

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**GUILHERME SALGADO CARRAZONI**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO REALIZADO ANTES E/OU DURANTE A GESTAÇÃO**  
**NA MEMÓRIA DA PROLE SUBMETIDA À PRIVAÇÃO MATERNAL**

**Uruguiana**

**2021**

**GUILHERME SALGADO CARRAZONI**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO REALIZADO ANTES E/OU DURANTE A GESTAÇÃO NA  
MEMÓRIA DA PROLE SUBMETIDA À PRIVAÇÃO MATERNAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Pâmela Billig Mello-Carpes

Coorientadora: Profa. Dra. Viviane Rostirola Elsner

Uruguaiana

2021

**GUILHERME SALGADO CARRAZONI**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO REALIZADO ANTES E/OU DURANTE A GESTAÇÃO  
NA MEMÓRIA DA PROLE SUBMETIDA À PRIVAÇÃO MATERNAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Dissertação de mestrado defendida e aprovada em: 05 de fevereiro de 2021.

Banca examinadora:



---

Prof. Dra. Pâmela Billig Mello Carpes  
Orientadora  
UNIPAMPA



---

Prof. Dra. Nadja Schroder  
UFRGS



---

Prof. Dra. Simone Pinton  
UNIPAMPA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

C313e Carrazoni, Guilherme Salgado

Efeitos do exercício realizado antes e/ou durante a  
gestação na memória da prole submetida à privação  
maternal / Guilherme Salgado Carrazoni.

71 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do  
Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2021.

"Orientação: Pâmela Billig Mello-Carpes".

1. exercício maternal. 2. estresse neonatal. 3.  
hipocampo. 4. memória espacial. 5. memória de  
reconhecimento. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Pâmela Billig Mello-Carpes por me aceitar para estágio voluntário no Grupo de Pesquisa em Fisiologia sem ao menos me conhecer, e, após, por ser fonte de inspiração durante todo mestrado e em todas as esferas. Muito obrigado por sempre incentivar, ajudar, apoiar e fazer questionar sobre tudo. Muito obrigado!

À Profa. Dra. Viviane Rostirola Elsner por proporcionar novos olhares e principalmente por ajudar no estudo de temas que contemplam esse trabalho.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIPAMPA que durante esses anos ajudaram a moldar e realizar esse trabalho, sempre sendo fonte de troca e construção de conhecimento. Meu especial obrigado para Ben-Hur Souto das Neves, Karine Ramires Lima e Marisele Soares, sem vocês segurando as pontas seria impossível chegar aqui. Muito obrigado por todo apoio!

Aos professores e professoras do PPGMCF da UNIPAMPA que sempre estiveram dispostos e abertos a discussões que despertam a vontade de ser professor a cada dia. Muito obrigado!

À UNIPAMPA e ao CNPq pelos auxílios e bolsas concedidos para que tornasse o trabalho viável de ser realizado. Todos que caminham essa estrada sabem o quanto isso é importante.

*In memoriam* à minha vó Elizabeth que me acolheu, educou e ensinou. Não existe outra pessoa no mundo que eu gostaria mais que estivesse lendo isso hoje. Obrigado por tudo.

## RESUMO

O objetivo desta dissertação foi estudar o impacto do exercício físico realizado antes e/ou durante a gestação de ratas Wistar sobre diferentes tipos de memória da prole submetida a um protocolo de privação de cuidados maternos nos primeiros dias de vida. Para isto, foram utilizadas 24 ratas Wistar fêmeas e 12 ratos Wistar machos para concepção da ninhada. As ratas mães (n = 4/grupo) foram submetidas a 4 semanas de exercício físico aeróbico em esteira antes da gestação e 3 semanas durante a gestação, ou somente durante as 3 semanas de gestação (EM). Após o nascimento, a ninhada foi separada em grupo controle ou grupo privado (submetido ao protocolo de privação maternal do primeiro ao décimo dia pós-natal; DPN 1-10), e foram submetidos a testes de memória a partir do DPN 22 (fêmeas; n = 8-11/grupo) ou DPN 60 (machos; n = 7-13/grupo). A privação maternal resultou em déficits na memória de reconhecimento de objetos e social nos filhotes fêmeas pré-púberes e machos adultos jovens. O exercício físico realizado durante a gestação mostrou resultados positivos, prevenindo os déficits de memória de reconhecimento nos animais privados, além de promover a melhora de performance de aprendizagem espacial em fêmeas pré-púberes. Já quando o exercício físico foi realizado também previamente à gestação, não foram observados efeitos neuroprotetores. Esses resultados mostram que o exercício maternal realizado durante a gestação é capaz de proteger contra o desenvolvimento de déficits de memória causados pela privação maternal, porém, quando iniciado antes da gestação e continuado com redução da intensidade, os efeitos positivos não são observados. Hipotetizamos que os resultados benéficos observados no grupo EM podem estar relacionados a fatores epigenéticos, como aumento dos níveis hipocâmpais de acetilação da histona H3, o que é capaz de aumentar a expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). No grupo que iniciou o exercício antes da gestação tais mudanças podem não ocorrer devido à redução considerável de intensidade de treinamento, além de uma possível adaptação da maquinaria transcricional que não induziu alterações epigenéticas, aspectos que serão investigados em estudos futuros.

**Palavras-chave:** exercício maternal; estresse neonatal; hipocampo; memória espacial; memória de reconhecimento.

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to study the impact of the physical exercise before and/or during pregnancy in different types of memories of Wistar offspring submitted to a maternal separation protocol in their first days of life. To assigned this, 24 females (n = 4/group) and 12 male Wistar rats were used to mate. Females dams (n = 4 per group) were submitted to 4 weeks of aerobic physical exercise before and 3 weeks during pregnancy or only 3 weeks of exercise during pregnancy (EM) using a treadmill for rodents. After delivery, pups were divided into control or maternal separated group (submitted to maternal separation protocol from postnatal day 1 to 10; PND 1-10); memory testing started PND 22 (females; n = 8-11/group) or PND 60 (males; n = 7-13/group). Maternal separation caused object and social recognition memory deficits in pre-pubertal females and young adult males. Physical exercise performed during pregnancy showed positive results, being able to prevent those deficits and enhance spatial learning in pre-pubertal females. On the other hand, when exercise was performed before and through pregnancy, we observed no significant neuroprotective effects. Those results elicit neuroprotective effects of aerobic exercise performed during pregnancy, protecting against memory deficits caused by maternal separation, however, when initiated before pregnancy reducing intensity during it, the positive effects where not observed. This may be due to epigenetic factors, such as histone H3 acetylation, which can enhance BDNF levels and elicit neuroprotective effects; in the group that started the exercise before the pregnancy such changes may not occur due to the considerable reduction in training intensity or even by an adaptation of transcriptional machinery, aspects that will be investigated in future research.

**Keywords:** maternal exercise; early life stress; hippocampus; spatial memory; recognition memory.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hipocampo e sua circuitaria dentro do cérebro humano e de ratos Wistar.....	17
Figura 2. Vias de sinalização de processos que envolvem a formação da memória. ....	18
Figura 3. Proliferação e sobrevivência neural hipocampal em situação normal (controle) e de privação maternal (PM).....	20
Figura 4. Efeitos do estresse no eixo HPA.....	21
Figura 5. Complexo de histonas, modificações em resíduos de lisina e ação das histonas acetiltransferases (HATs) e das histonas deacetilases (HDACs) na ativação e repressão gênica. ....	24
Figura 6. Delineamento experimental..	32
Figura 7. Resultados do teste de VO <sub>2</sub> máx realizado antes da primeira (S1) e terceira semana de treino (S3), e no primeiro dia de gestação (G1)..	38
Figura 8. O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento de objetos causado pela privação maternal em ratas pré-púberes.....	40
Figura 9. O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento social causado pela privação maternal em ratas pré-púberes.....	41
Figura 10. Exercício maternal promove aprendizado espacial durante primeira sessão de treino em ratas pré-púberes.....	42
Figura 11. A privação maternal não causou déficit de memória espacial e o exercício maternal não melhorou a latência de escape em ratas pré-púberes..	43
Figura 12. O exercício realizado durante a gestação é melhor que exercício prévio em relação a quantidade de erros cometidos para encontrar o escape em ratas pré-púberes..	44
Figura 13. A privação maternal tem efeito deletério na memória espacial de filhotes fêmeas pré-púberes de mães exercitadas previamente a gestação..	45
Figura 14. O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento de objetos causado pela privação maternal em ratas adultos jovens..	47
Figura 15. O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento social causado pela privação maternal em ratas adultos jovens..	48
Figura 16. Exercício maternal associado à privação maternal promove melhora de aprendizagem espacial em ratas adultos jovens. ....	49
Figura 17. Os ratos adultos jovens privados cujas mães realizaram exercício somente durante a gestação precisaram de menos tempo para encontrar o escape comparados aos animais cujas mães se realizaram exercícios antes e durante a gestação. ....	50

Figura 18. A privação maternal associada a prática de exercício físico pela mãe durante a gestação causou melhora de performance espacial, diminuindo o número de erros para encontrar o escape em ratos adultos jovens.....	51
Figura 19. A privação causou déficit nos ratos adultos jovens filhos de mães que diminuíram a intensidade do exercício a partir do início da gestação. ....	52
Figura 20. Possível mecanismo envolvido na prevenção do déficit de memória causado pela privação maternal na prole de mães exercitadas durante a gestação.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Os protocolos de exercício físico e a privação maternal não alteraram a atividade exploratória nas tarefas de reconhecimento de objetos (RO), reconhecimento social (RS), a função locomotora e atividade exploratória no campo aberto (CA), e o comportamento do tipo ansiedade avaliado por Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de ratas pré-púberes.....	46
Tabela 2. Os protocolos de exercício físico e a privação maternal não alteraram a atividade exploratória nas tarefas de reconhecimento de objetos (RO), reconhecimento social (RS), a função locomotora e atividade exploratória no campo aberto (CA), e o comportamento do tipo ansioso avaliado por Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de ratos adultos jovens..	53

## ANEXOS

<b>Anexo A.</b>	<b>Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....</b>	<b>71</b>
-----------------	--	-----------

## LISTA DE SIGLAS

- ACTH - hormônio adrenocorticotrófico (do inglês, *adrenocorticotrophic hormone*)
- AMPA – Receptor AMPA (alfa-amino-3-hidroximetil-5-4-isoxazolpropiónico)
- BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain derived neurotrophic factor*)
- CA – campo aberto
- CaMK - proteínas quinase dependentes da interação cálcio-calmodulina
- CE – córtex entorrinal
- CREB - elemento de resposta a ligação de AMP cíclico
- CRF – fator liberador de corticotrofina (do inglês, *corticotrophin releasing factor*)
- DPN – dia pós natal
- GD – giro denteado
- HAT – histona acetiltransferase
- HDAC – histona deacetilase
- HPA – Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
- LCE – labirinto em cruz elevado
- LTP – potenciação a longo prazo (do inglês, *long-term potentiation*)
- NaBu – butirato de sódio
- NDMA – receptor NMDA (N-metil-D-aspartato)
- NPV – núcleo paraventricular
- RO – reconhecimento de objetos
- RS – reconhecimento social
- LB – labirinto de Barnes
- SNC – sistema nervoso central
- VO<sub>2</sub>máx – consumo máximo de oxigênio

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	15
I. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
1.1 Memória.....	16
1.2 Estresse neonatal e memória.....	19
1.3 Mecanismos Epigenéticos.....	23
1.4 Exercício físico, epigenética e memória .....	25
II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	28
2.1 Justificativa .....	28
2.2 Hipótese .....	29
2.3 Objetivos.....	29
2.3.1 Objetivo geral.....	29
2.3.2 Objetivos específicos.....	29
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Animais e delineamento experimental.....	30
3.2 Protocolos .....	33
3.2.1 Protocolo de exercício físico .....	33
3.2.1.1 Habituação ao exercício físico.....	33
3.2.1.2 Protocolo de medida indireta do consumo máximo de oxigênio.....	33
3.2.1.3 Exercício físico .....	33
3.2.2 Protocolo de privação materna .....	34
3.2.3 Testes de memória.....	34
3.2.3.1 Tarefa de Reconhecimento de Objetos.....	34
3.2.3.2 Tarefa de Reconhecimento Social .....	35
3.2.3.3 Labirinto de Barnes .....	35
3.2.4 Testes de Controle Comportamental .....	36
3.2.4.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	36
3.2.4.2 Campo Aberto (CA) .....	36
3.3 Análise Estatística.....	37
IV. RESULTADOS .....	38
4.1. O exercício realizado previamente à gestação promove aumento do VO <sub>2</sub> máx indireto .....	38
4.2 Efeitos do exercício realizado durante a gestação em ratas pré-púberes submetidas ou não à privação materna .....	39
4.2.1 O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento de objetos causado pela privação materna.....	39

4.2.2 O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento social causado pela separação maternal.....	40
4.2.3 Exercício maternal melhora a aprendizagem espacial .....	41
4.1.3 O exercício realizado durante a gestação, assim como a privação maternal, não altera variáveis de locomoção, ansiedade e exploração em fêmeas pré-púberes.....	45
4.3.1 O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento de objetos causado pela privação maternal.....	47
4.3.2 O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento social causado pela privação maternal.....	48
4.3.3 O exercício maternal é melhor que o exercício pré-gestação para a retenção de memória espacial em filhotes privados maternalmente .....	49
4.4 O exercício físico realizado durante a gestação, assim como a privação maternal, não altera variáveis de locomoção, ansiedade e exploração em machos jovens adultos.....	52
V. DISCUSSÃO.....	54
VI. CONCLUSÃO.....	59
VII. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação buscou investigar os efeitos do exercício físico realizado antes e/ou durante a gestação na memória da prole submetida à privação maternal. No primeiro estudo avaliamos a memória de reconhecimento e memória espacial de fêmeas pré-púberes e, no segundo, de machos adultos jovens.

O documento está organizado em sete partes. Na primeira parte (Revisão de literatura) são apresentados os temas de estudo de forma a descrever os principais pontos que fundamentam nossa hipótese. A segunda parte é composta pela justificativa da realização do estudo, objetivos e hipótese. A terceira parte é composta pelos métodos que descrevem os protocolos experimentais utilizados no estudo, além da análise estatística realizada. Na quarta parte estão descritos os resultados. Na quinta parte discutimos os principais achados, como interação com a literatura e que acrescentam ao campo. Por fim, na sexta e sétima partes, são apresentadas, respectivamente, a conclusão e as perspectivas de continuidade do estudo.

## I. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Memória

Memória é a capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações obtidas a partir do meio interno ou do contato com ambiente externo (IZQUIERDO, 1989).

Sabemos que o processo de formação de memórias é complexo e não depende somente de uma parte do sistema nervoso central (SNC), além disso, devemos lembrar do fato de que nem tudo que tentamos recordar, conseguimos (IZQUIERDO, 1994).

O processo de formação de uma memória tem 3 fases principais: aquisição, consolidação e evocação (IZQUIERDO, 1989). A aquisição corresponde à fase de aprendizagem de uma nova tarefa ou informação. Durante esta fase ocorre o primeiro contato com a nova informação. Após a aquisição da memória, se desencadeiam processos bioquímicos que são necessários para a formação da memória de longa duração, como a tag sináptica<sup>1</sup> (LI; ROTHKEGEL; XIAO; ABRAHAM *et al.*, 2014) e a síntese de proteínas envolvidas no processo de potencialização a longo prazo<sup>2</sup> (LTP, do inglês *Long-Term Potentiation*) e consolidação da memória (BLISS; GARDNER-MEDWIN, 1973). Após a consolidação dessa memória, pode ocorrer a fase de evocação, correspondente ao momento em que a informação é lembrada pelo sujeito, para utilizar a memória aprendida com um determinado objetivo (MCGAUGH, 2000).

Após consolidada, a memória pode passar por um processo de esquecimento fisiológico, caso a informação adquirida não seja evocada novamente; por outro lado, caso a mesma seja utilizada, isto é, evocada, pode persistir por mais tempo (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016). A persistência da memória depende diretamente das fases de consolidação e evocação prévias, não podendo ocorrer caso a memória não seja consolidada. Além disso, a nova evocação da memória torna a mesma lábil, e pode fazer com que ocorra o processo de reconsolidação, que se dá a partir de mudanças na memória evocada (DUDAI; EISENBERG, 2004).

Quando falamos em tempo de duração de uma memória, a mesma pode durar minutos, dias, meses ou até anos; dependendo da sua duração podemos classifica-la em: memória de trabalho, memória de curta ou memória de longa duração (UNSWORTH; ENGLE, 2007). A

---

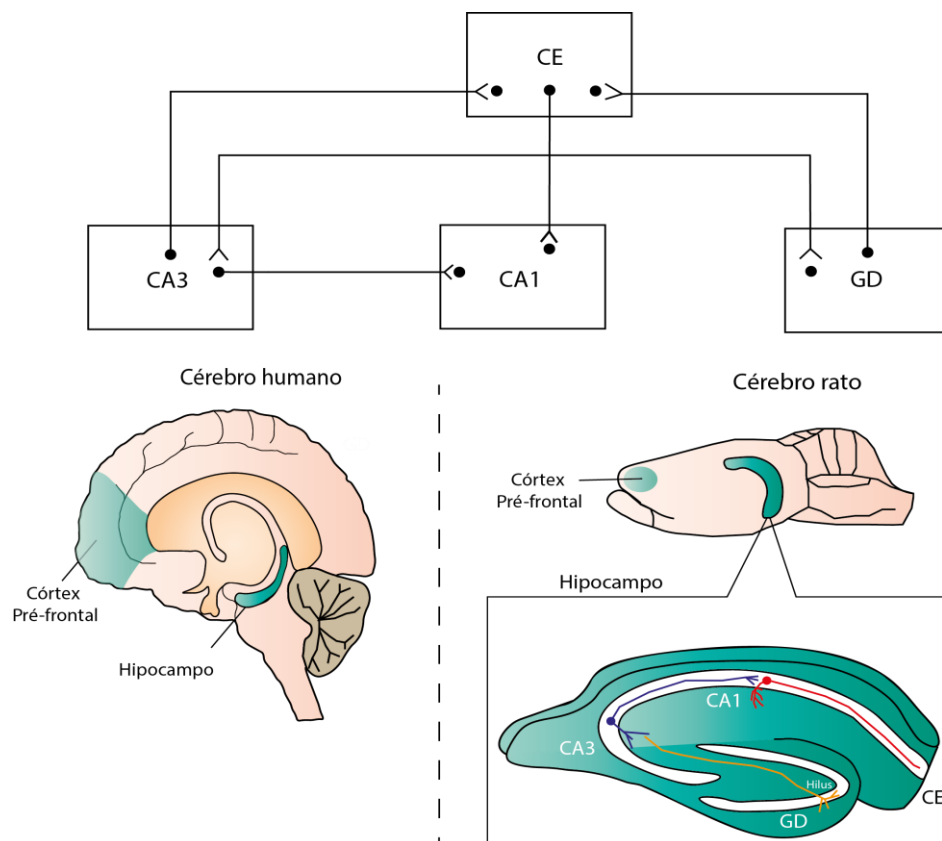
<sup>1</sup> Conjunto de interações moleculares variadas que marcam transitoriamente uma sinapse após a ativação dela, de forma que permite o reconhecimento de produtos transcripcionais que levam a uma mudança para estado duradouro na eficácia de transmissão (i. e. cinases ativas, moléculas de adesão, mudança na rede de actina e mudança na conformação de canais iônicos) (MARTIN; KOSIK, 2002).

<sup>2</sup> Forma de plasticidade sináptica na qual a atividade neuronal desencadeia mudança na força sináptica, capaz de persistir por horas (ABBAS *et al.*, 2015).

memória de trabalho corresponde mais a uma função executiva do que uma memória propriamente dita, já que está disponível somente por alguns segundos ou minutos, enquanto necessitamos da informação para concluir uma atividade ou raciocínio; este tipo de memória envolve ativação do córtex pré-frontal (LARA; WALLIS, 2015).

Já a memória de curta duração é formada por meio de processos bioquímicos simples que ocorrem entre o córtex-entorrinal (CE) e o hipocampo (Figura 1), podendo durar até cerca de seis horas (IZQUIERDO; MEDINA, 1997). Sendo assim, essas memórias são independentes da transcrição gênica e síntese de proteínas, processos necessários para a formação da memória de longa duração (IZQUIERDO, 1994). Por envolver estes processos mais complexos, como as citadas transcrição gênica e síntese proteica hipocampal para que ocorra sua consolidação, a memória de longa duração pode durar de horas a décadas (REDONDO; MORRIS, 2011).

