



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Genética e Evolução

Bruno Sauce Silva

**ARQUITETURA GENÉTICA DO COMPORTAMENTO MATERNO
DE CONSTRUÇÃO DE NINHO**

São Carlos

2010



Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Departamento de Genética e Evolução
Laboratório de Genética de Populações e Evolução

Título da Dissertação:

**ARQUITETURA GENÉTICA DO COMPORTAMENTO MATERNO
DE CONSTRUÇÃO DE NINHO**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Genética e
Evolução para a obtenção do título de
mestre em genética e evolução.

Aluno: Bruno Sauce Silva

Orientadora: Prof. Dra. Andréa Cristina Peripato

São Carlos

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S255ag

Sauce-Silva, Bruno.

Arquitetura genética do comportamento materno de construção de ninho / Bruno Sauce Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

75 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Genética quantitativa. 2. QTL. 3. Genética do comportamento. 4. Camundongos - ninhinhos. I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ARQUITETURA GENÉTICA DO COMPORTAMENTO
MATERNO DE CONSTRUÇÃO DE NINHO**

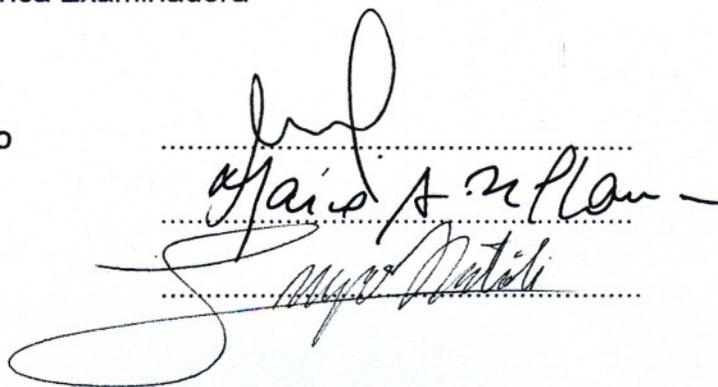
Dissertação de Mestrado de Bruno Sauce Silva

Banca Examinadora

Profa. Dra. Andrea Cristina Peripato

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Sergio Russo Matioli



Handwritten signatures of the examiners: Andrea Cristina Peripato, Marco Antonio Del Lama, and Sergio Russo Matioli. The signatures are written in black ink over horizontal dotted lines.

“There is a single light of science, and to brighten
it anywhere is to brighten it everywhere.”

Isaac Asimov

“Work and play are words used to describe
the same thing under differing conditions.”

Mark Twain

“We don’t stop playing because we grow old;
we grow old because we stop playing.”

George Bernard Shaw

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha família pelas condições apropriadas, desde minha infância, para um ótimo desenvolvimento intelectual e emocional. Agradeço minha orientadora pelo encaminhamento e ajuda. Agradeço todos amigos, companheiros de laboratório e professores pelos momentos de discussões e risadas. Por fim, agradeço a Ufscar e a agência Fapesp pelo suporte necessário para meu mestrado e minha pesquisa científica.

RESUMO

Arquitetura genética de um fenótipo representa o número total de genes, os efeitos independentes (aditividade), as interações entre alelos (dominância e epistasia), e o efeito destes em outros fenótipos (pleiotropia). Um grande debate entre tipos gerais de arquitetura genética está no papel da variação independente e de interações no processo adaptativo. Pela seleção natural reduzir a variação aditiva, esperamos de fenótipos ligados ao *fitness* menor variação aditiva relativa a variação de interações e genes com efeitos médios relativamente mais comuns. O cuidado materno é um fenótipo com grande importância para o *fitness*. Dentre os comportamentos de cuidado materno, a construção de ninho destaca-se aumentando a sobrevivência dos filhotes pela proteção contra predadores e manutenção da temperatura. Investigamos a arquitetura genética da construção de ninho em camundongos e testamos a hipótese que esse comportamento tem a arquitetura genética relacionada ao *fitness*, verificando também possíveis associações com ansiedade e peso. Para isso, checamos as relações entre os fenótipos e testamos, com a análise de QTL, a associação dos fenótipos com regiões (marcadores microssatélites) por todo o genoma de fêmeas F₂ em fase materna do intercruzamento das linhagens endogâmicas SM/J e LG/J. Obtivemos 23 QTLs que, individualmente, estão associados com a variação nos fenótipos de construção de ninho, peso e ansiedade (15 QTLs para os 6 fenótipos de construção de ninho). Os QTLs individuais de construção de ninho têm efeitos moderados (de 4 a 13%), e os muitos QTLs epistáticos colaboram aumentando essa variação explicada. Existem regiões em comum para ninho com peso e ansiedade e, na procura de genes candidatos, descobrimos genes já descritos com efeitos nesses fenótipos. Assim, corroboramos a hipótese do tipo de arquitetura genética relacionada ao *fitness* para o comportamento de construção de ninho, de genes com grandes efeitos e alta variação genética de interações. A identificação de regiões associadas ao cuidado materno em camundongos e o entendimento da arquitetura genética envolvida poderão contribuir na identificação de genes para esses comportamentos em outros mamíferos, e na compreensão do padrão geral do processo adaptativo e da evolução dos seres vivos.

Palavras-Chave: Arquitetura genética. QTL. Comportamento materno. Comportamento. Construção de ninho. Camundongo.

ABSTRACT

Genetic architecture of a phenotype represents the total number of genes, independent effects (additivity), the interactions between alleles (dominance and epistasis), and its effects on other phenotypes (pleiotropy). An enormous debate about general types of genetic architectures relates the importance of independent and interactive variation in the adaptive process. Because natural selection reduces additive variation, we expect, of fitness related phenotypes, lesser additive than interactive variation and relatively more genes with moderate effects. Maternal care is a phenotype with enormous importance to fitness. Of the maternal care behaviors, the nest building highlights itself improving pups survival by protection against predators and temperature maintenance. We investigated the genetic architecture of nest building in mice and tested the hypothesis that this behavior has a genetic architecture related to fitness, also verifying possible associations with anxiety and weight. For that, we checked the relation between all phenotypes and tested, using the QTL analysis, the phenotypic association with regions (microsatellites markers) spread about all genome of F2 females at maternal stage from the intercross of inbred strains SM/J and LG/J. We found 23 QTLs which, individually, are associated with phenotypic variation on nest building, weight and anxiety (15 QTLs at the 6 nest building phenotypes). The nest building's individual QTLs have moderate effects (from 4 to 13%), and the numerous epistatic QTLs add to increase this explained variation. There are common regions for nest building with anxiety and weight and, searching for candidate genes, we found genes with effects already described for these phenotypes. Hence, we corroborate our hypothesis of the genetic architecture type related to fitness for nest building behavior, of genes with bigger effects and high interactive variation. The identification of regions associated with maternal care in mice and the knowledge of the related genetic architecture can help in identifying genes for these behaviors in other mammals, and in the comprehension of general patterns in adaptive process and life evolution.

Keywords: Genetic architecture. QTL. Maternal Behavior. Behavior. Nest building. Mouse.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
Redes biológicas e arquitetura genética	8
Desvendando a arquitetura genética do cuidado materno	10
Desvendando a arquitetura genética do cuidado materno: construção de ninho	11
MATERIAL E MÉTODOS	15
Cruzamentos e procedimentos gerais com os camundongos	15
Fenótipo	16
<i>Construção de Ninho</i>	16
<i>Peso e Ansiedade</i>	20
<i>Tamanho de Ninhada e Idade</i>	22
Genótipo	23
Análise de QTL	25
<i>Análise de QTL individual</i>	25
<i>Análise de QTL epistático</i>	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
Fenótipo	28
<i>Construção de Ninho</i>	28
<i>Peso</i>	33
<i>Ansiedade</i>	34
<i>Tamanho de Ninhada e Idade</i>	37
<i>Modelo Geral para Construção de Ninho</i>	38
Genótipo	39
Análise de QTL	40
<i>Construção de Ninho</i>	41
<i>Peso</i>	55
<i>Ansiedade</i>	56
CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	60

INTRODUÇÃO

Redes biológicas e arquitetura genética

Redes são conjuntos de componentes com conexões que representam associações ou relações de causa e efeito (Newman 2003). Em uma relação de causa e efeito, alguns componentes (causadores) precedem e alteram a probabilidade de eventos em outros componentes (receptores do efeito); diferenciando-se de uma simples associação pelo grau de conhecimento e controle do sistema (Rockman 2008). Variações nos componentes de uma rede fornecem informações importantes sobre suas conexões, pois para conhecermos os efeitos de uma potencial causa, um componente precisa obrigatoriamente variar (Rockman 2008).

Em algumas redes biológicas, a relação entre componentes genéticos (genótipo) e outros componentes observáveis (fenótipo) é simples, e a existência de um gene mutante leva a um enorme efeito na proteína, célula, tecido, órgão e/ou organismo da rede (Wahlsten 1999). Nesses casos, a modificação de uma causa provável (variação genotípica) revela um efeito direto e claro (variação fenotípica). Essa abordagem é chamada de *reverse genetics* e suas técnicas incluem nocaute de genes por recombinação e silenciamento de expressão com RNA de interferência (Watson e colaboradores 2008).

Outros sistemas biológicos, porém, contêm redes complexas de causa e efeito mediadas por muitos componentes em diferentes níveis genéticos, bioquímicos, fisiológicos e ambientais (Oyama 2000). Para a maioria dos casos, sabemos muito pouco sobre a rede total, ou mesmo apenas a rede genética (ou arquitetura genética) de um fenótipo (Erickson 2005). Essa situação torna o uso da *reverse genetics* ineficiente, pois não temos informação para inferir quais genes específicos estão conectados ao fenótipo estudado, e quais potenciais conexões com outros genes. Para sistemas complexos, a solução é modificar vários componentes simultaneamente e observar os efeitos repetidas vezes (Rockman 2008). Uma modificação não precisa ser gerada pela intervenção humana: a variação genética que ocorre naturalmente em uma população ao longo da evolução é uma fonte multifatorial de modificações (Jansen e Nap 2001). Isso torna possível o uso da *forward genetics*; que parte da variação fenotípica (efeitos) para conhecermos a associação com a variação genética (potenciais causas). Um exemplo de *forward genetics* é a análise de QTLs (*Quantitative Trait Loci*, ou locos de fenótipo quantitativo).

Arquitetura ou rede genética de um fenótipo representa o número total de alelos (formas de um gene); os efeitos singulares e independentes no fenótipo (aditividade); as conexões/interações entre esses alelos no mesmo loco (dominância: como sobredominância e subdominância) ou em diferentes locos (epistasia: como “aditiva x aditiva”, “aditiva x dominante” e “dominante x dominante”); e a extensão dessa rede em outros fenótipos (pleiotropia, com efeitos sinérgicos ou antagonistas entre os fenótipos) (Falconer e Mackay 1996; Templeton 2006).

O número de genes afetando um fenótipo está positivamente relacionado à sua complexidade; e a quantidade de variação genética total esperada em fenótipos complexos é maior devido ao grande número de alvos para eventos mutacionais (Houle e colaboradores 1996). Além disso, o efeito de cada gene em um fenótipo e o tipo de variação genética (aditiva vs. interações) predominante são produtos intrincados da história da população e das forças evolutivas atuantes (Templeton 2006). Podemos resumir esses produtos em dois tipos gerais de arquitetura genética (Fisher 1930; Wright 1931 – ambos em Templeton 2006):

Tipo I - genes com efeitos pequenos no fenótipo e predominância de variação genética independente de conexões (aditiva);

Tipo II - genes com efeitos médios no fenótipo e predominância de variação genética dependente de conexões (dominante e epistática).

Em geral, a intensidade do efeito de cada gene no fenótipo dependerá do tamanho populacional e da importância do fenótipo em questão para o *fitness* (sucesso na viabilidade, acasalamento, fecundidade e fertilidade) do indivíduo. Em populações pequenas, pequenos efeitos positivos na passagem de um gene para a próxima geração não serão suficientes para superar a flutuação aleatória dessas frequências. Apenas em populações grandes o balanço entre seleção natural e deriva genética permitirá a manutenção de genes com pequenos efeitos no *fitness*. Genes com efeitos muito grandes, porém, têm maior probabilidade de causarem fenótipos prejudiciais e, por seleção natural, serem eliminados (Templeton 2006). Assim, genes com efeitos médios são mais comuns, proporcionalmente, para fenótipos mais relacionados ao *fitness*, pois fenótipos pouco relacionados ao *fitness* terão efeitos pequenos, médios e grandes (Merilä e Sheldon 1999).

Talvez o maior debate entre os dois tipos gerais de arquitetura genética esteja no papel da variação independente e de interações no processo adaptativo (Fenster e colaboradores 1997; Coyne e colaboradores 1997; Phillips 2008; Orr 2009). Em organismos

com reprodução sexuada, o efeito aditivo (independente) de um gene é o único transmitido para a próxima geração, e, por isso, é o único afetado diretamente por seleção natural. As interações entre genes, porém, tem um papel indireto na adaptação, pois servem de repositório de efeitos aditivos conforme as mudanças ambientais e a entrada de novos alelos na população (Templeton 2006).

Um fenótipo com grande influência no *fitness*, comparado a outros fenótipos, geralmente tem maior variação genética aditiva e de interações devido à maior complexidade (Merilä e Sheldon 1999). Dessa forma, fenótipos ligados ao *fitness* têm menor variação genética aditiva relativa (“por gene”) devido ao efeito da seleção natural reduzindo a variação (Merilä e Sheldon 1999). Porém, esses fenótipos têm maior variação genética dominante e epistática devido ao grande número de interações possível entre o maior número de genes (Lynch e Walsh 1998).

Assim, a arquitetura genética de um fenótipo pode conter importantes informações sobre os processos mutacionais, a evolução fenotípica e a influência do ambiente e das populações ao longo do tempo (Templeton 2006; Levy e Siegal 2008; Parter e colaboradores 2008). Com uma arquitetura genética conhecida, podemos conhecer conexões de associação e inferir redes causais de nossas observações – passando a entender o funcionamento do sistema de um fenótipo como um todo integrado (Rockman 2008).

Devido à alta complexidade encontrada em comportamentos animais, seu estudo é ideal para uma compreensão de arquiteturas genéticas e redes biológicas em geral (Boake e colaboradores 2002; Ruppell e colaboradores 2004). Parte da variação de um comportamento é determinada por genes (McGuffin e colaboradores 2001; Baker 2004; Tomida e colaboradores 2009). Na conexão entre genes e comportamentos, existem diversos componentes intermediários com causas e efeitos multidirecionais. Em um modelo simples, as formas alélicas de um gene podem traduzir diferentes proteínas, que podem funcionar diferentemente (Green e colaboradores 2008). Uma diferença na função de proteínas neurotransmissoras ou neuroreceptoras, por exemplo, pode refletir em diferentes níveis e/ou locais da atividade neural durante uma situação particular; que, finalmente, podem gerar diferenças na cognição e no comportamento (Green e colaboradores 2008).

Desvendando a arquitetura genética do cuidado materno

Dentre os comportamentos, o cuidado materno destaca-se pela sua grande importância para o *fitness* da mãe e sua progênie (Mousseau e Fox 1998). O ambiente

proporcionado pela mãe aos filhotes gera variação em fenótipos vitais como crescimento e sobrevivência (Räsänen e Kruuk 2007) e afeta diversos outros comportamentos ao longo das gerações (Varki e colaboradores 2008). Assim, os fenótipos da progênie são afetados indiretamente por genes do cuidado da mãe (Wolf e colaboradores 1999); revelando uma conexão causal complexa entre os componentes genéticos de diferentes indivíduos. Por esses genes estarem presentes também no filhos, a evolução desse comportamento ocorre pela seleção de redes que abrangem mais de um só organismo – com uma adaptação potencialmente mais rápida que fenótipos limitados a um indivíduo (Wolf e colaboradores 1999; Templeton 2006).

Nosso grupo trabalha com camundongos (*Mus musculus*) do cruzamento de duas linhagens SM/J e LG/J (Jackson Laboratory, EUA) em que algumas fêmeas não demonstraram cuidado com os filhotes. Para a base genética de camundongos existe uma ampla literatura e um rico banco de dados disponível (Mouse Genome Database 2010); sendo uma das espécies mais caracterizadas no campo da genética (Lee 1995; Collins e colaboradores 2007) e importantes para o estudo de comportamento (Bucan e Abel 2002). Além disso, camundongos têm, em geral, grande variação para o cuidado materno (Champagne e colaboradores 2007).

Em resultados anteriores, Peripato e colaboradores (2002) encontraram, por meio da análise de QTL, uma arquitetura genética complexa para um fenótipo relacionado com o cuidado materno: a sobrevivência dos filhotes na primeira semana de vida. Duas regiões (QTLs) apresentam efeito individual, respondendo diretamente por parte da variação no cuidado materno. No entanto, a maioria dos casos (23 regiões) está envolvida em conexões epistáticas.

O desempenho de uma mãe em manter seus filhotes vivos está relacionado a componentes gerais como: reconhecimento dos filhotes (Noirot 1972); aprendizagem e memorização (Dwyer e Lawrence 2000); e mecanismos de depressão, medo e ansiedade (Mayer e Rosenblatt 1987; Hansen e Ferreira 1986; Brunner e colaboradores 1999). Além disso, o próprio comportamento de cuidado materno é composto por comportamentos específicos como: produção e ejeção de leite (Horseman e colaboradores 1997), agressividade contra intrusos (Bateson 1994) e construção de ninho (Bult e Lynch 1997).

Desvendando a arquitetura genética do cuidado materno: construção de ninho

A preparação de um ninho durante a gravidez e sua manutenção após o nascimento dos filhotes é um comportamento comum em fêmeas de camundongos (Weber e colaboradores 2008). A construção de ninho é também comum em machos e fêmeas para repouso e termorregulação (ninhos de adultos), e parecem ter bases genéticas em comum com a construção de ninhos maternos (Lynch, 1981). Em ambiente natural, camundongos constroem ninhos usando pêlos, grama e outras plantas (Alcock 1993 – em Weber e colaboradores 2008). O tamanho de um ninho continua a aumentar durante a gestação e depois gradualmente diminui após o parto de acordo com a influência hormonal (Lisk e colaboradores 1969); mostrando a regulação nesse comportamento para melhores condições aos filhotes no nascimento.

A construção de ninhos é um importante comportamento de cuidado materno pelo seu papel na proteção contra predadores (Boake 1994), manutenção da temperatura (Lynch 1994) e redução da evaporação de água do corpo (Friedman e Bruno 1976). Além disso, o agrupamento dos filhotes em um ninho aumenta o contato com a mãe – facilitando o cuidado materno (Fleming e colaboradores 1999). Assim, o comportamento de construção de ninho materno tem, teoricamente, uma alta influência no *fitness* (Falconer e Mackay 1996). Camundongos selecionados para a adaptação ao frio constroem melhores ninhos de adultos para proteção individual (Barnett e Dickson 2008). Bult e Lynch (1997) selecionaram linhagens de camundongos para a construção de ninho e obtiveram diferentes respostas adaptativas, com diferentes componentes genéticos. Esses resultados suportam a associação de ninhos em geral com o *fitness* e mostram uma resposta desse comportamento à seleção natural.

Comportamentos essenciais para o *fitness* em ambientes naturais, como a construção de ninho, têm a mesma motivação em animais em ambientes artificiais (Dawkins 1998). Em laboratório, a oportunidade para a criação de ninhos (com materiais) parece importante para reprodução e nascimento bem sucedido (Wallace 1981).

O comportamento geral de construção de ninho (em machos e fêmeas) apresenta, em camundongos, uma herdabilidade ampla moderada ($H^2=0,62$); indicando alta variação genética total e baixa variação genética aditiva ($h^2=0,21$) (Lee 1973; Lynch 1994). Essa assimetria entre variação genética de interações e aditiva indica a importância do comportamento de construção de ninho para o *fitness*. O aumento na qualidade de ninho

construído por híbridos entre linhagens de camundongos corrobora a presença de conexões de dominância e epistasia para esse fenótipo (Lee 1973).

Assim, parece existir uma arquitetura genética do tipo II para o comportamento de construção de ninho devido à ação da seleção natural eliminando variação genética aditiva, mas com efeitos de interações entre componentes genéticos mantendo a variação genética total.

Estudos mostram a relação entre o comportamento de construção de ninho e outros fenótipos; sugerindo existência de pleiotropia. Porém, tais resultados para essas conexões ainda são escassos e as bases genéticas para a construção de ninho ainda é pouco compreendida (Boake 1994; Weber e colaboradores 2008).

De acordo com Bult e Lynch (2000), a qualidade do ninho está associada positivamente com a ingestão de alimentos na fase materna de camundongos. Camundongos com maiores peso e taxa de gordura também constroem melhores ninhos, provavelmente conectados a um mecanismo geral de proteção contra o frio (Barnett e Dickson 2008). O número de filhotes pode ser outro fenótipo relevante pela sua conhecida influência no comportamento de construção de ninho em fêmeas de ratos (Lee JG 1973) e pela perturbação dos filhotes nas condições do ninho pós-parto. Além disso, a maior quantidade de filhotes exigirá da fêmea uma maior ingestão de alimentos e, conseqüentemente, pode ter um efeito indireto na qualidade do ninho (Bult e Lynch 2000).

O comportamento de construção de ninho pode estar conectado também com o comportamento geral de ansiedade, pois a hiperatividade resultante diminui o tempo da mãe perto do local do ninho (Brunner e colaboradores 1999) e, logo, o tempo gasto em sua construção e manutenção. Camundongos mutantes sem o gene VDR (*vitamin D receptor*) são mais ansiosos e têm problemas com alguns comportamentos maternos, incluindo uma deficiência na construção de ninho (Keisala e colaboradores 2007). Além disso, Boccia e Pedersen (2001) separando filhotes de camundongos das mães em diferentes intervalos de tempo encontraram um aumento na ansiedade e uma queda na qualidade dos ninhos em separações mais longas; indicando componentes genéticos e hormonais em comum entre a ansiedade e o comportamento de construção de ninho. O efeito da idade das fêmeas pode ser outro fator importante devido às diferenças fisiológicas do envelhecimento sobre comportamentos gerais (Markowska 1998).

