. G. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *Int J Food Sci Nutr.*, v. 69(2), p. 125-143, março 2018.

CALDI 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, 1998.

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, 2018.

CASAMENTI, Fiorella; STEFANI, Massimo. Olive polyphenols: new promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. *Expert Review of Neurotherapeutics*, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 345–358, 2017.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxietylike behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 1193–1205, 2005.

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, 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, 2001.

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, 2003.

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, 2006.

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, 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.

CHENG H., MANCUSO D.J., JIANG X., GUAN S., YANG J., YANG K., et al. Shotgun lipidomics reveals the temporally dependent, highly diversified cardiolipin profile in the mammalian brain: temporally coordinated postnatal diversification of cardiolipin molecular species with neuronal remodeling. *Biochemistry*, v. 47, p. 5869–5880, 2008.

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, Natividade de Sá et al. Neonatal interventions differently affect maternal care quality and have sexually dimorphic developmental effects on corticosterone secretion. *International Journal of Developmental Neuroscience*, [s. l.], v. 55, p. 72–81, 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.

CRiado-MARRERO M., GEBRU N.T., GOULD L.A., SMITH T.M., KIM S., BLACKBURN R.J., DICKEY C.A., BLAIR L.J. Early Life Stress and High FKBP5 Interact to Increase Anxiety-Like Symptoms through Altered AKT Signaling in the Dorsal Hippocampus. *Int J Mol Sci.*, v. 20(11), p. 2738, 2019.

CUI Y, CAO K, LIN H, CUI S., et al. Early-Life Stress Induces Depression-Like Behavior and Synaptic-Plasticity Changes in a Maternal Separation Rat Model: Gender Difference and Metabolomics Study. *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 102, 2020.

DARNAUDÉRY, Muriel et al. Early motherhood in rats is associated with a modification of hippocampal function. *Psychoneuroendocrinology*, [s. l.], v. 32, n. 7, p. 803–812, 2007.

DAYI, A., CETIN, F., SISMAN, A.R., AKSU, I., TAS, A., GÖNENC, S., UYSAL, N. The effects of oxytocin on cognitive defect caused by chronic restraint stress applied to adolescent rats and on hippocampal VEGF and BDNF levels. *Med. Sci. Monit.* v. 21, p. 69-75, 2015.

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, 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, 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.

EID, RS. et al. Early and late effects of maternal experience on hippocampal neurogenesis, microglia, and the circulating cytokine milieu. *Neurobiology of Aging*, [s. l.], v. 78, p. 1–17, 2019.

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

FAISAL-CURY A; MENEZES PR. Ansiedade no puerpério: prevalência e fatores de risco. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 171–178, 2007.

FAYEZI S., LEROY J.L.M.R., NOVIN M.G., DARABI M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development. *Zygote*, v. 26, p. 1-13, dezembro 2017.

FEHÉR, Ágnes et al. Association between BDNF Val66Met polymorphism and alzheimer disease, dementia with lewy bodies, and pick disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 224–228, 2009.

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.

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.

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.

GRAHAM, Bronwyn M. Postnatal stress is associated with impaired fear conditioning and extinction, and heightened hippocampal fibroblast growth factor 2, in mother rats. *Hormones and Behavior*, v. 105, p. 110–114 2018.

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.
- HARTMANN J. M., MENDONZA-SASSI R. A., CÉSAR J. A. Postpartum depression: prevalence and associated factors. *Cad. Saúde Pública (Online)*, v. 33(9): e00094016.
- HASHIMOTO K., IWATA Y., NAKAMURA K., TSUJII M., et al. Reduced serum levels of brain-derived neurotrophic factor in adult male patients with autism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 30 (8), p. 1529-1531, 2006.
- HILLERER, Katharina M. et al. Lactation-induced reduction in hippocampal neurogenesis is reversed by repeated stress exposure. *Hippocampus*, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 673–683, 2014.
- HORWITZ, Sarah McCue et al. Persistence of Maternal Depressive Symptoms throughout the Early Years of Childhood. *Journal of Women's Health*, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 637–645, 2009.
- HWANG J., CHANG Y. H., PARK J., KIM S., CHUNG H., SHIM E., et al. Dietary saturated and monounsaturated fats protect against acute Acetaminophen hepatotoxicity by altering fatty acid composition of liver microsomal membrane in rats. *Lipids Health Disease*, v. 20, p. 184, outubro 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.
- JOHNSTONE, H. A. et al. Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: Changes in feedforward and feedback mechanisms. *Journal of Neuroendocrinology*, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 811–822, 2000.
- KALINICHEV, M.; EASTERLING, K. W.; HOLTZMAN, S. G. Periodic postpartum separation from the offspring results in long-lasting changes in anxiety-related behaviors and sensitivity to morphine in Long-Evans mother rats. *Psychopharmacology*, [s. l.], v. 152, n. 4, p. 431–439, 2000.
- KARMAKAR, S. W.; BOTTUM, K. M.; TISCHKAU S. E. Considerations for the use of anesthetics in neurotoxicity studies. *Comparative Medicine*, v. 60(4), p. 256-262, 2010.
- KHAN M, ULLAH R, et al. 17β-Estradiol Modulates SIRT1 and Halts Oxidative Stress-Mediated Cognitive Impairment in a Male Aging Mouse Model. *Cells*, v. 8(8), p. 928, 2019.
- KINGSTON, Dawn et al. Association between prenatal and postnatal psychological distress and toddler cognitive development: A systematic review. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1–16, 2015.
- KINSLEY, Craig H. et al. Motherhood and the hormones of pregnancy modify 29 concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Hormones and Behavior*, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 131–142, 2006.