**Figura 1. Hipocampo e sua circuitaria dentro do cérebro humano e de ratos Wistar.** O córtex entorrinal (CE) recebe informações das regiões CA (Corno de Amon) 1, 2 e 3, além do giro denteado (GD), integra as informações e, em resposta, suas eferências levam informações novamente as regiões CA e GD.

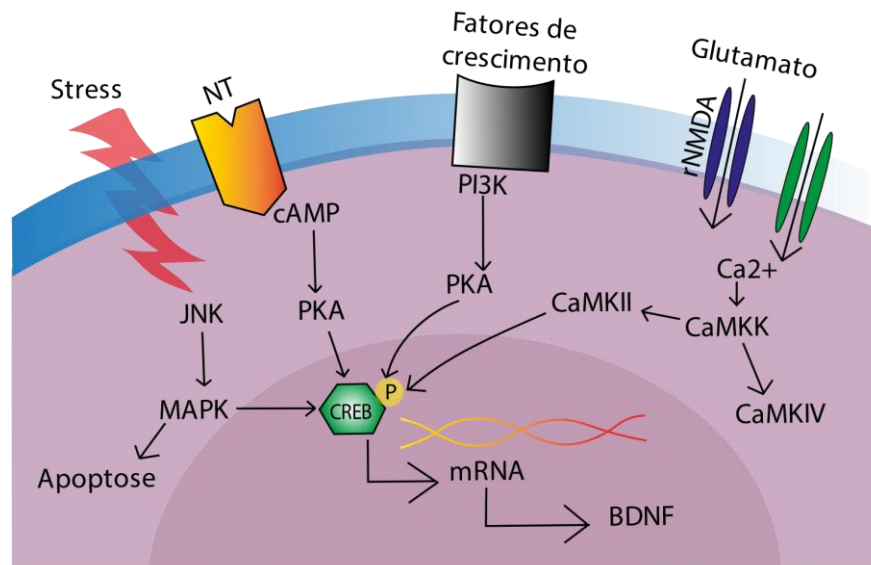


Fonte: O autor (2020).

O principal processo a partir do qual se forma uma memória de longa duração é a LTP (ABBAS; VILLERS; RIS, 2015). A LTP ocorre a partir de alguns processos bioquímicos que

ocorrem em sequência. Inicialmente ocorre o aumento da concentração intracelular de cálcio, pela ativação dos receptores alfa-amino-3-hidroximetil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA), com aumento da ativação de proteínas quinases A, C e G (PKA, PKC e PKG), além das proteínas quinase dependentes da interação cálcio-calmodulina II e IV (CaMK II e CaMK IV) (MINICHELLO, 2009; PENN; ZHANG; GEORGES; ROYER *et al.*, 2017). O efeito disto é a consequente fosforilação do elemento de resposta a ligação de AMP cíclico (CREB), que leva à ativação de receptores dendríticos de membrana e à mudanças nas proteínas de actina, norexinas e integrina - proteínas que mediam a interação entre células, sendo importantes para plasticidade sináptica e, conseqüentemente, formação de memória (DUNNING; DURING, 2003; IZQUIERDO; MEDINA, 1997) (Figura 2).

**Figura 2. Vias de sinalização de processos que envolvem a formação da memória.** A ligação de neurotransmissores (NT), fatores de crescimento, além do glutamato, principal NT excitatório do SNC, levam à fosforilação e ativação de segundos mensageiros como o cAMP e proteínas quinases como CAMKII e IV e PKA, que, por sua vez, levam à fosforilação do CREB, permitindo a transcrição de mRNAs e produção de proteínas como, por exemplo, o BDNF. O estresse, por outro lado, eleva os níveis de cortisol, ativando o segundo mensageiro JNK, podendo levar à repressão de CREB e sinalização de apoptose celular.



Fonte: Adaptado de Alberini (ALBERINI, 2009).

Esses eventos levam à transcrição de mRNAs pré-existentes que geram aumento da expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica, como Zif268 e c-Fos entre 1h e 3h após o evento desencadeador (KATCHE; CAMMAROTA; MEDINA, 2013). Após este período, ocorre uma nova cascata de eventos semelhantes, que leva à ativação de genes ligados a fatores de transcrição que desencadeiam mudanças conformacionais e à estabilização e maturação de novas sinapses, como o BDNF (ARDENGHI; BARROS; IZQUIERDO;

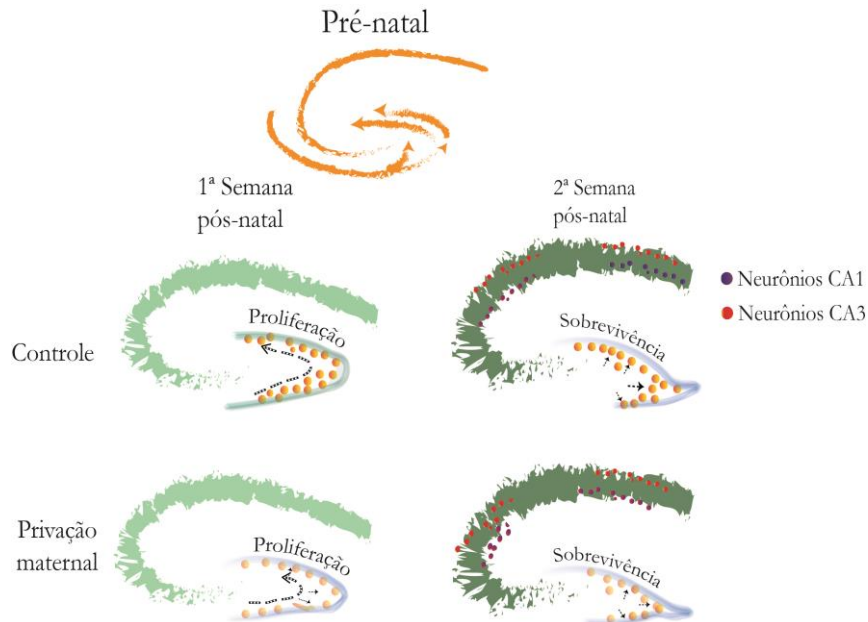
BEVILAQUA *et al.*, 1997; CARONI; CHOWDHURY; LAHR, 2014). O BDNF é uma neurotrofina transcrita a partir de 8 mRNAs, com clivagem extracelular e tem como receptor ligado a processos de memória o TrKB (NAGAPPAN; ZAITSEV; SENATOROV; YANG *et al.*, 2009); sua ligação com este receptor é capaz de induzir LTP e promover a consolidação de memórias (KANG; SCHUMAN, 1995).

Diferenças entre os sexos em testes de memória são denotados na literatura, sendo que apesar da escolha de estratégia de busca espacial se mostrar diferente entre os estudos para os sexos (POSTMA; JAGER; KESSELELS *et al.*, 2004; VORHEES & WILLIAMS, 2014), é observada vantagem para o sexo masculino em tarefas que envolvem flexibilidade espacial independentemente da estratégia utilizada (BLOKLAND; RUTTEN; PRICKAERTS, 2006; LAUER; YHANG; LOURENCO, 2019). Por sua vez, o sexo feminino apresenta melhores resultados em memórias episódicas (HEISZ; POTRUFF; SHORE, 2013; LUNDERVOLD; WOLLSCHAGER; WEHLING, 2014) e, apesar de efeitos negativos observados no início da vida, apresentam menor suscetibilidade aos efeitos neurodegenerativos causados pelo estresse neonatal após a puberdade (MARCO; VALERO; AISA; CORCEL *et al.*, 2012; BATH; NITENSON; LITCHMAN *et al.*, 2017).

## **1.2 Estresse neonatal e memória**

Durante o período neonatal ocorrem mudanças estruturais no cérebro, entre elas a maturação de sinapses, crescimento de espinhos dendríticos e alteração de circuitarias neurais (BUCHSBAUM; CAPPELLO, 2019) (Figura 3).

**Figura 3. Proliferação e sobrevivência neural hipocampal em situação normal (controle) e de privação maternal (PM).** Tanto a proliferação de neurônios quanto sua sobrevivência são afetadas pela PM nos primeiros 14 dias de vida, com menor ocorrência de neurônios precursoros de CA1 e CA3, além de menor volume hipocampal em animais privados matematicamente.



Fonte: Adaptado de Nomura & Tahakashi (NOMURA; TAKAHASHI; HARA; OSUMI, 2008) e Lajud & Torner (LAJUD; TORNER, 2015).

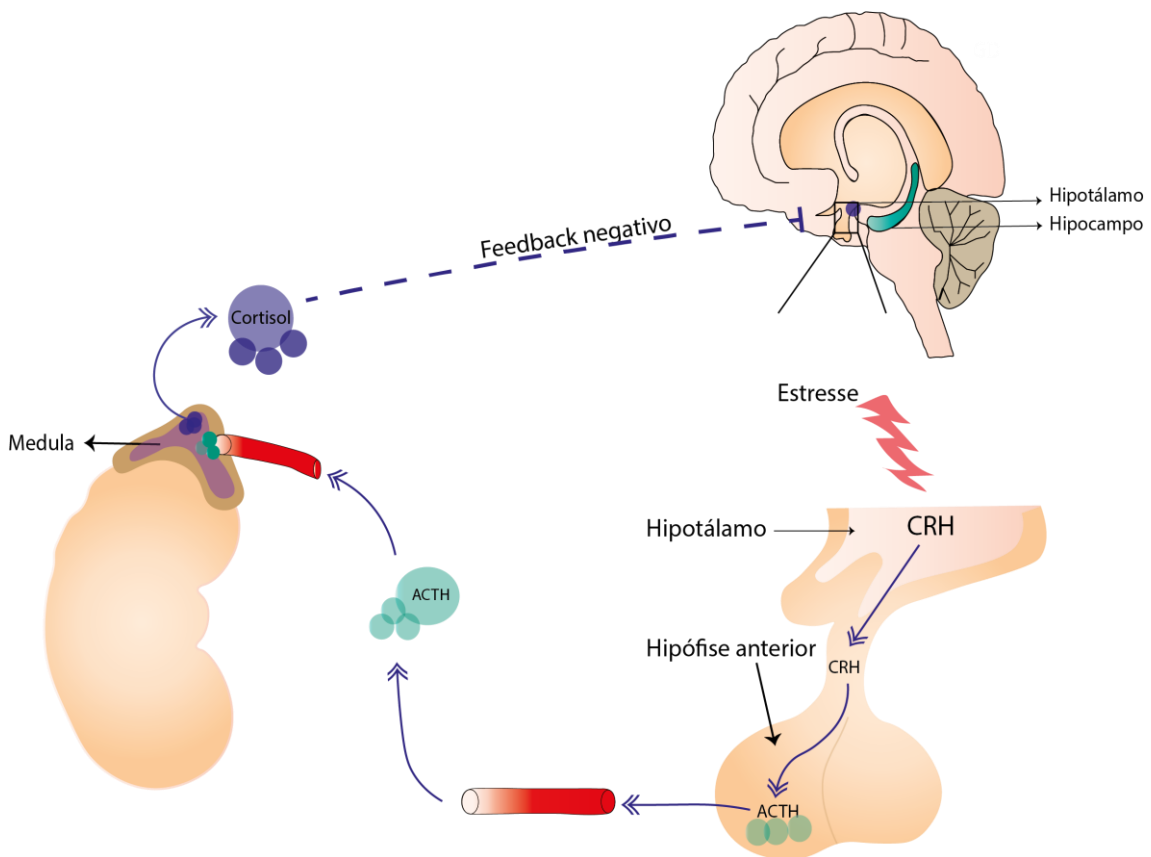
O estresse neonatal é relatado na literatura como um causador de alterações cerebrais que podem levar a déficits cognitivos, comportamento tipo ansioso, além de sintomas de depressão e suscetibilidade a doenças como Alzheimer e esquizofrenia (PIZZAGALLI; CARLEZON, 2017; SOUSA; VITAL; COSTENLA; BATALHA *et al.*, 2014; SYED; NEMEROFF, 2017). O termo estresse neonatal (*early life stress*, em inglês) descreve um amplo espectro de possíveis fatores e experiências estressoras (maus tratos, perda parental, privação maternal, abuso, violência, entre outras) (AGORASTOS; PERVANIDOU; CHROUSOS; BAKER, 2019).

A privação de cuidados no início da vida é um destes possíveis estressores, que pode se dar pela privação maternal (PM). A PM afeta o desenvolvimento em diversos aspectos, gerando mudanças de comportamento e personalidade, além de déficits de memória que persistem em diversas fases da vida (NEVES; MENEZES; SOUZA; MELLO-CARPES, 2015; SURI; BHATTACHARYA; VAIDYA, 2014), e alterações nos processos de mudanças estruturais no cérebro (LAJUD; TORNER, 2015) (Figura 3).

O estresse neonatal também promove alterações na circuitaria do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), alterando a regulação da resposta ao estresse. Os estudos divergem no que diz respeito aos efeitos do estresse sobre o eixo HPA: alguns afirmam que o estresse neonatal promove a hiperexcitabilidade, enquanto outros que promovem a hipossensitividade do eixo (GUNNAR; QUEVEDO, 2007; JUSTER; MCEWEN; LUPIEN, 2010; SANCHEZ, 2006). Talvez o principal fator que diferencie o impacto do estresse na atividade do eixo HPA seja o momento exato em que o evento estressor ocorre (AGORASTOS; PERVANIDOU; CHROUSOS; BAKER, 2019).

O estresse também promove um aumento na liberação do fator liberador de corticotrofina (do inglês *corticotrophin release factor*, CRF), que comanda todas as respostas ao estresse em mamíferos, coordenando diversos sistemas biológicos, como, por exemplo, o sistema nervoso autônomo e o sistema endócrino (SANCHEZ, 2006) (Figura 4).

**Figura 4. Efeitos do estresse no eixo HPA.** O estresse prolongado faz com que o núcleo paraventricular libere o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na eminência mediana ligada à hipófise anterior através de vasos sanguíneos. O CRH estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea. Na medula da glândula adrenal, o ACTH induz a liberação de glicocorticoides, como o cortisol. O cortisol exerce efeito de feedback negativo no eixo HPA através de glico e mineralcorticoides que atuam na hipófise anterior, hipotálamo e hipocampo.



O núcleo paraventricular (NPV) é o local com maior concentração de fator liberador de corticotrofina no encéfalo (ANTONI; PALKOVITS; MAKARA; LINTON *et al.*, 1983). Após ativação neuroendócrina pelos neurônios localizados no núcleo central da amígdala, em resposta ao estresse, os neurônios do NPV se projetam ao centro de norepinefrina no *locus coeruleus*, levando à liberação de adrenalina pela medula da glândula adrenal (SYED; NEMEROFF, 2017).

A ativação do eixo HPA, pelos neurônios liberadores de corticotrofina do NPV, estimula a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Figura 4). O ACTH, por sua vez, estimula a liberação de glicocorticóides do córtex da adrenal, que agem em um feedback negativo que promove a diminuição da ativação do eixo HPA pela estimulação dos receptores de glicocorticóides no encéfalo (GUTMAN; NEMEROFF, 2002) (Figura 4). Toda esta cascata de eventos leva ao aumento das concentrações, tanto basais quanto induzidas por estresse, de ACTH e de CRF na eminência mediana do circuito hipotálamo-hipófise de animais submetidos a PM durante o período neonatal (LADD; OWENS; NEMEROFF, 1996; LADD; HUOT; THRIVIKRAMAN; NEMEROFF *et al.*, 2004).

Estudos recentes demonstraram que os níveis de CRF de animais separados maternalmente são aumentados em relação à animais controle, tanto no plasma quanto na região CA1 do hipocampo (LI; LEE; FILLER; HOCK *et al.*, 2017; WANG; NIE; LI; HOU *et al.*, 2014). Diversos outros efeitos que podem estar relacionados com a liberação crônica de altos níveis de cortisol são observados no cérebro dos animais submetidos à PM, entre eles o aumento da peroxidação lipídica, tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal (NEVES; MENEZES; SOUZA; MELLO-CARPES, 2015), a diminuição nos níveis hipocampais de noradrenalina (SOSA; NEVES; CARRAZONI; GOMES *et al.*, 2019), e alterações na maturação do sistema dopaminérgico (MAJCHER-MASLANKA; SOLARZ; WEDZONY; CHOCYK, 2017). Adicionalmente, a PM durante 3h por dia prejudica a LTP entre as regiões CA3-CA1 do hipocampo em fêmeas jovens no DPN30 (HEYDARI; ESMAEILPOUR; SHEIBANI, 2019).

Essas mudanças levam à déficits em vários tipos de memória, como de reconhecimento, aversiva e espacial, tanto em ratos adultos quanto jovens, tanto em fêmeas quanto em machos (MAGHAMI; ZARDOOZ; KHODAGHOLI; BINAYI *et al.*, 2018; NEVES; MENEZES; SOUZA; MELLO-CARPES, 2015).

Além disso, a literatura já aponta vários mecanismos epigenéticos envolvidos em processos de formação e consolidação de memória (WOLDEMICHAEL *et al.*, 2014; ZOVKIC; SWEATT, 2013).

### 1.3 Mecanismos Epigenéticos

Epigenética se refere ao processo no qual o ambiente externo interage com o código genético, promovendo mudanças de conformação da cromatina, e, conseqüentemente, influenciando no fenótipo, sem alteração da sequência genética (CAMPBELL; WOOD, 2019).

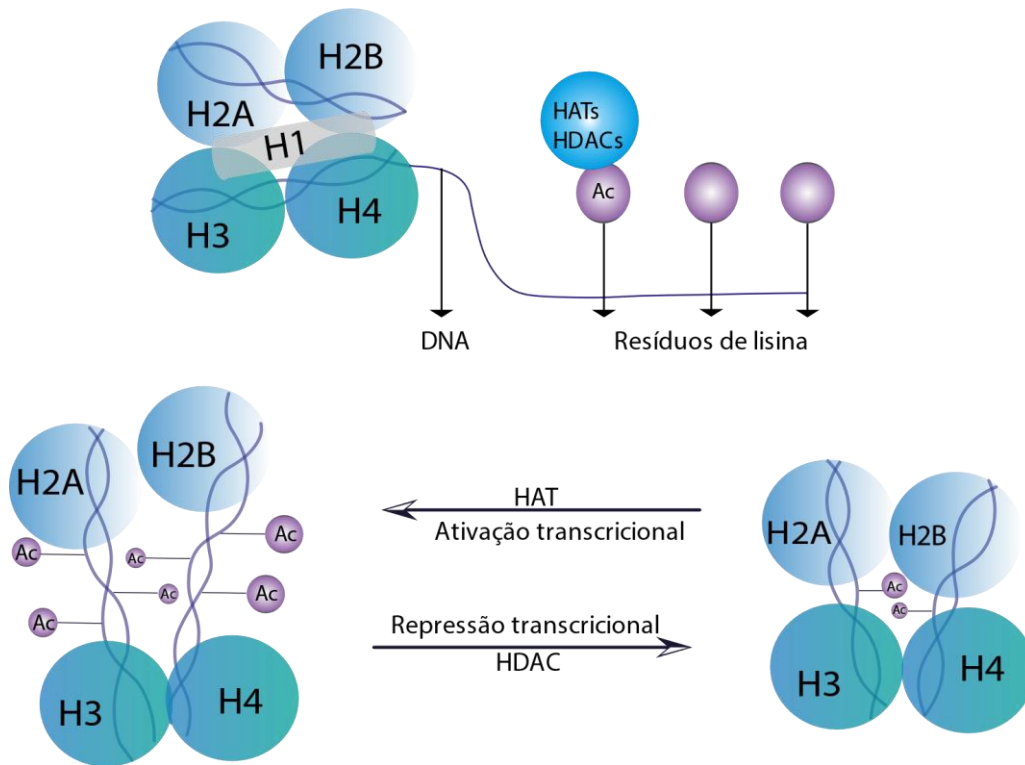
Existem variados tipos de mecanismos que as células utilizam para realizar modificações epigenéticas. Entre eles estão a troca de variáveis de histonas, modificação de nucleotídeos, regulação mediada por ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*), remodelação da cromatina, e modificações em histonas (CAMPBELL; WOOD, 2019; GRAFF; MANSUY, 2008).