As linhagens SM/J e LG/J usadas em nosso laboratório apresentam variação para os fenótipos construção de ninho (Peripato e Cheverud 2002; Peripato e colaboradores 2002; Sauce e colaboradores 2008; Sauce e colaboradores 2009); peso (Cheverud e colaboradores 2004, Hrbek e colaboradores 2006), tamanho de ninhada (Peripato e colaboradores 2004, Gallo e colaboradores 2008), ansiedade (Sauce e colaboradores 2009), entre outras. Além disso, camundongos deficientes (pela técnica de nocaute) para o gene *Peg3* (*Paternally Expressed Gene 3*) constroem ninhos de pouca qualidade (Li e colaboradores 1999). Estudando a relação do gene *Peg3* com o cuidado materno, encontramos grande variação entre as linhagens LG/J e SM/J na seqüência e expressão desse gene candidato (Chiavegatto e colaboradores 2008). Tais fatos – aliados ao rico banco de dados genéticos para camundongos, à endogamia nas duas linhagens e à associação das progênes com desempenho materno geral – representam uma grande oportunidade para o estudo da arquitetura genética do comportamento específico de construção de ninho.

Neste trabalho, investigamos a arquitetura genética da construção de ninho e testamos a hipótese de que a variação existente em tal comportamento apresenta uma arquitetura genética do tipo II. Por ser um fenótipo complexo e relacionado com o *fitness*, esperamos muitos componentes genéticos com efeitos médios de cada gene e um grande número de conexões de dominância e epistasia.

Verificamos a arquitetura genética dos fenótipos de peso e ansiedade para conhecermos se existem componentes genéticos conectados também com o comportamento de construção do ninho. Além disso, testamos as possíveis conexões da construção de ninho com os componentes fenotípicos de idade, tamanho de ninhada, peso e ansiedade.

Verificamos também se existem regiões (QTLs) associadas à construção de ninho próximas às regiões encontradas para desempenho materno por Peripato e colaboradores (2002).

MATERIAL E MÉTODOS

Cruzamentos e procedimentos gerais com os camundongos

Utilizamos fêmeas resultantes do inter cruzamento das linhagens endogâmicas Small (SM/J) e Large (LG/J) oriundas do Jackson Laboratory, EUA. Experimentos distintos criaram essas linhagens: LG/J originou-se de uma população albina selecionada para tamanho grande de corpo aos 60 dias (Goodale 1938) e SM/J originou-se de uma seleção para tamanho pequeno de corpo aos 60 dias (MacArthur 1944). Ambas as linhagens são homozigóticas entre si para todos os locos – com exceção do loco *Agouti* na linhagem SM/J devido a problemas de viabilidade (Hrbeck e colaboradores 2006) – e foram utilizadas em pesquisas envolvendo obesidade, crescimento, estrutura óssea, tamanho de ninhada e cuidado materno (Vaughn e colaboradores 1999; Cheverud e colaboradores 2004; Günter e colaboradores 2008; Peripato e colaboradores 2002, 2004).

Realizamos o cruzamento do tipo Progênie F₂ de Intercruzamento, que envolve o cruzamento de duas linhagens endogâmicas. Os animais F₁ resultantes, todos heterozigotos, são inter cruzados gerando os animais da geração F₂. Os indivíduos F₂, por apresentarem a segregação dos alelos parentais, permitem a identificação da variação fenotípica em conjunto com a variação genotípica (Lynch e Walsh 1998).

Inicialmente, cruzamos machos SM/J com fêmeas LG/J – que produziram híbridos (F₁, e classificados como tipo A) autossomicamente idênticos entre si e heterozigotos para cada um dos locos que diferem entre as linhagens parentais. Também cruzamos machos LG/J com fêmeas SM/J (híbridos resultantes classificados como tipo B) para uma representatividade nos cromossomos sexuais X e Y de ambas as linhagens parentais. Na terceira semana após o parto realizamos o desmame, separando os animais em caixas com até cinco animais/caixa do mesmo sexo. Pesamos os animais F₁ semanalmente após uma semana de vida até sete semanas. Após a maturidade sexual (sete a dez semanas), encaminhamos os animais para reprodução. Para compor o cruzamento F₁x F₁, realizamos todas as combinações de cruzamentos entre os tipos A e B de indivíduos.

I- Grupo fêmea SM/J x Macho LG/J:

♀ A x ♂ B

♀ A x ♂ A

II- Grupo fêmea LG/J x Macho SM/J:

♀ B x ♂ A

♀ B x ♂ B

Cruzamos os animais F₂ aleatoriamente (por sorteio) entre famílias; evitando cruzamento entre irmãos. Realizamos 258 cruzamentos F₂xF₂.

Controlamos as condições do biotério com a temperatura por volta de 22°C e fotoperíodo de 12 horas. Alimentamos os animais sem restrições para comida e água (*ad libitum*). Todos eles são mantidos em caixas dentro de um compartimento de purificação de ar (rack ventilada Alesco - ALERKD-112). Identificamos todos os animais por meio do corte nos dedos no sétimo dia de vida – com, no máximo, dois dedos retirados de cada membro (Figura 1). Fizemos todos os cruzamentos em caixas separadas por casais e pesamos os animais uma vez por semana para a detecção da gravidez. Com a fêmea grávida, retiramos o macho e realizamos o procedimento de análise do comportamento pré e pós-parto. Após o término dos experimentos, sacrificamos e realizamos a necropsia dos animais – retirando órgãos para procedimentos moleculares.

Fenótipo

Para uniformidade de variáveis externas, realizamos todos os testes e observações na sala ambiente dos animais, respeitando o mesmo período do dia (entre 8:00 e 14:00 horas). Utilizamos fluxo laminar (Veco CFLH-09) para avaliação de ninho e peso; e um espaço com laterais fechadas, permitindo o isolamento dos animais, para teste de ansiedade. Conduzimos todos os procedimentos de acordo com protocolo aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de São Carlos.

Construção de ninho

Avaliamos o fenótipo de construção de ninho em 238 fêmeas F₂ no pré-parto (dias da detecção de gravidez até parto) e 241 pós-parto (durante 7 dias após o parto). Realizamos dois métodos diferentes para o experimento da construção do ninho: método inicial e alterado.

Método inicial: adicionamos, no primeiro dia de experimentação pré-parto, algodão diretamente acima da maravalha – em porções visualmente parecidas para cada fêmea. Por estar junto da fêmea, a picotagem do algodão poderia, com maior probabilidade,

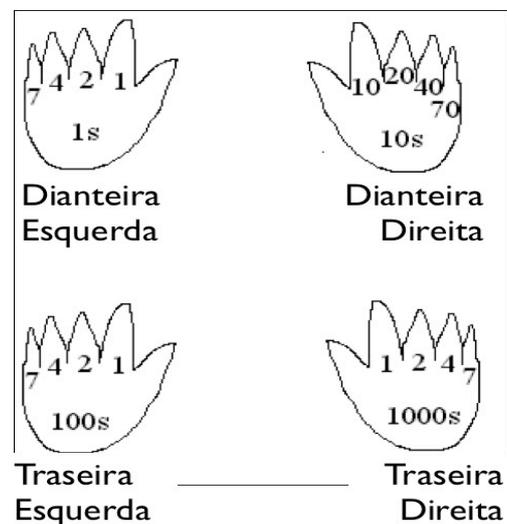


Figura 1: Representação do sistema de numeração para a identificação dos animais.

ser fruto de um comportamento agressivo ou de estresse; superestimando o comportamento de construção de ninho pela presença aleatória do algodão. Classificamos a qualidade do ninho (ruim, regular, intermediário, bom, ótimo) no período pré e pós-parto. Percebemos, com o tempo, alta subjetividade nessa classificação, pois não tínhamos critérios claros para a distinção. Medimos a largura, comprimento e altura do ninho construído (em centímetros) no período pré-parto. Percebemos em nossos animais que a largura e comprimento dos ninhos recebiam muita influência do tamanho da fêmea. Anotamos a localização do ninho construído (nove áreas da caixa) pré e pós-parto. Observamos a localização da mãe (dentro ou fora do ninho) e a presença de maravalha no fundo do ninho (sim ou não); porém, percebemos com o tempo que ambas as variáveis dependiam muito do momento de observação e da forma de manuseio. Evitamos perturbar o ninho durante os dias de observação. Com isso, não pudemos inferir se a fêmea tinha um bom desempenho na construção do ninho durante todos os dias pré-parto, pois, depois de construído, a estrutura geralmente se mantinha da mesma forma em todos os dias subsequentes.

Após 108 fêmeas fenotipadas, reconhecemos as falhas do método inicial. Em uma nova revisão pela literatura e com o acúmulo de conhecimento prático, alteramos vários aspectos do experimento de construção de ninho. Utilizamos o segundo método para as 133 fêmeas restantes.

Método alterado: passamos a colocar algodão (média de $3,67 \pm 0,48g$) sobre a grade divisória da caixa do animal, abaixo do bebedouro de água. Adicionamos também um pedaço de papel (média de $1,08 \pm 0,03g$) acima do algodão para compararmos possíveis diferenças no uso entre o algodão e o papel – observada em outros trabalhos (Sherwin 1997; Van de Weerd 1998). A cada dia do período pré-parto retiramos toda a maravalha, algodão e papel da caixa da fêmea; depois adicionamos tudo novo – obrigando a fêmea a recomeçar a construção do ninho. Isso garante que os ninhos de cada dia do experimento sejam resultados do comportamento diário de captura de materiais e construção (Schneider e Chenoweth 1970; Lee 1973; Lynch e Roberts 1984). Não realizamos essas perturbações diárias no período pós-parto para não prejudicarmos a relação materna com os filhotes.

Pesamos as quantidades de algodão e papel colocados e retirados no período pré-parto para termos uma medida quantitativa do uso desses materiais e da qualidade do ninho (Deacon 2006). Passamos a medir apenas a altura do ninho (valor mínimo e máximo) – agora nos períodos pré e pós-parto. Deixamos de observar a localização da mãe e a presença

de maravalha no fundo do ninho. Continuamos anotando a localização do ninho construído (nove áreas da caixa) pré e pós-parto.

Em ambos os métodos, consideramos o uso do algodão pela fêmea um indicador da sofisticação e resistência do ninho construído (Bult e Lynch 1996). Anotamos também o fechamento do ninho com maravalha e/ou algodão, pois esperamos que um ninho fechado com filhotes em ambiente natural proteja melhor contra predadores e variação de temperatura. Consideramos também a altura do ninho para o isolamento dos filhotes. No período pós-parto, registramos a temperatura interna do ninho em relação ao ambiente externo durante o segundo e quarto dia após o parto; anotando o valor após um minuto de permanência do medidor (termômetro digital in/out TM882) dentro do ninho.

Consideramos pouco confiáveis e/ou irrelevantes os dados pré e pós-parto de Presença de Algodão, Qualidade do Ninho, Localização do Ninho, Localização da Mãe, Presença de Maravalha no Fundo do Ninho, Comprimento do Ninho e Largura do Ninho. Descartamos todos esses dados antes das análises.

Para as análises subsequentes do comportamento de construção de ninho, usamos as seguintes variáveis:

- Presença do Ninho (0 = ausente; 1 = presente), pré e pós-parto;
- Fechamento do Ninho (0 = não, ou aberto; 1 = sim, ou fechado), pré e pós-parto;
- Altura do Ninho (em centímetros, cm), pré e pós-parto;
- Algodão Usado (em gramas, g), pré-parto, sendo a diferença entre a quantidade de algodão colocado e retirado no intervalo de um dia;
- Papel Usado (em gramas, g), pré-parto, sendo a diferença entre a quantidade de papel colocado e retirado no intervalo de um dia;
- Variação de Temperatura, sendo a diferença entre a temperatura externa e interna no dia 2 e 4 pós-parto (em graus Celsius, °C).

Registramos também o comportamento de construção de ninho nas fêmeas das linhagens SM/J (n=29), LG/J (n=22) e F₁ (n=23) em fase materna. Com isso, pudemos comparar os fenótipos entre esses animais e em relação às fêmeas F₂ para checarmos possíveis conexões entre componentes genéticos desse fenótipo. Usamos, para essas análises, os fenótipos Presença do Ninho, Fechamento do Ninho e Altura do Ninho durante a gravidez

do primeiro parto de cada fêmea. Não avaliamos o ninho no período pós-parto para não prejudicarmos a geração dos indivíduos F₂.

Fizemos registros de ninho em 11 machos da linhagem F₂ para conhecermos se o comportamento de construção de ninho em nossos animais depende do gênero. Seguindo a mesma idéia, utilizamos dados de fêmeas da linhagem F₂ fora da fase materna (sem experiência com parto, mas que não eram virgens) para testarmos se o comportamento analisado sofre influência diferencial pela fase materna. Usamos para as análises de ambos os controles os mesmos fenótipos de nossas fêmeas F₂ em fase materna.

Análise dos resultados de construção de ninho

Ponderamos os dados de ninho de acordo com a importância relativa de cada dia. No período pré-parto, demos maior peso aos dias mais próximos do parto, pois representam condições mais próximas das que os filhotes terão ao nascerem. Sendo 12 o número total de dias pré-parto em fêmeas F₂ em fase materna (o tempo mais longo observado), o multiplicador é: 12/12 para o dia anterior ao parto, (12-1)/12 para o segundo dia antes do parto, (12-2)/12 para o terceiro antes do parto e sucessivamente. No período pós-parto, demos maior peso também para os dias mais próximos do parto, devido à maior fragilidade (e necessidade) dos filhotes. Assim, sendo 7 o número total de dias pós-parto, o multiplicador foi: 1/7 para o primeiro dia após o parto, (1+1)/7 para o segundo dia antes do parto e sucessivamente.

Depois das ponderações, fizemos a média entre todos os dias, separados para os períodos pré e pós. Ponderamos cada dia na divisão (com as mesmas taxas ou índices das ponderações dos dados), para evitar assimetrias dos valores entre fêmeas com diferentes quantidades de dias observados. O resultado, então, foi o valor único para cada fêmea (para cada fenótipo). Realizamos essas transformações dos fenótipos de construção de ninho para todos os animais analisados (fêmeas SM/J, fêmeas LG/J, fêmeas F₁, fêmeas F₂ em fase materna, fêmeas F₂ fora da fase materna, e machos F₂).

Com o intuito de reduzirmos o número de variáveis da construção de ninho para as análises de QTL, usamos, com o programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009), a Análise de Componente Principal (PCA) (Pearson 1901 – em Zar 1999): que transforma um número de variáveis correlacionadas em um número menor de variáveis sem correlação.

Devido ao número reduzido de fêmeas amostradas SM/J, LG/J e F₁ (desfavorecendo uma distribuição normal de nossos dados), e à natureza ordinal da maioria das variáveis utilizamos os testes não-paramétricos de Mann-Whitney (U) (Mann e Whitney 1947 – em Zar 1999) para dois grupos e a análise de variância de Kruskal-Wallis (K) (Kruskal e Wallis 1952 – em Zar 1999) para mais de dois grupos. Calculamos esses valores com o programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009) para conhecermos se existem diferenças significativas entre as fêmeas SM/J, LG/J, F₁ e F₂ em fase materna. Pelos mesmos motivos de baixa amostragem e natureza ordinal das variáveis, também usamos esses testes para compararmos nossas fêmeas F₂ em fase materna com os nossos controles de machos F₂ e fêmeas F₂ fora da fase materna.

Nas fêmeas F₂ em fase materna, confiamos em métodos paramétricos para as análises, pois o grande número de indivíduos amostrados aproxima nossos dados de uma distribuição normal. Realizamos a Análise Multivariada de Variância (MANOVA) (Zar 1999), com o programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009), para conhecermos, com o teste Lambda de Wilks (λ), o efeito do período pré e pós-parto nas variáveis de comportamento de construção de ninho nessas fêmeas.

Peso e Ansiedade

Para o fenótipo peso no período materno, registramos peso de 240 fêmeas desde o primeiro dia do parto até o sétimo dia pós-parto (D1 até D7) e no dia do desmame (D21).

Para avaliarmos ansiedade, usamos o teste do Labirinto em Cruz Elevado (Pellow e colaboradores 1985) originalmente descrito para ratos, mas com validação para camundongos (Lister 1987, Carola e colaboradores 2002). Esse teste é baseado no conflito entre a exploração de locais abertos e a proteção em locais fechados (pelo medo de ambientes abertos) – ambos comportamentos inatos com base ecológica (Walf e Frye 2007). O aparato do labirinto para camundongos (Insight Equipamentos) consiste em 2 braços abertos (30x5x0, 25 cm) dispostos em oposição e 2 braços fechados com uma parede transparente (30x5x15 cm) também opostos, formando uma cruz (Figura 2). Essa cruz encaixa-se em uma base

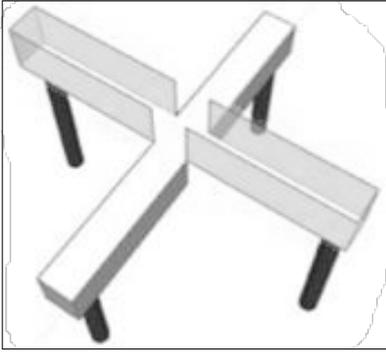


Figura 2: Representação do Labirinto em Cruz Elevado para o teste de ansiedade.

elevada a 38,5 cm de altura. Colocamos o animal no centro da cruz, com a cabeça voltada para o braço aberto norte, e gravamos os seus movimentos com uma filmadora durante 5 minutos. Realizamos esses procedimentos em 182 fêmeas F₂ no quarto dia pós-parto (D4).

Para conhecermos o quanto desse teste reflete a fase materna das fêmeas, fizemos testes de Labirinto em Cruz Elevado com 103 fêmeas F₂ fora da fase materna (mesmas fêmeas testadas em fase materna com, no mínimo, três semanas após o parto). Realizamos também testes de Labirinto em Cruz Elevado em 13 fêmeas SM/J e 6 fêmeas LG/J em fase materna. Assim, testamos a presença de variações nesses fenótipos entre as linhagens parentais.

Análise dos resultados de Peso e Ansiedade

Utilizamos a variação do peso (VP) logo após o parto (PP) até o desmame (PD) após três semanas (VP=PD-PP). Fizemos uma análise de correlação de Pearson (r) (Pearson 1920 – em Zar 1999), usando o programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009), entre cada dois dias sequenciais e encontramos duas tendências distintas na variação de peso do parto até o desmame. O registro D1 ainda sofre os efeitos da perda de peso do parto, mas do D2 até o D5 as fêmeas, em geral, ganham peso. No D6 até o D21, as fêmeas perdem peso. Assim, separamos o fenótipo de peso em duas variáveis: Peso entre o segundo dia até quinto dia pós-parto (VP1=D5-D2) e peso entre o sexto dia e o vigésimo primeiro dia pós-parto (VP2=D21-D6). Verificamos estatisticamente as diferenças entre VP1 e VP2 nas fêmeas F₂ em fase materna usando o teste paramétrico *t* de Student (Fisher 1925 – em Zar 1999).

Utilizamos o programa *X-Plo-Rat* (versão 1.1.0 de 2005; disponível em <http://scotty.ffclrp.usp.br>) para a interpretação manual das gravações dos testes de Labirinto em Cruz Elevado. Avaliamos a frequência de entrada completa (com as quatro pernas) nos braços abertos (Frequência Aberto) e fechados (Frequência Fechado); e o tempo de permanência de cada animal nos braços abertos (Tempo Aberto) e nos braços fechados (Tempo Fechado).

Para as linhagens SM/J e LG/J (com pouco número de dados) utilizamos o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (U) (Mann e Whitney 1947 – em Zar 1999) com o programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009) para compararmos, dentro de cada

linhagem, a frequência de entrada e tempo de permanência entre os braços abertos e fechados. Isso permitiu conhecermos a presença de ansiedade em cada linhagem parental.

Para as fêmeas F_2 , usamos os fenótipos Frequência Relativa Aberto (frequência de entradas nos braços abertos dividida pela frequência de entradas no braços aberto e fechados, em %) e Tempo Relativo Aberto (tempo de permanência nos braços abertos dividido pelo tempo de permanência nos braços aberto e fechados, em %). Esses fenótipos são importantes por fornecerem uma medida do comportamento de exploração (negativamente relacionado com a ansiedade) retirando a influência da locomoção em geral (Walf e Frye 2007). Usando esses valores, comparamos as fêmeas F_2 controle fora da fase materna com as fêmeas F_2 em fase materna utilizando o teste Lambda de Wilks (λ) (fenótipos de ansiedade agrupados) e o teste F (fenótipos de ansiedade separados) de uma MANOVA (Zar 1999) com o programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009).

Fizemos o teste de Mann-Whitney (U) (Mann e Whitney 1947 – em Zar 1999), com o programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009), para conhecermos se existem diferenças significativas entre as fêmeas das linhagens SM/J e LG/J e com cada linhagem parental entre as fêmeas F_2 em fase materna para os fenótipos Frequência Relativa Aberto e Tempo Relativo Aberto.

Tamanho de Ninhada e Idade

Registramos o número de filhotes nascidos (Tamanho de Ninhada) nas linhagens SM/J e LG/J, e as gerações F_1 e F_2 . Para termos uma idéia da relação do Tamanho de Ninhada e a variação do peso, fizemos uma análise de correlação de Pearson (Pearson 1920 – em Zar 1999) entre peso (VP1 e VP2) e Tamanho de Ninhada usando o programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009).

A comparação do Tamanho de Ninhada entre todas nossas linhagens e intercruzamento informou sobre as interações dos componentes genéticos desse fenótipo. Para as análises desses valores entre as linhagens, usamos os testes de Mann-Whitney (U) (Mann e Whitney 1947 – em Zar 1999) e de Kruskal-Wallis (K) (Kruskal e Wallis 1952 – em Zar 1999) com o programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009).

Registramos também a idade das fêmeas F_2 (do nascimento até o parto) para testarmos sua influência nos fenótipos de construção de ninho.

Análise do Fenótipo em geral

Antes de todas as análises dos fenótipos, retiramos todos os registros com vazamento do bebedouro (aproximadamente 15 registros). Por preencher a caixa do animal com água, consideramos tal evento um fator estressante para fêmea e, assim, uma interferência nos fenótipos. Depois, checamos os valores muito discrepantes para as variáveis de ninho, peso e ansiedade; e retornamos aos registros originais para esclarecimento. Decidimos manter os poucos dados discrepantes (um pouco mais de três desvios padrão) que restaram por não conhecermos a distribuição probabilística de nossa população para esses fenótipos.

Testamos, separadamente, a influência da idade, tamanho de ninhada, peso e ansiedade das fêmeas F₂ em nossos fenótipos, em conjunto, de construção do ninho pré-parto e construção pós-parto. Para isso, usamos no programa *SYSTAT 13.0* (SYSTAT Software Inc. 2009), Análise de Correlação Canônica (R²) (Hotelling 1936 – em Zar 1999) para conhecermos a correlação entre dois conjuntos de variáveis e a significância dessas conexões entre os componentes fenotípicos.