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.

LEE, H.-J., MACBETH, A.H., PAGANI, J.H., SCOTT YOUNG, W. Oxytocin: The great facilitator of life. *Prog. Neurobiol.*, v.88, p. 127-151, 2009.

LEE SH, LEE JH, LEE HY, MIN KJ. Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. *BMB Rep.*, v. 52(1), p. 24-34, 2019.

LIN, Y.T., HSIEH, T.Y., TSAI, T.C., CHEN, C.C., HUANG, C.C., HSU, K.S. Conditional deletion of hippocampal CA2/CA3a oxytocin receptors impairs the persistence of long-term social recognition memory in mice. *J. Neurosci.*, v. 38, p. 1218–1231, 2018.

LINNARSSON S., BJÖRKLUND A., ERNFORS P. Learning deficit in BDNF mutant mice. *Europe Journal Neuroscience*, v. 9, p. 2581-2587, 1997.

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.

LU, M.S et al. Maternal dietary patterns during pregnancy and preterm delivery: A large prospective cohort study in China. *Nutrition Journal*, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 71, 2018.

MACHADO A.G., SILVEIRA A.C.S., PERES A.M., et al. Olive oil-rich diet during pregnancy/lactation attenuated the early life stress effects on depressive-like behavior and altered energy metabolism in the dorsal hippocampus in a sexspecific manner. *Nutritional Neuroscience*, publicação online em maio de 2021.

MACRÍ S, MASON G.J, 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 M.J. 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.

MAGTANONG L., KO PJ., TO M., CAO JY., FORCINA GC., TARANGELO A., WARD CC., CHO K., PATTI GJ., NOMURA DK., OLZMANN JA., DIXON S.J. Exogenous Monounsaturated Fatty Acids Promote a Ferroptosis-Resistant Cell State. *Cell Chem Biol.*, v. 26(3), p. 420-432.e9. março 2021.

MARAIS L, VAN RENSBURG S.J., VAN ZYL J.M., STEIN D.J., 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.

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

MEDINA J. M., TABERNERO A. The neurotrophic effect of oleic acid: implications for olive Oil in Health and disease. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc; 2010, v. 156, p. 1405-1412.

MEDINA, Joanna; WORKMAN, Joanna L. Maternal experience and adult neurogenesis in mammals: Implications for maternal care, cognition, and mental health. *Journal of Neuroscience Research*, [s. l.], n. January, p. 1–16, 2018.

MICHÁN S, LI Y, CHOU MM, et al. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci.*, v. 30(29), p. 9695–9707, 2010.

MILLIGAN-SAVILLE, J. S.; GRAHAM, B. M. Mothers do it differently: reproductive experience alters fear extinction in female rats and women. *Translational psychiatry*, [s. l.], v. 6, n. 10, p. e928, 2016.

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.

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.

NEUMANN, I.D. Alterations in behavioral and neuroendocrine stress coping strategies in pregnant, parturient and lactating rats. *Progress in Brain Research*, [s. l.], v. 133, p. 143–152, 2001.

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.

ORSO R., et al. Maternal behavior of the mouse dam toward pups: implications for maternal separation model of early life stress. *Stress*, 2018.

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, 2012.

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.

PASE 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, 2015.

PAXINOS G., WATSON C.R. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego, 1997.

PERVEEN T., HASHMI B. M., HAIDER S., TABASSUM S., SALEEM S., SIDDIQUI M. A., et al. Role of monoaminergic system in the etiology of olive Oil induced antidepressant and anxiolytic effects in rats. *ISRN Pharmacol.*, v. 10, p: 1– 5, 2013.

PORSOLT RD., LE PICHON M, JALFRE M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, v. 266, p. 730 - 732, 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, 1978.

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, 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- β and tau pathologies in the brains of TgSwDI mice. *Journal Nutritional Biochemistry*, v.26, n.12, p.1479 - 1490, 2015.

RAVAUT G., LÉGIOT A., BERGERON K.F., MOUNIER C. Monounsaturated Fatty Acids in Obesity-Related Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22(1), p. 330, 2020.

ROSENBLATT, J. A. Y. S.; MAYER, Anne D.; GIORDANO, Anthony L. Hormonal basis during pregnancy for the Onset of Maternal Behavior in the Rat. *Psychoneuroendocrinology*, [s. l.], v. 13, p. 29–46, 1988.