Entre as principais alterações epigenéticas está a acetilação de histonas. A cromatina é formada por quatro pares de proteínas chamadas histonas, sendo elas H2, H2B, H3 e H4. Além disso, a histona H1 forma um elo entre esses 4 pares que estão envolvidos pelo DNA. A acetilação de histonas ocorre em sítios específicos denominados resíduos de lisinas. A partir da acetilação destes resíduos, pode ocorrer a alteração de conformação da cromatina, levando à regulação da transcrição gênica (ANNUNZIATO; HANSEN, 2000).

O aumento da acetilação de histonas está ligado ao aumento da atividade transcricional (CHOI; HOWE, 2009), enquanto o aumento da deacetilação está ligada à repressão transcricional (SPINDLER; CECHINEL; BASSO; MOYSES *et al.*, 2014). Já o balanço entre esses dois fenômenos está intimamente ligado ao controle da homeostasia, e, como consequência, à diversas funções do corpo (SAHA; LIU; PAHAN, 2006).

Essas reações de acetilação e deacetilação podem ser catalisadas por duas grandes famílias enzimáticas, sendo elas as histonas acetiltransferases (HATs) e as histona deacetilases (HDACs) (Figura 5).

**Figura 5. Complexo de histonas, modificações em resíduos de lisina e ação das histonas acetiltransferases (HATs) e das histonas deacetilases (HDACs) na ativação e repressão gênica.** Cromatina formada pela ligação de octâmero de histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4, envolvidas pelo DNA. HATs e HDACs adicionam ou retiram um grupamento acetil dos resíduos de lisina, podendo levar à ativação ou repressão transcricional a partir do modelamento da conformação da cromatina.



Fonte: O autor (2020).

As HATs atuam utilizando o acetil-CoA como doador de grupamento acetil para as histonas, neutralizando sua carga positiva, levando ao enfraquecimento de sua interação com a dupla fita de DNA e possibilitando a facilitação da transcrição gênica a partir da descompactação da cromatina (ALLFREY; FAULKNER; MIRSKY, 1964; SCHNEIDER; CHATTERJEE; BOUSIGES; SELVI *et al.*, 2013). Já as HDAC atuam de forma a reprimir a expressão gênica ao remover um grupamento acetil aos resíduos de lisina das histonas, dificultando a transcrição e expressão de genes (GANAI; RAMADOSS; MAHADEVAN, 2016).

Uma das histonas mais estudadas em relação a eventos de memória é a H3 e seus resíduos, uma vez que o aumento da acetilação da histona H3 aumenta a expressão gênica no hipocampo, além de aumentar a acetilação de resíduos ligados ao promotor da região IV do BDNF (BOULLE; VAN DEN HOVE; JAKOB; RUTTEN *et al.*, 2012; BREDY; WU; CREGO; ZELLHOEFER *et al.*, 2007). Um estudo de Campbell & Wood (CAMPBELL; WOOD, 2019) revelou que a ativação neural eleva os níveis de H3, e que reduzir os níveis de ativação da

mesma leva à redução de espinhos dendríticos no hipocampo, além de prejudicar a memória de reconhecimento de objetos e memória de medo contextual.

É importante ressaltar que existem diversas HATs e HDACs, mais de uma dúzia, sendo cada uma responsável por algum tipo de modificação epigenética (SHAHBAZIAN; GRUNSTEIN, 2007), mas todas atuam de forma regulada e em conjunto na cromatina. Sendo assim, os mecanismos epigenéticos podem atuar de forma a ter um papel chave na manutenção de processos mnemônicos a partir da modulação de fases, como a modificação do epigenoma de uma célula, convertendo os estados de cromatina condensada para aberto, tornando possível que fatores de transcrição gênica acessem o DNA, além de realizar manutenção das sinapses e modulação da LTP (CAMPBELL; WOOD, 2019; VECSEY; HAWK; LATTAL; STEIN *et al.*, 2007).

Como os mecanismos epigenéticos se moldam a partir de interação com o ambiente externo, agentes terapêuticos não-farmacológicos, como o exercício físico, são capazes de atuar promovendo a mudança do fenótipo através da acetilação e deacetilação de histonas (SPINDLER; CECHINEL; BASSO; MOYSES *et al.*, 2014). Estudos já demonstram que a prática de exercício físico leva a mudanças nos níveis de acetilação em diversas áreas do cérebro, como córtex pré-frontal e hipocampo, influenciando em parâmetros de memória (DE MEIRELES; BERTOLDI; CECHINEL; SCHALLENBERGER *et al.*, 2016; GOMEZ-PINILLA; ZHUANG; FENG; YING *et al.*, 2011; SPINDLER; CECHINEL; BASSO; MOYSES *et al.*, 2014).

#### **1.4 Exercício físico, epigenética e memória**

O desenvolvimento cerebral é um processo de alta complexidade e que pode durar décadas (BASSETT; GAZZANIGA, 2011). Especialmente os eventos que ocorrem durante o processo de maturação cerebral podem levar a efeitos que persistem durante toda vida. Além disso, é importante considerar que o cérebro é um órgão plástico, que está sujeito a mudanças ao longo da vida (BUCHSBAUM; CAPPELLO, 2019).

A literatura aponta o exercício físico como uma estratégia não-farmacológica de baixo custo capaz de promover neuroplasticidade, sendo tão eficaz na prevenção quanto no tratamento de diversos tipos de déficits cognitivos (DE MEIRELES; BERTOLDI; CECHINEL; SCHALLENBERGER *et al.*, 2016; MARCELINO; LONGONI; KUDO; STONE *et al.*, 2013; NEVES; MENEZES; SOUZA; MELLO-CARPES, 2015). Tais efeitos do exercício físico parecem estar relacionados à suas ações no Sistema Nervoso Central (SNC), que incluem

mudanças no hipocampo, entre elas o aumento de neurogênese, a melhora da LTP e o aumento de níveis de BDNF (VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004).

Também já foi demonstrado que o exercício físico promove melhora da memória de reconhecimento de objetos em ratos (ROBINSON; BUCCI, 2014), assim como a memória espacial (ERICKSON; VOSS; PRAKASH; BASAK *et al.*, 2011) e plasticidade sináptica (BETTIO; THACKER; HUTTON; CHRISTIE, 2019). Além disto, previne o déficit de memória aversiva e de reconhecimento de objetos de curto e longo prazo em ratos adultos submetidos à PM no início da vida (NEVES; MENEZES; SOUZA; MELLO-CARPES, 2015).

Considerando a modulação do exercício sobre o desenvolvimento do cérebro no início da vida, o exercício físico realizado durante a gestação é capaz de aumentar defesas antioxidantes nos filhotes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (MARCELINO; LONGONI; KUDO; STONE *et al.*, 2013), as quais sofrem efeitos deletérios advindos da privação materna (MENEZES; NEVES; SOUZA; MELLO-CARPES, 2017; MALCON; WEARICK-SILVA; ZAPARTE; ORSO *et al.*, 2020).

Além disso, estudo prévio evidenciou que a prole de ratas que realizaram exercício físico durante a gestação apresentou um melhor desempenho em uma tarefa de memória que animais filhos de ratas não submetidas a nenhum treinamento físico (DAYI; AGILKAYA; OZBAL; CETIN *et al.*, 2012). Quanto ao desempenho em tarefas de memória espacial, filhotes de mães que realizaram exercício físico aeróbio durante a gestação necessitaram de menos tempo para encontrar o escape no teste de Morris Water Maze (MWM), além de encontrar a localização da plataforma em tempo menor do que os filhotes de mães sedentárias e apresentar maiores níveis de BDNF e maior número de neurônios no hipocampo, quando comparado a animais controle (BAGHERI; HABIBZADEH; RAZAVIPOUR; VOLMAR *et al.*, 2019; DAYI; AGILKAYA; OZBAL; CETIN *et al.*, 2012).

Quando avaliamos na literatura o efeito de diferentes modalidades de exercício físico em marcadores epigenéticos, achados evidenciam que o exercício aeróbio reduz os níveis de HDACs e aumenta os níveis de HAT no hipocampo de ratos, sendo estes acompanhados pelo aumento nos níveis de BDNF em diversas idades (FISCHER; SANANBENESI; WANG; DOBBIN *et al.*, 2007).

Por exemplo, o exercício livre em roda para roedores durante 7 dias, se mostrou capaz de aumentar os níveis de CREB fosforilado, os níveis de mRNA e, ainda, os níveis totais de BDNF, a partir do aumento da acetilação da histona H3 na região promotora do BDNF de ratos adultos (GOMEZ-PINILLA; ZHUANG; FENG; YING *et al.*, 2011). Quando consideramos ratos adolescentes, Abel & Rissman (2013) também encontraram efeitos da corrida voluntária

durante 7 dias no perfil de acetilação de H3, aumentando a acetilação global de H3 no hipocampo e cerebelo dos animais exercitados, fato que se correlacionou positivamente com aumento na expressão de BDNF no hipocampo.

Corroborando essa ideia, trabalhos já demonstram que inibidores de HDACs como o butirato de sódio (NaBu) e tricostatina (FISCHER; SANANBENESI; WANG; DOBBIN *et al.*) são capazes de consolidar uma memória fraca (não consolidada em animais controle) e mudar respostas induzidas por estímulo da fase inicial para a fase tardia da LTP (BLANK; WERENICZ; VELHO; PINTO *et al.*, 2015; GARCEZ; DE CARVALHO; MINA; BELLETTINI-SANTOS *et al.*, 2018).

Contudo, os efeitos neuroprotetores do exercício físico realizado pela mãe antes e/ou durante a gestação sobre os déficits de memória causados pela privação maternal ainda não estão bem elucidados, assim como não é claro se a prática de exercício nos dois momentos teria efeito semelhante.

## II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

### 2.1 Justificativa

Devido à dificuldade de acompanhamento de estudos com humanos nesta área, o modelo de PM em ratos tem sido utilizado para estudar os efeitos do estresse nos primeiros dias de vida, bem como os mecanismos neurais envolvidos (MARCO, 2017). A compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de doença ou desordem neurológica relacionada à PM é importante para que se possam pensar possíveis intervenções terapêuticas, tanto para prevenir quanto para tratar os efeitos causados pelo estresse neonatal, que frequentemente persistem ao longo da vida.

Sendo assim, o exercício tem se mostrado uma opção não-farmacológica de grande valor tanto para a prevenção quanto para a atenuação de déficits relacionados à cognição, incluindo os advindos da PM (COLLINS; HILL; CHANDRAMOHAN; WHITCOMB *et al.*, 2009; NEVES; MENEZES; SOUZA; MELLO-CARPES, 2015; PATKI; SOLANKI; ATROOZ; ANSARI *et al.*, 2014). Os efeitos do exercício físico estão relacionados ao aumento do fluxo sanguíneo (YANG; HE; ZHANG; WU *et al.*, 2012), melhora dos níveis de enzimas antioxidantes (SCHIMIDT; VIEIRA; ALTERMANN; MARTINS *et al.*, 2014), sendo capaz de combater a apoptose neural (JUNG; KIM; YUNE; SHIN *et al.*, 2014), além de estimular a neurogênese (NOKIA; LENSU; AHTIAINEN; JOHANSSON *et al.*, 2016).

Estudos prévios demonstram efeitos epigenéticos do exercício realizado pelo pai ou mãe no período pré/durante a gestação, sendo benéficos em vários aspectos, como melhora na resistência à insulina (CARTER; QI; DE CABO; PEARSON, 2013), diminuição do comportamento tipo ansioso (SHORT; YESHURUN; POWELL; PERREAU *et al.*, 2017), além de aumento de neurogênese hipocampal em animais nascidos de mães que realizaram exercício aeróbio durante a gestação (BICK-SANDER; STEINER; WOLF; BABU *et al.*, 2006). Ainda, o exercício maternal se mostrou capaz de melhorar as defesas antioxidantes e aumentar a biogênese mitocondrial da prole (MARCELINO; LONGONI; KUDO; STONE *et al.*, 2013).

Dentre os mecanismos envolvidos nesses efeitos, está o aumento da acetilação da histona H3 na prole a partir do exercício realizado pela mãe, capaz de melhorar respostas ao estresse e promover efeitos positivos sobre a memória (COLLINS; HILL; CHANDRAMOHAN; WHITCOMB *et al.*, 2009).

Desta forma, neste estudo, avaliamos o impacto da prática de exercícios físicos pela mãe antes e/ou durante a gestação na cognição da prole submetida à privação maternal.

## **2.2 Hipótese**

Hipotetiza-se que a prática de exercício pela mãe gestante pode melhorar a neuroplasticidade do cérebro dos filhotes, visto que este está em desenvolvimento durante a gestação, induzindo neuroproteção, de forma que estes animais estejam mais protegidos dos efeitos da PM sobre o sistema nervoso do que ratos descendentes de mães sedentárias.

## **2.3 Objetivos**

### **2.3.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do exercício físico realizado pela mãe antes e/ou durante a gestação na memória dos ratos da prole submetidos à privação maternal.

### **2.3.2 Objetivos específicos**

Avaliar a memória de ratos submetidos à privação maternal e oriundos da prole de ratas que realizaram exercício físico antes e durante a gestação;

Avaliar a memória de ratos submetidos à privação maternal e oriundos da prole de ratas que realizaram exercício físico durante a gestação;

Avaliar a memória de ratos submetidos à privação maternal e oriundos da prole de ratas que não realizaram exercício físico antes ou durante a gestação;

Verificar se o exercício físico realizado pela mãe antes e/ou durante o período de gestação é capaz de atenuar os déficits de memória de reconhecimento e memória espacial causados pela privação maternal em ratas jovens pré-púberes e;

Verificar se o exercício físico realizado pela mãe antes e/ou durante o período de gestação é capaz de atenuar os déficits de memória de reconhecimento e memória espacial causados pela privação maternal em ratos adultos jovens.

### III. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e delineamento experimental

Inicialmente foram utilizadas 24 ratas Wistar fêmeas e 12 ratos Wistar machos, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria - RS, Brasil, após a aprovação pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa (protocolo 042/2018; ANEXO A). Os animais foram mantidos em caixas moradia (40 x 33,3 x 17cm), com limpeza e troca de maravalha 3 vezes por semana e condições padrão de biotério (ciclo 12/12h claro-escuro, luzes acesas as 07:00h), com temperatura média de 23°C, e água e ração *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa de acordo com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório” (NIH publicação nº 80-23, revisada em 1996) e normativas do CONCEA (art. 5º, incisos I e IV, da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008).

Após uma semana de habituação ao Biotério e manipulação pelo experimentador durante 1min por dia, as ratas mães foram divididas nos 6 seguintes grupos, considerando os procedimentos adotados com a mãe e com a prole:

- (i) **Controle (GC):** As ratas mães deste grupo (n = 4) não foram submetidas ao protocolo de exercício físico e os filhotes não foram submetidos ao protocolo de privação maternal (PM) (n=24 filhotes, 12 machos/M e 12 fêmeas/F);
- (ii) **Exercício pré-gestação (EP):** As ratas mães deste grupo (n = 4) iniciaram o protocolo de exercício físico 4 semanas antes do período de acasalamento e continuaram durante o período gestacional, e os filhotes não foram submetidos ao protocolo de PM (n=24 filhotes, 12M e 12F);
- (iii) **Exercício Maternal (EM):** As ratas mães desse grupo (n = 4) foram submetidas ao protocolo de exercício físico durante a gestação, e os filhotes não foram submetidos ao protocolo de PM (n=24 filhotes, 12M e 12F);
- (iv) **Privação Maternal (PM):** As ratas mães desse grupo (n = 4) não foram submetidas ao protocolo de exercício físico, e os filhotes foram submetidos ao protocolo de PM (n=24 filhotes, 12M e 12F);
- (v) **Exercício pré-gestação + privação maternal (EPPM):** As ratas mães deste grupo (n = 4) iniciaram o protocolo de exercício físico 4 semanas antes do

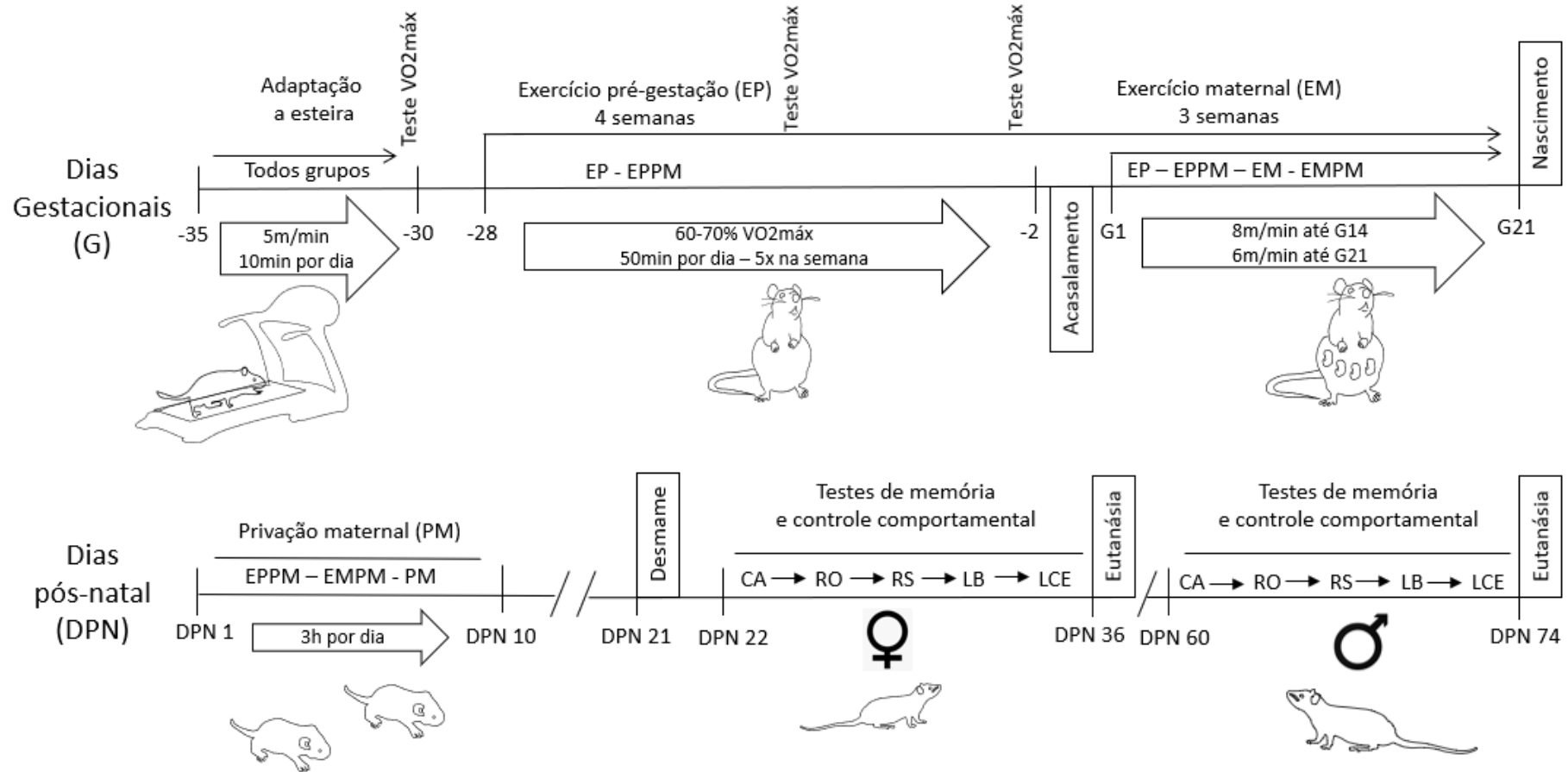
período de acasalamento e continuaram durante a gestação, e os filhotes foram submetidos ao protocolo de PM (n=24 filhotes, 12M e 12F);

- (vi) **Exercício maternal + privação maternal (EMPM):** As ratas mães desse grupo (n = 4) foram submetidas ao protocolo de exercício físico durante a gestação, e os filhotes foram submetidos ao protocolo de PM (n=24 filhotes, 12M e 12F).