Usamos o *General Linear Model* (GLM), com o programa *SYSTAT 13.0* (SYSTAT Software Inc. 2009) para conhecermos o efeito das variáveis peso, ansiedade, idade e tamanho de ninhada como um todo nas variáveis de construção de ninho em F₂; separadamente para pré e pós-parto. Testamos, assim, todas as conexões entre os fenótipos e a influência dessas interações no comportamento de construção de ninho. Para o modelo, usamos as funções lineares:

$$NPré = \mu + TN + I + VP1 + VP2 + FA + TA + e$$

$$NPós = \mu + TN + I + VP1 + VP2 + FA + TA + e$$

Sendo NPré = todos os fenótipos de ninho pré-parto; NPós = todos os fenótipos de ninho pós-parto; μ = constante; TN = o tamanho da ninhada nascida; I = a idade da fêmea ao parto; VP1 = a variação de peso entre o segundo e quinto dia após o parto; VP2 = a variação de peso entre o sexto e 21º dia após o parto; FA = a frequência de entradas relativas (%) nos braços abertos do labirinto; TA = o tempo de permanência relativa (%) nos braços abertos do labirinto; e e = resíduo.

Usamos um nível de significância, alfa, de 0,05 para todos os testes entre os fenótipos. Em Resultados, destacamos todos os valores significativos com um asterisco (*).

Genótipo

O cruzamento do tipo Progênie F₂ de intercruzamento em camundongos permite a varredura do genoma completo por QTLs com, geralmente, 70 a 90 marcadores uniformemente distribuídos (Williams, 1998). No presente estudo, utilizamos 101 marcadores moleculares de microssatélites para cada uma das 234 fêmeas F₂. Esses marcadores abrangem todos os 19 cromossomos autossômicos e o cromossomo sexual X de forma aproximadamente uniforme (Figura 3), e são polimórficos (no número de repetições) nas linhagens SM/J e LG/J; com tamanhos suficientemente distintos para separação visual em gel de agarose. Um animal F₂ pode herdar as duas regiões microssatélite da linhagem SM/J, as duas da LG/J, ou uma região de cada linhagem. Considerando o tamanho do microssatélite de cada linhagem parental, conhecemos o genótipo das fêmeas F₂.

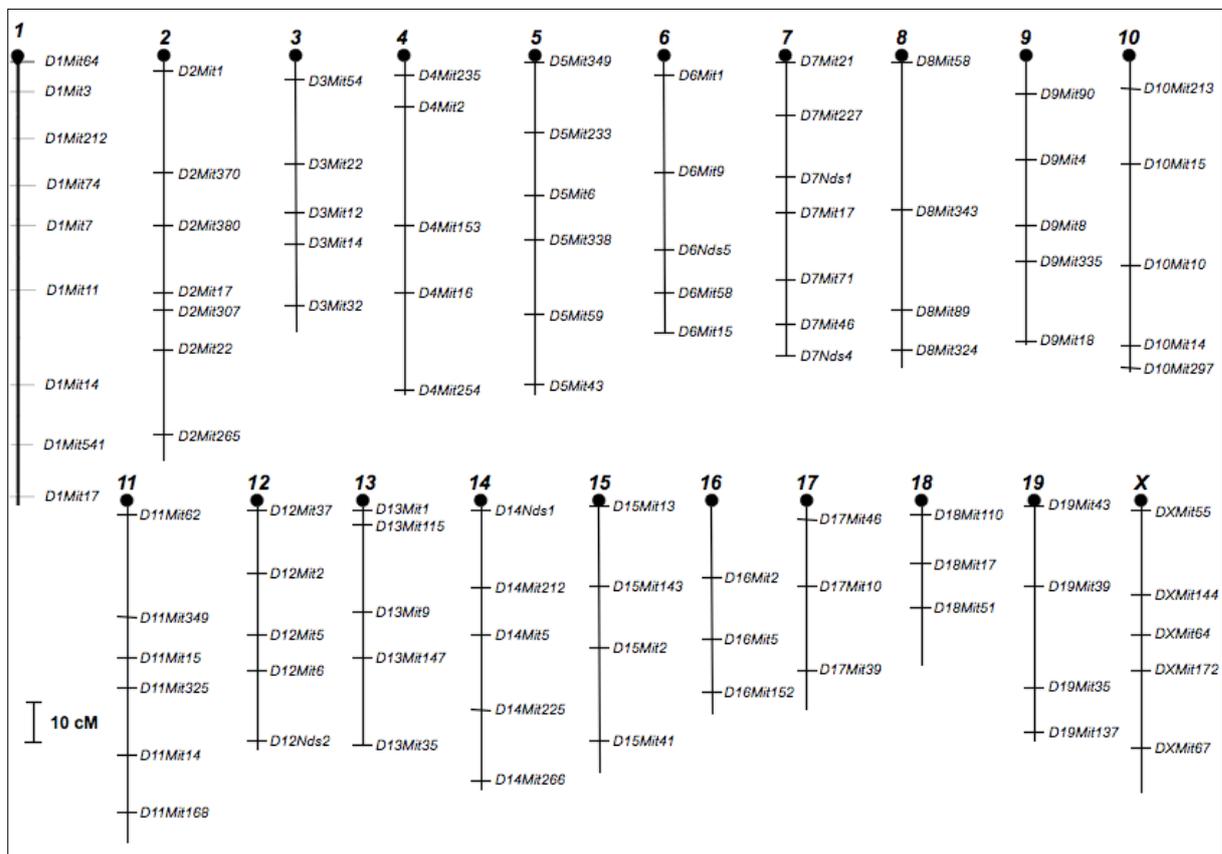


Figura 3: Localização dos marcadores microssatélites que usamos nos 20 cromossomos (19 autossômicos e 1 sexual) do genoma de camundongos.

Extraímos o DNA celular total do fígado das 234 fêmeas F₂ com o protocolo de tiocianato de guanidina (Nelson e Krawetz, 1992). Utilizamos a técnica de PCR com auxílio de um aparelho termociclador PTC 200 (BIORAD) para amplificarmos os marcadores moleculares. Para cada conjunto de *primers*, padronizamos a temperatura de hibridização (com diferentes gradientes de temperatura com o DNA das linhagens SM/J, F₁ e LG/J).

Baseamos no protocolo para microssatélites descrito por Dietrich e colaboradores (1992) e modificado por Routman e Cheverud (1994). As modificações envolvem a adição de corante (Vermelho de Cresol) e sacarose entre os componentes da PCR que não alteram seu produto, e facilita a aplicação, pois adicionamos o corante à solução principal e depois distribuímos entre os tubos individuais. Isso permitiu genotiparmos um grande número de indivíduos rapidamente, pois aplicamos o material amplificado diretamente no gel de corrida.

Aplicamos o produto da PCR em gel de agarose 3% ou 5% – dependendo do marcador – com tampão de TBE “1X” (tris-Cl a 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA a 20mM e água destilada) e com Brometo de Etídio. Usando uma cuba com tampão TBE, com metade (0,5X) da concentração do gel, atraímos o DNA aplicado para o pólo positivo a 200mA. Após a separação do material, fotografamos o gel para genotipagem das fêmeas.

Devido o limite de 96 poços da placa, fizemos, para cada marcador, 92 fêmeas F₂ por vez, mais os indivíduos parentais LG/J e SM/J e F₁ e um poço controle (sem DNA) para testarmos contaminação. No total, realizamos cerca de 25.000 genotipagens.

Análise de QTL

Com os dados genotípicos das fêmeas F₂, conhecemos a origem (SM/J+SM/J, SM/J+LG/J ou LG/J+LG/J) e, conseqüentemente, a taxa de recombinação entre os marcadores microssatélites. Usando a função Kossambi, com o programa *Map Manager QTX* (Manly e colaboradores 2001), criamos o mapa de ligação dos marcadores para o nosso intercruzamento. Com isso, realizamos o mapeamento por intervalo, no qual criamos intervalos teóricos de 2cM entre cada marcador, calculando as diferentes probabilidades do valor genotípico para cada região (Lander e Botstein 1989).

Utilizamos a análise de QTL para testarmos a associação entre os genótipos e fenótipos. Essa técnica, apesar de dispendiosa, é ainda hoje eficiente em diferentes estudos (Hunter e Crawford 2008), e permite investigar a arquitetura genética envolvida no fenótipo em questão. A análise combina genética quantitativa com mapa genético e é uma importante ferramenta na tentativa de apontar genes candidatos; sendo especialmente útil para elucidar o tipo de efeito dos genes (Lynch e Walsh 1998; Flint 2003). A análise de QTL é uma correlação entre fenótipos segregantes e marcadores genéticos polimórficos dispersos no genoma; e consiste em uma varredura de regiões que tenham genes (transmitidos em conjunto na meiose) afetando o fenótipo em questão (Liu 1997).

Análise de QTL individual

Usamos 10 fenótipos para as análises de QTL – sete relacionados com o comportamento de construção de ninho (três pré-parto e três pós-parto), dois com peso e dois com ansiedade.

A. Construção de ninho pré-parto: Presença do Ninho e Estrutura do Ninho. Ambos vetores resultantes de uma PCA entre as variáveis Presença do Ninho, Fechamento do Ninho e Altura do Ninho. Material Usado, como um vetor resultante da PCA entre as variáveis Algodão Usado e Papel Usado.

B. Construção de ninho pós-parto: Presença do Ninho e Estrutura do Ninho. Ambos vetores resultantes de uma PCA entre as variáveis Presença do Ninho, Fechamento do Ninho e Altura do Ninho. Variação de Temperatura, isoladamente.

C. Peso: Variação de peso do D2 até D5 (VP1) e variação de Peso do D6 até D21 (VP2).

D. Ansiedade: Frequência relativa de entradas nos braços abertos (Frequência Relativa Aberto) e tempo relativo de permanência nos braços abertos (Tempo Relativo Aberto).

Estimamos a presença de potenciais QTLs e as suas posições relativas por mapeamento por intervalo (Lander e Bolstein 1989) usando análise de regressão múltipla (Haley e Knott 1992). Essa análise consiste na regressão do fenótipo pelos registros de genótipo em intervalos de 2 cM ao longo de cada cromossomo. Esses coeficientes de regressão são as estimativas dos valores genotípicos aditivos (a) e de dominância (d) se um QTL ocorre na posição testada (Falconer e Mackay 1996). Obtivemos a probabilidade de um gene afetar o fenótipo naquela posição específica usando o procedimento MIXED no programa *SAS 9.0* (SAS Institute 2004). Mesmo desconhecendo a distribuição probabilística da maioria dos nossos fenótipos, utilizamos modelos paramétricos pela acurácia do método (Kort 1973) e sucesso em análises de QTL (Visscher e colaboradores 1996, Rebai 1997). Avaliamos a significância estatística do teste utilizando “LOD” (*logarithm of odds*) scores. Por meio de uma PCA (Pearson 1901 – em Zar 1999), com programa SYSTAT 13.0 (SYSTAT Software Inc. 2009), obtivemos os valores vetoriais (*eigenvalues*) da matriz dos intervalos genotípicos entre os microsatélites. Assim, calculamos com o modelo os LOD scores em dois níveis de significância – no nível cromossômico e no nível genômico, baseados no modelo multiloco de Li e Ji (2005). Os LOD scores acima do valor de significância no nível do cromossomo apenas sugerem associação entre o componente genético e o componente

fenotípico. Esse valor de significância é muito informativo, pois representa um equilíbrio entre a eliminação de resultados falsos positivos evitando falsos negativos (Weller e colaboradores 1998). Já LOD scores acima do nível genômico indicam evidência altamente significativa dessa associação (Lander e Kruglyak 1995).

Análise de QTL epistático

Testamos a interação entre todos os nossos genótipos criados pelo mapeamento por intervalos usando o modelo de epistasia “fisiológica” (Cheverud 2000) com o programa *SAS 9.0* (SAS Institute 2004). Nesse modelo, os valores genotípicos epistáticos são definidos e as suas contribuições para as variâncias aditivas e de interações são incluídas simultaneamente em um teste de significância para epistasia. Investigamos cada par de regiões genotípicas dos fenótipos de construção de ninho para as interações epistáticas. Para os fenótipos de peso e ansiedade, investigamos cada par de QTL individual. Realizamos regressões múltiplas com os valores fenotípicos para os pares de locos utilizando os coeficientes genotípicos aditivos, de dominância e os seus produtos. Consideramos como variáveis independentes as formas de interações aditiva-por-aditiva ($X_{a1} * X_{a2}$), aditiva-por-dominante ($X_{a1} * X_{d2}$), dominante-por-aditiva ($X_{d1} * X_{a2}$), e dominante-por-dominante ($X_{d1} * X_{d2}$). Testamos a significância estatística conforme descrito por Routman e Cheverud (1997) e Cheverud (2000). Com nossos marcadores, usamos um valor de threshold para “p” de 1,6E-05. Consideramos o intervalo de confiança de ± 10 cM em cada QTL epistático.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fenótipo

Construção de ninho

As análises do comportamento de construção de ninho entre as linhagens parentais SM/J e LG/J, e as gerações F₁ e F₂ revelaram dados interessantes. Entre as linhagens parentais, não existem diferenças significativas para os fenótipos pré-parto Presença do Ninho (U=355; p=0,4), Fechamento do Ninho (U=236; p=0,09) e Altura do Ninho (U=318; p=0,6). Encontramos, porém, maiores valores médios no inter cruzamento F₁ e F₂ na comparação com as duas linhagens SM/J e LG/J para Presença do Ninho (K=10,277; p=0,02*), Fechamento do Ninho (K=11,228; p=0,02*) e Altura do Ninho (K=51,05; p=0,01*). Entre F₁ e F₂ não existem diferenças para Presença do Ninho (U=3124; p=0,1) e Fechamento do Ninho (U=2870,5; p=0,3), mas a Altura do Ninho é significativamente maior em F₂ (U=1676; p=0,01*). Esses resultados em conjunto (Figuras 4 e 5) indicam um aumento do valor da construção de ninho dos híbridos em relação à média dos parentais. Tal desvio, também chamado de heterose, é encontrado em outros comportamentos (Lee 1973), revelam interações entre os componentes genéticos de um fenótipo (Lynch e Walsh 1998). Esse efeito é resultado do balanço positivo entre os efeitos benéficos da complementaridade na progênie dos genes letais recessivos dos parentais (interações de dominância) e os efeitos prejudiciais da perda de complexos gênicos coadaptados (interações de epistasia) (Lynch e Walsh 1998).

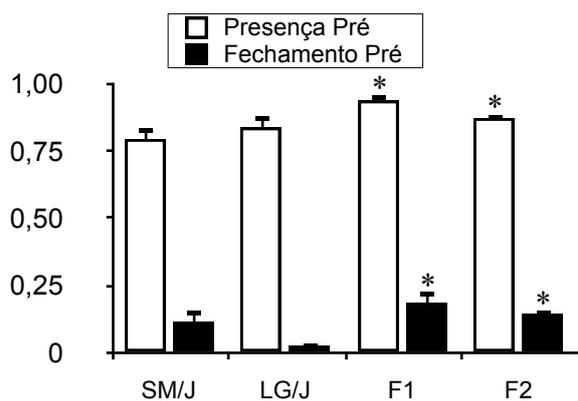


Figura 4: Valores médios de Presença do Ninho e Fechamento do Ninho para fêmeas das linhagens SM/J e LG/J, e as híbridas F₁ e F₂.
* = diferença significativa das parentais.

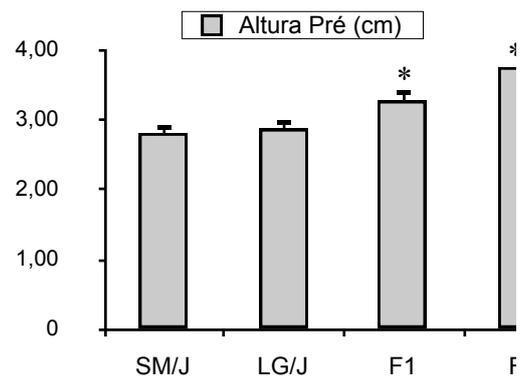


Figura 5: Valores médios de Altura do Ninho para fêmeas das linhagens SM/J e LG/J, e as híbridas F₁ e F₂.
* = diferença significativa das parentais.
** = diferença significativa das parentais e F₁.

Considerando a mesma influência ambiental e a semelhança na construção do ninho entre SM/J e LG/J, somente com interações dominantes e/ou epistáticas as linhagens F₁

e F₂ seriam diferentes das linhagens parentais. Essa conclusão é suportada por uma análise anterior que fizemos com esse mesmo inter cruzamento, e encontramos um aumento na qualidade geral do ninho em F₁ em relação à média das linhagens parentais e uma menor redução, devido à epistasia, da qualidade em F₂ (Sauce e colaboradores 2008).

Em relação ao comportamento de construção de ninhos nas fêmeas F₂ em fase materna, as médias, erros da média e desvios padrão das variáveis pré e pós-parto estão na Tabela 1.

Tabela 1: Número de indivíduos amostrados e médias, para fêmeas F₂ em fase materna, dos valores pré e pós-parto de Presença do Ninho, Fechamento do Ninho e Altura do Ninho (centímetros); e os valores pré-parto Algodão Usado (gramas) e Papel Usado (gramas).

	Período Pré-Parto					Período Pós-Parto			
	Presença do Ninho (0 a 1)	Fechamento do Ninho (0 a 1)	Altura do Ninho (cm)	Algodão Usado (g)	Papel Usado (g)	Presença do Ninho (0 a 1)	Fechamento do Ninho (0 a 1)	Altura do Ninho (cm)	Varição de Temperatura (°C)
Número de Fêmeas F ₂	231	224	224	116	106	241	238	139	232
Média da Linhagem F ₂	0,873 ±0,015	0,145 ±0,015	3,752 ±0,055	1,862 ±0,081	0,761 ±0,042	0,958 ±0,01	0,072 ±0,01	3,217 ±0,089	2,613 ±0,075

O teste Lambda de Wilks da MANOVA mostrou que existem evidências suficientes para as diferenças entre os períodos pré e pós-parto para os fenótipos reunidos Presença do Ninho, Fechamento do Ninho e Altura do Ninho ($\lambda=0,868$; $p=10^{-10}$ *). A Presença do Ninho é maior no pós-parto ($F=13,663$; $p=10^{-3}$ *), mas com o pré-parto com valores maiores para Fechamento do Ninho ($F=8,045$; $p=0,005$ *) e Altura do Ninho ($F=29,181$; $p=10^{-6}$ *). Tais resultados podem ser causados pelas diferentes influências entre os dois períodos na fêmea; com grande estímulo hormonal antes do parto e uma predominância de estímulos sensoriais dos filhotes após o parto (Rosenblatt 1975). Além disso, a presença dos filhotes no pós-parto pode modificar os fenótipos de ninho avaliados. É mais difícil, por exemplo, um ninho permanecer fechado com filhotes se movendo (em comparação a um ninho pré-parto), e mais fácil anotarmos erroneamente a presença de um ninho pós-parto (devido à presença de filhotes na maravalha, em comparação a um ninho pré-parto). Por esses motivos, tratamos os fenótipos pré e pós-parto separadamente para as análises de QTL.

Na comparação entre machos F₂ e fêmeas F₂ em fase materna, verificamos que não existem diferenças significativas para os fenótipos Presença do Ninho ($U=1451,5$; $p=0,7$), Altura do Ninho ($U=1489,5$; $p=0,2$), Algodão Usado ($U=638$; $p=0,9$) e Papel Usado ($U=713$;

$p=0,2$). Entre fêmeas F_2 em fase materna e fêmeas F_2 fora de fase materna não existem diferenças significativas para os fenótipos Presença do Ninho ($U=1086,5$; $p=0,7$), Fechamento do Ninho ($U=1146$; $p=0,1$), Algodão Usado ($U=666$; $p=0,1$) e Papel Usado ($U=376$; $p=0,9$). Ainda na comparação com as fêmeas F_2 em fase materna, as análises mostraram que machos F_2 são inferiores para o fenótipo Fechamento do Ninho ($U=1628$; $p=0,045^*$) e fêmeas F_2 fora da fase materna são inferiores para Altura do Ninho ($U=1425$; $p=0,006^*$). Encontramos diferenças nas comparações entre os três grupos (fêmeas F_2 em fase materna, machos F_2 e fêmeas F_2 fora da fase) para Fechamento do Ninho ($K=6,133$; $p=0,045^*$) e Altura do Ninho ($K=9,109$; $p=0,02^*$) (Figuras 6 e 7). Não existem diferenças entre machos e fêmeas F_2 fora de fase materna para os fenótipos de construção de ninho.

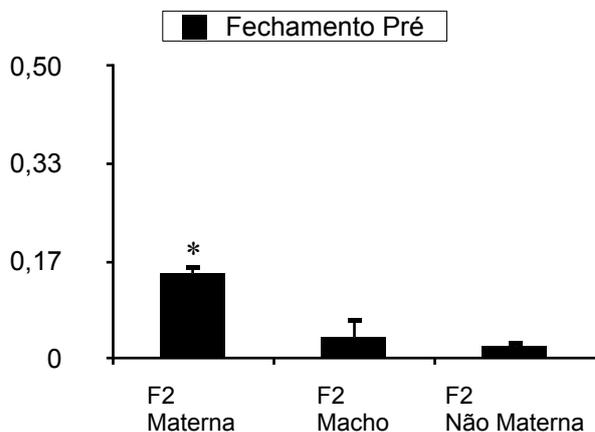


Figura 6: Valores médios de Fechamento do Ninho para fêmeas F_2 em fase materna e fora de fase materna (não materna), e machos F_2 .
* = diferença significativa dos outros grupos.

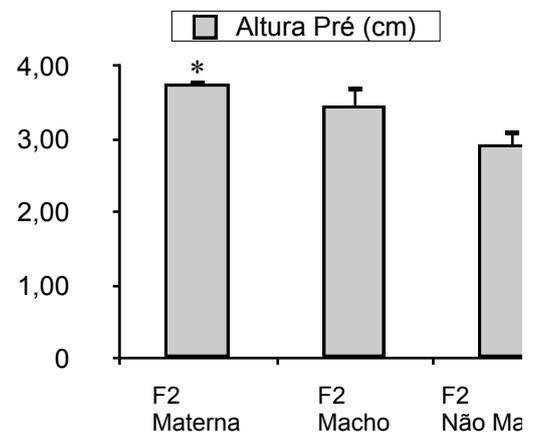


Figura 7: Valores médios de Altura do Ninho para fêmeas F_2 em fase materna e fora de fase materna (não materna), e machos F_2 .
* = diferença significativa dos outros grupos.