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

RUSSELL, JA; DOUGLAS, AJ; INGRAM, CD. Brain preparations for maternity--adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation. An overview. *The Maternal Brain*, v. 133, p. 1-38, 2001.

RUIZ R., ROQUE A., PINEDA E., LICONA-LIMÓN P., JOSÉ Valdéz-Alarcón J., LAJUD N. Early life stress accelerates age-induced effects on neurogenesis, depression, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology*, v. 96, p. 203-211, julho 2018.

JOUSHI S, ESMAEILPOUR K, MASOUMI-ARDAKANI K, ESMAEILI-MAHANI S, SHEIBANI V. Intranasal oxytocin administration facilitates the induction of long-term potentiation and promotes cognitive performance of maternally separated rats. *Psychoneuroendocrinology*, v. 123, p. 105044, 2021.

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.

SHEPPARD, P.A.S.; CHOLERIS E.; GALEA, L.A.M. Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents. *Molecular Brain*, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 22, 2019.

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.

SOLFRIZZI V., CAPURSO C., D'INTRONO A., COLACICCO A. M., FRISARDI V., Santamato A., et al. Dietary fatty acids, age-related cognitive decline, and mild cognitive impairment. *J Nutr Health Aging*, v. 12, p. 382-386, 2008.

SLATTERY, David A.; HILLERER, Katharina M. The maternal brain under stress: Consequences for adaptive peripartum plasticity and its potential functional implications. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 41, p. 114-128, 2016.

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

STRANGE BA, WITTER MP, LEIN ES, MOSER EI. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci*. v. 15(10), p. 655–669, 2014.

SUNG Y. A., SHIN M. S. , CHO S., BAIK H. H., JIN B. K., CHANG H. K., LEE E. K., KIM C. J. 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.

THEME FILHA M. M., AYERS, S. DA GAMA S. G. N., LEAL M. C. Factors associated with postpartum depressive symptomatology in Brazil: The Birth in Brazil National Research Study, 2011/2012. *Journal of Affective Disorders*, v. 194, p. 159-167, abril 2016.

TOMIZAWA, K., IGA, N., LU, Y.-F., MORIWAKI, A., MATSUSHITA, M., LI, S.-T., MIYAMOTO, O., ITANO, T., MATSUI, H. Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. *Nat. Neurosci.*, v. 6, p. 384-390, 2003.

TRIPOLI, E et al. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, [s. l.], v. 18, n. 01, p. 98, 2005.

UHL-BRONNER, S., WALTISPERGER, E., MARTÍNEZ-LORENZANA, G., CONDES LARA, M., FREUND-MERCIER, M.J. Sexually dimorphic expression of oxytocin binding sites in forebrain and spinal cord of the rat. *Neuroscience*, v. 135, p 147–154, 2005.

VAIDYANATHAN, R., HAMMOCK, E.A. Oxytocin receptor dynamics in the brain across development and species. *Dev. Neurobiol.*, v. 77, p.143–157, 2017.

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.

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.

ZHANG Y, YUAN S, PU J, YANG L, ZOU X, LIU L, JIANG X, ZHANG H, TENG T, TIAN L, XIE P. Integrated Metabolomics and Proteomics Analysis of Hippocampus in a Rat Model of Depression. *Neuroscience*, v. 371 (10), p. 207-220, 2018.

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.

ZUENA A. R., MAIRESSE J., CASOLINI P., CINQUE C., ALEMÁ G. S., MORLEY-FLETCHER S., et al. Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PLoS One*, v. 3, p. e2170, 2008.

ANEXO A - Carta de aprovação do comitê de ética



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37804

Título: ESTUDO DOS EFEITOS DE UMA DIETA COM AZEITE DE OLIVA SOBRE O CUIDADO MATERNO, A EMOCIONALIDADE E OCITOCINA DE RATAS SUBMETIDAS À SEPARAÇÃO MATERNA

Vigência: 06/08/2019 à 31/08/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

Rachel Krolow Santos Silva Bast - coordenador desde 06/08/2019
Natividade de Sá Couto Pereira - pesquisador desde 06/08/2019
Jade De Oliveira - pesquisador desde 06/08/2019
ANA CAROLINE SILVA SILVEIRA - Aluno de Mestrado desde 06/08/2019
Alessandra Gonçalves Machado - Aluno de Doutorado desde 06/08/2019
Ariadni Mesquita Peres - Aluno de Mestrado desde 06/08/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 09/12/2019 - Sala 56 do prédio 11209 - Salas de aula do Campus Centro - Porto Alegre/RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de um total de 62 ratas (Rattus norvegicus) Wistar fêmeas, primíparas, provenientes do biotério do Departamento de Bioquímica (UFRGS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 3 de Janeiro de 2020

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética

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

Tabela suplementar 1: 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
Palmitico 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