Para acasalamento, os animais foram divididos em 12 caixas, com 1 macho e 2 fêmeas por caixa, durante 72h (ROBINSON; BUCCI, 2014; KLEIN *et al.*, 2019). Após a confirmação da gestação, as ratas foram alojadas individualmente até o parto.

Após o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram padronizadas com n = 8 por mãe, sendo, preferencialmente, 4 machos e 4 fêmeas. Os filhotes que não foram submetidos ao protocolo de privação maternal não passaram por nenhuma intervenção durante os 10 primeiros dias de vida.

O delineamento experimental do estudo é ilustrado na Figura 6.



**Figura 6. Delineamento experimental.** Todas as ratas mães foram submetidas aos protocolos de adaptação a esteira e teste de  $VO_{2máx}$ . Os grupos EP e EPPM realizaram 4 semanas de exercício prévio a gestação e mantiveram a prática de exercício, embora em menor intensidade, durante a gestação. Ainda, os grupos EM e EMPM realizaram o exercício durante toda gestação. Os filhotes dos grupos PM passaram por 3h/dia de privação materna nos 10 primeiros dias de vida. Testes de memória a partir do dia pós-natal 22 para as fêmeas e 60 para os machos. CT: controle; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal; PM: privação materna; EPPM: EP+PM; EMPM: EM+PM; CA: campo aberto; RO: reconhecimento de objetos; RS: reconhecimento social; LB: labirinto de Barnes; LCE: labirinto em cruz elevado.

## **3.2 Protocolos**

### **3.2.1 Protocolo de exercício físico**

#### **3.2.1.1 Habituação ao exercício físico**

O exercício físico aeróbio foi realizado em uma esteira rolante motorizada para roedores (Insight Ltda, São Paulo, Brasil). Para tal, inicialmente as ratas adultas foram habituadas à esteira rolante por 4 dias (NEVES; MENEZES; SOUZA; MELLO-CARPES, 2015). Nos dois primeiros dias foram colocadas no aparato sem velocidade e sem inclinação. No terceiro e quarto dia os animais foram adaptados a uma velocidade de 5m/min durante 10 min.

#### **3.2.1.2 Protocolo de medida indireta do consumo máximo de oxigênio**

Após a habituação à esteira, foi realizado o protocolo para determinação do consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$ máx) indireto para realização do exercício físico. A medida do  $VO_2$ máx foi realizada a partir do protocolo de Brooks & White (BROOKS; DONOVAN; WHITE, 1984). Brevemente, as ratas foram colocadas na esteira com velocidade inicial de 3m/min, com aumento de 5m/min a cada 3min até atingirem a exaustão. O tempo de fadiga em minutos e a velocidade em m/min foi anotada e utilizada para calcular a velocidade equivalente à 60%-70 do  $VO_2$ máx indireto de cada animal.

#### **3.2.1.3 Exercício físico**

As ratas dos grupos EP e EPPM realizaram 4 semanas de exercício físico anterior ao acasalamento, seguidas pelo exercício durante a gestação (aproximadamente 3 semanas). Já as ratas dos grupos EM e EMPM realizaram exercício somente durante o período gestacional.

No período de exercício pré-gestação, em cada sessão, o exercício de corrida em esteira foi realizado com velocidade inicialmente crescente de: 30% do  $VO_2$ máx durante 5 minutos, 45% do  $VO_2$ máx durante 5 min, 60%-70% do  $VO_2$ máx durante 30min (velocidade alvo equivalente à 22-26m/min; Fig. 7/S1), e posteriormente decrescente de 45% do  $VO_2$ máx durante 5 minutos, e 30% do  $VO_2$ máx durante os 5 minutos finais, totalizando 50 minutos de exercício por sessão, 5 vezes por semana (FRASIER; MOORE; BROWN, 2011; PRADO LIMA; SCHIMIDT; GARCIA; DARE *et al.*, 2018; ROSSI DARE; GARCIA; ALVES; VENTURA DIAS *et al.*, 2019). Ao final da segunda semana de exercício, o teste de  $VO_2$ máx indireto foi realizado novamente para ajuste da velocidade de treinamento (60-70%  $VO_2$ máx equivalente à 24-28m/min; Fig. 7/S3) até o final da quarta semana de exercício físico.

Considerando a condição de gestação, durante este período, as ratas correram na esteira na velocidade de 8m/min durante duas semanas, e 6m/min na última semana de gestação, 30min por dia, 5 vezes por semana, até o dia do parto (SPINDLER; SEGABINAZI; MEIRELES; PIAZZA *et al.*, 2019).

### **3.2.2 Protocolo de privação maternal**

Nos grupos PM, EPPM e EMPPM, o protocolo de privação maternal foi realizado durante os 10 primeiros dias de vida da prole. O protocolo consistiu em retirar a mãe da caixa moradia dos filhotes, realojando esta caixa em outra sala, por 3h/dia durante o ciclo claro (BENETTI; MELLO; BONINI; MONTEIRO *et al.*, 2009). A temperatura ambiente foi controlada e mantida em 29°C para suprir a falta de calor da mãe. Ao final de cada sessão de privação, a mãe era realocada juntamente aos filhotes na caixa moradia.

Todos os filhotes dos grupos CT, EP e EM permaneceram na caixa moradia até o DPN 21, quando todas as ninhadas foram desmamadas e realocadas, de acordo com o sexo, em caixas com até 4 animais. As ratas mães também foram realocadas em caixas com 4 animais até a eutanásia.

Posteriormente, as ratas filhotes oriundas da prole foram submetidas à testes de memória e de controle comportamental a partir do vigésimo segundo dia de vida (DPN-22; período pré-púbere), enquanto os filhotes machos oriundos da prole foram submetidos à testes de memória e de controle comportamental na vida adulta (a partir de DPN-60).

### **3.2.3 Testes de memória**

#### **3.2.3.1 Tarefa de Reconhecimento de Objetos**

Para avaliar a memória de reconhecimento de objetos foi utilizada a tarefa de Reconhecimento de Objetos (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). O aparato consiste em uma caixa de madeira (60cm x 60cm x 60cm). O procedimento inicial consistiu na habituação dos animais à caixa durante 4 dias consecutivos, por um período de 20 min/dia, a fim de que pudessem explorá-la livremente antes do primeiro ensaio de reconhecimento de objetos.

Após os quatro dias de habituação, dois objetos diferentes (A e B) foram colocados na caixa para que os animais pudessem explorá-los livremente durante 5 min (sessão de treino). Após 24 horas da sessão de treino, um dos objetos foi aleatoriamente substituído por um novo objeto (C) e os animais foram colocados novamente no aparato por mais 5 min para livre exploração (sessão de teste). Foi considerado exploração tocar ou cheirar o objeto a menos de

3cm do mesmo. O ato de subir no objeto, sem explorar o mesmo, não foi considerado exploração.

### **3.2.3.2 Tarefa de Reconhecimento Social**

A tarefa de reconhecimento social (PRADO LIMA; SCHIMIDT; GARCIA; DARE *et al.*, 2018) foi realizada em 3 dias. No primeiro dia, os animais foram habituados ao aparato com duas gaiolas de acrílico transparente vazias durante 20min (mesmo aparato já mencionado na tarefa de reconhecimento de objetos).

No segundo dia, em uma das gaiolas foi inserido um animal estranho, e foi permitido que o animal em experimentação explorasse livremente por 1h. No terceiro dia o animal já explorado no dia anterior (agora familiar) foi novamente inserido em uma das gaiolas, e um novo animal (não-familiar) na outra gaiola. Durante os 5 minutos iniciais da sessão de teste, foi contabilizado o tempo de exploração de cada animal (familiar x não-familiar). Foram considerados como exploração o toque com nariz ou patas, e cheirar as gaiolas.

### **3.2.3.3 Labirinto de Barnes**

Para avaliação da memória espacial foi utilizado o Labirinto de Barnes adaptado (BARNES, 1979). O teste consiste em uma plataforma circular de 92cm de diâmetro com 20 buracos igualmente espaçados (5cm de diâmetro e 7,5cm de distância entre os buracos, a uma altura de 105cm do chão), dispendo de pistas espaciais colocadas no ambiente de realização do teste (figuras geométricas 30cm x 30cm coladas na parede da sala), com uma lâmpada incandescente 50cm acima da mesa como reforço negativo para o animal.

No primeiro dia de contato com o aparato os animais foram colocados na sala de teste e deixados na mesma, sem perturbação, pelo período de 60min, para habituação ao ambiente. Após, um animal por vez foi colocado gentilmente em uma câmara escura no centro da plataforma, onde permaneceu por 10s. Após, a câmara foi levantada, a luz ligada e o animal guiado para o buraco de escape, onde ficara por 120s (adaptação). Na sequência, o animal foi novamente colocado na câmara escura no centro da plataforma por 10s, após, a câmara foi levantada e o mesmo dispôs de 180s para encontrar o buraco correspondente a caixa de escape. Caso não encontrasse, o experimentador o conduzia gentilmente para a caixa de escape, onde ficara por 60s (período de aquisição). Os animais passaram por 3 sessões diárias de aquisição durante 4 dias consecutivos.

Foram contabilizados os erros primários (quantidade de erros de escape que o animal cometeu antes de encontrar o escape correto) e erros totais (quantidade de erros de escape que

o animal cometeu antes de entrar no escape), e a latência primária (tempo que o animal demorou para encontrar o escape) e a latência total (tempo necessário para entrar no escape).

No quinto dia foi realizado o teste de preferência, no qual o buraco de escape foi fechado de modo que ficasse igual aos demais buracos. O animal foi então colocado na câmara escura no centro da mesa por 10s, após, a luz foi ligada e o animal teve 180s para exploração da plataforma. Foram contabilizados os erros primários e a latência primária. Além disso, avaliamos a preferência, isto é, o tempo que o animal passou no quadrante alvo (QA), ou seja, o quadrante onde virtualmente estaria o escape correto.

### **3.2.4 Testes de Controle Comportamental**

Os testes de controle comportamental foram realizados para garantir que os protocolos de exercício físico, privação maternal, ou outros procedimentos não interferiram nos resultados dos testes de memória, já que neste modelo animal a memória é avaliada a partir da observação do comportamento.

#### **3.2.4.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

Para avaliar o estado de ansiedade dos animais, utilizamos a tarefa do LCE (FILE; PELLOW, 1985). Este labirinto consiste em uma plataforma em cruz com 40 centímetros de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura; dois braços contralaterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados braços fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados braços abertos. O animal foi colocado no centro do labirinto e deixado livre para explorá-lo por 5 minutos. Registrou-se o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estivesse o animal, menor o tempo de permanência nos braços abertos e o número de entradas nos mesmos.

#### **3.2.4.2 Campo Aberto (CA)**

Para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais utilizamos a análise do comportamento de locomoção/exploração no esquema conhecido como campo aberto (BENETTI; DA SILVEIRA; DA SILVA; CAMMAROTA *et al.*, 2012; BENETTI; MELLO; BONINI; MONTEIRO *et al.*, 2009). Para isto foi utilizado o mesmo aparato que a tarefa de reconhecimento de objetos. O assoalho da caixa é dividido em 12 quadrantes com igual área de superfície. O animal foi gentilmente colocado na arena do campo aberto, a qual ele poderia explorar livremente por 5 min. Durante este tempo registrou-se o

número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras, comportamentos que nos roedores denotam exploração.

### **3.3 Análise Estatística**

Para avaliar a distribuição dos dados foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Os resultados do teste de VO<sub>2</sub>máx das fêmeas mães foram analisados através da ANOVA de duas vias com post hoc Fischer LSD. Para comparação intragrupo entre o primeiro dia de treino (S1) e o primeiro dia de gestação (G1) foi utilizado ANOVA de medidas repetidas.

Nas tarefas de RO e RS o tempo de exploração de cada objeto ou animal foi convertido em percentual do tempo total de exploração, e foi utilizado o teste t de Student de uma amostra quando a distribuição dos dados se mostrou normal, ou teste de Wilcoxon Signed Rank, quando a distribuição se mostrou não-normal. Em ambos os casos foi considerada uma média teórica de 50% para comparação.

Para avaliação da aprendizagem de cada grupo no Labirinto de Barnes, a comparação entre e intra sessões de treino foi realizada por meio de ANOVA de medidas repetidas com post hoc Fischer LSD. Para comparações dos resultados na sessão de teste entre diferentes grupos foi utilizada ANOVA de duas vias com post hoc Fisher LSD.

Os resultados do LCE e CA foram analisados utilizando ANOVA.

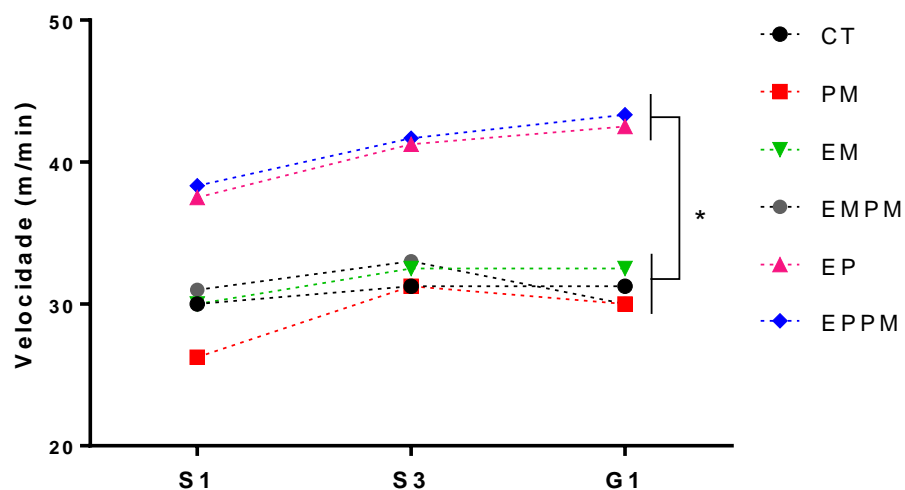
Em todos os casos, valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. O exercício realizado previamente à gestação promove aumento do VO<sub>2</sub>máx indireto

Para avaliar a capacidade máxima de consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>máx) e validar os efeitos do protocolo de exercício sobre a capacidade aeróbica, nós realizamos três testes de VO<sub>2</sub>máx indireto durante nosso protocolo, sendo eles: ao final da primeira semana de habituação ao exercício (S1; Fig. 7), ao final da segunda semana de exercício pré-gestação (S3; Fig. 7), e no primeiro dia gestacional (G1; Fig. 7).

**Figura 7. Resultados do teste de VO<sub>2</sub>máx realizado antes da primeira (S1) e terceira semana de treino (S3), e no primeiro dia de gestação (G1).** \*P < 0.05; Two-way ANOVA. Os dados são apresentados na forma de média (n = 4/grupo). S1: Primeiro teste VO<sub>2</sub>máx; S3: segundo teste VO<sub>2</sub>máx; G1: terceiro teste VO<sub>2</sub>máx. CT: Controle; PM: Privação maternal; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal; EPPM: EP+PM; EMPM: EM+PM.



Fonte: O autor (2020).

No teste de VO<sub>2</sub>máx realizado em S1 (Fig. 7), houveram diferenças entre os grupos (P = 0,001). O grupo EP demonstrou maior capacidade aeróbica que os grupos CT (P = 0,002; Fig. 7), PM (P = 0,0001; Fig. 7), EM (P = 0,0002; Fig. 7) e EMPM (P = 0,0008; Fig. 7). O grupo EPPM também demonstrou maior capacidade aeróbica que os mesmos grupos (vs CT: P = 0,0008; PM: P = 0,0001; EM: P = 0,0008 e; EMPM: P = 0,003; Fig. 7).

Não houve diferença de capacidade aeróbia entre os grupos EP e EPPM no primeiro teste de VO<sub>2</sub>máx indireto ( $P = 0,36$ ; Fig. 7/S1), nem dentre os demais grupos ( $P > 0,05$  para todas comparações; Fig. 7/S1).

No último teste de VO<sub>2</sub>máx indireto (Fig. 7/G1) o grupo EP apresentou maior capacidade aeróbia que os seguintes grupos (vs CT:  $P < 0,0001$ ; PM:  $P < 0,0001$ ; EM:  $P = 0,0002$  e; EMPM:  $P < 0,0001$ ; Fig. 7/G1), assim como o grupo EPPM (vs CT:  $P < 0,0001$ ; PM:  $P < 0,0001$ ; EM:  $P < 0,003$ ; EMPM:  $P < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os grupos EP e EPPM, nem dentre os demais grupos ( $P > 0,05$ ; Fig. 7/G1). A velocidade máxima de corrida dos animais dos diferentes grupos foi, em média (Média  $\pm$  DP; Fig. 7/G1): EP  $42,5 \pm 2,88$ m/min; EPPM  $41,25 \pm 4,78$ m/min; CT  $31,25 \pm 2,5$ m/min; PM  $30 \pm 4,08$ m/min; EM  $32,5 \pm 2,88$ m/min; EMPM  $31,25 \pm 4,78$ m/min.

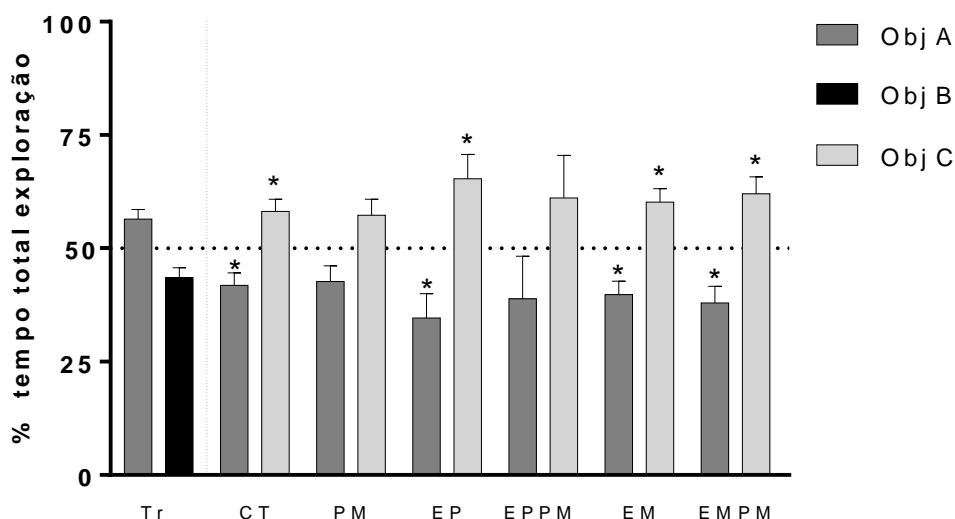
Os grupos EP e EPPM demonstraram ganho de VO<sub>2</sub>máx indireto pelo treino aeróbio quando comparados o primeiro e o último teste de VO<sub>2</sub>máx (S1 vs G1 EP:  $P = 0,01$ ; EPPM:  $P = 0,04$ ; Fig. 7), enquanto os demais grupos não (S1 vs G1 CT:  $P = 0,637$ ; PM:  $P = 0,329$ ; EM:  $P = 0,329$ ; EMPM:  $P > 0,999$ ).

## **4.2 Efeitos do exercício realizado durante a gestação em ratas pré-púberes submetidas ou não à privação maternal**

### **4.2.1 O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento de objetos causado pela privação maternal**

Na sessão de treino na tarefa de RO (Fig. 8, Tr), as fêmeas pré-púberes de todos os grupos exploraram cada objeto (A e B) por uma porcentagem do tempo total de exploração de cerca de 50% (nos gráficos os dados estão apresentados como média de todos os grupos: objeto A = média  $\pm$  DP%, objeto B = média  $\pm$  DP%,  $P > 0,05$  para todos grupos; CT:  $t(6) = 0,98$ ,  $P = 0,36$ ; PM:  $t(9) = 2,01$ ,  $P = 0,07$ ; EP:  $t(5) = 0,40$ ,  $P = 0,70$ ; EPPM:  $t(6) = 2,05$ ,  $P = 0,11$ . EM:  $t(7) = 1,79$ ,  $P = 0,11$  e; EMPM:  $t(6) = 1,93$ ,  $P = 0,10$ ).

**Figura 8. O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento de objetos causado pela privação maternal em ratas pré-púberes.** \* $P < 0.05$ ; Teste-t de Student de uma amostra ou Wilcoxon signed rank (média teórica de 50%). Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP ( $n = 8-11$ /grupo). Tr: treino; CT: Controle; PM: Privação maternal; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal; EPPM: EP+PM; EMPM: EM+PM



Fonte: O autor (2020).