As semelhanças gerais na construção de ninho pré-parto entre gênero (macho e fêmea) e momento materno (dentro e fora da fase materna) mostram a proximidade desse comportamento nos animais F_2 em nossas fêmeas. Diferentes de alguns outros mamíferos, o comportamento de construção de ninho em roedores não é específico da fase materna (Weber e colaboradores 2008). Ninhos de adultos (para termorregulação e repouso) e ninhos maternos apresentam semelhanças e diferenças (Denenberg e colaboradores 1969).

As diferenças que encontramos para Fechamento e Altura do Ninho entre os três grupos F_2 sugerem um efeito específico da fase materna (no período pré-parto) para esses dois fenótipos – agrupados nas análises de QTL por representarem a qualidade geral do ninho. Esses resultados são suportados pela evidência que, em camundongos, os ninhos maternos têm em média o dobro da altura dos ninhos de adultos, e são muitas vezes fechados (Weber e

colaboradores 2008). Talvez essa diferença na qualidade do ninho seja por estímulo hormonal específico da gravidez aprimorando a construção normal do ninho para adultos (Schneider e Lynch 1984) de nossos controles com machos e fêmeas fora de fase materna. Assim, o comportamento de construção de ninhos de adultos e ninhos maternos parecem ter componentes genéticos em comum (Lynch, 1981), mas com alguns deles dependentes da fase materna.

Além disso, em nossas fêmeas em fase materna pode existir uma resposta diferencial específica após o parto pelos estímulos dos filhotes. Zarrow e colaboradores (1971) mostraram que a remoção dos bulbos olfatórios em fêmeas de camundongos após o parto impediram a construção de ninhos, possivelmente pelo dano na termorregulação e no reconhecimento dos filhotes na ativação desse comportamento. Pelas diferenças que encontramos em nossas fêmeas F₂ para os fenótipos de ninho entre os períodos pré e pós-parto, talvez esse seja o caso.

Usando a Análise de Componente Principal (PCA) conseguimos, como esperado, reduzir algumas variáveis e conhecer melhor a relação entre elas para as fêmeas F₂ em fase materna para as análises de QTL. A PCA para as variáveis de construção de ninho pré-parto (Presença do Ninho, Fechamento do Ninho, Altura do Ninho, Algodão Usado e Papel Usado) revelou três agrupamentos entre os fenótipos. Devido ao número reduzido de avaliações para as variáveis pré-parto Algodão Usado e Papel Usado (133 fêmeas no método novo, apenas), realizamos uma PCA separada entre ambas variáveis relacionadas com o uso de material. Obtivemos um vetor abrangendo 94,6% de toda a variação no uso de materiais no ninho. Isso significa que as fêmeas que buscam materiais para a construção do ninho não têm, geralmente, preferências: mostrado também pelo alto coeficiente de correlação de Pearson ($r=0,89$) entre o algodão e o papel usados.

Para as variáveis restantes pré-parto Presença do Ninho, Fechamento do Ninho e Altura do Ninho reduzimos os dados para dois vetores (Presença do Ninho e Estrutura do Ninho): que explicam 83,3% de toda a variação. Essa distinção entre estrutura (ou qualidade) e presença do ninho existe na comparação entre as linhagens parentais SM/J e LG/J (Sauce e colaboradores 2009). As fêmeas LG/J constroem ninhos, mas sua qualidade é menor que das fêmeas SM/J. Isso indica a relevância biológica de nossos agrupamentos das variáveis de construção de ninho. De acordo com as variáveis envolvidas, interpretamos o agrupamento da seguinte forma: Presença do Ninho isoladamente para o mesmo fenótipo, Estrutura do Ninho

para altura e fechamento do ninho, e Material Usado para uso de ninho e algodão. Tais agrupamentos de variáveis contém informações distintas quanto à construção do ninho. Utilizamos o valor normalizado desses vetores Presença do Ninho, Estrutura do Ninho e Material Usado em cada fêmea F₂ em fase materna para as análises de QTL (Figura 8).

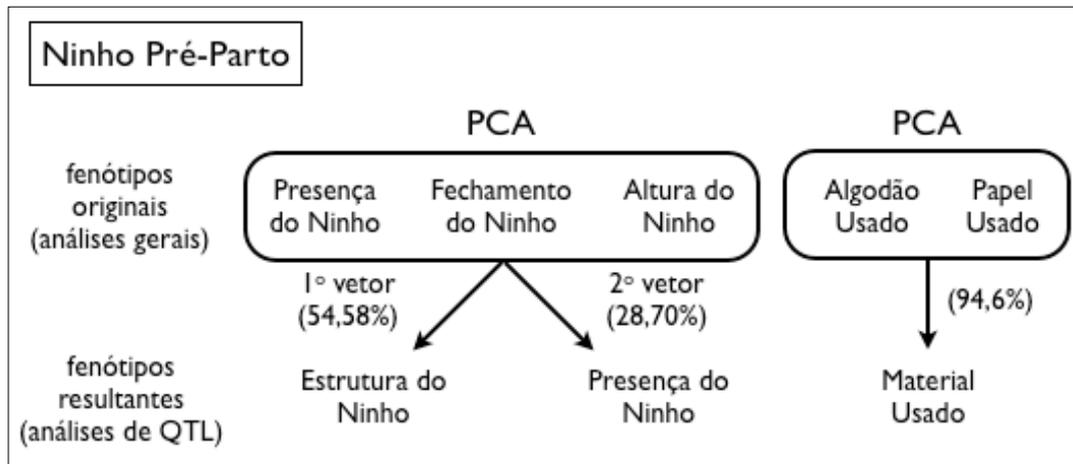


Figura 8: Fenótipos de Ninho Pré-Parto das fêmeas F₂ que usamos nas análises gerais (acima), e a transformação e redução de variáveis, pela PCA, para as análises de QTL (abaixo). Cada valor da seta indica a variação explicada (em %) do vetor em relação às variáveis originais.

Para as variáveis de ninho pós-parto, fizemos a PCA dos fenótipos Presença do Ninho, Fechamento do Ninho e Altura do Ninho para mantermos o padrão da PCA pré-parto. Obtivemos dois vetores explicando 83,9% de toda a variação; que interpretamos como Presença do Ninho e Estrutura do Ninho (da mesma forma que os dados pré-parto). Utilizamos o valor normalizado desses vetores Presença do Ninho e Estrutura do Ninho em cada fêmea F₂ em fase materna para as análises de QTL. Utilizamos o fenótipo Variação de Temperatura inalterado (Figura 9).

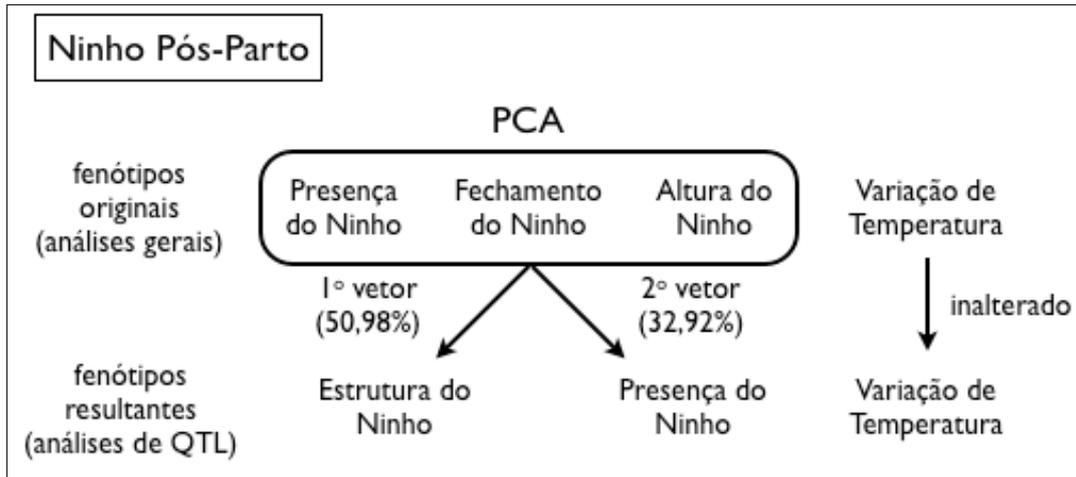


Figura 9: Fenótipos de Ninho Pós-Parto das fêmeas F_2 que usamos nas análises gerais (acima), e a transformação e redução de variáveis, pela PCA, para as análises de QTL (abaixo). Cada valor da seta indica a variação explicada (em %) do vetor em relação às variáveis originais.

Peso

Os dados de peso da fêmea na fase pós-parto, nas fêmeas F_2 , VP1 (entre D5 e D2) e VP2 (entre D21 e D6) revelaram uma grande variação em cada fenótipo (Tabela 2); em especial em VP2, possivelmente pelo maior número de dias envolvidos.

Tabela 2: Número de indivíduos e médias, para as fêmeas F_2 , dos valores de variação de peso entre os dias 2 e 5 pós-parto (VP1, em gramas) e variação de peso entre os dias 6 e 21 pós-parto (VP2, em gramas).

	VP1(g)	VP2 (g)
Número de Fêmeas F_2	234	207
Média da Linhagem F_2	1,618±0,129	-2,295±0,333

O contraste entre VP1 e VP2 ($t=10,956$; $p=10^{-15}$ *) em nossas fêmeas indica que nesse intervalo de três semanas entre o parto e o desmame houve uma ingestão grande e diferencial de alimentos pelas mães. Na correlação entre os dias, as fêmeas, em média, ganham peso ($r=0,16$) do segundo até o quinto dia (VP1), provavelmente pela ingestão de alimentos superar o dispendioso gasto de energia da produção de leite. Porém, a perda de peso nas fêmeas ($r=-0,23$) do sexto até o dia do desmame (VP2) indica uma redução ou manutenção da taxa de ingestão alimentar, considerando que a demanda por leite dos filhotes é cada vez maior.

Essa diferença entre VP1 e VP2 em nossas linhagens é suportada em roedores pela conhecida influência de hormônios, como a prolactina, na maior ingestão de alimentos e no ganho de peso pela maior deposição de gordura (Moore e colaboradores 1986). Ao longo

do período pós-parto, a prolactina tem seus níveis plasmáticos reduzidos (Amenomori e colaboradores 1970); explicando parte da perda de peso em fêmeas. A prolactina tem conhecida influência em diversos comportamentos de cuidado materno em fase pré e pós-parto (Mann e Bridges 2001), incluindo efeito sobre o comportamento de construção de ninho (Voci e Carlson 1973). Assim como a prolactina, os hormônios progesterona e estradiol também têm seus níveis plasmáticos influenciados pela fase materna e associados com mudança de peso e acúmulo de gordura (Mayes e Watson 2004). Lisk e colaboradores (1971) encontraram em camundongos um efeito da progesterona e o estradiol, em conjunto, na melhora da qualidade de ninho materno construído; mostrando a importância deles para esse comportamento. Por esses motivos, a prolactina, a progesterona e o estradiol são potenciais componentes conectados com a variação de peso e construção de ninho em nosso intercruzamento.

A análise canônica entre peso e construção de ninho mostrou que não existem associações significativas entre o conjunto dos fenótipos de peso (VP1 e VP2) e o conjunto dos fenótipos de construção de ninho pré-parto ($p=0,1$), e o conjunto dos fenótipos de construção de ninho pós-parto ($p=0,3$). Porém, o fenótipo VP1 isolado revelou uma correlação fraca ($R^2=0,12$), mas significativa ($p=0,03^*$) com o conjunto ninho pré-parto. O mesmo ocorreu entre VP1 e o conjunto de ninho pós-parto; com uma fraca correlação ($R^2=0,1$), mas significativa ($p=0,01^*$). Isso indica que diferenças na variação de peso durante os primeiros dias após o parto parece ser influenciada por algum hormônio ou neurotransmissor/neuroreceptor que causa também diferenças na construção geral de ninho no período de gravidez e após o parto. Como essa correlação não ocorre entre VP2 e ninho, esse efeito parece ser temporalmente regulado para os dias mais próximos antes e depois do parto.

Ansiedade

A ansiedade, avaliada pelo teste de Labirinto em Cruz Elevado, em nossas fêmeas F₂ em fase materna está resumida da Tabela 3. Os nossos resultados mostram que fêmeas F₂ têm maior frequência e permanência nos braços fechados ($\lambda=0,175$; $p=10^{-15^*}$) (Figuras 10 e 11). De acordo com as premissas do teste, maior frequência e tempo nos braços fechados representa, devido à ansiedade, uma preponderância do comportamento de proteção em relação ao comportamento exploratório (Rodgers e Dalvi 1997).

Tabela 3: Número amostrado e médias, para as fêmeas F₂, dos valores de frequência de entradas nos braços fechados (em número de entradas) e tempo de permanência nos braços fechados (em segundos).

	Frequência Relativa Aberto (%)	Tempo Relativo Aberto (%)
Número de Fêmeas F ₂ em fase materna	178	178
Média das Fêmeas F ₂ em fase materna	16,681±1,534	9,2±1,364
Número de Fêmeas F ₂ fora de fase materna	103	103
Média das Fêmeas F ₂ fora de fase materna	7,611±1,448	5,123±1,369

A ansiedade também existe nas linhagens parentais após o parto, com maior Frequência Fechado e Tempo Fechado nas fêmeas SM/J (U=35 e p=0,02* para frequência; U=43 e p=0,04* para tempo) e LG/J (U=4,5 e p=0,03* para frequência; U=2; p=0,01* para tempo). No contraste entre as duas linhagens parentais, a linhagem LG/J tem menor frequência relativa nos braços abertos (U=16; p=0,045*) e passa relativamente menos tempo no braços abertos (U=16; p=0,045*), sendo, portanto, mais ansiosa (Figuras 10 e 11). A linhagem SM/J tem maior frequência absoluta de entrada na totalidade dos braços (U=2 p=0,002*). Em outro estudo, encontramos essas mesmas diferenças de atividade motora pelo teste de arena, que mede, entre outros fatores, a mobilidade (Sauce e colaboradores 2009). Ou seja, embora ansiosas, a tendência das fêmeas LG/J é ficarem mais paradas em geral do que as fêmeas da linhagem SM/J.

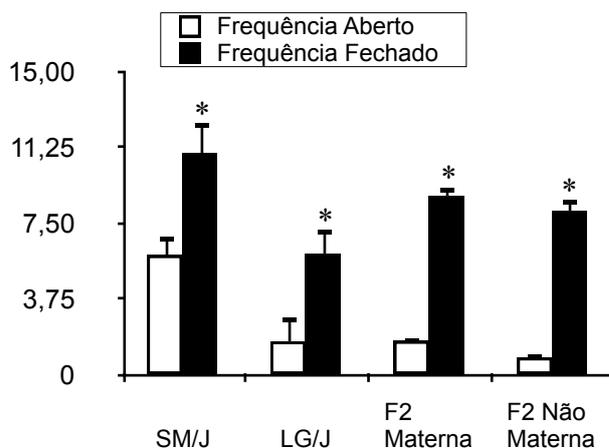


Figura 10: Valores médios de Frequência Aberto e Fechado para fêmeas das linhagens parentais e as F₂ em fase materna e fora de fase materna (não materna).

* = diferença significativa de Frequência Aberto dentro deste grupo.

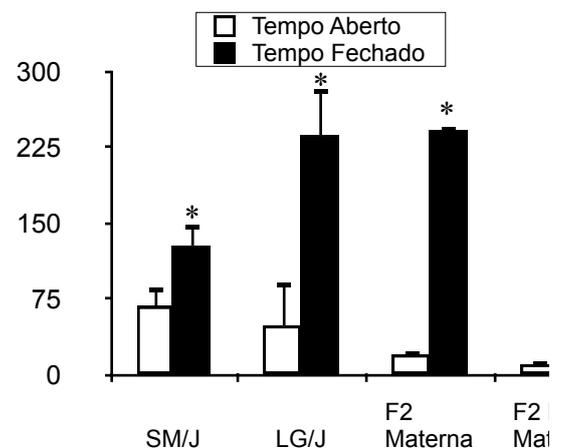


Figura 11: Valores médios de Tempo Aberto e Fechado para fêmeas das linhagens parentais e em fase materna e fora de fase materna (não materna).

* = diferença significativa de Tempo Aberto dentro deste grupo.

Os fenótipos Frequência Relativa Aberto e Tempo Relativo Aberto têm, como esperado, uma alta correlação ($r=0,74$), mas, pela diferença restante e para facilitar a comparação com futuros estudo, tratamos ambos separados durante todas as análises de fenótipo e de QTL.

O teste de cada linhagem parental entre a geração F_2 mostrou que as fêmeas F_2 têm maior frequência relativa nos braços abertos ($U=555,5$; $p=0,002^*$) e passam mais tempo relativo nos braços abertos ($U=363$; $p=10^{-4}^*$) do que as fêmeas SM/J. Entre F_2 e LG/J não existem diferenças na Frequência Relativa Aberto ($U=594$; $p=0,6$) e no Tempo Relativo Aberto ($U=586,5$; $p=0,6$). Assim, nossas fêmeas F_2 tem um nível de ansiedade relativamente alto e parecido com as fêmeas LG/J.

Na comparação entre as fêmeas após o parto e as fêmeas fora da fase materna, encontramos que existem diferenças significativas para Frequência Relativa Aberto e Tempo Relativo Aberto reunidos ($\lambda=0,938$; $p=10^{-3}^*$); com as fêmeas em fase materna apresentando maior frequência relativa nos braços abertos ($F=15,563$; $p=10^{-3}^*$), mas ambas não diferindo para Tempo Relativo Aberto ($F=3,864$; $p=0,5$). Esse resultados sugerem que a ansiedade em fêmeas F_2 de nossas linhagens é dependente da fase materna.

A correlação canônica entre os fenótipos de construção de ninho pré e pós e os fenótipos de ansiedade não foi significativa ($p=0,6$ para pré parto; $p=0,4$ para pós-parto). Também não foi significativa a correlação separada para Frequência Relativa Aberto ($p=0,4$ para pré parto; $p=0,8$ para pós-parto) e Tempo Relativo Aberto ($p=0,4$ para pré parto; $p=0,2$ para pós-parto).

Como a construção do ninho materno em camundongos está ligada especificamente com o fechamento e altura do ninho (Weber e colaboradores 2008), também testamos a correlação deles com a ansiedade, mas não encontramos correlações significativas para Frequência Relativa Aberto ($p=0,6$ para pré parto; $p=0,6$ para pós-parto) e Tempo Relativo Aberto ($p=0,2$ para pré parto; $p=0,6$ para pós-parto). Todos esses resultados evidenciam que, em F_2 em fase materna, o nível de ansiedade não está conectado com o comportamento de construção de ninho antes e depois do parto. Diferentemente dos resultados obtidos por Brunner e colaboradores 1999, em nossos animais parece não existir o efeito da atividade ansiosa no tempo gasto para a construção de ninho. Porém, o nível de atividade motora geral está, em camundongos, associado com a construção de ninho (Carter e

colaboradores 2000) e talvez seja esse o caso em nosso inter cruzamento – explicando a discrepância entre atividade motora e ansiedade que encontramos em SM/J e LG/J.

Tamanho de Ninhada e Idade

Obtivemos diferentes valores de Tamanho de Ninhada (número de filhotes nascidos) dos cruzamentos entre as linhagens endogâmicas SM/J e LG/J, entre animais F₁ e entre animais F₂ (Tabela 4). Essas diferenças no Tamanho de Ninhada são significativas entre SM/J e LG/J (U=344; p=0,02*), mas as linhagens parentais com médias inferiores em relação às gerações inter cruzadas e os animais F₁ com maior número de filhotes (K=47,214; p=10⁻⁹*). Isso evidencia o efeito esperado da endogamia na redução do valor adaptativo desses animais e do hibridismo na heterose do tamanho de ninhada (van Haandel e Visscher 1995).

Tabela 4: Número de cruzamentos realizados de cada tipo e médias do Tamanho de Ninhada das amostras e as médias de Tamanho de Ninhada e Idade para as fêmeas F₂ em geral; assim como os desvios padrão de todas as amostragens.

	♀ LG/J ♂ SM/J	♀ SM/J ♂ LG/J	♀ F ₁ (A) ♂ F ₁ (A)	♀ F ₁ (A) ♂ F ₁ (B)	♀ F ₁ (B) ♂ F ₁ (A)	♀ F ₁ (B) ♂ F ₁ (B)	♀ F ₁ (AeB) ♂ F ₁ (AeB)	♀ F ₂ ♂ F ₂
Número de Cruzamentos	24	20	14	13	16	13	56	258
Média do TN	6,46	4,25	9,43	8,46	9,75	9,69	9,36±0,4	8,47±0,19
Desvio Padrão do TN	2,92	2,2	1,55	3,99	3,75	2,18	3,03	2,91

Outros estudos com inter cruzamentos entre as mesmas linhagens de camundongos levando em consideração a sobrevivência ao longo de uma semana sugerem a mesma conclusão (Peripato e colaboradores 2004, Gallo e colaboradores 2008). Todos esses resultados indicam interações dominantes e epistáticas entre os genes das linhagens parentais para o fenótipo de Tamanho de Ninhada. O possível aumento no valor adaptativo na linhagem F₂ pelo tamanho da ninhada pode estar conectado a outro fenótipo importante para o sucesso de um indivíduo e seus parentes – o comportamento de construção de ninho.

Ao checarmos a relação entre o Tamanho de Ninhada e os fenótipos de peso VP1 e VP2, obtivemos o esperado. Em ambos os momentos após o parto das fêmeas F₂, o tamanho da ninhada parece explicar, em partes, a variação de peso (r=0,36 para VP1; r=-0,35 para VP2). Assim, um maior número de filhotes leva a um maior estímulo da ingestão de alimentos nos primeiros dias após o parto. Tal resultado pode indicar em nossos animais uma

conhecida relação dos níveis do hormônio prolactina (estimulante da ingestão de alimentos) e o tamanho de ninhada em ratos (Mattheij e colaboradores 1979). Nos últimos dias da fase materna, as fêmeas F₂ com maior tamanho de ninhada perdem, em média, mais peso (devido à correlação negativa). Possivelmente isso acontece pela redução da prolactina (e ingestão de alimentos) independente do número de filhotes; levando a uma maior perda de peso nas fêmeas com maior ninhada pelo gasto superior na produção do leite.