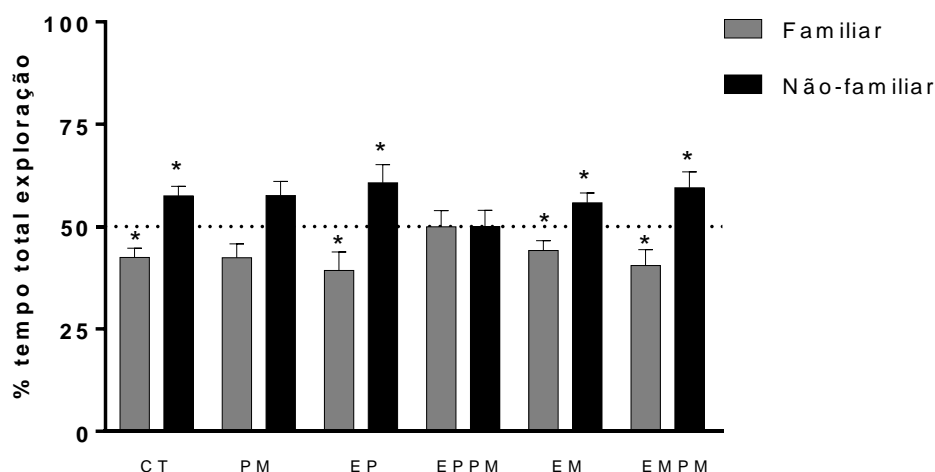
Na sessão de teste, os animais do grupo controle exploraram por mais tempo o novo objeto (CT:  $t(6) = 2,99$ ,  $P = 0,02$ ; Fig. 8), assim como os animais dos demais grupos não submetidos à privação maternal (EP:  $t(6) = 2,862$ ,  $P = 0,028$ ; EM:  $t(7) = 3,44$ ,  $P = 0,01$ ; Fig. 8). O protocolo de privação maternal gerou déficit de memória no teste de reconhecimento de objetos (PM:  $t(9) = 2,1$ ,  $P = 0,065$ ; Fig.7). O exercício físico realizado somente durante a gestação foi capaz de prevenir esse déficit (EMPM:  $t(6) = 3,24$ ,  $P = 0,01$ ; Fig. 8). Surpreendentemente, o exercício realizado pelas mães previamente a gestação, com o declínio de intensidade durante o período gestacional, não foi capaz de prevenir o déficit de memória causado pela privação maternal (EPPM:  $t(6) = 1,18$ ,  $P = 0,28$ ; Fig. 8).

#### 4.2.2 O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento social causado pela separação maternal

No teste de reconhecimento social os resultados dos testes realizados com as ratas pré-púberes apresentaram resultados similares ao teste da tarefa de reconhecimento de objetos. Os animais do grupo controle exploraram por mais tempo o animal não-familiar (CT:  $t(8) = 3,31$ ,  $P = 0,01$ ; Fig. 9), assim como os animais dos demais grupos não submetidos à privação maternal

(EP:  $t(7) = 2,37$ ,  $P = 0,04$ ; EM:  $t(8) = 2,41$ ,  $P = 0,04$ ; Fig. 9). O protocolo de privação materna gerou déficit de memória no teste de reconhecimento social (PM:  $t(10) = 2,21$ ,  $P = 0,05$ ; Fig. 9). O exercício físico realizado somente durante a gestação foi capaz de prevenir esse déficit (EMPM:  $t(7) = 2,43$ ,  $P = 0,04$ ; Fig. 9). Novamente, o exercício realizado pelas mães previamente a gestação, com o declínio de intensidade durante o período gestacional, não foi capaz de prevenir o déficit de memória causado pela privação materna (EPPM:  $t(8) = 0,006$ ,  $P = 0,99$ ; Fig. 9).

**Figura 9. O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento social causado pela privação materna em ratas pré-púberes.** \* $P < 0.05$ ; Teste-t de Student de uma amostra ou Wilcoxon signed rank (média teórica de 50%). Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP (n = 8-11/grupo). CT: Controle; PM: Privação materna; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal EPPM: EP+PM; EMPM: EM+PM.



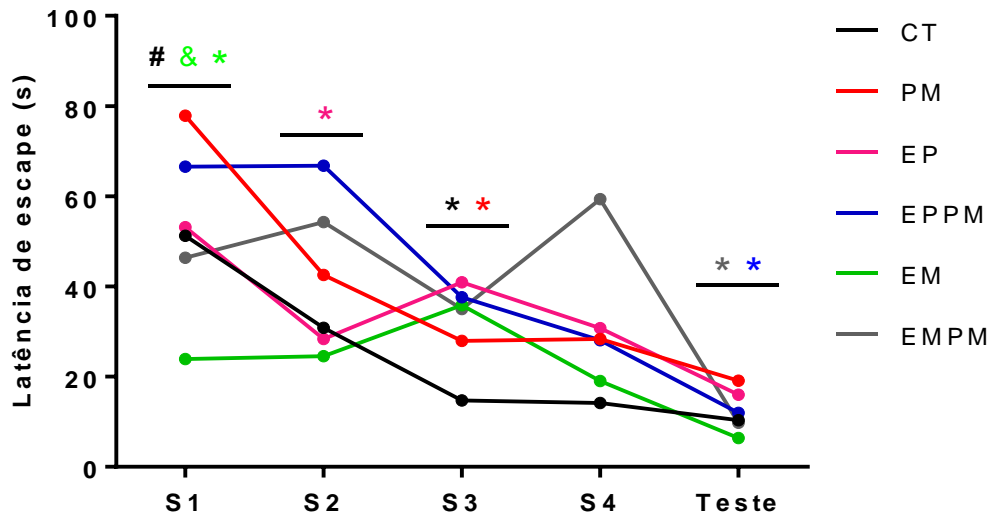
Fonte: O autor (2020).

#### 4.2.3 Exercício maternal melhora a aprendizagem espacial

Nós utilizamos o Labirinto de Barnes para avaliar a aprendizagem e retenção da memória espacial, consistindo de 3 trials por sessão, com 4 dias (sessões) de aprendizagem, e o teste de retenção sendo realizado no quinto dia.

Quando analisados os 3 trials realizados dentro da primeira sessão de treino (S1), o grupo EM foi o único a demonstrar diminuição de latência entre o primeiro e terceiro trial (trial 1 vs trial 3:  $P = 0,029$ ; Fig. 10/S1).

**Figura 10. Exercício maternal promove aprendizado espacial durante primeira sessão de treino em ratas pré-púberes.** # $P < 0,05$ ; Dunn's Test (EM vs CT; PM; EPPM e; EMPM em S1). & $P < 0,05$ ; Fisher's LSD (comparação entre primeiro e terceiro trial de S1 de EM). \* $P < 0,05$  demonstra a sessão que o grupo aprendeu a localização do escape; Fisher's LSD (comparação intragrupo entre S1 e a respectiva sessão). Os dados são apresentados na forma de média ( $n = 8-11$ /grupo). S1-4: Sessões de treino; CT: Controle; PM: Privação maternal; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal; EPPM: EP+PM; EMPM: EM+PM.



Fonte: O autor (2020).

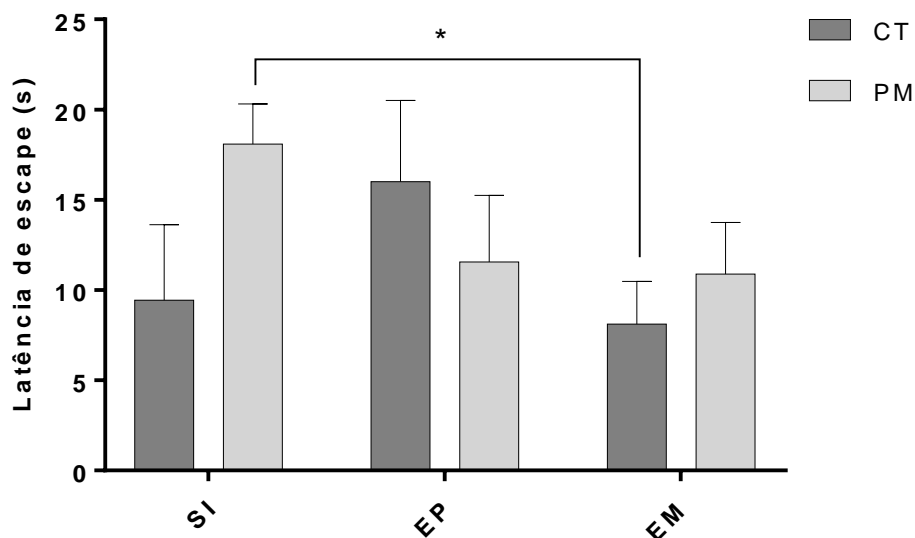
Ainda em S1, foram encontradas diferenças para as latências de escape entre os grupos ( $P = 0,031$ ; Fig. 10). O grupo EM encontrou o escape em menor tempo que o grupo CT ( $P = 0,041$ ; Fig. 10), PM ( $P = 0,001$ ; Fig. 10), EPPM ( $P = 0,005$ ; Fig. 10) e EMPM ( $P = 0,049$ ; Fig. 10).

O grupo EP aprendeu a localização do escape no segundo dia de treino ( $P = 0,034$ ; Fig. 10). Os grupos CT e PM aprenderam a localização do escape no terceiro dia de treino (CT:  $P = 0,017$ ; PM:  $P = 0,0009$ ; Fig. 10).

Os grupos EPPM e EMPM demonstraram ter aprendido a localização do escape somente no quinto dia (teste) (EPPM:  $P = 0,0003$ ; EMPM:  $P = 0,03$ ; Fig. 10).

No dia do teste, somente houve diferença entre os grupos EM e PM ( $P = 0,044$ ; Fig. 11), com menor latência para o grupo exercitado. Não houve diferença entre os demais grupos ( $P > 0,05$ ; Fig. 11).

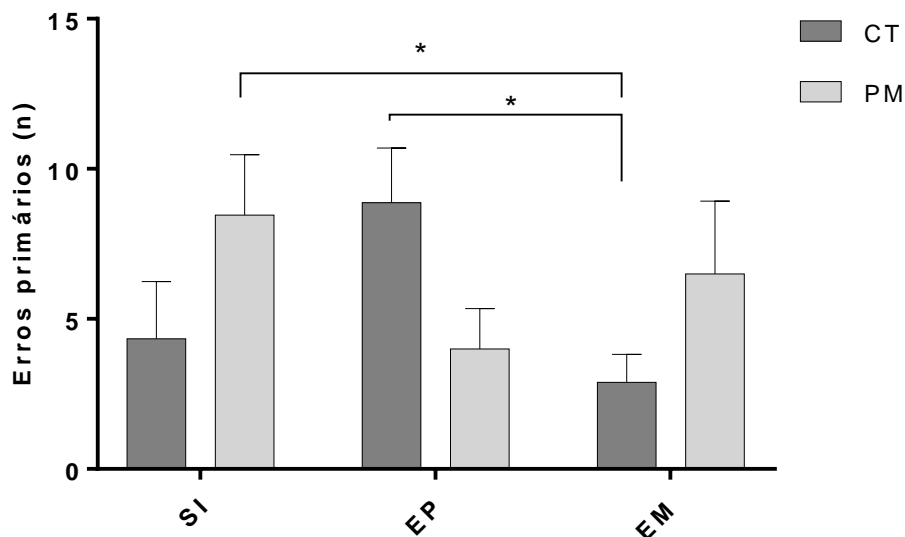
**Figura 11. A privação maternal não causou déficit de memória espacial e o exercício maternal não melhorou a latência de escape em ratos pré-púberes. \* $P < 0,05$ ; Fishers LSD. Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP (n = 8-11/grupo). SI: sem intervenção; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal CT: Controle; PM: Privação maternal.**



Fonte: O autor (2020).

Ainda, analisamos a quantidade de erros cometidos antes que os animais encontrassem o escape virtual no dia do teste. Foram encontradas diferença entre os grupos ( $P = 0,02$ ; Fig. 12). Os resultados mostraram que o grupo EM cometeu de menos erros para encontrar o escape comparado ao grupo EP ( $P = 0,024$ ) e ao grupo PM ( $P = 0,035$ ). Não houve diferença entre os demais grupos (Fig.12;  $P > 0,05$  para todas comparações).

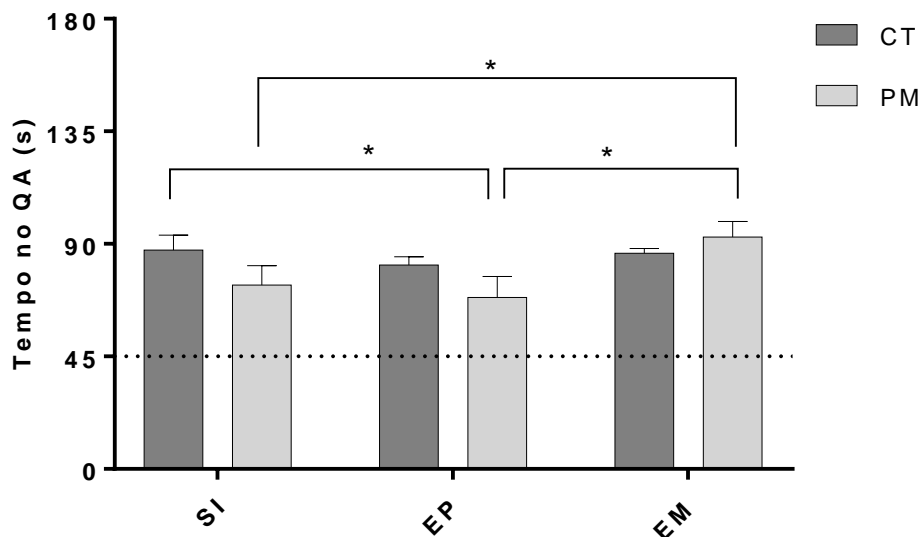
**Figura 12. O exercício realizado durante a gestação é melhor que exercício prévio e durante em relação a quantidade de erros cometidos para encontrar o escape em ratos pré-púberes. \*P < 0,05; Fisher LSD. Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP (n = 8-11/grupo). SI: sem intervenção; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal CT: Controle; PM: Privação maternal.**



Fonte: O autor (2020).

Do mesmo modo, analisamos o tempo total que os grupos passaram explorando o quadrante alvo (QA) no dia do teste de preferência. Houve diferença entre os grupos CT e EPPM, com média menor para o grupo separado ( $P = 0,038$ ; Fig. 13), demonstrando déficit. Além de melhor performance dos animais EMPM comparado aos animais EPPM ( $P = 0,011$ ; Fig. 13). Ainda, os filhotes EMPM mostraram melhor performance que o grupo PM, passando mais tempo no QA ( $P = 0,033$ ; Fig. 13). Não houve diferença entre o restante dos grupos ( $P > 0,05$ ; Fig. 13).

**Figura 13. A privação maternal tem efeito deletério na memória espacial de filhotes fêmeas pré-púberes de mães exercitadas previamente a gestação.** \* $P < 0,05$ ; Fisher LSD. Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP (n = 8-11/grupo). SI: sem intervenção; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal CT: Controle; PM: Privação maternal.



Fonte: O autor (2020).

#### 4.1.3 O exercício realizado durante a gestação, assim como a privação maternal, não altera variáveis de locomoção, ansiedade e exploração em fêmeas pré-púberes

Os testes de controle comportamental mostram que tanto nosso protocolo de privação maternal quanto nossos protocolos utilizados de exercício físico, não afetaram a atividade exploratória ou locomotora, nem denotaram comportamento tipo ansioso nos animais (tabela 1).

**Tabela 1. Os protocolos de exercício físico e a privação maternal não alteraram a atividade exploratória nas tarefas de reconhecimento de objetos (RO), reconhecimento social (RS), a função locomotora e atividade exploratória no campo aberto (CA), e o comportamento do tipo ansiedade avaliado por Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de ratas pré-púberes. Os dados são expressos como média  $\pm$  DP do tempo total de exploração (RO e RS; n = 8-11/grupo); número de cruzamentos e elevações (CA; n = 8-11/grupo), e média  $\pm$  DP do tempo gasto nos braços abertos (n = 8-11/grupo) ( $P \geq 0,05$ ; ANOVA uma via).**

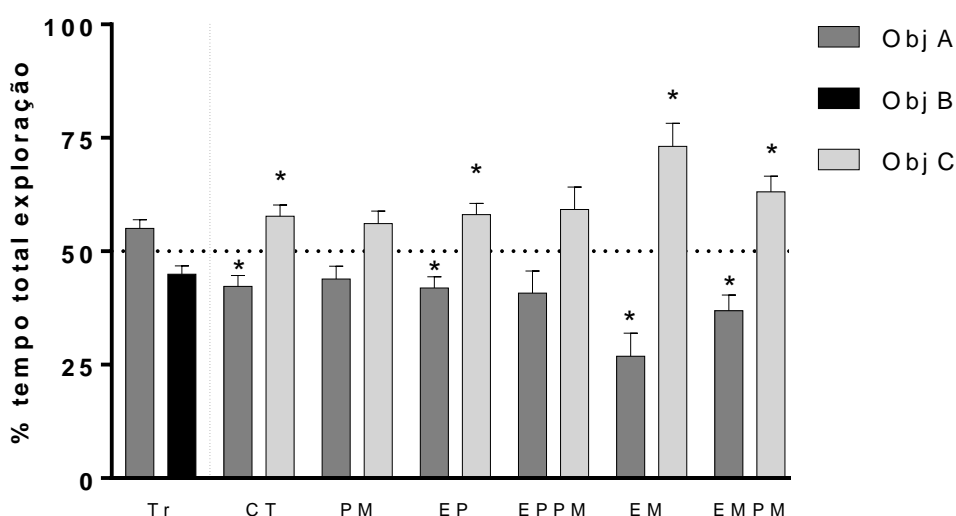
Tarefas Comportamentais		Controle			Privação maternal			P
		SI	EP	EM	SI	EP	EM	Valor
<b>Tempo de exploração RO</b>	Tempo total de exploração no treino (s)	56 30,7	38,43 17,53	51,75 53,23	52,80 26,39	41 19,41	54,75 25,58	0,67
	Tempo total de exploração no teste (s)	64 29,89	42,14 16,35	46,5 16,99	50,1 28,15	32,25 24,52	39,25 22,42	0,17
<b>Tempo de exploração RS</b>	Tempo total de exploração (s)	104,7 34,96	109,5 33,07	88,33 28,26	104,3 36,25	99,22 35,99	88,25 32,76	0,70
<b>Campo aberto</b>	Cruzamentos (n)	70,33 19,6	73,09 14,45	80,89 25,98	101 24,71	83,44 19,08	75,5 9,25	0,05
	Elevações (n)	26,11 10,09	27,27 8,54	26,89 9,94	28 9,61	28,56 12,31	30,83 2,98	0,88
<b>Labirinto em cruz elevado</b>	Tempo nos braços abertos (s)	155,3 45,72	142,8 61,91	140,8 43,84	128,5 45,46	86,33 50,78	140,8 43,84	0,09

### 4.3 Efeitos do exercício realizado durante a gestação em ratos adultos jovens submetidos ou não à privação maternal

#### 4.3.1 O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento de objetos causado pela privação maternal

Na sessão de treino na tarefa de RO (Fig. 14, Tr), os ratos adultos de todos os grupos exploraram cada objeto (A e B) por uma porcentagem do tempo total de exploração de cerca de 50% (nos gráficos os dados estão apresentados como média de todos os grupos: objeto A = média  $\pm$  DP%, objeto B = média  $\pm$  DP%,  $P > 0,05$  para todos grupos; CT:  $t(7) = 0,87$ ,  $P = 0,41$ ; PM:  $t(6) = 2,44$ ,  $P = 0,05$ ; EP:  $t(8) = 1,94$ ,  $P = 0,08$ ; EPPM:  $t(10) = 0,80$ ,  $P = 0,44$ . EM:  $t(6) = 0,06$ ,  $P = 0,95$  e; EMPM:  $t(9) = 2,15$ ,  $P = 0,06$ .

**Figura 14. O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento de objetos causado pela privação maternal em ratos adultos jovens.** \* $P < 0,05$ ; Teste-t de Student de uma amostra ou Wilcoxon signed rank (média teórica de 50%). Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP (n = 7-11/grupo). Tr: treino; CT: Controle; PM: Privação maternal; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal EPPM: EP+PM; EMPM: EM+PM.



Fonte: O autor (2020).

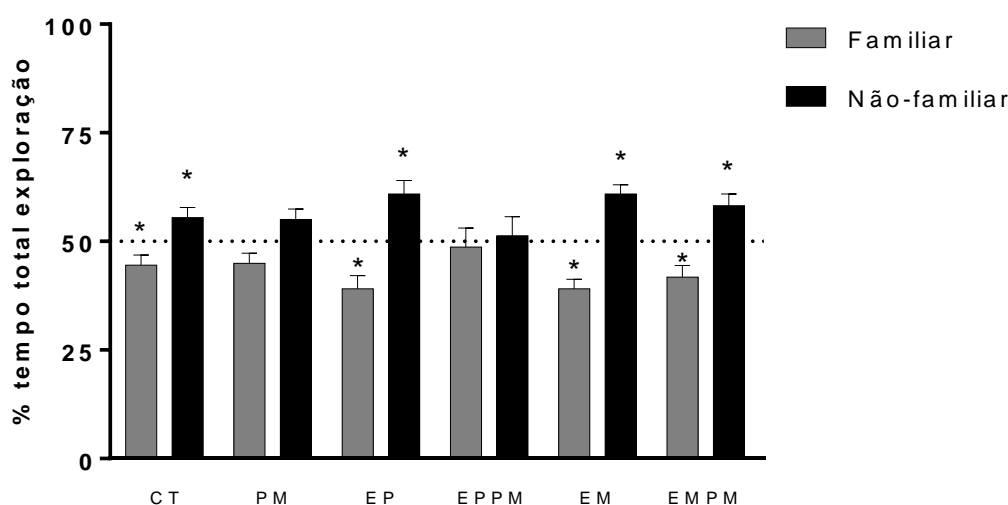
Na sessão de teste, os animais CT exploraram por mais tempo o novo objeto ( $t(7) = 3,16$ ,  $P = 0,01$ ; Fig. 14/CT), assim como os animais dos demais grupos não submetidos à privação maternal (EP:  $t(8) = 3,29$ ,  $P = 0,01$ ; EM:  $t(7) = 3,44$ ,  $P = 0,01$ ; Fig. 14). O protocolo de privação maternal gerou déficit de memória no teste de reconhecimento de objetos ( $t(6) = 2,11$ ,  $P = 0,07$ ; Fig. 14/PM). O exercício físico realizado somente durante a gestação foi capaz de prevenir esse déficit ( $t(9) = 3,79$ ,  $P = 0,004$ ; Fig. 14/EMPM). O exercício realizado pelas

mães previamente a gestação, com o declínio de intensidade durante o período gestacional, não foi capaz de prevenir o déficit de memória causado pela privação materna ( $t(10) = 1,89$ ,  $P = 0,053$ ; Fig.14/EPPM).

### 4.3.2 O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento social causado pela privação materna

No teste de reconhecimento social (Fig. 15) os resultados dos animais com 60 dias apresentaram resultados similares ao teste da tarefa de reconhecimento de objetos. Os animais CT exploraram por mais tempo o animal não-familiar ( $t(8) = 2,35$ ,  $P = 0,04$ ; Fig. 15/CT), assim como os animais dos demais grupos não submetidos à privação materna (EP:  $t(7) = 3,54$ ,  $P = 0,009$ ; EM:  $t(7) = 5,05$ ,  $P = 0,001$ ; Fig. 15).

**Figura 15. O exercício realizado durante a gestação previne o déficit de memória de reconhecimento social causado pela privação materna em ratos adultos jovens.** \* $P < 0.05$ ; Teste-t de Student de uma amostra ou Wilcoxon signed rank (média teórica de 50%). Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP ( $n = 8-13$ /grupo). CT: Controle; PM: Privação materna; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício materno EPPM: EP+PM; EM+PM.



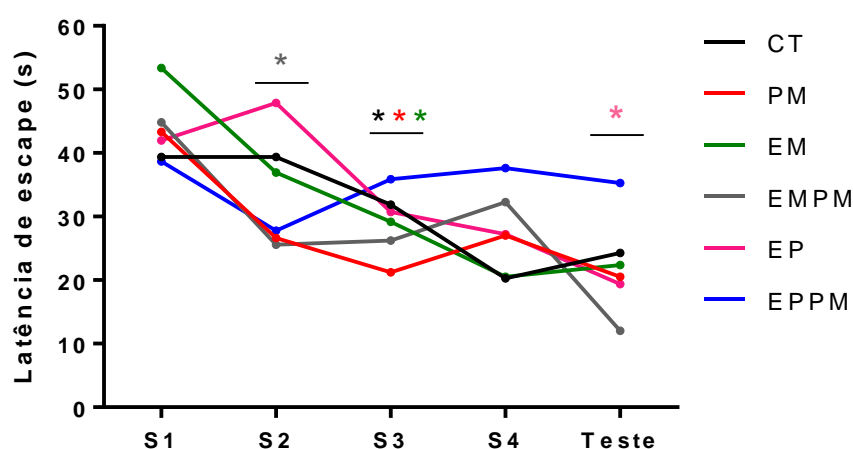
Fonte: O autor (2020).

O protocolo de privação materna gerou déficit de memória no teste de reconhecimento social ( $t(12) = 2,12$ ,  $P = 0,05$ ; Fig. 15/PM). O exercício físico realizado somente durante a gestação foi capaz de prevenir esse déficit ( $t(10) = 3,06$ ,  $P = 0,01$ ; Fig. 15/EM+PM). Novamente, o exercício realizado pelas mães previamente a gestação, com o declínio de intensidade durante o período gestacional, não foi capaz de prevenir o déficit de memória causado pela privação materna ( $t(10) = 0,3$ ,  $P = 0,46$ ; Fig. 15/EPPM).

### 4.3.3 O exercício maternal é melhor que o exercício pré-gestação para a retenção de memória espacial em filhotes privados maternalmente

No primeiro dia de treino no Labirinto de Barnes, não foram observadas diferenças entre os grupos ( $P = 0,647$ ; Fig. 16).

**Figura 16. Exercício maternal associado à privação maternal promove melhora de aprendizagem espacial em ratos adultos jovens.** \* $P < 0,05$  demonstra a sessão que o grupo aprendeu a localização do escape; Fisher's LSD. Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP ( $n = 8$ /grupo). S1-4: Sessões de treino; CT: Controle; PM: Privação maternal; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal; EPPM: EP+PM; EMPM: EM+PM

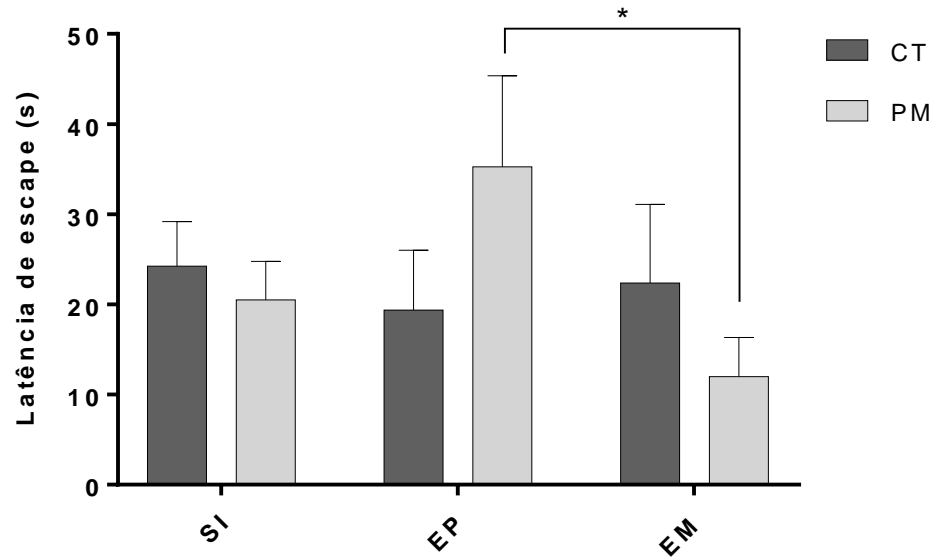


Fonte: O autor (2020).

O grupo EMPM aprendeu a localização do escape no segundo dia de treino ( $P = 0,026$ ; Fig. 16). Os grupos CT, EM e PM aprenderam a localização do escape no terceiro dia de treino (CT:  $P = 0,007$ ; EM:  $P = 0,026$ ; PM:  $P = 0,001$ ; Fig. 16). O grupo EP aprendeu a localização do escape no quinto dia (teste) ( $P = 0,026$ ; Fig. 16). O grupo EPPM não aprendeu a localização do escape até o dia do teste ( $P > 0,05$ ; Fig. 16/S1 vs Teste).

No dia do teste, o grupo EMPM precisou de menos tempo para encontrar o escape que o grupo EPPM ( $P = 0,021$ ; Fig. 17). Não houve diferença entre dos demais grupos ( $P > 0,05$ ; Fig. 17).

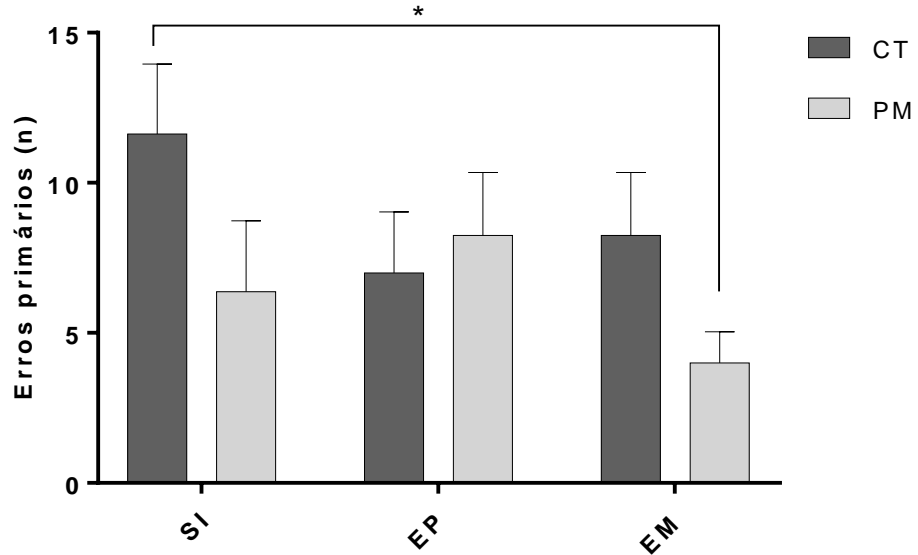
**Figura 17. Os ratos adultos jovens privados cujas mães realizaram exercício somente durante a gestação precisam de menos tempo para encontrar o escape comparados aos animais cujas mães se realizaram exercícios antes e durante a gestação. \* $P < 0,05$ ; Fishers LSD. Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP (n = 8/grupo). SI: sem intervenção; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal CT: Controle; PM: Privação maternal.**



Fonte: O autor (2020).

Ainda, analisamos a quantidade de erros cometidos antes que os animais encontrassem o escape virtual no dia do teste. Os resultados mostraram que o grupo EMPM cometeu menos erros antes de encontrar o escape, comparado ao CT ( $P = 0,011$ ; Fig. 18), denotando melhora de performance. Não houve diferença entre os demais grupos ( $P > 0,05$ ; Fig. 18).

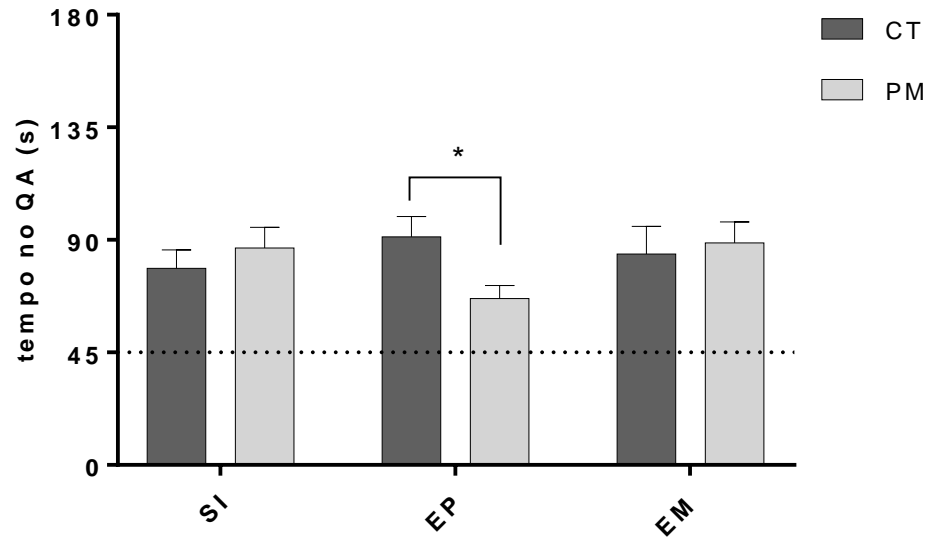
**Figura 18. A privação materna associada a prática de exercício físico pela mãe durante a gestação causou melhora de performance espacial, diminuindo o número de erros cometidos antes de encontrar o escape em ratos adultos jovens. \* $P < 0,05$ ; Fishers LSD. Os dados são apresentados na forma de média  $\pm$  DP ( $n = 8$ /grupo). SI: sem intervenção; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal CT: Controle; PM: Privação materna.**



Fonte: O autor (2020).

Do mesmo modo, analisamos o tempo total que os grupos passaram explorando o quadrante alvo. Houve diferença entre os grupos EP e EPPM, com média menor para o grupo separado ( $P = 0,039$ ; Fig. 19). Não houve diferença entre o restante dos grupos ( $P > 0,05$ ; Fig. 19).

**Figura 19. A privação causa efeito deletério em ratos adultos jovens filhos de mães que diminuíram a intensidade do exercício a partir do início da gestação. \*P < 0,05; Fishers LSD. Os dados são apresentados na forma de média ± DP (n = 8/grupo). QA: quadrante alvo; SI: sem intervenção; EP: exercício pré-gestação; EM: exercício maternal CT: Controle; PM: Privação maternal.**



Fonte: O autor (2020).

#### **4.4 O exercício físico realizado durante a gestação, assim como a privação maternal, não altera variáveis de locomoção, ansiedade e exploração em machos jovens adultos**

Os testes de controle comportamental mostram que tanto nosso protocolo de privação maternal quanto nossos protocolos utilizados de exercício físico não afetaram a atividade exploratória ou locomotora, nem denotaram comportamento tipo ansioso nos animais (tabela 2). Todos os resultados da tabela se encontram em Média ± DP.

**Tabela 2. Os protocolos de exercício físico e a privação maternal não alteraram a atividade exploratória nas tarefas de reconhecimento de objetos (RO), reconhecimento social (RS), a função locomotora e atividade exploratória no campo aberto (CA), e o comportamento do tipo ansioso avaliado por Labirinto em Cruz Elevado (LCE) de ratos adultos jovens.** Os dados são expressos como média  $\pm$  DP do tempo total de exploração (RO e RS; n = 7-13/grupo); número de cruzamentos e elevações (CA; n = 7-13/grupo), e média  $\pm$  DP do tempo gasto nos braços abertos (n = 7-13/grupo) ( $P \geq 0,05$ ; ANOVA uma via).

Tarefas Comportamentais		Controle			Privação maternal			P
		SI	EP	EM	SI	EP	EM	Valor
<b>Tempo de exploração RO</b>	Tempo total de exploração no treino (s)	51,63 25,25	39,44 18,36	20,86 6,89	38,71 23,45	40,36 21,81	44,3 27,89	0,186
	Tempo total de exploração no teste (s)	50,88 26,17	42,56 21,02	39,57 18,85	46,14 32,14	48,82 17,9	47,9 23,37	0,932
<b>Tempo de exploração RS</b>	Tempo total de exploração (s)	117,1 10,69	121,6 32,32	101,9 39,09	124,6 33,16	120,2 22,05	118,2 28,75	0,771
<b>Campo aberto</b>	Cruzamentos (n)	62,88 23,9	65,44 37,8	54,56 20,16	65,64 25,93	72,58 26,61	74,5 26,61	0,411
	Elevações (n)	19,5 7,59	20,56 11,76	17,67 10,07	25,43 11,05	24 9,72	20,9 5,7	0,435
<b>Labirinto em cruz elevado</b>	Tempo nos braços abertos (s)	140,1 46,77	139,5 40,1	81,13 65,14	113,5 54,91	139,5 56,45	125 55,79	0,346

## V. DISCUSSÃO

Nosso estudo analisou mudanças de comportamento, avaliou as memórias de reconhecimento (de objetos e social) e memória espacial, além de parâmetros comportamentais de locomoção e comportamento tipo ansioso em fêmeas pré-púberes e machos adultos jovens oriundos da prole de mães que realizaram exercício físico previamente e/ou durante a gestação, que passaram ou não por estresse neonatal oriundo da privação maternal nos primeiros dias de vida.

Os resultados mostram que o exercício físico durante a gestação é capaz de prevenir déficit nas memórias de reconhecimento de objetos e social causados pela privação maternal durante os primeiros dias de vida. Além disso, o exercício realizado durante a gestação promoveu uma melhora da aprendizagem espacial em fêmeas pré-púberes e mostrou melhores resultados que o exercício realizado previamente à gestação na memória espacial nas duas idades avaliadas.

Nossos resultados confirmam resultados prévios, demonstrando que a privação maternal, por algumas horas por dia, durante os dez primeiros dias de vida, é capaz de causar déficits de memória que perduram até a vida adulta (CZARNABAY; DALMAGO; MARTINS; QUEIROZ *et al.*, 2019; NEVES; MENEZES; SOUZA; MELLO-CARPES, 2015; SOSA; NEVES; CARRAZONI; GOMES *et al.*, 2019).

Para entendermos o que poderia estar causando esses déficits, devemos lembrar que os filhotes roedores passam seus primeiros dias de vida no ninho criado pela mãe. Sendo assim, retirar a mãe de perto dos filhotes pode perturbar o comportamento e ser tratado como uma ameaça pelos filhotes (LAJUD; TORNER, 2015), desta forma, ativando o eixo HPA (LAJUD; ROQUE; CAJERO; GUTIERREZ-OSPINA *et al.*, 2012).

Como sabemos, a ativação do eixo HPA durante esse período pode levar ao aumento crônico do hormônio liberador de corticotrofina, podendo promover modificações no nicho de novos neurônios encontrados na zona subgranular da formação hipocampal, prejudicando o processo de neurogenese e causando disfunções sinápticas hipocampais, como a diminuição no número de sinapses durante a vida (BAYER, 1980; ORELAND; NYLANDER; PICKERING, 2010; SCHMIDT; WANG; MEIJER, 2011), prejudicando processos de aprendizagem e consolidação de memórias.

Tanto para a avaliação da memória da prole na fase pré-púbere quanto na fase adulta jovem, nossa hipótese de que o exercício físico realizado pela mãe poderia prevenir o déficit na memória causado pela PM foi confirmada para as memórias de reconhecimento. Isto é, os

filhotes de ratas que realizaram corrida em esteira somente durante a gestação não apresentam déficits de memória de reconhecimento, mesmo quando submetidos à PM.

A PM não causou déficit de aprendizagem espacial nos animais no período pré-púbere ou adulto jovem. Ressaltamos que esse não é um resultado novo, mas que vai ao encontro de estudos anteriores que demonstraram não haver déficit no teste na memória espacial avaliada para ratos que passaram por estresse neonatal (GOMES DA SILVA; DE ALMEIDA; FERNANDES; LOPIM *et al.*, 2016; HOEIJMAKERS; AMELIANCHIK; VERHAAG; KOTAH *et al.*, 2018; LIN; ZHANG; DAI; XIAO *et al.*, 2016). Ainda, houve melhora da aprendizagem dos grupos somente exercitados em relação aos controles no período pré-púbere.

O grupo EM demonstrou aprendizagem no primeiro dia de treino do labirinto de Barnes, revelando alta capacidade de aprendizagem para filhotes de mães exercitadas durante a gestação, conforme já demonstrado com uso do mesmo protocolo de exercício utilizado no nosso estudo e com outro tipo de exercício durante a gestação (DAYI; AGILKAYA; OZBAL *et al.*, 2012; M; MILADI-GORJI; EMAMI-ABARGHOIE; SAFARI *et al.*, 2013).