A Análise Canônica mostrou uma correlação fraca e significativa ($R^2=0,12$; $p=0,04^*$) entre o Tamanho de Ninhada e os fenótipos conjuntos de Construção de Ninho pré-parto. O mesmo tipo de correlação foi significativa ($R^2=0,08$; $p=0,04^*$) entre o Tamanho de Ninhada e o conjunto de ninho pós-parto. Como o tamanho de ninhada em nosso inter cruzamento está relacionado positivamente com ganho de peso, talvez esses fenótipos e o comportamento de construção de ninho estejam todos conectados e tenham um componente causal em comum.

A idade das fêmeas (média em F₂=153,95±3,73), porém, parece não estar correlacionada com os fenótipos conjuntos de construção de ninho pré-parto ($p=0,1$) e pós-parto ($p=0,2$). Como todas nossas fêmeas F₂ analisadas estavam em seu primeiro parto, talvez a influência da idade seja relevante apenas quando indicadora de experiência materna (Denenberg e colaboradores 1958). Em camundongos, a sobrevivência e o peso dos filhotes é maior na segundo parto do que no primeiro (Brown e colaboradores 1999), mas isso parece não depender da idade.

Modelo Geral para Construção de Ninho

O modelo geral entre nossos fenótipos nas fêmeas F₂, considerando o teste Lambda de Wilks (λ) do GLM, revelou o que esperávamos: as nossas variáveis de idade, tamanho de ninhada, peso e ansiedade consideradas conjuntamente têm pouco ou nenhum efeito nos conjuntos dos fenótipos de construção de ninho. Obtivemos para os fenótipos do período pré-parto: Idade ($\lambda=0,91$; $p=0,6$), VP1 ($\lambda=0,917$; $p=0,7$), VP2 ($\lambda=0,927$; $p=0,7$), Frequência Relativa Aberto ($\lambda=0,878$; $p=0,5$) e Tempo Relativo Aberto ($\lambda=0,9$; $p=0,6$). Apenas Tamanho de Ninhada ($\lambda=0,695$; $p=0,04^*$) mostrou efeito significativo. Obtivemos para os fenótipos em conjunto do período pós-parto: Idade ($\lambda=0,868$; $p=0,08$), Tamanho de Ninhada ($\lambda=0,908$; $p=0,2$), VP1 ($\lambda=0,927$; $p=0,3$), VP2 ($\lambda=0,960$; $p=0,6$), Frequência Relativa Aberto ($\lambda=0,959$; $p=0,6$) e Tempo Relativo Aberto ($\lambda=0,860$; $p=0,07$).

A ausência de efeitos gerais se deve provavelmente as diferentes informações de cada fenótipo de ninho para esse comportamento e as conexões entre tamanho de ninhada e peso da fêmea. Como observamos em nossos resultados separadamente, a presença de um ninho relaciona-se com o comportamento geral de construção de ninho (materno e de adultos), com o período pós-parto distinto do pré-parto devido a presença dos filhotes. A estrutura do ninho (fechamento e altura) relaciona-se ao comportamento de construção de ninho do tipo materno; com o período pós-parto diferente do pré-parto por possíveis estímulos dos filhotes no comportamento da mãe e pela perturbação dos filhotes na estrutura do ninho. A quantidade de material usado deve ter relação com a atividade motora geral da fêmeas (mas não sua ansiedade), e a variação de temperatura dentro do ninho deve ter relação com o tamanho de ninhada. Nos resultados separados, o peso e o tamanho de ninhada têm, cada, um efeito nos fenótipos de construção de ninho pré e pós-parto. Porém, o próprio tamanho de ninhada também está associado com o peso. Provavelmente parte dessas interações e diferenças consideradas em conjunto sejam antagônicas em nosso modelo geral – cancelando os efeitos conjuntos.

Genótipo

Obtivemos uma quantidade média de 35 ng de DNA por 10mg de fígado durante o processo de extração pelo protocolo de tiocianato de guanidina.

Durante o processo de eletroforese detectamos, nas padronizações dos conjuntos de *primers*, polimorfismo para algumas regiões em concentrações menores que os 5% de agarose no gel previstos. A Figura 12 representa o padrão de bandas observados para

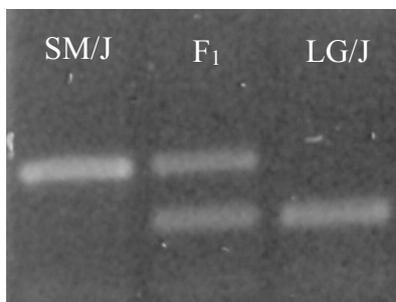


Figura 12: Visualização do gel de agarose, após eletroforese, do polimorfismo de uma região microssatélite (*D13Mit1*).

um determinado microssatélite na linhagem SM/J, F₁ e LG/J, respectivamente. O microssatélite com maior número de repetições migra menos no gel em direção ao pólo positivo; e o microssatélite menor migra mais. Na Tabela 5 representamos as padronizações de temperatura de hibridização e concentração de agarose para cada marcador.

Fizemos aproximadamente 25.000 genotipagens.

Tabela 5: Padronização da reação de marcadores microssatélites para as linhagens SM/J e LG/J. Nome do marcador, tamanho da região amplificada (em pares de base: bp), a melhor temperatura de hibridização na PCR, e a concentração mínima de agarose no gel para visualização de polimorfismo.

Marcador Microssatélite	Tamanho da Região	Temperatura de Hibridização	Gel de Agarose	Marcador Microssatélite	Tamanho da Região	Temperatura de Hibridização	Gel de Agarose
<i>D1Mit64</i>	132pb	54° C	3%	<i>D10Mit213</i>	150pb	54° C	5%
<i>D1Mit3</i>	160pb	57° C	3%	<i>D10Mit15</i>	184pb	54° C	2%
<i>D1Mit212</i>	146pb	50° C	3%	<i>D10Mit10</i>	180pb	54° C	5%
<i>D1Mit74</i>	138pb	54° C	3%	<i>D10Mit14</i>	190pb	54° C	5%
<i>D1Mit7</i>	104pb	59° C	3%	<i>D10Mit297</i>	120pb	53° C	5%
<i>D1Mit11</i>	100pb	51° C	3%	<i>D11Mit62</i>	150-157pb	53° C	3%
<i>D1Mit14</i>	180pb	54° C	5%	<i>D11Mit349</i>	118-126pb	53° C	3%
<i>D1Mit541</i>	123-124pb	51° C	3%	<i>D11Mit15</i>	150pb	53° C	3%
<i>D1Mit17</i>	167-179pb	54° C	5%	<i>D11Mit325</i>	124pb	54° C	5%
<i>D2Mit1</i>	116-123pb	55° C	3%	<i>D11Mit14</i>	158-160pb	53° C	5%
<i>D2Mit370</i>	114-119pb	51° C	3%	<i>D11Mit168</i>	125-147pb	54° C	5%
<i>D2Mit380</i>	118-122pb	52° C	3%	<i>D12Mit37</i>	140pb	54° C	5%
<i>D2Mit17</i>	194-201pb	56° C	5%	<i>D12Mit2</i>	134pb	54° C	5%
<i>D2Mit307</i>	149pb	56° C	5%	<i>D12Mit5</i>	48pb	54° C	5%
<i>D2Mit22</i>	189pb	55° C	3%	<i>D12Mit6</i>	105pb	54° C	5%
<i>D2Mit265</i>	105pb	53° C	3%	<i>D12Nds2</i>	148pb	57° C	3%
<i>D3Mit54</i>	147pb	57° C	5%	<i>D13Mit1</i>	236pb	54° C	1%
<i>D3Mit22</i>	220pb	48° C	5%	<i>D13Mit115</i>	144pb	55° C	5%
<i>D3Mit12</i>	149pb	48° C	5%	<i>D13Mit9</i>	125pb	52° C	5%
<i>D3Mit14</i>	168-198pb	48° C	5%	<i>D13Mit147</i>	108pb	57° C	3%
<i>D3Mit32</i>	175pb	48° C	5%	<i>D13Mit35</i>	193pb	54° C	5%
<i>D4Mit235</i>	116pb	50° C	5%	<i>D14Nds1</i>	188pb	54° C	5%
<i>D4Mit2</i>	184-191pb	52° C	5%	<i>D14Mit212</i>	102pb	54° C	3%
<i>D4Mit153</i>	111-117pb	50° C	5%	<i>D14Mit5</i>	178-180pb	54° C	5%
<i>D4Mit16</i>	230pb	48° C	5%	<i>D14Mit225</i>	121-131pb	54° C	5%
<i>D4Mit254</i>	114pb	50° C	5%	<i>D14Mit266</i>	148pb	53° C	2%
<i>D5Mit349</i>	124pb	52° C	5%	<i>D15Mit13</i>	136pb	50° C	5%
<i>D5Mit233</i>	114pb	54° C	5%	<i>D15Mit143</i>	128-140pb	54° C	5%
<i>D5Mit6</i>	135pb	54° C	3%	<i>D15Mit2</i>	81-93pb	56° C	3%
<i>D5Mit338</i>	119pb	54° C	3%	<i>D15Mit41</i>	123pb	52° C	5%
<i>D5Mit59</i>	122pb	54° C	3%	<i>D16Mit2</i>	189pb	57° C	5%
<i>D5Mit43</i>	131pb	56° C	5%	<i>D16Mit5</i>	156pb	55° C	3%
<i>D6Mit1</i>	220pb	54° C	5%	<i>D16Mit152</i>	105pb	50° C	5%
<i>D6Mit9</i>	137-138pb	52° C	3%	<i>D17Mit46</i>	212pb	57° C	3%
<i>D6Nds5</i>	100pb	54° C	3%	<i>D17Mit10</i>	160pb	50° C	5%
<i>D6Mit58</i>	115-116pb	53° C	5%	<i>D17Mit39</i>	109pb	55° C	3%
<i>D6Mit15</i>	253pb	54° C	3%	<i>D18Mit110</i>	149pb	55° C	3%
<i>D7Mit21</i>	126-130pb	54° C	5%	<i>D18Mit17</i>	187pb	57° C	3%
<i>D7Mit227</i>	90pb	54° C	5%	<i>D18Mit51</i>	196pb	57° C	3%
<i>D7Nds1</i>	220pb	47° C	3%	<i>D19Mit43</i>	144pb	53° C	5%
<i>D7Mit17</i>	161pb	54° C	5%	<i>D19Mit39</i>	254-256pb	55° C	3%
<i>D7Mit71</i>	117pb	50° C	5%	<i>D19Mit35</i>	118pb	51° C	3%
<i>D7Mit46</i>	182pb	54° C	5%	<i>D19Mit137</i>	119-122pb	53° C	5%
<i>D7Nds4</i>	200pb	50° C	5%	<i>DXMit55</i>	137pb	53° C	5%
<i>D8Mit58</i>	166pb	54° C	5%	<i>DXMit144</i>	124-125pb	53° C	5%
<i>D8Mit343</i>	153pb	54° C	3%	<i>DXMit64</i>	110-130pb	55° C	3%
<i>D8Mit89</i>	131pb	53° C	5%	<i>DXMit172</i>	129-148pb	53° C	5%
<i>D8Mit324</i>	111-117pb	50° C	5%	<i>DXMit67</i>	171pb	46° C	5%
<i>D9Mit90</i>	140pb	54° C	5%				
<i>D9Mit4</i>	122pb	54° C	5%				
<i>D9Mit8</i>	183pb	53° C	5%				
<i>D9Mit335</i>	121-133pb	60° C	3%				
<i>D9Mit18</i>	180pb	54° C	5%				

Análise de QTL

Regressões dos valores de construção de ninho pré e pós parto, peso e ansiedade das fêmeas F₂ nos valores genotípicos nos 101 marcadores microssatélites permitiram procurarmos QTLs individuais pelo genoma. No total, obtivemos 23 regiões que,

individualmente, estão significativamente associadas com a variação nos 10 fenótipos analisados. Destes QTLs, 6 estão acima do nível de significância genômico (de 2,95 para o modelo geral; e 3,25 para os modelos aditivos e dominantes em separado) e, por isso, representam alta evidência de conexão com os fenótipos. Os 17 QTLs restantes estão apenas acima do nível cromossômico; sendo uma sugestão dessas conexões. Na Figura 13 está o resumo simplificado de todos os QTLs encontrados em relação aos cromossomos e os fenótipos.

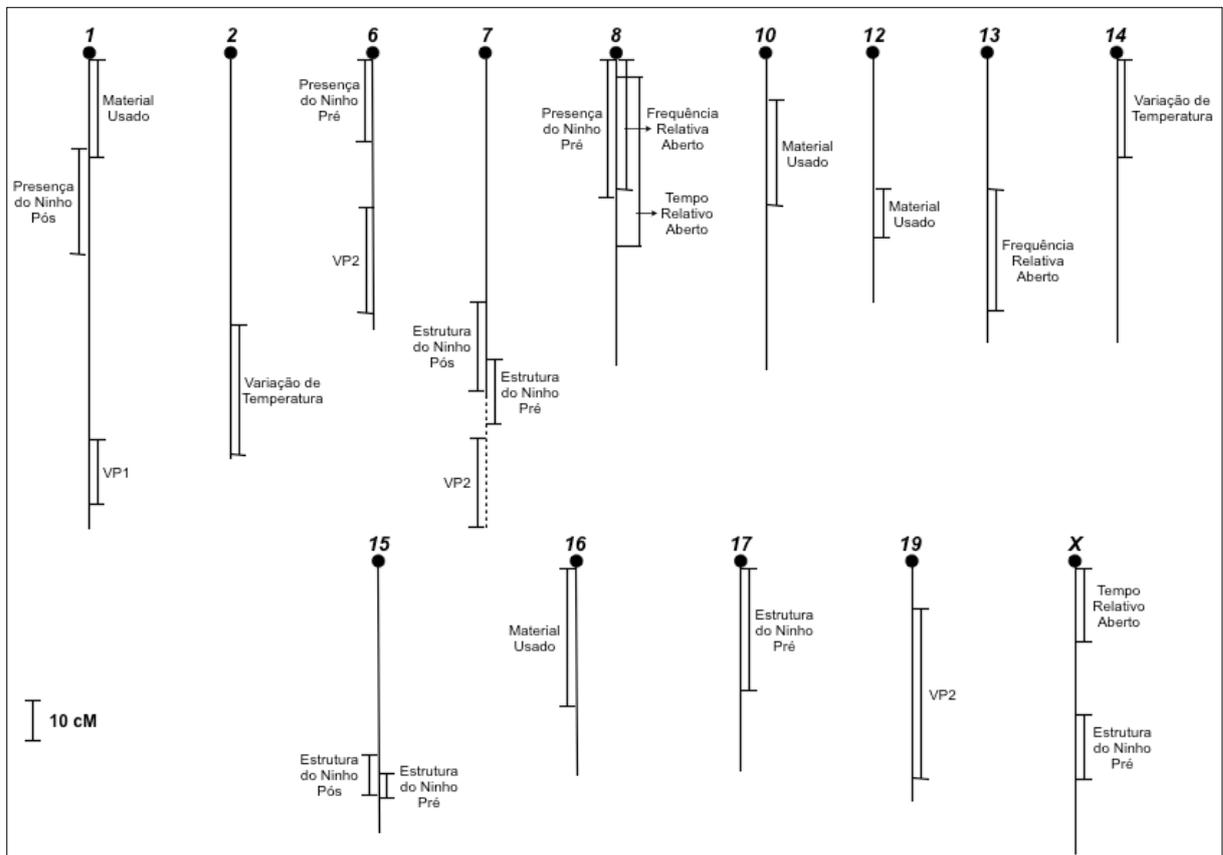


Figura 13: Localização dos QTLs individuais que encontramos nas fêmeas F_2 de nosso intercruzamento nos 14 cromossomos do genoma de camundongos, com os respectivos fenótipos e intervalos de confiança.

Construção de ninho

Dividimos o comportamento de construção de ninho em 6 fenótipos distintos (3 durante o período pré-parto e 3 durante o período pós-parto). Encontramos 15 QTLs individuais para os fenótipos de ninho, agrupados em período pré-parto e pós-parto.

Durante o período pré-parto (Tabela 6), todos os 10 QTLs individuais estão em cromossomos distintos, talvez devido às diferenças de cada fenótipo que observamos durante a Análise de Componente Principal. Portanto, considerando cada fenótipo um importante contribuinte para o comportamento de construção de ninho, obtivemos um número alto de

componentes genéticos – esperado para um fenótipo complexo (Houle e colaboradores 1996; Merilã e Sheldon 1999).

Tabela 6: QTLs individuais dos fenótipos de construção de ninho pré-parto. Cromossomo e posição no centrômero (em cM) do LOD score mais alto, com marcador microssatélite associado e a distância deste (em cM). Intervalo de Confiança da região (± 1 LOD). Valores genotípicos estimados para os fenótipos: absolutos e normalizados de aditividade (a , $2a/\sigma_p$) e de dominância (d , d/σ_p). Variação do fenótipo explicada pelo QTL (em %). Modelo do LOD score mais alto (m =total, a =aditivo, d =dominante) e nível de significância atingido

Fenótipos Ninho Pré-Parto	Crom	Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	Intervalo de Confiança (cM)	a	d	$2a/\sigma_p$	d/σ_p	Variação Explicada (%)	LOD score	Modelo/ Sign
Presença do Ninho	6	<i>D6Mit1</i>	+10	10	0-20	-0,266	-0,423	-0,531	-0,423	4,3	2,102	m/crom
	8	<i>D8Mit58</i>	+14	14	0-34	-0,375	0,007	-0,750	0,007	3,4	2,569	a/crom
Estrutura do Ninho	7	<i>D7Mit17</i>	+16	82	74-90	-0,373	-0,282	-0,747	-0,282	6,4	3,577	a/geno
	15	<i>D15Mit2</i>	+20	56	50-56	-0,023	0,521	-0,046	0,521	4,4	2,924	d/crom
	17	<i>D17Mit46</i>	+12	12	0-30	0,473	-0,062	0,945	-0,062	5,3	3,337	a/geno
	X	<i>DXMit172</i>	+0	42	36-52	-0,330	-0,037	-0,659	-0,037	5	3,246	a/geno
Material Usado	1	<i>D1Mit3</i>	+6	10	0-24	0,394	0,562	0,787	0,562	11,2	2,772	m/crom
	10	<i>D10Mit15</i>	+4	26	10-36	0,071	0,838	0,142	0,838	9,1	2,741	d/crom
	12	<i>D12Mit5</i>	+0	38	32-44	-0,041	-0,682	-0,082	-0,682	9,2	2,820	d/crom
	16	<i>D16Mit2</i>	+12	12	0-34	0,454	0,506	0,908	0,506	11	2,653	m/crom

Os QTLs individuais dos fenótipos no período pré-parto, em separado, têm efeitos independentes e de interações. Encontramos efeito de aditividade (efeito de uma cópia maior ou menor que o efeito da interação entre duas cópias) em quatro QTLs: no fenótipo Presença do Ninho na região do cromossomo 8 e Estrutura do Ninho nas regiões dos cromossomos 7, 17 e X. Nossas fêmeas heterozigotas têm em média um fenótipo com valor mais alto que as homozigotas – caracterizando um efeito de sobredominância – em quatro QTLs: em Estrutura do Ninho na região do cromossomo 15 e em Material Usado nas regiões dos cromossomos 1, 10 e 16. E encontramos efeitos de subdominância (heterozigotos com médias inferiores aos homozigotos) em dois QTLs: em Presença do Ninho na região do cromossomo 6 e em Material Usado na região do cromossomo 12. Esses resultados em conjunto estão de acordo com nossa hipótese de arquitetura genética do tipo II, pois os componentes genéticos do comportamento de construção de ninho pré-parto em nossas fêmeas F₂ mostram efeitos de conexão dentro de uma mesma região na forma de sub e sobredominâncias.

Considerando os efeitos aditivos e dominantes da construção de ninho pré-parto, os QTLs individuais do fenótipo Presença do Ninho explicam, em conjunto, 7% da

variação em nossas fêmeas F₂. Os QTLs do fenótipo Estrutura do Ninho explicam, em conjunto, 16,1% da variação. Para Material Usado, as regiões explicam em conjunto 26,6% da variação. Esses resultados mostram influência de componentes genéticos no comportamento de construção de ninho pré-parto em nossas fêmeas F₂. Além disso, como esperado para a nossa hipótese de arquitetura genética do tipo II, os efeitos de cada QTL são moderados em comparação com o encontrado em outros trabalhos (Ramos e colaboradores 1999; Turri e colaboradores 2001).

Assim como no período pré-parto, todos os 5 QTLs individuais do período pós-parto (Tabela 7) estão em cromossomo distintos, talvez devido às diferenças de cada fenótipo que observamos na PCA. Considerando cada fenótipo um importante contribuinte para o comportamento de construção de ninho, obtivemos um número bem menor de componentes genéticos no período pós-parto em relação ao período pré-parto. Talvez isso seja pela menor variação que encontramos na presença, fechamento e altura do ninho devido à presença dos filhotes e aos estímulos hormonais após o parto.

Tabela 7: QTLs individuais dos fenótipos de construção de ninho pós-parto. Cromossomo e posição no centrômero (em cM) do LOD score mais alto, com marcador microsatélite associado e a distância deste (em cM). Intervalo de Confiança da região (± 1 LOD). Valores genotípicos estimados para os fenótipos: absolutos e normalizados de aditividade (a , $2a/\sigma_p$) e de dominância (d , d/σ_p). Variação do fenótipo explicada pelo QTL (em %). Modelo do LOD score mais alto (m =total, a =aditivo, d =dominante) e nível de significância atingido

Fenótipos Ninho Pós-Parto	Crom	Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	Intervalo de Confiança (cM)	a	d	$2a/\sigma_p$	d/σ_p	Variação Explicada (%)	LOD score	Modelo/ Sign
Presença do Ninho	1	D1Mit74	+4	36	22-48	0,140	-0,762	0,281	-0,762	9,8	3,601	d/geno
Estrutura do Ninho	7	D7Mit17	+8	74	60-82	-0,397	-0,917	-0,793	-0,917	12,9	3,882	m/geno
	15	D15Mit2	+20	56	46-56	0,374	0,522	0,749	0,522	8,7	2,590	m/crom
Variação de Temperatura	2	D2Mit17	+6	80	66-98	-0,234	-0,506	-0,409	-0,442	4,6	2,544	m/crom
	14	D14Nds1	+10	10	0-24	0,067	-0,569	0,117	-0,497	3,1	2,385	d/crom

No período pós-parto, todos os efeitos dos QTLs individuais são de interações. Encontramos efeito de sobredominância no QTL para Estrutura do Ninho na região do cromossomo 15. E encontramos efeitos de subdominância em quatro QTLs: em Presença do Ninho na região do cromossomo 1, em Estrutura do Ninho na região do cromossomo 7 e em Variação de Temperatura nas regiões dos cromossomos 2 e 14. Esses resultados em conjunto estão de acordo com nossa hipótese de arquitetura genética do tipo II, pois os componentes genéticos do comportamento de construção de ninho pós-parto em nossas fêmeas F₂ mostram efeitos de conexão dentro de uma mesma região.