Apesar de também encontrarmos uma melhora no processo de aprendizagem em relação ao grupo controle na idade pré-púbere, quando o exercício foi iniciado antes da gestação, mantido no período gestacional e combinado com a PM, observamos um efeito negativo tanto na aprendizagem, quanto na retenção de memória espacial nas duas idades.

Na literatura, não encontramos estudos que relacionem o exercício pré-gestacional mantido com declínio da intensidade durante a gestação com a melhora ou piora de processos mnemônicos na prole privada ou não, embora estudos demonstrem que o exercício no período pré-gestacional não é capaz de proteger a prole de fêmeas e machos adultos de efeitos deletérios do estresse pré-natal (LUFT; LEVICES; DA COSTA; HAUTE *et al.*, 2020). Acreditamos que seja a primeira vez que se demonstra que esse protocolo não previne o déficit de memória de reconhecimento causado pela privação na prole.

Destacamos que o protocolo de exercício físico utilizado na fase pré-gestacional já se mostrou eficaz em prevenir déficits de memória em outros modelos (ROSSI DARE; GARCIA; ALVES; VENTURA DIAS *et al.*, 2019; PRADO LIMA; SCHIMIDT; GARCIA; DARE *et al.*, 2018), assim como nosso protocolo de exercício durante a gestação (SPINDLER; SEGABINAZI; MEIRELES; PIAZZA *et al.*, 2019), mas eles não haviam sido previamente testados em associação com a PM e gestação. Não está claro porque o exercício, quando realizado de forma crônica antes da gestação e mantido ao longo desta, não é capaz de prevenir os déficits de memória causados pela PM. Uma hipótese que poderia explicar este resultado inclui o fato de que a intensidade do exercício foi reduzida na transição do período pré para o

gestacional, de forma que um organismo treinado poderia interpretar esta redução como um destreino.

Em humanos, já se sabe do efeito negativo do destreino tanto em fatores musculares, quanto cardíacos e metabólicos, como a diminuição do VO<sub>2</sub>máx e alterações de enzimas da cadeia respiratória (HENRIKSSON; REITMAN, 1977). Recentemente, o aumento da citocromo C oxidase foi relacionado à neuroproteção contra déficits de memória em ratos adultos (KLEIN; HOPPE; SACCOMORI; DOS SANTOS *et al.*, 2019) em estudo que avaliou a prole de mães exercitadas, demonstrando que a neuroproteção causada pelo exercício maternal não é somente dependente do aumento de VO<sub>2</sub>máx, mas também pode ser advindo da alteração do funcionamento mitocondrial na prole provocado pelo exercício maternal.

Uma vez que enzimas de funcionamento mitocondrial são afetadas de maneira negativa pelo destreino e essas enzimas estão ligadas à neuroproteção (KLEIN; HOPPE; SACCOMORI; DOS SANTOS *et al.*, 2019), podemos hipotetizar que a partir da não-manutenção do estado redox a partir do destreino (HENRIKSSON; REITMAN, 1977; RADAK; TOLDY; SZABO; SIAMILIS *et al.*, 2006) houve diminuição de enzimas da cadeia respiratória. Esta diminuição pode ter impedido que observássemos efeitos protetores do exercício após o período de diminuição da intensidade do treino durante a gestação, uma vez que o DNA mitocondrial contém todas estruturas da cadeia respiratória e é herdado de parte materna (WALLACE, 2007).

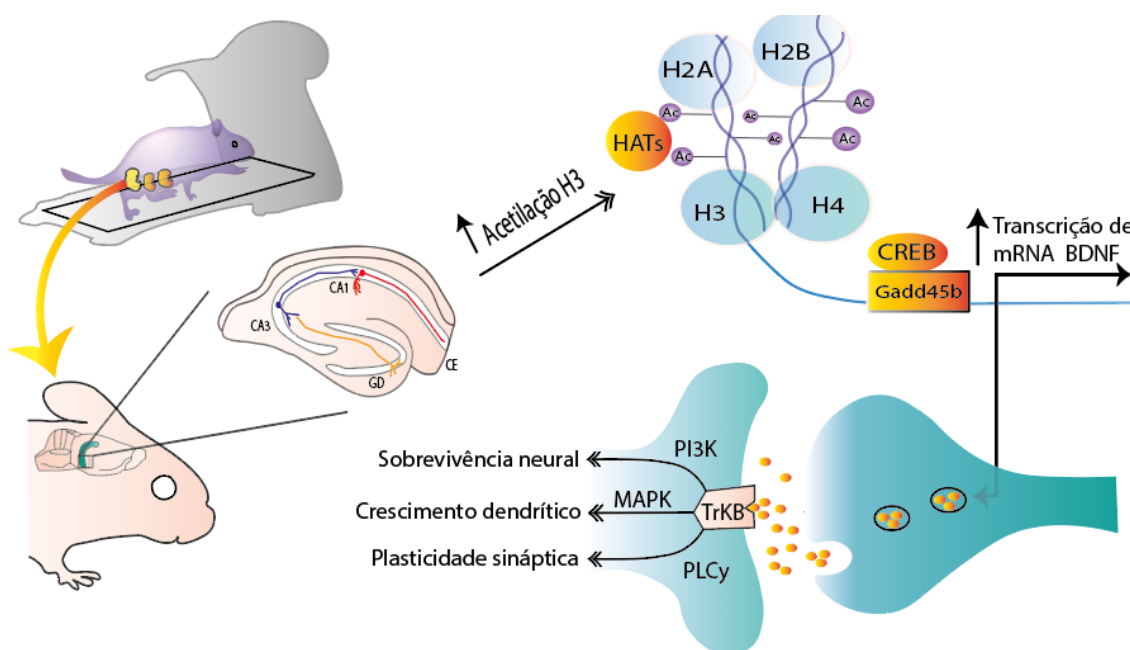
Estudos também já demonstraram que um período de destreino diminui fatores importantes para a neuroproteção, como os níveis de BDNF e NGF (do inglês, *nerve growth factor*), podendo afetar a retenção de memórias (RADAK; TOLDY; SZABO; SIAMILIS *et al.*, 2006), o que também explicaria a falta de efeitos protetores no grupo exercitado previamente à gestação. É importante notar que os estudos que envolvem destreino e memória ainda são, em sua grande maioria, realizados com ratos, e não encontramos estudos, até o momento, que relacionem o destreino com o início da gestação. De qualquer forma, novos estudos nessa linha são necessários para esclarecer se a diminuição da intensidade está associada a este efeito, e se outro protocolo que não varie a intensidade durante a gestação seria capaz de promover neuroproteção na prole.

Estudos em humanos já demonstraram que filhos de mães exercitadas apresentam melhores resultados durante a primeira infância em testes de memória (CLAPP; SIMONIAN; LOPEZ; APPLEBY-WINEBERG *et al.*, 1998). Tais efeitos também podem estar ligados ao aumento da neurogênese e modulação epigenética, especificamente, pelo aumento do status de acetilação de histonas em resposta ao exercício em roedores adolescentes e adultos, demonstrado previamente por outros autores (SPINDLER; CECHINEL; BASSO; MOYSES *et*

*al.*, 2014; ELSNER; BASSO; BERTOLDI; DE MEIRELES *et al.*, 2017; ELSNER; BERTOLDI; VANZELLA *et al.*, 2011). Cabe descrever ainda que a hiperacetilação de histonas em resposta ao exercício está ligada ao aumento na expressão de BDNF (COLLINS; HILL; CHANDRAMOHAN; WHITCOMB *et al.*, 2009).

Dessa forma, nossa hipótese é de que o exercício maternal iniciado durante a gestação preveniria a queda dos níveis de BDNF causada pela privação maternal a partir do aumento dos níveis hipocampais de acetilação de histonas H3, levando a efeitos neuroprotetores, como a sobrevivência neural, crescimento dendrítico e plasticidade sináptica (figura 20).

**Figura 20. Possível mecanismo envolvido na prevenção do déficit de memória causado pela privação maternal na prole de mães exercitadas durante a gestação.** A partir da realização do exercício aeróbio, ocorre o aumento dos níveis hipocampais de acetilação da histona H3, possibilitando a descompactação da cromatina e o aumento da transcrição de mRNA de BDNF. A partir de sua síntese no hipocampo, o BDNF se liga a seu receptor TrkB promovendo efeitos neuroprotetores como a sobrevivência neural, crescimento dendrítico e plasticidade sináptica.



Fonte: O autor (2020).

Rodrigues & Toffoli (RODRIGUES; TOFFOLI; MANFREDO; FRANCIS-OLIVEIRA *et al.*, 2015) demonstraram que o exercício físico é capaz de alterar os níveis de metilação do DNA em ratos submetidos a estresse, e a partir disto modular os níveis de genes relacionados ao BDNF, sugerindo que o exercício seja capaz de modular os níveis em animais em situações adversas também a partir da metilação do DNA, e não somente da acetilação de histonas.

Corroborando nossa hipótese, em humanos foi demonstrado que níveis baixos de BDNF devidos a uma variação genética aumentam a probabilidade de desordens de ordem

neuropsiquiátricas, como transtornos bipolares e depressão (LIN; HUANG, 2020). Em modelos animais, a relação da privação maternal durante os primeiros dias de vida com os níveis de BDNF e seu receptor durante as primeiras semanas de vida têm sido estabelecida, sendo que a diminuição da sinalização BDNF-ERK pela PM (ERK do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*) leva a diminuição de espinhos dendríticos aos 21 dias de vida (OHTA; SUZUKI; WARITA; KAJI *et al.*, 2017), podendo prejudicar a aprendizagem e consolidação de memórias nessa fase.

Em contrapartida, Aksu e colaboradores (AKSU; BAYKARA; OZBAL; CETIN *et al.*, 2012) demonstraram um aumento dos níveis de BDNF tanto em ratos jovens (DPN26) quanto na idade adulta (DPN120) utilizando o mesmo protocolo de exercício durante a gestação utilizado no nosso estudo. Com isso, nossos resultados demonstram que o exercício maternal é capaz de prevenir os déficits de memória causados pela privação maternal, o que pode estar relacionado com o aumento dos níveis de BDNF no hipocampo da prole privada

Embora não tenhamos mensurado, a literatura também indica que o aumento de BDNF periférico durante o exercício (SCHMIDT-KASSOW; SCHADLE; OTTERBEIN; THIEL; *et al.*, 2012) pode ter efeitos diretamente no cérebro dos filhotes, já que filhotes de linhagem *Bdnf* (-/-) apresentam BDNF quando o mesmo é administrado periféricamente nas mães durante a gestação (KODOARI; WADA; NAKAMURA; WADA; 2009). Sendo assim, há evidências de que o BDNF é capaz de atravessar a barreira placentária e agir de forma a promover efeitos neuroprotetores e auxiliar no neurodesenvolvimento da prole de mães exercitadas durante a gestação.

Por fim, é importante destacar que não foram observadas diferenças entre os grupos nos resultados dos testes de controle comportamental de locomoção e exploração (campo aberto) e comportamento tipo ansioso (labirinto em cruz elevado), independentemente da idade ou do sexo dos animais. Estes dados permitem afirmar que os resultados observados nos testes de memória são advindos de alterações específicas nesta esfera cognitiva.

## VI. CONCLUSÃO

A privação maternal causa déficit de memória de reconhecimento em ratas pré-púberes e ratos adultos jovens. Ainda, causa déficit de aprendizagem espacial quando combinada com o declínio de intensidade durante a gestação. O exercício físico aeróbico, quando realizado pela rata mãe somente durante a gestação, é capaz de prevenir os déficits de aprendizagem e memória da prole provocados pelo estresse neonatal induzido pela privação maternal. Além disso, é capaz de melhorar a aprendizagem espacial de fêmeas pré-púberes. De forma contrária, quando o exercício físico é iniciado previamente à gestação e tem sua intensidade diminuída durante a gestação, ele não é capaz de prevenir os déficits de memória da prole.

## VII. PERSPECTIVAS FUTURAS

A fim de entender os mecanismos envolvidos nos efeitos observados na memória dos animais, pretendemos avaliar se o exercício realizado pelas mães em diferentes momentos antes e/ou durante a gestação, assim como a privação maternal, são capazes de alterar a acetilação de histonas H3 e os níveis de BDNF no hipocampo dos filhotes de diferentes idades e sexos. Estes experimentos estavam previstos no projeto inicial, no entanto, dada a situação vivenciada em 2020 devido à pandemia da COVID-19, não foi viável sua execução a tempo de conclusão desta dissertação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; VILLERS, A.; RIS, L. Temporal phases of long-term potentiation (LTP): myth or fact? **Rev Neurosci**, 26, n. 5, p. 507-546, 2015.

ABEL, J. L.; RISSMAN, E. F. Running-induced epigenetic and gene expression changes in the adolescent brain. **Int J Dev Neurosci**, 31, n. 6, p. 382-390, Oct 2013.

AGORASTOS, A.; PERVANIDOU, P.; CHROUSOS, G. P.; BAKER, D. G. Developmental Trajectories of Early Life Stress and Trauma: A Narrative Review on Neurobiological Aspects Beyond Stress System Dysregulation. **Front Psychiatry**, 10, p. 118, 2019.

AKSU, I.; BAYKARA, B.; OZBAL, S.; CETIN, F. *et al.* Maternal treadmill exercise during pregnancy decreases anxiety and increases prefrontal cortex VEGF and BDNF levels of rat pups in early and late periods of life. **Neurosci Lett**, 516, n. 2, p. 221-225, May 16 2012.

ALBERINI, C. M. Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. **Physiol Rev**, 89, n. 1, p. 121-145, Jan 2009.

ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 51, p. 786-794, May 1964.

ANNUNZIATO, A. T.; HANSEN, J. C. Role of histone acetylation in the assembly and modulation of chromatin structures. **Gene Expr**, 9, n. 1-2, p. 37-61, 2000.

ANTONI, F. A.; PALKOVITS, M.; MAKARA, G. B.; LINTON, E. A. *et al.* Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in the hypothalamoinfundibular tract. **Neuroendocrinology**, 36, n. 6, p. 415-423, Jun 1983.

ARDENGI, P.; BARROS, D.; IZQUIERDO, L. A.; BEVILAQUA, L. *et al.* Late and prolonged post-training memory modulation in entorhinal and parietal cortex by drugs acting on the cAMP/protein kinase A signalling pathway. **Behav Pharmacol**, 8, n. 8, p. 745-751, Dec 1997.

BAGHERI, A.; HABIBZADEH, P.; RAZAVIPOUR, S. F.; VOLMAR, C. H. *et al.* HDAC Inhibitors Induce BDNF Expression and Promote Neurite Outgrowth in Human Neural Progenitor Cells-Derived Neurons. **Int J Mol Sci**, 20, n. 5, Mar 5 2019.

BARNES, C. A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. **J Comp Physiol Psychol**, 93, n. 1, p. 74-104, Feb 1979.

BASSETT, D. S.; GAZZANIGA, M. S. Understanding complexity in the human brain. **Trends Cogn Sci**, 15, n. 5, p. 200-209, May 2011.

BATH, K.G.; NITENSON, A.S.; LICHTMAN, E.; LOPEZ, C.; CHEN, W.; GALLO, M.; GOODWILL, H.; MANZANO-NIEVES, G.; Early life stress leads to developmental and sex

selective effects on performance in a novel object placement task. **Neurobiol Stress**. 2017 Apr 24;7:57-67

BAYER, S. A. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. **J Comp Neurol**, 190, n. 1, p. 115-134, Mar 1 1980.

BENETTI, F.; DA SILVEIRA, C. K.; DA SILVA, W. C.; CAMMAROTA, M. *et al.* Histamine reverses a memory deficit induced in rats by early postnatal maternal deprivation. **Neurobiol Learn Mem**, 97, n. 1, p. 54-58, Jan 2012.

BENETTI, F.; MELLO, P. B.; BONINI, J. S.; MONTEIRO, S. *et al.* Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. **Int J Dev Neurosci**, 27, n. 1, p. 59-64, Feb 2009.

BETTIO, L.; THACKER, J. S.; HUTTON, C.; CHRISTIE, B. R. Modulation of synaptic plasticity by exercise. **Int Rev Neurobiol**, 147, p. 295-322, 2019.

BICK-SANDER, A.; STEINER, B.; WOLF, S. A.; BABU, H. *et al.* Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 10, p. 3852-3857, Mar 7 2006.

BLANK, M.; WERENICZ, A.; VELHO, L. A.; PINTO, D. F. *et al.* Enhancement of memory consolidation by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in aged rats. **Neurosci Lett**, 594, p. 76-81, May 6 2015.

BLISS, T. V.; GARDNER-MEDWIN, A. R. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol**, 232, n. 2, p. 357-374, Jul 1973.

BOULLE, F.; VAN DEN HOVE, D. L.; JAKOB, S. B.; RUTTEN, B. P. *et al.* Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. **Mol Psychiatry**, 17, n. 6, p. 584-596, Jun 2012.

BREDY, T. W.; WU, H.; CREGO, C.; ZELLHOEFER, J. *et al.* Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. **Learn Mem**, 14, n. 4, p. 268-276, Apr 2007.

BROOKS, G. A.; DONOVAN, C. M.; WHITE, T. P. Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rats during exercise. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, 56, n. 2, p. 520-525, Feb 1984.

BUCHSBAUM, I. Y.; CAPPELLO, S. Neuronal migration in the CNS during development and disease: insights from in vivo and in vitro models. **Development**, 146, n. 1, Jan 9 2019.

CAMPBELL, R. R.; WOOD, M. A. How the epigenome integrates information and reshapes the synapse. **Nat Rev Neurosci**, 20, n. 3, p. 133-147, Mar 2019.

CARONI, P.; CHOWDHURY, A.; LAHR, M. Synapse rearrangements upon learning: from divergent-sparse connectivity to dedicated sub-circuits. **Trends Neurosci**, 37, n. 10, p. 604-614, Oct 2014.

CARTER, L. G.; QI, N. R.; DE CABO, R.; PEARSON, K. J. Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. **Med Sci Sports Exerc**, 45, n. 5, p. 832-840, May 2013.

CHOI, J. K.; HOWE, L. J. Histone acetylation: truth of consequences? **Biochem Cell Biol**, 87, n. 1, p. 139-150, Feb 2009.

CLAPP, J. F., 3rd; SIMONIAN, S.; LOPEZ, B.; APPLEBY-WINEBERG, S. *et al.* The one-year morphometric and neurodevelopmental outcome of the offspring of women who continued to exercise regularly throughout pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, 178, n. 3, p. 594-599, Mar 1998.

COLLINS, A.; HILL, L. E.; CHANDRAMOHAN, Y.; WHITCOMB, D. *et al.* Exercise improves cognitive responses to psychological stress through enhancement of epigenetic mechanisms and gene expression in the dentate gyrus. **PLoS One**, 4, n. 1, p. e4330, 2009.

CZARNABAY, D.; DALMAGO, J.; MARTINS, A. S.; QUEIROZ, A. *et al.* Repeated three-hour maternal deprivation as a model of early-life stress alters maternal behavior, olfactory learning and neural development. **Neurobiol Learn Mem**, 163, p. 107040, Sep 2019.

DAYI, A.; AGILKAYA, S.; OZBAL, S.; CETIN, F. *et al.* Maternal aerobic exercise during pregnancy can increase spatial learning by affecting leptin expression on offspring's early and late period in life depending on gender. **ScientificWorldJournal**, 2012, p. 429803, 2012.

DE MEIRELES, L. C.; BERTOLDI, K.; CECHINEL, L. R.; SCHALLENBERGER, B. L. *et al.* Treadmill exercise induces selective changes in hippocampal histone acetylation during the aging process in rats. **Neurosci Lett**, 634, p. 19-24, Nov 10 2016.

DUDAI, Y.; EISENBERG, M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. **Neuron**, 44, n. 1, p. 93-100, Sep 30 2004.

DUNNING, J.; DURING, M. J. Molecular mechanisms of learning and memory. **Expert Rev Mol Med**, 5, n. 25, p. 1-11, Oct 7 2003.

ELSNER, V. R.; BASSO, C.; BERTOLDI, K.; DE MEIRELES, L. C. *et al.* Differential effect of treadmill exercise on histone deacetylase activity in rat striatum at different stages of development. **J Physiol Sci**, 67, n. 3, p. 387-394, May 2017.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1 1988.