Considerando os efeitos aditivos e dominantes da construção de ninho pós-parto, o QTL individual do fenótipo Presença do Ninho explica 9,8% da variação. Os QTLs do fenótipo Estrutura do Ninho explicam, em conjunto, 20,3% da variação. Para Variação de Temperatura, as regiões explicam em conjunto 7% da variação. Esses resultados, em semelhança ao período pré-parto, mostram uma considerável influência de componentes genéticos no comportamento de construção de ninho pós-parto em nossas fêmeas F₂. Além disso, como esperado para a nossa hipótese de arquitetura genética do tipo II, os efeitos de cada QTL são moderados em comparação com o encontrado em outros trabalhos (Ramos e colaboradores 1999; Turri e colaboradores 2001).

Sobre os períodos pré e pós-parto em conjunto, existem QTLs no cromossomo 7 e no cromossomo 15 conectados aos fenótipos Estrutura do Ninho pré-parto e Estrutura do Ninho pós-parto. O fenótipo Estrutura do Ninho é uma medida da qualidade do ninho composta dos fenótipos Fechamento do Ninho e Altura do Ninho; e essas regiões antes e após o nascimento dos filhotes estão aproximadamente no mesmo intervalo de confiança. Esse resultado faz sentido em conjunto com as diferenças que encontramos para o fechamento e altura do ninho de fêmeas F₂ em fase materna comparadas com os dois grupos controles de machos e fêmeas fora de fase materna. Os mesmos hormônios responsáveis pela construção do ninho materno (superior ao ninho de adultos) durante a gravidez podem afetar também o período após o parto (Weber e colaboradores 2008). Apesar dos ninhos em nossas fêmeas F₂ serem diferentes durante os períodos pré e pós-parto, esses resultados das análises de QTL indicam um ou mais componentes em comum entre os dois momentos maternos influenciando a qualidade do ninho. Talvez a qualidade dos ninhos construídos na gravidez apresentem diferenças devido aos QTLs nos cromossomos 17 e X exclusivos para pré-parto, ou então pela perturbação do ninho causada pelos filhotes após o parto. Além disso, podem existir influências de nosso método distinto colocando materiais (algodão e papel) e trocando a caixa da fêmea diariamente apenas durante a fase pré-parto.

Encontramos um QTL próximo das regiões encontradas para desempenho materno por Peripato e colaboradores (2002) – que obtiveram QTLs individuais nos cromossomos 2 e 7. O QTL para Variação de Temperatura do ninho está no cromossomo 2 e aproximadamente na mesma região para desempenho materno. A manutenção da temperatura proporcionada por um ninho materno é essencial, pois camundongos nascem ectotérmicos e têm fraca capacidade de termorregulação até a terceira semana de vida (Lynch e Possidente

1978). Portanto, talvez a sobrevivência dos filhotes nos primeiros dias de vida em nossas linhagens esteja conectada a uma eficiente termorregulação proporcionada pelo ninho em algumas fêmeas F₂. Além disso também encontramos QTLs no cromossomo 7 para a construção de ninho, mas estão em regiões distantes por mais de 30 cM (considerando o intervalo de confiança) daquela encontrada por Peripato e colaboradores (2002).

Na análise de epistasia entre os marcadores genotípicos de cada fenótipo de construção de ninho, encontramos muitas conexões. No período pré-parto, nossos resultados revelam dez interações afetando significativamente Presença do Ninho (Tabela 8), sete interações em Estrutura do Ninho (Tabela 9) e dez em Material Usado (Tabela 10). Dentro do intervalo de confiança dos QTLs, tivemos QTLs epistáticos e individuais em comum na região do cromossomo 6 para Presença do Ninho (0-20 cM) e nas regiões dos cromossomos 1 (0-24 cM), 12 (32-44 cM) e 16 (0-34 cM) para Material Usado. Tal resultado mostra que os efeitos individuais nessas regiões são reflexos do repositório de interações genéticas com outras regiões do genoma em nossas fêmeas F₂. Isso apóia a importância da epistasia no processo adaptativo (Phillips 2008), pois a variação aditiva, apesar de independente em alguns contextos, sofre influência de outros genes no caso de mudanças na rede genética e/ou ambiental (Templeton 2006).

Tabela 8: QTLs epistáticos do fenótipo Presença do Ninho Pré-Parto. Marcador microssatélite associado (com a distância deste e do centrômero, em cM) do valor de F mais alto de ambas as regiões de cada interação. Probabilidade do efeito de epistasia observado ser fruto do acaso. Tipos de epistasia (AA: aditiva-por-aditiva; AD: aditiva-por-dominante; DA: dominante-por-aditiva; DD: dominante-por-dominante) e respectivos valores genotípicos estimados para o fenótipo, com a probabilidade de acaso.

Presença do Ninho Pré-Parto									
1° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	2° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	Prob. Epistasia	Tipo	Valor Genotípico	Prob. Valor Genotípico
<i>D4Mit16</i>	+8	68	<i>D7Mit227</i>	+10	32	4,48E-08	AD DD	0,645 -0,952	1,53E-03 9,51E-08
<i>D5Mit6</i>	+4	46	<i>D6Mit1</i>	+16	16	1,60E-05	AD DA	-0,534 0,615	1,31E-03 5,12E-05
<i>D6Mit9</i>	+0	22	<i>DXMit172</i>	+16	58	7,26E-06	AD DD	0,351 0,556	1,30E-02 2,23E-06
<i>D7Mit227</i>	+22	44	<i>D11Mit62</i>	+26	26	5,10E-06	AA DA	0,669 0,680	6,45E-04 9,05E-05
<i>D7Mit71</i>	+8	92	<i>D15Mit143</i>	+2	18	3,52E-07	AA DA DD	-0,650 -0,588 0,693	2,31E-03 2,03E-03 4,75E-05
<i>D8Mit89</i>	+8	76	<i>D10Mit10</i>	+14	62	2,53E-07	AA AD DD	-0,741 0,442 0,524	1,32E-04 3,89E-03 1,75E-04
<i>D9Mit90</i>	+22	22	<i>D11Mit15</i>	+0	48	5,13E-08	DA DD	0,862 -0,709	9,30E-06 7,21E-06
<i>D13Mit115</i>	+40	52	<i>D15Mit143</i>	+8	24	1,45E-05	AA AD DA	-0,732 0,487 -0,545	2,82E-04 9,11E-03 4,25E-03
<i>D15Mit143</i>	+10	26	<i>DXMit144</i>	+14	34	6,48E-07	AA DA	-0,534 0,979	5,23E-03 5,35E-07
<i>D17Mit46</i>	+0	0	<i>D18Mit17</i>	+18	38	1,44E-06	DA DD	-0,308 -0,612	2,36E-02 2,03E-07

Tabela 9: QTLs epistáticos do fenótipo Estrutura do Ninho Pré-Parto. Marcador microsatélite associado (com a distância deste e do centrômero, em cM) do valor de F mais alto de ambas as regiões de cada interação. Probabilidade do efeito de epistasia observado ser fruto do acaso. Tipos de epistasia (AA: aditiva-por-aditiva; AD: aditiva-por-dominante; DA: dominante-por-aditiva; DD: dominante-por-dominante) e respectivos valores genotípicos estimados para o fenótipo, com a probabilidade de acaso.

Estrutura do Ninho Pré-Parto									
1° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	2° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	Prob. Epistasia	Tipo	Valor Genotípico	Prob. Valor Genotípico
<i>D1Mit212</i>	+8	26	<i>D4Mit235</i>	+6	6	3,79E-05	DD	0,687	9,63E-07
<i>D5Mit233</i>	+6	26	<i>D6Mit1</i>	+0	0	1,38E-04	DD	-0,675	3,19E-06
<i>D5Mit233</i>	+4	24	<i>DXMit55</i>	+10	10	5,44E-05	AD	0,805	8,12E-07
<i>D6Mit58</i>	+10	62	<i>D9Mit8</i>	+14	68	2,26E-07	DD	0,681	5,82E-09
<i>D7Nds1</i>	+2	52	<i>D14Mit225</i>	+8	48	7,05E-05	AD	0,827	1,54E-06
<i>D9Mit4</i>	+10	46	<i>D11Mit14</i>	+0	66	6,56E-06	AD DA	0,461 -0,561	5,51E-04 1,40E-04
<i>D19Mit35</i>	+8	66	<i>DXMit55</i>	+18	18	9,28E-06	AA AD DD		3,38E-02 2,74E-05 9,70E-03

Tabela 10: QTLs epistáticos do fenótipo Material Usado Pré-Parto. Marcador microssatélite associado (com a distância deste e do centrômero, em cM) do valor de F mais alto de ambas as regiões de cada interação. Probabilidade do efeito de epistasia observado ser fruto do acaso. Tipos de epistasia (AA: aditiva-por-aditiva; AD: aditiva-por-dominante; DA: dominante-por-aditiva; DD: dominante-por-dominante) e respectivos valores genotípicos estimados para o fenótipo, com a probabilidade de acaso.

1° Marcador	+cM	Material Usado		2° Marcador	+cM	Prob. Epistasia	Tipo	Valor Genotípico	Prob. Valor Genotípico
		Posição no Centrômero (cM)	Posição no Centrômero (cM)						
<i>D1Mit14</i>	+2	80	<i>D3Mit22</i>	+6	28	1,97E-05	DD	1,038	2,60E-06
<i>D1Mit3</i>	+6	10	<i>D5Mit59</i>	+6	70	1,72E-04	AA	-1,071	2,80E-06
<i>D1Mit11</i>	+2	60	<i>D7Mit21</i>	+0	0	5,63E-06	AD	0,789	1,89E-04
							DD	0,781	3,85E-05
<i>D1Mit14</i>	+2	80	<i>D16Mit5</i>	+8	30	9,71E-08	AA	0,802	7,06E-04
							AD	0,766	9,63E-04
							DA	0,916	6,19E-06
<i>D5Mit338</i>	+10	60	<i>D12Mit2</i>	+10	28	8,17E-06	AD	0,869	7,51E-05
							DD	0,732	3,29E-04
<i>D5Mit59</i>	+2	66	<i>D19Mit43</i>	+10	10	1,19E-05	AA	-0,734	3,11E-02
							AD	-1,075	7,33E-04
							DA	-0,774	6,03E-03
							DD	-0,796	6,67E-03
<i>D8Mit58</i>	+6	6	<i>D17Mit10</i>	+18	60	6,98E-07	DA	2,402	2,27E-08
<i>D11Mit349</i>	+0	36	<i>D17Mit46</i>	+18	18	2,74E-06	AD	-2,401	1,49E-07
<i>D11Mit62</i>	+0	0	<i>D18Mit17</i>	+0	20	4,62E-05	DD	0,950	2,46E-06
<i>D17Mit46</i>	+22	22	<i>D18Mit110</i>	+14	14	5,28E-06	AA	0,945	4,98E-02
							DA	1,529	1,09E-02
							DD	2,897	1,81E-06

No período pós-parto, existem 26 interações afetando significativamente Presença do Ninho (Tabela 11), 13 interações em Estrutura do Ninho (Tabela 12) e cinco em Variação de Temperatura (Tabela 13). Obtivemos mais QTLs epistáticos no período pós-parto em relação ao período pré-parto mesmo menos QTLs individuais. Como esperamos uma maior importância no período pós-parto para a sobrevivência dos filhotes (Wallace 1981; Weber e colaboradores 2008), talvez essa diferença em nossos resultados corrobore a idéia que fenótipos mais importantes para o *fitness* têm menor variação genética aditiva relativa (“por gene”) (Merilä e Sheldon 1999). Encontramos QTLs epistáticos e individuais em comum no período pós-parto na região do cromossomo 1 (22-48 cM), para Presença do Ninho; na região do cromossomo 7 (60-82 cM) para Estrutura do Ninho; e na região do cromossomo 2 (66-98 cM) para Variação de Temperatura.

Tabela 11: QTLs epistáticos do fenótipo Presença do Ninho Pós-Parto. Marcador microssatélite associado (com a distância deste e do centrômero, em cM) do valor de F mais alto de ambas as regiões de cada interação. Probabilidade do efeito de epistasia observado ser fruto do acaso. Tipos de epistasia (AA: aditiva-por-aditiva; AD: aditiva-por-dominante; DA: dominante-por-aditiva; DD: dominante-por-dominante) e respectivos valores genotípicos estimados para o fenótipo, com a probabilidade de acaso.

Presença do Ninho Pós-Parto									
1° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	2° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	Prob. Epistasia	Tipo	Valor Genotípico	Prob. Valor Genotípico
<i>D1Mit3</i>	+6	10	<i>D9Mit355</i>	+14	88	1,04E-07	AA	1,395	1,23E-07
							DA	-0,631	5,61E-03
<i>D1Mit3</i>	+4	8	<i>D9Mit4</i>	+12	48	1,24E-05	AA	1,181	1,27E-06
<i>D1Mit7</i>	+6	48	<i>D11Mit325</i>	+0	58	6,67E-06	AA	0,944	2,88E-04
							AD	0,624	1,42E-03
							DD	0,495	1,12E-02
<i>D1Mit3</i>	+8	12	<i>DXMit172</i>	+12	54	1,94E-05	DD	0,899	2,83E-06
<i>D2Mit22</i>	+20	128	<i>D4Mit235</i>	+10	10	1,57E-05	AA	0,609	1,17E-02
							AD	0,761	2,09E-04
							DD	0,618	2,32E-03
<i>D2Mit22</i>	+12	120	<i>D9Mit355</i>	+18	92	9,13E-07	AA	0,838	6,54E-04
							DD	1,095	2,10E-06
<i>D2Mit22</i>	+10	118	<i>D12Mit5</i>	+6	44	1,21E-08	AA	-0,943	6,92E-05
							DD	1,122	4,51E-08
<i>D2Mit22</i>	+12	120	<i>DXMit55</i>	+2	2	3,28E-06	AA	0,762	1,87E-03
							AD	-0,653	1,28E-03
							DA	-0,719	1,67E-03
<i>D3Mit22</i>	+4	26	<i>D6Nds5</i>	+0	36	2,64E-07	AA	-1,831	5,22E-05
							AD	1,052	1,15E-03
							DA	-0,750	3,21E-02
							DD	0,915	2,64E-03
<i>D4Mit235</i>	+10	10	<i>D5Mit59</i>	+18	82	1,70E-10	AA	-0,748	7,23E-03
							AD	1,073	9,98E-07
							DA	-0,817	2,16E-04
							DD	0,735	8,58E-05
<i>D4Mit16</i>	+8	68	<i>D11Mit14</i>	+14	80	1,61E-06	DA	-0,745	1,74E-04
							DD	0,781	8,72E-06
<i>D4Mit235</i>	+4	4	<i>D15Mit143</i>	+8	24	7,52E-05	AD	-1,372	3,74E-06
<i>D4Mit2</i>	+4	18	<i>D16Mit2</i>	+2	2	1,39E-06	DA	-1,379	5,16E-07
							DD	0,525	3,78E-02
<i>D4Mit16</i>	+16	76	<i>D17Mit10</i>	+26	68	2,63E-06	AA	-1,051	7,50E-04
							DA	-1,038	1,93E-05
<i>D7Mit17</i>	+12	78	<i>D13Mit115</i>	+34	46	3,28E-06	DA	1,513	8,79E-08

<i>D9Mit355</i>	+12	86	<i>D12Mit5</i>	+10	48	8,25E-13	AA	-1,097	2,92E-06
							DD	1,200	2,28E-11
<i>D9Mit4</i>	+2	38	<i>D13Mit115</i>	+40	52	2,54E-08	AA	-1,035	3,31E-04
							AD	0,654	6,66E-03
							DA	-0,970	3,30E-05
							DD	0,663	3,60E-03
<i>D10Mit15</i>	+22	44	<i>D15Mit143</i>	+18	34	2,62E-11	AA	-1,518	1,76E-04
							AD	1,369	2,65E-05
							DA	-1,174	2,66E-04
							DD	1,327	2,91E-06
<i>D10Mit14</i>	+2	66	<i>D18Mit17</i>	+0	20	5,76E-10	AA	1,738	3,36E-04
							AD	-1,770	3,77E-06
							DA	-1,320	1,93E-04
							DD	1,035	1,32E-03
<i>D11Mit14</i>	+14	80	<i>D13Mit115</i>	+28	40	6,07E-10	AA	1,753	3,67E-08
							AD	-1,233	1,09E-04
							DA	-0,515	3,13E-02
							DD	0,631	3,36E-02
<i>D11Mit349</i>	+6	42	<i>D16Mit2</i>	+0	0	5,11E-07	AA	-1,147	4,18E-05
							AD	0,621	5,39E-03
							DD	0,671	5,62E-04
<i>D13Mit115</i>	+34	46	<i>D15Mit2</i>	+20	56	3,44E-07	AA	-1,097	2,56E-04
							AD	-0,952	1,06E-04
							DA	0,871	3,01E-03
<i>D13Mit115</i>	+8	20	<i>D17Mit10</i>	+24	66	2,02E-07	AA	4,388	2,94E-04
							AD	-3,092	8,69E-04
							DA	-3,191	5,02E-04
							DD	1,819	2,52E-02
<i>D13Mit147</i>	+26	98	<i>DXMit172</i>	+10	52	4,83E-06	AA	-0,939	3,10E-04
							DD	0,822	1,78E-05
<i>D14Mit5</i>	+10	38	<i>DXMit55</i>	+0	0	3,50E-07	AA	0,712	7,06E-04
							AD	-0,754	1,99E-05
							DA	-0,439	1,45E-02
<i>D15Mit2</i>	+20	56	<i>D16Mit5</i>	+14	36	1,31E-06	AA	-0,953	5,11E-05

Tabela 12: QTLs epistáticos do fenótipo Estrutura do Ninho Pós-Parto. Marcador microsatélite associado (com a distância deste e do centrômero, em cM) do valor de F mais alto de ambas as regiões de cada interação. Probabilidade do efeito de epistasia observado ser fruto do acaso. Tipos de epistasia (AA: aditiva-por-aditiva; AD: aditiva-por-dominante; DA: dominante-por-aditiva; DD: dominante-por-dominante) e respectivos valores genotípicos estimados para o fenótipo, com a probabilidade de acaso.

Estrutura do Ninho Pós-Parto									
1° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	2° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	Prob. Epistasia	Tipo	Valor Genotípico	Prob. Valor Genotípico
<i>D1Mit14</i>	+14	92	<i>D9Mit8</i>	+6	60	7,73E-06	AA	0,672	5,02E-03
							DA	-0,764	1,30E-04
							DD	0,505	7,24E-03
<i>D1Mit541</i>	+2	96	<i>D11Mit14</i>	+14	80	1,95E-09	AA	0,844	5,04E-04
							AD	-0,676	4,72E-04
							DA	-0,839	2,43E-05
							DD	0,579	8,92E-04
<i>D2Mit307</i>	+0	88	<i>D4Mit235</i>	+12	12	1,12E-05	AA	-0,767	2,55E-04
							DA	0,620	3,63E-04
<i>D2Mit380</i>	+18	68	<i>D16Mit5</i>	+4	26	6,36E-08	DA	0,412	3,22E-02
							DD	-1,025	1,15E-08
<i>D2Mit307</i>	+0	88	<i>D19Mit39</i>	+14	42	7,67E-06	AD	-0,606	1,63E-02
							DD	1,019	2,82E-06
<i>D3Mit54</i>	+20	20	<i>D7Mit71</i>	+6	90	8,12E-07	AA	1,358	3,51E-03
							AD	1,000	6,03E-03
							DA	0,903	6,52E-03
							DD	1,152	1,81E-04
<i>D5Mit59</i>	+12	76	<i>D7Mit71</i>	+0	84	6,26E-09	AA	-1,037	2,61E-04
							AD	-0,774	3,67E-04
							DA	0,505	3,50E-02
							DD	0,905	1,16E-05
<i>D5Mit338</i>	+8	58	<i>D12Mit6</i>	+14	64	7,34E-06	AA	1,074	8,66E-04
							AD	0,792	1,32E-03
							DA	0,637	9,60E-03
<i>D7Mit17</i>	+12	78	<i>D13Mit115</i>	+18	30	1,25E-06	DD	1,706	5,79E-08
<i>D7Mit46</i>	+8	116	<i>D17Mit46</i>	+20	20	1,26E-05	AD	0,752	3,50E-02
							DA	1,155	8,93E-05
							DD	-0,928	7,99E-03
<i>D10Mit10</i>	+8	56	<i>D15Mit143</i>	+10	26	3,90E-06	AA	1,220	1,66E-04
							AD	-1,097	2,49E-04
<i>D10Mit213</i>	+10	10	<i>D19Mit39</i>	+28	56	8,18E-06	AD	0,626	4,57E-03
							DA	-0,714	8,44E-03
							DD	0,912	1,12E-04
<i>D12Mit6</i>	+14	64	<i>D19Mit43</i>	+22	22	5,29E-07	AA	-0,752	2,82E-03
							AD	0,800	3,44E-04
							DA	-0,767	1,95E-04

Tabela 13: QTLs epistáticos do fenótipo Variação de Temperatura Pós-Parto. Marcador microsatélite associado (com a distância deste e do centrômero, em cM) do valor de F mais alto de ambas as regiões de cada interação. Probabilidade do efeito de epistasia observado ser fruto do acaso. Tipos de epistasia (AA: aditiva-por-aditiva; AD: aditiva-por-dominante; DA: dominante-por-aditiva; DD: dominante-por-dominante) e respectivos valores genotípicos estimados para o fenótipo, com a probabilidade de acaso.

Variação de Temperatura									
1° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	2° Marcador	+cM	Posição no Centrômero (cM)	Prob. Epistasia	Tipo	Valor Genotípico	Prob. Valor Genotípico
<i>D2Mit380</i>	+18	68	<i>D19Mit35</i>	+6	64	1,95E-06	AA	-0,569	5,06E-03
							DA	0,666	3,71E-04
							DD	0,552	9,76E-04
<i>D6Nds5</i>	+14	50	<i>D10Mit15</i>	+0	22	1,19E-05	AD	-0,638	3,21E-03
							DA	-0,496	1,10E-02
							DD	0,630	9,00E-04
<i>D9Mit355</i>	+24	98	<i>D14Mit225</i>	+16	56	3,08E-10	DD	1,314	8,70E-12
<i>D10Mit14</i>	+6	70	<i>D13Mit1</i>	+0	0	1,54E-05	AD	0,352	2,39E-02
							DA	0,702	6,59E-06
<i>D13Mit147</i>	+20	92	<i>D18Mit17</i>	+18	38	3,69E-06	AD	-0,882	3,87E-07

Os QTLs epistáticos do período pré-parto, em conjunto com os QTLs aditivos, explicam 53,7% da variação em Presença do Ninho e 60,4% da variação em Estrutura do Ninho. Os QTLs epistáticos do período pós-parto, em conjunto com os QTLs aditivos, explicam 39,1% da variação em Variação de Temperatura. Esses resultados indicam a grande influência de interações na variação do comportamento de construção de ninho pré e pós-parto em nossas fêmeas F₂.

Os resultados das análises de QTLs individuais e epistáticos nos períodos pré e pós-parto mostram a grande complexidade desses fenótipos de construção de ninho que, além de terem regiões individuais no genoma associadas, também dependem das conexões entre esses componentes. Em geral, esperávamos mais sobreposições entre QTLs de ninho com ansiedade e peso, e talvez nossos resultados sejam pelos fenótipos analisados indicarem apenas uma parte da complexidade total ou por existir realmente poucos efeitos pleiotrópicos entre eles. Pela construção de ninho ser um fenótipo complexo e relacionado com o *fitness*, esperávamos muitos componentes genéticos com um grande número de conexões (Lynch e Walsh 1998; Merilä e Sheldon 1999). Apesar dos QTLs individuais por fenótipo em nossas fêmeas F₂ não serem numerosos, existe um número razoável por agrupamento pré (10 QTLs) e pós-parto (5 QTLs). Além disso, encontramos uma grande quantidade de dominância e epistasia para todos os fenótipos. Em suma, os resultados corroboram nossa hipótese de arquitetura genética do tipo II para o comportamento de construção de ninho.

Procuramos por genes candidatos em todos os QTLs para construção de ninho pré e pós-parto usando a ferramenta de busca do Mouse Genome Database (2010) com palavras-chave fenotípicas como “comportamento”, “comportamento materno”, “construção de ninho”, “ansiedade” e “obesidade”. Encontramos genes descritos em outros estudos associados a fenótipos como comportamento em geral, comportamento materno, ansiedade, atividade motora, cognição, produção de leite e ingestão de alimentos (Tabelas 14 e 15). Tamanha diversidade encontrada representa a complexidade esperada para o comportamento de construção de ninho (Boake 1994; Weber e colaboradores 2008) e é uma pequena indicação de nossa idéia que os fenótipos de ansiedade e peso estão conectados à construção de ninho em nossas linhagens.

Tabela 14: Genes candidatos para os QTLs individuais dos fenótipos de construção de ninho pré-parto. Posição no centrômero (em cM) do loco (marcador microssatélite) associado com LOD score mais alto. Intervalo de Confiança da região (± 1 LOD). Nome do gene e sua posição no centrômero. Fenótipos associados ao gene candidato em outros estudos, e as respectivas referências.

Fenótipos Ninho Pré-Parto	Loco	Posição do Centrômero (cM)	Intervalo de Confiança (cM)	Gene Candidato	Nome do Gene	Posição do Gene (cM)	Fenótipo	Referência
Presença do Ninho	<i>D6Mit1</i>	10	0-20	Mest	mesoderm specific transcript	7.5 cM	comportamento materno e construção do ninho	Lefebvre e colaboradores, 1998
	<i>D8Mit58</i>	14	0-34	Plat	plasminogen activator, tissue	9.0 cM	estresse e ansiedade	Pawlak e colaboradores, 2003
Estrutura do Ninho	<i>D7Mit17</i>	82	74-90	não encontrado	-	-	-	-
	<i>D15Mit2</i>	56	50-56	Trpc2	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 2	50.0 cM	resposta a feromônios e comportamentos sociais	Leypold e colaboradores, 2002
	<i>D17Mit46</i>	12	0-30	Mas1	MAS1 oncogene	7.45 cM	aprendizagem, memória e ansiedade	Walther e colaboradores, 1998
	<i>D17Mit46</i>	12	0-30	Park2	Parkinson disease (autosomal recessive, juvenile) 2, parkin	5.91 cM	comportamento de exploração e ansiedade	Zhu e colaboradores, 2007
	<i>DXMit172</i>	42	36-52	Atp7a	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide	44.0 cM	comportamento materno e atividade motora	Martin e colaboradores, 1991
Material Usado	<i>D1Mit3</i>	10	0-24	tb	tumbler	10.0 cM	comportamento geral e sistema endócrino	Dung, 1975
	<i>D10Mit15</i>	26	10-36	Fyn	Fyn proto-oncogene	25.0 cM	ansiedade e atividade motora	Miyakawa e colaboradores, 1996
	<i>D12Mit5</i>	38	32-44	Esr2	estrogen receptor 2 (beta)	33.0 cM	cognição, ansiedade e comportamento afetivo	Walf e colaboradores, 2009
	<i>D16Mit2</i>	12	0-34	Drd3	dopamine receptor 3	23.3 cM	emocionalidade e atividade motora	Vallone e colaboradores, 2002

Tabela 15: Genes candidatos para os QTLs individuais dos fenótipos de construção de ninho pós-parto. Posição no centrômero (em cM) do loco (marcador microssatélite) associado com LOD score mais alto. Intervalo de Confiança da região (± 1 LOD). Nome do gene e sua posição no centrômero. Fenótipos associados ao gene candidato em outros estudos, e as respectivas referências.

Fenótipos Ninho Pós-Parto	Loco	Posição do Centrômero (cM)	Intervalo de Confiança (cM)	Gene Candidato	Nome do Gene	Posição do Gene (cM)	Fenótipo	Referência
Presença do Ninho	<i>D1Mit74</i>	36	22-48	ErbB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)	35.1 cM	atividade motora, memória, aprendizado e produção de leite	Golub e colaboradores, 2004; Muraoka-Cook e colaboradores, 2008
Estrutura do Ninho	<i>D7Mit17</i>	74	60-82	Drd4	dopamine receptor 4	70.1 cM	atividade motora	Fan e colaboradores, 2010
	<i>D15Mit2</i>	56	46-56	Dgat1	diacylglycerol O-acyltransferase 1	46.9 cM	ingestão de alimentos, metabolismo e produção de leite	Chen e colaboradores, 2003; Winter e colaboradores, 2002
Variação de Temperatura	<i>D2Mit17</i>	80	66-98	Ckmt1	creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous	67.6 cM	sistema sensorial, atividade motora e aprendizagem	Streijger e colaboradores, 2004
	<i>D14Nds1</i>	10	0-24	Ppyr1	pancreatic polypeptide receptor 1	10.5 cM	atividade motora e ingestão de alimentos	Edelsbrunner e colaboradores, 2009

O gene candidato *Mest* (*Mesoderm Specific Transcript*) para o QTL de Presença do Ninho pré-parto em nossas linhagens tem conhecida relação com a construção de ninho. Lefebvre e colaboradores (1998) usaram a técnica de nocaute para anular o efeito desse gene em camundongos e encontraram que a maioria (63%) dessas mães não construíram

ninhos. Nossos resultados indicam variação nesse mesmo fenótipo relacionado com a presença/ausência de um ninho. E, como a Presença do Ninho não difere entre nossos controles com machos e fêmeas fora da fase materna, possivelmente esse gene candidato é um componente conectado ao comportamento de construção de ninhos materno e também de adultos. Assim, o gene *Mest* é um importante gene dentro de nossas linhagens para confirmarmos em futuros estudos, por meio de técnicas da *reverse genetics*.

Peso

Para peso, analisamos os fenótipos VP1 e VP2 e encontramos 4 QTLs (Tabela 16). Destes, a região no cromossomo 7 se destaca por se encontrar aproximadamente no mesmo intervalo de confiança dos QTLs para a qualidade do ninho pré e pós-parto. Porém, como é um QTL para o fenótipo VP2, esse resultado contraria nossa idéia proposta com base nos resultados fenotípicos que algum componente fisiológico seria a conexão causal entre a maior ingestão de alimentos e o comportamento de construção de ninho na gravidez e início do período pós parto.

Tabela 16: QTLs individuais dos fenótipos de peso. Cromossomo e posição no centrômero (em cM) do LOD score mais alto, com marcador microssatélite associado e a distância deste (em cM). Intervalo de Confiança da região (± 1 LOD). Valores genotípicos estimados para os fenótipos: absolutos e normalizados de aditividade (a , $2a/\sigma_p$) e de dominância (d , d/σ_p). Variação do fenótipo explicada pelo QTL (em %). Modelo do LOD score mais alto (m =total, a =aditivo, d =dominante) e nível de significância atingido (cromossômico ou genômico).

Fenótipos Peso	Crom	Marcador	+cM	Posição do Centrômero (cM)	Intervalo de Confiança (cM)	a	d	$2a/\sigma_p$	d/σ_p	Variação Explicada (%)	LOD score	Modelo/ Sign
VP1	1	<i>D1Mit541</i>	+8	102	94-110	0,428	0,726	0,434	0,368	3,9	2,247	m/crom
	6	<i>D6Nds5</i>	+12	48	36-62	-1,583	1,875	-0,661	0,391	4,2	2,048	a/crom
VP2	7	<i>D7Mit46</i>	+6	114	94-116	-1,106	2,155	-0,462	0,450	6	2,987	m/geno
	19	<i>D19Mit43</i>	+26	26	10-52	-1,521	-0,574	-0,635	-0,120	2,9	2,220	a/crom

Nos fenótipos de peso, encontramos efeitos aditivos e de interações dentro dos QTLs individuais. O QTL para VP2 (na região do cromossomo 19) tem efeito aditivo. Encontramos efeito de sobredominância em três QTLs: em VP1 na região do cromossomo 1 e em VP2 nas regiões dos cromossomos 6 e 7.

Na comparação entre os QTLs individuais para os fenótipos de peso, encontramos conexões epistáticas entre todas as regiões. Em VP1, tivemos apenas um QTL individual, portanto não testamos epistasia. Em VP2, encontramos interação epistática entre as regiões dos cromossomo 6 e 7 ($p=0,02^*$), e 7 e 19 ($p=0,003^*$); mas a interação entre os cromossomos 6 e 19 não foi significativa ($p=0,055$). A existência dessas conexões sugere uma

complexidade para a variação de peso no período tardio (6º dia ao desmame) após o parto, possivelmente devido ao balanço hormonal entre a redução na ingestão de alimento em relação ao início da fase materna e a maior exigência fisiológica da mãe para alimentar seus filhotes em crescimento.

Procuramos por genes candidatos em todos os QTLs para os fenótipos VP1 e VP2, e encontramos genes descritos em outros estudos associados a fenótipos como ingestão de alimentos, obesidade, absorção de gorduras, glicemia, agressividade e atividade motora (Tabela 17). Não encontramos genes conectados diretamente à prolactina, progesterona ou estradiol – candidatos supostos pelos nossos resultados comparando os fenótipos de peso e ansiedade.

Tabela 17: Genes candidatos para os QTLs individuais dos fenótipos de peso. Posição no centrômero (em cM) do loco (marcador microsatélite) associado com LOD score mais alto. Intervalo de Confiança da região (± 1 LOD). Nome do gene e sua posição no centrômero. Fenótipos associados ao gene candidato em outros estudos, e as respectivas referências.

Fenótipos Peso	Loco	Posição do Centrômero (cM)	Intervalo de Confiança (cM)	Gene Candidato	Nome do Gene	Posição do Gene (cM)	Fenótipo	Referência
VP1	<i>D1Mit541</i>	102	94-110	Parp1	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	98.6 cM	glicemia e diabetes	Masutani e colaboradores, 1999
	<i>D6Nds5</i>	48	36-62	Hrh1	histamine receptor H1	49.0 cM	obesidade, ingestão de alimentos, atividade motora, agressividade, memória e aprendizado	Masaki e colaboradores, 2004; Yanai e colaboradores, 1998
VP2	<i>D7Mit46</i>	114	94-116	não encontrado	-	-	-	-
	<i>D19Mit43</i>	26	10-52	Pnlp	pancreatic lipase	29.0 cM	absorção de gorduras e obesidade	Gilham e colaboradores, 2007

Ansiedade

Para ansiedade, analisamos os fenótipos Frequência Relativa Aberto e Tempo Relativo Aberto e encontramos 4 QTLs no total (Tabela 18).

Tabela 18: QTLs individuais dos fenótipos de ansiedade. Cromossomo e posição no centrômero (em cM) do LOD score mais alto, com marcador microsatélite associado e a distância deste (em cM). Intervalo de Confiança da região (± 1 LOD). Valores genotípicos estimados para os fenótipos: absolutos e normalizados de aditividade (a, $2a/\sigma_p$) e de dominância (d, d/σ_p). Variação do fenótipo explicada pelo QTL (em %). Modelo do LOD score mais alto (m=total, a=aditivo, d=dominante) e nível de significância atingido (cromossômico ou

Fenótipos Ansiedade	Crom	Marcador	+cM	Posição do Centrômero (cM)	Intervalo de Confiança (cM)	a	d	$2a/\sigma_p$	d/σ_p	Variação Explicada (%)	LOD score	Modelo/ Sign
Frequência Relativa Aberto	8	<i>D8Mit58</i>	+16	16	0-32	-7,464	-13,444	-0,729	-0,657	5,9	2,585	m/crom
	13	<i>D13Mit115</i>	+36	48	32-62	4,059	-14,762	0,397	-0,721	5,1	2,572	d/crom
Tempo Relativo Aberto	8	<i>D8Mit58</i>	+22	22	4-46	-8,335	-6,244	-0,916	-0,343	6,1	3,093	a/crom
	X	<i>DXMit55</i>	+6	6	0-18	1,237	10,876	0,136	0,597	4,7	2,692	d/crom

Encontramos QTLs no cromossomo 8, no mesmo intervalo de confiança, para Frequência Relativa Aberto e Tempo Relativo Aberto: refletindo a semelhança entre esses dois fenótipos. Porém, o QTL para Frequência Relativa Aberto no cromossomo 13 e o QTL para Tempo Relativo Aberto no cromossomo X mostram que talvez o tempo e frequência nos braços abertos no teste de Labirinto em Cruz Elevado tenham alguns componentes bioquímicos e fisiológicos distintos. Pelas diferenças na atividade motora geral que encontramos em nossas linhagens parentais (Sauce e colaboradores 2009), talvez a frequência de entradas nos braços abertos agrupe outros fatores dentro do complexo fenótipo de ansiedade (Walf e Frye 2007).

No cromossomo X, encontramos um QTL para Tempo Relativo Aberto a 18 cM de distância do intervalo de confiança do QTL para Estrutura do Ninho pré-parto. Possivelmente essa é uma relação parecida com o efeito da ansiedade no uso de material (Brunner e colaboradores 1999): mas fazendo com que a fêmea dedique pouco tempo na construção da altura e do fechamento do ninho.

Nos fenótipos de ansiedade, encontramos efeitos aditivos e de interações dentro dos QTLs individuais. O QTL para Tempo Relativo Aberto (na região do cromossomo 8) tem efeito aditivo. O QTL para Tempo Relativo Aberto (na região do cromossomo X) tem efeito sobredominante. Encontramos efeito de subdominância nos dois QTLs para Frequência Relativa Aberto.

Nas análises epistáticas entre os QTLs individuais para o fenótipo Frequência Relativa Aberto, tivemos interação significativa (regiões dos cromossomos 8 e 13; $p=0,02^*$). Para Tempo Relativo Aberto, encontramos epistasia entre as duas regiões individuais, dos cromossomos 8 e X ($p=0,003^*$). Esses resultados sugerem a complexidade da ansiedade; possivelmente pela diferença entre a atividade motora geral e a imobilidade causada pela ansiedade.

Procuramos por genes candidatos em todos os QTLs para os fenótipos Frequência Relativa Aberto e Tempo Relativo Aberto, e encontramos genes descritos em outros estudos associados a fenótipos estresse, ansiedade e depressão (Tabela 19).

Tabela 19: Genes candidatos para os QTLs individuais dos fenótipos de construção de ninho pós-parto. Posição no centrômero (em cM) do loco (marcador microssatélite) associado com LOD score mais alto. Intervalo de Confiança da região (± 1 LOD). Nome do gene e sua posição no centrômero. Fenótipos associados ao gene candidato em outros estudos, e as respectivas referências.

Fenótipos Ansiedade	Loco	Posição do Centrômero (cM)	Intervalo de Confiança (cM)	Gene Candidato	Nome do Gene	Posição do Gene (cM)	Fenótipo	Referência
Frequência Relativa Aberto	<i>D8Mit58</i>	16	0-32	Plat	plasminogen activator, tissue	9.0 cM	estresse e ansiedade	Pawlak e colaboradores, 2003
	<i>D13Mit115</i>	48	32-62	Htr1a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	58.0 cM	ansiedade materna e depressão	Gleason e colaboradores, 2010
Tempo Relativo Aberto	<i>D8Mit58</i>	22	4-46	Adcy7	adenylate cyclase 7	40.0 cM	depressão	Hines e colaboradores, 2006
	<i>DXMit55</i>	6	0-18	Agtr2	angiotensin II receptor, type 2	12.5 cM	ansiedade	Okuyama e colaboradores, 1999

O gene *Htr1A* (*serotonin receptor 1A*), candidato no nosso QTL do cromossomo *13*, tem associação importante em camundongos com a ansiedade específica para o período materno e com possível efeito também na depressão (Gleason e colaboradores 2010). Esse gene codifica uma proteína receptora da serotonina – hormônio associado em camundongos com a sobrevivência dos filhotes e comportamento maternos como a construção do ninho (Lerch-Haner e colaboradores 2008). Apesar de em nossas linhagens SM/J e LG/J não existirem diferenças na expressão do gene *Htr1A* (Chiavegatto e colaboradores 2008), a associação com a construção de ninho pode estar na diferente recepção do sinal da serotonina devido às diferentes interações fisiológicas nas fêmeas F₂. Assim, o gene *Htr1A* é um potencial componente genético conectado à ansiedade e ao comportamento de construção em nossas linhagens. Além disso, em nossas linhagens estamos estudando também a depressão nas fêmeas F₂, e, portanto, o gene *Htr1A* é uma expectativa para a análise de QTL desse fenótipo.

CONCLUSÕES

Em nossas linhagens de camundongos, o comportamento de construção de ninho nas fêmeas F₂ em fase materna está associado com os fenótipos de tamanho de ninhada e peso das fêmeas e isso se deve provavelmente ao efeito de pleiotropia, com um componente genético em comum nessa rede fenotípica. Encontramos que não existe associação entre a ansiedade das mães e a construção do ninho, mas possivelmente alguns aspectos do teste de ansiedade – como a atividade motora – podem estar associados com o ninho. Além disso, não encontramos associação entre a idade da mãe e a construção de ninho, sugerindo um efeito apenas da experiência materna nesse comportamento. A arquitetura genética dos fenótipos de

construção de ninho, peso e ansiedade é complexa, e a existência de genes candidatos com funções para construção de ninho/ansiedade e construção de ninho/peso revelam componentes genéticos potenciais para essas conexões fenotípicas.

Obtivemos QTLs associados a construção de ninho em regiões encontradas em outro estudo para o fenótipo de desempenho materno no mesmo inter cruzamento. Assim, talvez o comportamento de construção de ninho em nossas linhagens seja responsável por parte da sobrevivência dos filhotes. A sobrevivência e o ninho podem também ter componentes genéticos em comum e ambos fenótipos serem consequências (efeitos) de outro fenótipo – como depressão, produção de leite e reconhecimento dos filhotes.

Para a arquitetura genética da construção de ninho, encontramos muitos QTLs em diferentes cromossomos. Além do efeito aditivo, os QTLs têm efeitos dominantes dentro da mesma região e muitas conexões entre regiões diferentes revelando efeitos epistáticos nos fenótipos de ninho. Esses QTLs têm efeitos individuais e epistáticos associados com considerável parte da variação. O grande número de genes, os efeitos de intensidade moderada e a grande proporção de conexões dominantes e epistáticas corroboram nossa hipótese sobre uma arquitetura genética do tipo II para um fenótipo importante para o *fitness* como o comportamento de construção de ninho.

Por fim, a identificação de genes relacionados ao cuidado materno, como construção de ninho, em camundongos e o entendimento da arquitetura genética envolvida poderão contribuir na identificação de genes para esse comportamento em outros mamíferos, em virtude da similaridade dos mapas genéticos entre diversas espécies. Além disso, pudemos conhecer sobre a complexa rede envolvida no comportamento de construção de ninho e o padrão geral relacionado com o processo adaptativo e a evolução dos seres vivos.

REFERÊNCIAS

Alcock J (1993) *Animal Behavior: An Evolutionary Approach, 5th ed.* Sinauer Associates Inc, Sunderland.

Amenomori Y, Chen CL, Meites J (1970) Serum Prolactin Levels in Rats During Different Reproductive States. *Endocrinology* 86(3): 506-510.

Bateson P (1994) The dynamics of parent offspring relationship in mammals. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 399-403.

Baker C (2004) *Behavioral Genetics: An introduction to how genes and environments interact through development to shape differences in mood, personality, and intelligence.* AAAS, Washington DC.

Barnett SA, Dickson RG (2008) Wild mice in the cold: some findings on adaptation. *Biological Reviews* 64(4): 317-340.

Boake CRB (1994) *Quantitative Genetic Studies of Behavioral Evolution.* The University of Chicago Press, Chicago.

Boake CRB, Arnold SJ, Breden F, Meffert LM, Ritchie M, Taylor BJ, Wolf JB, Moore AJ (2002) Genetic Tools for Studying Adaptation and the Evolution of Behavior. *Am Nat* 160: 143-159.

Boccia ML, Pedersen CA (2001) Brief vs. long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 26(7): 657-72.

Brown RE, Mathieson WB, Stapleton J, Neumann PE (1999) Maternal behavior in female C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Physiology & Behavior* 67(4): 599-605.

Brunner D, Buhot MC, Hen R, Hofer M (1999) Anxiety, motor activation, and maternal-infant interactions in 5HT1B knockout mice. *Behav Neurosci* 113(3): 587-601.

Bucan M e Abel T (2002) The mouse: Genetics meet behavior. *Nature Reviews Genetics* 3: 114-123.