ERICKSON, K. I.; VOSS, M. W.; PRAKASH, R. S.; BASAK, C. *et al.* Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 7, p. 3017-3022, Feb 15 2011.

FILE, S. E.; PELLOW, S. The effects of PK 11195, a ligand for benzodiazepine binding sites, in animal tests of anxiety and stress. **Pharmacol Biochem Behav**, 23, n. 5, p. 737-741, Nov 1985.

FISCHER, A.; SANANBENESI, F.; WANG, X.; DOBBIN, M. *et al.* Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. **Nature**, 447, n. 7141, p. 178-182, May 10 2007.

FRASIER, C. R.; MOORE, R. L.; BROWN, D. A. Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. **J Appl Physiol** (1985), 111, n. 3, p. 905-915, Sep 2011.

GANAI, S. A.; RAMADOSS, M.; MAHADEVAN, V. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors - emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration. **Curr Neuropharmacol**, 14, n. 1, p. 55-71, 2016.

GALE SD, BAXTER L, THOMPSON J. Greater memory impairment in dementing females than males relative to sex-matched healthy controls. **J Clin Exp Neuropsychol**. 2016; 38(5):527-33.

GARCEZ, M. L.; DE CARVALHO, C. A.; MINA, F.; BELLETTINI-SANTOS, T. *et al.* Sodium butyrate improves memory and modulates the activity of histone deacetylases in aged rats after the administration of d-galactose. **Exp Gerontol**, 113, p. 209-217, Nov 2018.

GOMES DA SILVA, S.; DE ALMEIDA, A. A.; FERNANDES, J.; LOPIM, G. M. *et al.* Maternal Exercise during Pregnancy Increases BDNF Levels and Cell Numbers in the Hippocampal Formation but Not in the Cerebral Cortex of Adult Rat Offspring. **PLoS One**, 11, n. 1, p. e0147200, 2016.

GOMEZ-PINILLA, F.; ZHUANG, Y.; FENG, J.; YING, Z. *et al.* Exercise impacts brain-derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. **Eur J Neurosci**, 33, n. 3, p. 383-390, Feb 2011.

GRAFF, J.; MANSUY, I. M. Epigenetic codes in cognition and behaviour. **Behav Brain Res**, 192, n. 1, p. 70-87, Sep 1 2008.

GUNNAR, M.; QUEVEDO, K. The neurobiology of stress and development. **Annu Rev Psychol**, 58, p. 145-173, 2007.

GUTMAN, D. A.; NEMEROFF, C. B. Neurobiology of early life stress: rodent studies. **Semin Clin Neuropsychiatry**, 7, n. 2, p. 89-95, Apr 2002.

HENRIKSSON, J.; REITMAN, J. S. Time course of changes in human skeletal muscle succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities and maximal oxygen uptake with physical activity and inactivity. **Acta Physiol Scand**, 99, n. 1, p. 91-97, Jan 1977.

HEYDARI, A.; ESMAEILPOUR, K.; SHEIBANI, V. Maternal separation impairs long term-potential in CA3-CA1 synapses in adolescent female rats. **Behav Brain Res**, 376, p. 112239, Dec 30 2019.

HOEIJMAKERS, L.; AMELIANCHIK, A.; VERHAAG, F.; KOTAH, J. *et al.* Early-Life Stress Does Not Aggravate Spatial Memory or the Process of Hippocampal Neurogenesis in Adult and Middle-Aged APP/PS1 Mice. **Front Aging Neurosci**, 10, p. 61, 2018.

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Behav Neural Biol**, 51, n. 2, p. 171-202, Mar 1989.

IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB J**, 8, n. 14, p. 1139-1145, Nov 1994.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R.; MYSKIW, J. C. Fear Memory. **Physiol Rev**, 96, n. 2, p. 695-750, Apr 2016.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997.

JUNG, S. Y.; KIM, D. Y.; YUNE, T. Y.; SHIN, D. H. *et al.* Treadmill exercise reduces spinal cord injury-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in rats. **Exp Ther Med**, 7, n. 3, p. 587-593, Mar 2014.

JUSTER, R. P.; MCEWEN, B. S.; LUPIEN, S. J. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. **Neurosci Biobehav Rev**, 35, n. 1, p. 2-16, Sep 2010.

KANG, H.; SCHUMAN, E. M. Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. **Science**, 267, n. 5204, p. 1658-1662, Mar 17 1995.

KATCHE, C.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J. H. Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage. **Neurobiol Learn Mem**, 106, p. 40-47, Nov 2013.

KLEIN, C. P.; HOPPE, J. B.; SACCOMORI, A. B.; DOS SANTOS, B. G. *et al.* Physical Exercise During Pregnancy Prevents Cognitive Impairment Induced by Amyloid-beta in Adult Offspring Rats. **Mol Neurobiol**, 56, n. 3, p. 2022-2038, Mar 2019.

KODOMARI I, WADA E, NAKAMURA S, WADA K. Maternal supply of BDNF to mouse fetal brain through the placenta. **Neurochem Int**. 2009 Feb;54(2):95-8.

KODOMARI, I.; WADA, E.; NAKAMURA, S.; WADA, K. Maternal supply of BDNF to mouse fetal brain through the placenta. **Neurochem Int**. 54:95-98.2009.

LADD, C. O.; HUOT, R. L.; THRIVIKRAMAN, K. V.; NEMEROFF, C. B. *et al.* Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. **Biol Psychiatry**, 55, n. 4, p. 367-375, Feb 15 2004.

LADD, C. O.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation. **Endocrinology**, 137, n. 4, p. 1212-1218, Apr 1996.

LAJUD, N.; ROQUE, A.; CAJERO, M.; GUTIERREZ-OSPINA, G. *et al.* Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. **Psychoneuroendocrinology**, 37, n. 3, p. 410-420, Mar 2012.

LAJUD, N.; TORNER, L. Early life stress and hippocampal neurogenesis in the neonate: sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. **Front Mol Neurosci**, 8, p. 3, 2015.

LARA, A. H.; WALLIS, J. D. The Role of Prefrontal Cortex in Working Memory: A Mini Review. **Front Syst Neurosci**, 9, p. 173, 2015.

LAUER, J. E., YHANG, E., LOURENCO, S. F. The development of gender differences in spatial reasoning: A meta-analytic review. **Psych Bul**, 145(6), 537–565.

LI, B.; LEE, C.; FILLER, T.; HOCK, A. *et al.* Inhibition of corticotropin-releasing hormone receptor 1 and activation of receptor 2 protect against colonic injury and promote epithelium repair. **Sci Rep**, 7, p. 46616, May 11 2017.

LI, Q.; ROTHKEGEL, M.; XIAO, Z. C.; ABRAHAM, W. C. *et al.* Making synapses strong: metaplasticity prolongs associativity of long-term memory by switching synaptic tag mechanisms. **Cereb Cortex**, 24, n. 2, p. 353-363, Feb 2014.

LIN, L. Y.; ZHANG, J.; DAI, X. M.; XIAO, N. A. *et al.* Early-life stress leads to impaired spatial learning and memory in middle-aged ApoE4-TR mice. **Mol Neurodegener**, 11, n. 1, p. 51, Jul 12 2016.

LOPRINZI P.D., FRITH E. The Role of Sex in Memory Function: Considerations and Recommendations in the Context of Exercise. **J Clin Med**. 2018 May 31;7(6):132.

LOPRINZI, P.D.; FRITH, E. The Role of Sex in Memory Function: Considerations and Recommendations in the Context of Exercise. **J Clin Med**. 2018 May 31;7(6):132.

LUFT, C.; LEVICES, I. P.; DA COSTA, M. S.; HAUTE, G. V. *et al.* Exercise before pregnancy attenuates the effects of prenatal stress in adult mice in a sex-dependent manner. **Int J Dev Neurosci**, 80, n. 2, p. 86-95, Apr 2020.

LUNDERVOLD AJ, WOLLSCHLÄGER D, WEHLING E. Age and sex related changes in episodic memory function in middle aged and older adults. **Scand J Psychol**. 2014 Jun; 55(3):225-32.

M, M. A.; MILADI-GORJI, H.; EMAMI-ABARGHOIE, M.; SAFARI, M. *et al.* Maternal Voluntary Exercise during Pregnancy Enhances the Spatial Learning Acquisition but not the Retention of Memory in Rat Pups via a TrkB-mediated Mechanism: The Role of Hippocampal BDNF Expression. **Iran J Basic Med Sci**, 16, n. 9, p. 955-961, Sep 2013.

MAGHAMI, S.; ZARDOOZ, H.; KHODAGHOLI, F.; BINAYI, F. *et al.* Maternal separation blunted spatial memory formation independent of peripheral and hippocampal insulin content in young adult male rats. **PLoS One**, 13, n. 10, p. e0204731, 2018.

MAGUIRE EA, BURGESS N, O'KEEFE J. Human spatial navigation: cognitive maps, sexual dimorphism, and neural substrates. **Curr Opin Neurobiol**. 1999 Apr; 9(2):171-7.

MAJCHER-MASLANKA, I.; SOLARZ, A.; WEDZONY, K.; CHOCYK, A. The effects of early-life stress on dopamine system function in adolescent female rats. **Int J Dev Neurosci**, 57, p. 24-33, Apr 2017.

MALCON, L. M. C.; WEARICK-SILVA, L. E.; ZAPARTE, A.; ORSO, R. *et al.* Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male Balb/cJ mice. **Exp Brain Res**, Jul 12 2020.

MARCELINO, T. B.; LONGONI, A.; KUDO, K. Y.; STONE, V. *et al.* Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. **Neuroscience**, 246, p. 28-39, Aug 29 2013.

MARCO, A. The Origin and Evolution of Maternal Genes. **Results Probl Cell Differ**, 63, p. 483-494, 2017.

MARCO, E.M.; VALERO, M.; DE LA SERNA, O. Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats. **Neuropharmacology**. 2013 May;68:223-231.

MAREN, SC.; SCHADLE, S.; OTTERBEIN, S.; THIEL, C.; DOEHRING, A.; LOSTCH, J.; KAISER, L. Kinetics of serum brain-derived neurotrophic factor following low-intensity versus high-intensity exercise in men and women. **NeuroReport**. 23:889-893. 2012.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, 287, n. 5451, p. 248-251, Jan 14 2000.

MENEZES, J.; NEVES, B. H.; SOUZA, M.; MELLO-CARPES, P. B. Green tea protects against memory deficits related to maternal deprivation. **Physiol Behav**, 182, p. 121-127, Dec 1 2017.

MINICHIELLO, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. **Nat Rev Neurosci**, 10, n. 12, p. 850-860, Dec 2009.

NAGAPPAN, G.; ZAITSEV, E.; SENATOROV, V. V., Jr.; YANG, J. *et al.* Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 4, p. 1267-1272, Jan 27 2009.

NEVES, B. H.; MENEZES, J.; SOUZA, M. A.; MELLO-CARPES, P. B. Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation. **Physiol Behav**, 152, n. Pt A, p. 99-105, Dec 1 2015.

NOKIA, M. S.; LENSU, S.; AHTIAINEN, J. P.; JOHANSSON, P. P. *et al.* Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **J Physiol**, 594, n. 7, p. 1855-1873, Apr 1 2016.

NOMURA, T.; TAKAHASHI, M.; HARA, Y.; OSUMI, N. Patterns of neurogenesis and amplitude of Reelin expression are essential for making a mammalian-type cortex. **PLoS One**, 3, n. 1, p. e1454, Jan 16 2008.

OHTA, K. I.; SUZUKI, S.; WARITA, K.; KAJI, T. *et al.* Prolonged maternal separation attenuates BDNF-ERK signaling correlated with spine formation in the hippocampus during early brain development. **J Neurochem**, 141, n. 2, p. 179-194, Apr 2017.

ORELAND, S.; NYLANDER, I.; PICKERING, C. Prolonged maternal separation decreases granule cell number in the dentate gyrus of 3-week-old male rats. **Int J Dev Neurosci**, 28, n. 2, p. 139-144, Apr 2010.

PATKI, G.; SOLANKI, N.; ATROOZ, F.; ANSARI, A. *et al.* Novel mechanistic insights into treadmill exercise based rescue of social defeat-induced anxiety-like behavior and memory impairment in rats. **Physiol Behav**, 130, p. 135-144, May 10 2014.

PENN, A. C.; ZHANG, C. L.; GEORGES, F.; ROYER, L. *et al.* Hippocampal LTP and contextual learning require surface diffusion of AMPA receptors. **Nature**, 549, n. 7672, p. 384-388, Sep 21 2017.

PIZZAGALLI, D. A.; CARLEZON, W. A. Error Processing in Depressive States: A Translational Opportunity? **Neuropsychopharmacology**, 42, n. 1, p. 372, Jan 2017.

POSTMA, A., JAGER, G., KESSELS R.P., KOPPESCHAAR H.P., VAN HONK J. Sex differences for selective forms of spatial memory. **Brain Cogn.** 2004 Feb; 54(1):24-34.

PRADO LIMA, M. G.; SCHIMIDT, H. L.; GARCIA, A.; DARE, L. R. *et al.* Environmental enrichment and exercise are better than social enrichment to reduce memory deficits in amyloid beta neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 10, p. E2403-E2409, Mar 6 2018.

RADAK, Z.; TOLDY, A.; SZABO, Z.; SIAMILIS, S. *et al.* The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochem Int**, 49, n. 4, p. 387-392, Sep 2006.

REDONDO, R. L.; MORRIS, R. G. Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. **Nat Rev Neurosci**, 12, n. 1, p. 17-30, Jan 2011.

ROBINSON, A. M.; BUCCI, D. J. Physical exercise during pregnancy improves object recognition memory in adult offspring. **Neuroscience**, 256, p. 53-60, Jan 3 2014.

RODRIGUES, G. M., Jr.; TOFFOLI, L. V.; MANFREDO, M. H.; FRANCIS-OLIVEIRA, J. *et al.* Acute stress affects the global DNA methylation profile in rat brain: modulation by physical exercise. **Behav Brain Res**, 279, p. 123-128, Feb 15 2015.

ROSSI DARE, L.; GARCIA, A.; ALVES, N.; VENTURA DIAS, D. *et al.* Physical and cognitive training are able to prevent recognition memory deficits related to amyloid beta neurotoxicity. **Behav Brain Res**, 365, p. 190-197, Jun 3 2019.

SAHA, R. N.; LIU, X.; PAHAN, K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. **J Neuroimmune Pharmacol**, 1, n. 3, p. 212-222, Sep 2006.

SANCHEZ, M. M. The impact of early adverse care on HPA axis development: nonhuman primate models. **Horm Behav**, 50, n. 4, p. 623-631, Nov 2006.

SCHIMIDT, H. L.; VIEIRA, A.; ALTERMANN, C.; MARTINS, A. *et al.* Memory deficits and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion: neuroprotective role of physical exercise and green tea supplementation. **Neurobiol Learn Mem**, 114, p. 242-250, Oct 2014.

SCHMIDT, M. V.; WANG, X. D.; MEIJER, O. C. Early life stress paradigms in rodents: potential animal models of depression? **Psychopharmacology (Berl)**, 214, n. 1, p. 131-140, Mar 2011.

SCHMIDT-KASSOW M, SCHÄDLE S, OTTERBEIN S, THIEL C, DOEHRING A, LÖTSCH J, KAISER J. Kinetics of serum brain-derived neurotrophic factor following low-intensity versus high-intensity exercise in men and women. **Neuroreport**. 2012 Oct 24;23(15):889-93.

SCHNEIDER, A.; CHATTERJEE, S.; BOUSIGES, O.; SELVI, B. R. *et al.* Acetyltransferases (HATs) as targets for neurological therapeutics. **Neurotherapeutics**, 10, n. 4, p. 568-588, Oct 2013.

SHAHBAZIAN, M. D.; GRUNSTEIN, M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. **Annu Rev Biochem**, 76, p. 75-100, 2007.

SHORT, A. K.; YESHURUN, S.; POWELL, R.; PERREAU, V. M. *et al.* Exercise alters mouse sperm small noncoding RNAs and induces a transgenerational modification of male offspring conditioned fear and anxiety. **Transl Psychiatry**, 7, n. 5, p. e1114, May 2 2017.

SOSA, P. M.; NEVES, B. S.; CARRAZONI, G. S.; GOMES, G. M. *et al.* Maternal Deprivation Induces Memory Deficits That Are Reduced by One Aerobic Exercise Shot Performed after the Learning Session. **Neural Plast**, 2019, p. 3608502, 2019.

SOUSA, V. C.; VITAL, J.; COSTENLA, A. R.; BATALHA, V. L. *et al.* Maternal separation impairs long term-potential in CA1-CA3 synapses and hippocampal-dependent memory in old rats. **Neurobiol Aging**, 35, n. 7, p. 1680-1685, Jul 2014.

SPINDLER, C.; CECHINEL, L. R.; BASSO, C.; MOYSES, F. *et al.* Treadmill exercise alters histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in frontal cortices from wistar rats. **Cell Mol Neurobiol**, 34, n. 8, p. 1097-1101, Nov 2014.

SPINDLER, C.; SEGABINAZI, E.; MEIRELES, A. L. F.; PIAZZA, F. V. *et al.* Paternal physical exercise modulates global DNA methylation status in the hippocampus of male rat offspring. **Neural Regen Res**, 14, n. 3, p. 491-500, Mar 2019.

SURI, D.; BHATTACHARYA, A.; VAIDYA, V. A. Early stress evokes temporally distinct consequences on the hippocampal transcriptome, anxiety and cognitive behaviour. **Int J Neuropsychopharmacol**, 17, n. 2, p. 289-301, Feb 2014.

SYED, S. A.; NEMEROFF, C. B. Early Life Stress, Mood, and Anxiety Disorders. **Chronic Stress (Thousand Oaks)**, 1, Feb 2017.

THARMARATNAM, K.; SPERRIN, M.; JAKI, T.; REPPE, S. *et al.* Tilting the lasso by knowledge-based post-processing. **BMC Bioinformatics**, 17, n. 1, p. 344, Sep 2 2016.

UNSWORTH, N.; ENGLE, R. W. On the division of short-term and working memory: an examination of simple and complex span and their relation to higher order abilities. **Psychol Bull**, 133, n. 6, p. 1038-1066, Nov 2007.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Eur J Neurosci**, 20, n. 10, p. 2580-2590, Nov 2004.

VECSEY, C. G.; HAWK, J. D.; LATTAL, K. M.; STEIN, J. M. *et al.* Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. **J Neurosci**, 27, n. 23, p. 6128-6140, Jun 6 2007.

VORHEES, C.V., WILLIAMS, M.T. Assessing spatial learning and memory in rodents. **ILAR J**. 2014;55(2):310-32.

WALLACE, D. C. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. **Annu Rev Biochem**, 76, p. 781-821, 2007.

WANG, A.; NIE, W.; LI, H.; HOU, Y. *et al.* Epigenetic upregulation of corticotrophin-releasing hormone mediates postnatal maternal separation-induced memory deficiency. **PLoS One**, 9, n. 4, p. e94394, 2014.

YANG, X.; HE, Z.; ZHANG, Q.; WU, Y. *et al.* Pre-ischemic treadmill training for prevention of ischemic brain injury via regulation of glutamate and its transporter GLT-1. **Int J Mol Sci**, 13, n. 8, p. 9447-9459, 2012.

## ANEXOS

## ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.040, de 11 de junho de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPII)



**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Fone: (55)911-0200. E-mail: ceua@unipampa.edu.br

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO  
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: 042/2018

Título: Efeitos do exercício físico realizado pela mãe durante a gestação na memória da prole submetida à privação maternal

Data da aprovação: 21/11/2018

Período de vigência do projeto: 21/11/2020

Pesquisadores(a): Pâmella Billing Mello Carpes

Campus: Uruguaiana

Telefone: (55) 99661-2454

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

**CEUA**

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	183
Peso/idade	350 g / 3-4 meses (15 machos e 24 fêmeas) 350 g / nascimento até 60-80 dias (72 machos) 50 g / nascimento até 30-50 dias (72 fêmeas)
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFSM

*Cátia A. Veiverberg*  
Prof.ª Dr.ª Cátia Aline Veiverberg  
Coordenadora Substituta CEUA/JUNIPAMPA