Bult A, Lynch CB (1996) Multiple selection responses in house mice bidirectionally selected for thermoregulatory nest-building behavior: Crosses of replicate lines. *Behavior Genetics* 26(4): 439-446.

Bult A, Lynch CB (1997) Nesting and Fitness: Lifetime Reproductive Success in House Mice Bidirectionally Selected for Thermoregulatory Nest-Building Behavior. *Behavior Genetics* 27(3): 231-240.

Bult A, Lynch CB (2000) Breaking Through Artificial Selection Limits of an Adaptive Behavior in Mice and the Consequences for Correlated Responses. *Behavior Genetics* 30(3): 193-206.

Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P (2002) Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res* 134(1-2): 49-57.

Carter PA, Swallow JG, Davis SJ, Garland Jr T (2000) Nesting Behavior of House Mice (*Mus Domesticus*) Selected for Increased Wheel-Running Activity. *Behavior Genetics* 30(2): 85-94.

Champagne FA, Curley JP, Keverne EB, Bateson PPG (2007) Natural variations in postpartum maternal care in inbred and outbred mice. *Physiology & Behavior* 91: 325-334.

Chen HC, Ladha Z, Smith SJ, Farese RV Jr (2003) Analysis of energy expenditure at different ambient temperatures in mice lacking DGAT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284 (1): 213-218.

Cheverud JM (2000) Detecting epistasis among quantitative trait loci. Em: Wolf JB, Brodie III ED, Wade MJ. *Epistasis and the Evolutionary Process*, pp 58-81. Oxford University Press, New York.

Cheverud JM, Ehrich TH, Hrbek T, Kenney JP, Pletscher LS, Semenkovich CF (2004) Quantitative Trait Loci for Obesity- and Diabetes-Related Traits and Their Dietary Responses to High-Fat Feeding in LGXSM Recombinant Inbred Mouse Strains. *Diabetes* 53(12): 3328-3336.

Cheverud JM, Vaughn TT, Pletscher LS, Peripato AC, Adams ES, Erikson CF, King-Ellison KJ (2001) Genetic architecture of adiposity in the cross of LG/J and SM/J inbred mice. *Mammalian Genome* 12: 3-12.

Chiavegatto S, Ambar G, Sauce B, Anceti KF, Peripato AC (2008) Genetic basis of maternal care in the cross between LG/J and SM/J inbred mice: a closer look. *The Annual Symposium of the American Genetic Association - Genetics and Genomics of Behavior*: 17.

Collins FS, Rossant J, Wurst W, International Mouse Knockout Consortium (2007) A mouse for all reasons. *Cell* 128(1): 9-13.

Coyne J, Barton NH, Turelli M (1997) A critique of Sewall Wright's shifting balance theory of evolution. *Evolution* 51: 643-671.

Dawkins MS (1998) Evolution and animal welfare. *Quart Rev Biol* (73): 305-328.

Deacon RMJ (2006) Assessing nest building in mice. *Nature Protocols* 1: 1117-1119.

Denenberg VH, Sawin PB, Fromer GP, Ross S (1958) Genetic, Physiological and Behavioral Background of reproduction in the Rabbit: IV. An Analysis of Maternal Behavior at Successive Parturitions. *Behaviour* 13: 131-141.

Denenberg VH, Taylor RE, Zarrow MX (1969) Maternal Behavior in the Rat: An Investigation and Quantification of Nest Building. *Behaviour* 34: 1-16.

Dietrich W, Katz H, Lincoln S, Shin H-S, Friedman J, Dracopoli N, Lander ES (1992) A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics* 131: 423-447.

Dung HC (1975) Growth retardation, high mortality, and low reproductivity of neurological mutant mice. *Anat Rec* 181: 347-348.

Dwyer CM, Lawrence AB (2000) Maternal behaviour in domestic sheep (*Ovis aries*): constancy and change with maternal experience. *Behaviour* 137(10): 1391-1413.

Edelsbrunner ME, Painsipp E, Herzog H, Holzer P (2009) Evidence from knockout mice for distinct implications of neuropeptide-Y Y2 and Y4 receptors in the circadian control of locomotion, exploration, water and food intake. *Neuropeptides* 43(6): 491-497.

Erickson D (2005) Mapping the future of QTL's. *Heredity* 95: 417-418.

Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman Press, New York.

Fan X, Xu M, Hess EJ (2010) D2 dopamine receptor subtype-mediated hyperactivity and amphetamine responses in a model of ADHD. *Neurobiol Dis* 37(1): 228-236.

Fenster CB, Galloway LF, Chao L (1997) Epistasis and its consequences for the evolution of natural populations. *Trends Ecol Evol* 12: 282-286.

Fisher RA (1925) Applications of "Student's" distribution. *Metron* 5: 90-104.

Fisher RA (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.

Fleming AS, O'Day DH, Kraemer GW (1999) Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neuros Biobehav Rev* 23: 673-685.

Flint J (2003) Analysis of quantitative trait loci that influence animal behavior. *Journal of Neurobiology* 54(1): 46-77.

Friedman MI, Bruno JP (1976) Exchange of water during lactation. *Science* 197: 409-410.

Gallo TCG, Anceti KF, Sauce B, Peripato AC (2008) Variação no tamanho de ninhada em camundongos LG/J x SM/J. *Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética*: 210.

Gleason G, Liu B, Bruening S, Zupan B, Auerbach A, Mark W, Oh JE, Gal-Toth J, Lee F, Toth M (2010) The serotonin1A receptor gene as a genetic and prenatal maternal environmental factor in anxiety. *Proc Natl Acad Sci* 107(16): 7592-7597.

Golub MS, Germann SL, Lloyd KC (2004) Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav Brain Res* 153(1): 159-170.

Goodale H (1938) A study of the inheritance of body weight in the albino mouse by selection. *J Hered* 29: 101-112.

Gilham D, Labonté ED, Rojas JC, Jandacek RJ, Howles PN, Hui DY (2007) Carboxyl ester lipase deficiency exacerbates dietary lipid absorption abnormalities and resistance to diet-induced obesity in pancreatic triglyceride lipase knockout mice. *J Biol Chem* 282(34): 24642-24649.

Günter P, Wagner, Jane P, Kenney-Hunt, Mihaela Pavlicev, Joel R. Peck, David Waxman & James M. Cheverud (2008) Pleiotropic scaling of gene effects and the 'cost of complexity'. *Nature* 452: 470-472.

Haley CS, Knott SA (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315-324.

Hansen S, Ferreira A (1986) Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. *Behav Neurosci* 100(1): 64-70.

Hines LM, Hoffman PL, Bhave S, Saba L, Kaiser A, Snell L, Goncharov I, LeGault L, Dongier M, Grant B, Pronko S, Martinez L, Yoshimura M, Tabakoff B (2006) A sex-specific role of type VII adenylyl cyclase in depression. *J Neurosci* 26(48): 12609-12619.

Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K (1997) Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of prolactin gene. *EMBO J* 16: 6926-6935.

Hotelling H (1936) Relations between two sets of variates. *Biometrika* 28: 321-377.

Houle D, Morikawa B, Lynch M (1996) Comparing mutational variabilities. *Genetics* 143: 1467-1483.

Hunter KW, Crawford NPS (2008) The Future of Mouse QTL Mapping to Diagnose Disease in Mice in the Age of Whole-Genome Association Studies. *Annu Rev Genet* 42: 131-41.

Hrbek T, de Brito RA, Wang B, Pletscher LS, Cheverud JM (2006) Genetic characterization of a new set of recombinant inbred lines (LGXSM) formed from the intercross of SM/J and LG/J inbred mouse strains. *Mammalian Genome* 17: 417-429.

Jansen RC, Nap JP (2001) Genetical genomics: the added value from segregation. *Trends Genet* 17: 388-391.

Keisala T, Minasyan A, Järvelin U, Wang J, Hämäläinen T, Kalueff AV, Tuohimaa P (2007) Aberrant nest building and prolactin secretion in vitamin D receptor mutant mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104(3-5): 269-273.

Kort F (1973) Regression analysis and discriminant analysis. *Am Polit Sci Rev* 67: 555-559.

Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47(260): 583-621.

Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.

Lander ES, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11: 241-247.

Lee CT (1973) Genetic analysis of nest-building behavior in laboratory mice (*Mus musculus*). *Behavior Genetics* 3 (3): 247-256.

Lee JG (1973) Effects of litter size, age of young, and parity on foster mother behaviour in *Rattus norvegicus*. *Animal Behaviour* 21(1): 78-82.

Lee MS (1995) *Mouse Genetics Concepts and Applications*. New York, Oxford University Press.

Lefebvre L, Viville S, Barton SC, Ishino F, Keverne EB, Surani MA (1998) Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene *Mest*. *Nat Genet* 20(2): 163-169.

Lerch-Haner JK, Frierson D, Crawford LK, Beck SG, Deneris ES (2008) Serotonergic transcriptional programming determines maternal behavior and offspring survival. *Nature Neuroscience* 11: 1001-1003.

Levy SF, Siegal ML (2008) Network hubs buffer environmental variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* 6(11): e264.

Leybold BG, Yu CR, Leinders-Zufall T, Kim MM, Zufall F, Axel R (2002) Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci* 99(9): 6376-81.

Li L-L, Keverne EB, Aparicio SA, Ishino F, Barton SC, Surani MA (1999) Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed *Peg3*. *Science* 284: 330-333.

Li J, Ji L (2005) Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity* 95(3): 221-227.

Lisk RD (1971) Oestrogen and progesterone synergism and elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*). *Anim Behav* 19: 606-610.

Lisk RD, Pretlow III RA, Friedman ST (1969) Hormonal stimulation necessary for elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*). *Anim Behav* 17: 730-737.

Lister LG (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92(2): 180-185.

Liu B-H (1997) *Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis*. CRC, New York.

Lynch CB, Possidente Jr BP (1978) Relationships of maternal nesting to thermoregulatory nesting in house mice (*Mus musculus*) at warm and cold temperatures. *Anim Behav* (26): 1136-1143.

Lynch CB, Roberts RC (1984) Aspects of temperature regulation in mice selected for large and small size. *Genet Res.* 43(3): 299-306.

Lynch CB (1994) Evolutionary inferences from genetic analyses of cold adaptation in laboratory and wild populations of the house, pp.278-301 in *Quantitative Genetic Studies of Behavioral Evolution*, editado por Boake CRB. The University of Chicago Press, Chicago.

Lynch M, Walsh B (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

MacArthur J (1944) Genetics of body size and related characters. I. Selection of small and large races of the laboratory mouse. *Am Nat* 78: 42-157.

Manly KF, Cudmore Jr RH, Meer JM (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12: 930-932.

Mann PE, Bridges RS (2001) Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. *Prog Brain Res* 133: 251-62.

Mann HB, Whitney DR (1947) On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* 18: 50-60.

Markowska AL, Spangler EL, Ingram DK (1998) Behavioral assessment of the senescence-accelerated mouse (SAM P8 and R1). *Physiol Behav* 64(1): 15-26.

Martin PM, Irino M, Suzuki K, Lewis MH, Mailman RB (1991) The female brindled mouse as a model of Menkes' disease: the relationship of fur pattern to behavioral and neurochemical abnormalities. *Dev Neurosci* 13(3): 121-129.

Masaki T, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, Watanabe T, Sakata T, Yoshimatsu H (2004) Involvement of hypothalamic histamine H1 receptor in the regulation of feeding rhythm and obesity. *Diabetes* 53(9): 2250-2260.

Masutani M, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, Jishage K, Watanabe T, Sugimoto T, Nakagama H, Ochiya T, Sugimura T (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 96(5): 2301-2304.

Mattheij JAM, Gruisen EFM, Swarts JJM (1979) The Suckling-Induced Rise of Plasma Prolactin in Lactating Rats: Its Dependence on Stage of Lactation and Litter Size. *Horm Res* 11: 325-336.

Mayer AD, Rosenblatt JS (1987) Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. *Horm Behav* 21(2): 253-267.

Mayes JS, Watson GH (2004) Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obesity Reviews* 5: 197-216.

Merilä J, Sheldon BC (1999) Genetic architecture of fitness and nonfitness traits: empirical patterns and development of ideas. *Heredity* 83: 103-109.

McGuffin P, Riley B, Plomin R (2001) Genomics and behavior: Toward behavioral genomics. *Science* 291(5507): 1232-1249.

Miyakawa T, Yagi T, Kagiya A, Niki H (1996) Radial maze performance, open-field and elevated plus-maze behaviors in Fyn-kinase deficient mice: further evidence for increased fearfulness. *Brain Res Mol Brain Res* 37(1-2): 145-150.

Moore BJ, Gerardo-Gettens T, Horwitz BA, Stern JS (1986) Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Res Bull* 17(4): 563-569.

Mouse Genome Database (2010) *Mouse Genome Informatics*. The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. (URL:<http://www.informatics.jax.org/>)

Mousseau TA, Fox CW (1998) *Maternal Effects as Adaptations*. Oxford University Press, New York.

Muraoka-Cook RS, Sandahl M, Hunter D, Miraglia L, Earp HS 3rd (2008) Prolactin and ErbB4/HER4 signaling interact via Janus kinase 2 to induce mammary epithelial cell gene expression differentiation. *Mol Endocrinol* 22(10): 2307-2321.

Nelson JE e Krawetz SA (1992) Purification of cloned and genomic DNA by guanidine thiocyanate/isobutyl alcohol fractionation. *Anal Biochem*. 207(1): 197-201.

Newman MEJ (2003) The structure and function of complex networks. *SIAM Review* 45 (2): 167-256.

Noirot E (1972) Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Developmental Psychobiology* 5(4): 371-387.

Okuyama S, Sakagawa T, Chaki S, Imagawa Y, Ichiki T, Inagami T (1999) Anxiety-like behavior in mice lacking the angiotensin II type-2 receptor. *Brain Res* 821(1): 150-159.

Orr HA (2009) Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nature Reviews Genetics* 10 (8): 531-539.

Oyama S (2000) *The Ontogeny of Information: Developmental Systems and Evolution*. Duke Univ. Press.

Parter M, Kashtan N, Alon U (2008) Facilitated variation: how evolution learns from past environments to generalize to new environments. *PLoS Comput Biol* 4(11): e1000206.

Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S (2003) Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 6(2): 168-174.

Pearson K (1901). On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. *Philosophical Magazine* 2(6): 559-572.

Pearson K (1920) Notes on the history of correlation. *Biometrika* 13(1): 25-45.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14(3): 149-67.

Peripato AC, Cheverud JM (2002) Genetic influences on maternal care. *Am Nat* 160: 173-185.

Peripato AC, de Brito RA, Matioli SR, Pletscher LS, Vaughn TT, Cheverud JM (2004) Epistasis affecting litter size in mice. *J Evol Biol* 17: 593-602.

Peripato AC, de Brito RA, Vaughn TT, Pletscher LS, Matioli SR, Cheverud JM (2002) Quantitative trait loci for maternal performance for offspring survival in mice. *Genetics* 162: 1341-1362.

Phillips PC (2008) Epistasis – the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature Reviews Genetics* 9: 855-867.

Ramos A, Moisan MP, Chaouloff F, Mormède C, Mormède P (1999) Identification of female-specific QTLs affecting an emotionality-related behavior in rats. *Mol Psychiatry* 4(5): 453-62.

Räsänen K, Kruuk LEB (2007) Maternal effects and evolution at ecological time-scales. *Functional Ecology* 21: 408–421.

Rebai A (1997) Comparison of methods for regression interval mapping in QTL analysis with non-normal traits. *Genet. Res.* 69: 69-74.

Rockman MV (2008) Reverse engineering the genotype-phenotype map with natural genetic variation. *Nature* 456: 738-744.

Rosenblatt JS (1975) Prepartum and postpartum regulation of maternal behaviour in the rat. *Ciba Found Symp* 33: 17-37.

Routman EJ, Cheverud JM (1994) A rapid method of scoring simple sequence repeat polymorphisms with agarose gel electrophoresis. *Mammal Genome* 5: 187-188.

Routman EJ, Cheverud JM (1997) Gene effects on a quantitative trait: two-locus epistatic effects measured at microsatellite markers and at estimated QTL. *Evolution* 51: 1654-1662.

Rüppell O, Pankiw T, Page Jr RE. (2004) Pleiotropy, Epistasis and New QTL: The Genetic Architecture of Honey Bee Foraging Behavior. *Journal of Heredity* 95(6): 481-491.

SAS Institute (2004) *SAS/STAT 9.1 User's Guide*. SAS Institute. Cary, NC.

Sauce B, Anceti KF, Peripato AC (2008) Mecanismos envolvidos na heterose do comportamento de construção de ninho em camundongos. *Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética*: 209.

Sauce B, Gallo TCG, Goes CP, Sucomine VM, Watanabe IM, Peripato AC (2009) Contrasting Maternal Care between SM/J and LG/J inbred mouse strains. *46th Annual Meeting of the Animal Behavior Society*: 119.

Schneider JE, Lynch CB (1984) Investigation of a common physiological mechanism underlying progesterone- induced and maternal nesting in mice, *Mus musculus*. *J Comp Psychol* 98: 165-176.

SYSTAT Software Inc. (2009) *Systat 13.0 Statistics I II III IV*. SYSTAT Software Inc. Chicago.

Schneider CW, Chenoweth MB (1970) Effects of Hallucinogenic and other Drugs on the Nest-building Behaviour of Mice. *Nature* 225: 1262-1263.

Sherwin CM (1997) Observations on the prevalence of nest-building in non-breeding TO strain mice and their use of two nesting materials. *Lab Anim* 31: 125-132.

Streijger F, Jost CR, Oerlemans F, Ellenbroek BA, Cools AR, Wieringa B, Van der Zee CE (2004) Mice lacking the UbCKmit isoform of creatine kinase reveal slower spatial learning acquisition, diminished exploration and habituation, and reduced acoustic startle reflex responses. *Mol Cell Biochem* 256-257(1-2): 305-318.

Templeton, AR (2006) *Population Genetics and Microevolutionary Theory*. John Wiley & Sons Inc., New Jersey.

Tomida S, Mamiya T, Sakamaki H, Miura M, Aosaki T, Masuda M, Niwa M, Kameyama T, Kobayashi J, Iwaki Y, Imai S, Ishikawa A, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T, Ebihara S (2009) Usp46 is a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension and forced swimming tests. *Nature Genetics* 41(6): 688-695.

Turri MG, Datta SR, DeFries J, Henderson ND, Flint J (2001) QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. *Curr Biol* 15(10): 725-34.

Vallone D, Pignatelli M, Grammatikopoulos G, Ruocco L, Bozzi Y, Westphal H, Borrelli E, Sadile AG (2002) Activity, non-selective attention and emotionality in dopamine D2/D3 receptor knock-out mice. *Behav Brain Res* 130(1-2): 141-148.

van de Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V (1998) Strength of preference for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Applied Animal Behaviour Science* 55: 369-382.

van Haandel EBP, Visscher AH (1995) Genetic parameters for reproduction traits in crosses between Finnish Landrace and Ile de France sheep. *Livestock Production Science* 43 (2): 129-136.

Varki A, Geschwind DH, Eichler EE (2008) Explaining human uniqueness: genome interactions with environment, behaviour and culture. *Nature Reviews Genetics* 9: 749-763.

Vaughn TYT, Pletscher LS, Peripato A, King-Ellison K, Adams E, Erikson C, Cheverud JM (1999) Mapping quantitative trait loci for murine growth: a closer look at genetic architecture. *Genetical Research* 74(3): 313-322.

Visscher PM, Haley CS, Knott SA (1996) Mapping QTLs for binary traits in backcross and F₂ populations. *Gen Res* 68: 55-63.

Voci VE, Carlson NR (1973) Enhancement of maternal behavior and nest building following systemic and diencephalic administration of prolactin and progesterone in the mouse. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 83(3): 388-393.

Wahlsten D (1999) Single-gene influences on brain and behavior. *Annual Review of Psychology* 50: 599-624.

Wahlsten D, Crabbe JC (2003) Studies of activity, behavior, and forebrain morphometry in two laboratories. (URL:<http://phenome.jax.org/pub/cgi/phenome/mpdcgi?rtn=projects/details&sym=Wahlsten1&full=1>)

Wallace ME (1981) The breeding, inbreeding and management of wild mice. *Symp Zool Soc Lond* 47: 183-204.

Walf AA, Frye CA (2007) The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2: 322-328.

Walf AA, Koonce C, Manley K, Frye CA (2009) Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. *Behav Brain Res* 196(2): 254-260.

Walther T, Balschun D, Voigt JP, Fink H, Zuschratter W, Birchmeier C, Ganten D, Bader M (1998) Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* 273(19): 11867-11873.

Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R (2008) *Molecular Biology of the Gene, Sixth Edition*, Benjamin Cummings.

Weber EM, Anna I, Olsson S (2008) Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: An ethological review. *Applied Animal Behaviour Science* 114: 1-22.

Weller JI, Song JZ, Heyen DW, Lewin HA, Ron M (1998) A new approach to the problem of multiple comparisons in the genetic dissection of complex traits. *Genetics* 150: 1699-1706.

Williams, RW (1998) Neuroscience meets quantitative genetics: using morphometric data to map genes that modulate CNS architecture. The 1998 Short Course in Quantitative

Neuroanatomy (Morisson J, Hof P, eds) pp. 66-78. Washington: Society for Neuroscience.
(URL:<http://www.nervenet.org/papers/ShortCourse98.html>)

Winter A, Krämer W, Werner FA, Kollers S, Kata S, Durstewitz G, Buitkamp J, Womack JE, Thaller G, Fries R (2002) Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc Natl Acad Sci* 99(14): 9300-9305.

Wolf JB, Brodie III ED, Moore AJ (1999) Interacting Phenotypes and the Evolutionary Process. II. Selection Resulting from Social Interactions. *The American Naturalist* 153(3): 254-266.

Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.

Yanai K, Son LZ, Endou M, Sakurai E, Nakagawasai O, Tadano T, Kisara K, Inoue I, Watanabe T, Watanabe T (1998) Behavioural characterization and amounts of brain monoamines and their metabolites in mice lacking histamine H1 receptors. *Neuroscience* 87 (2): 479-487.

Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis 4th edition*. Prentice Hall, New Jersey.

Zarrow MX, Gandelman R, Denenberg VH (1971) Lack of nest building and maternal behavior in the mouse following olfactory bulb removal. *Hormones and Behavior* 2(3): 227-238.

Zhu XR, Maskri L, Herold C, Bader V, Stichel CC, Güntürkün O, Lübbert H (2007) Non-motor behavioural impairments in parkin-deficient mice. *Eur J Neurosci* 26(7): 1902-1911.