

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

**GUILHERME SALGADO CARRAZONI**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL  
DURANTE A GESTAÇÃO NA MODULAÇÃO DOS DÉFICITS DE MEMÓRIA  
E COMPORTAMENTO DE MÃES E DA PROLE EM UM MODELO DE  
PRIVAÇÃO MATERNAL**

**URUGUAIANA  
2025**

**GUILHERME SALGADO CARRAZONI**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL  
DURANTE A GESTAÇÃO NA MODULAÇÃO DOS DÉFICITS DE MEMÓRIA  
E COMPORTAMENTO DE MÃES E DA PROLE EM UM MODELO DE  
PRIVAÇÃO MATERNAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguiana, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Pâmela Billig Mello-Carpes

**URUGUAIANA  
2025**

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 FÍSICO E ENRIQUECIMENTO  
AMBIENTAL DURANTE A GESTAÇÃO NA MODULAÇÃO DOS DÉFICITS  
DE MEMÓRIA E COMPORTAMENTO DE MÃES E DA PROLE EM UM  
MODELO DE PRIVAÇÃO MATERNA / Guilherme Salgado  
Carrazoni.

118 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Pampa,  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2025.

"Orientação: Pâmela Billig Mello-Carpes".

1. memória. 2. período neonatal. 3. exercício  
maternal. 4. comportamento maternal. 5. estresse  
oxidativo. I. Título.

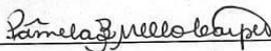
GUILHERME SALGADO CARRAZONI

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL DURANTE A  
GESTAÇÃO NA MODULAÇÃO DOS DÉFICITS DE MEMÓRIA E COMPORTAMENTO  
DE MÃES E DA PROLE EM UM MODELO DE PRIVAÇÃO MATERNAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Tese defendida e aprovada em: 24 de fevereiro de 2025.

Banca examinadora:



Prof. Dra. Pâmela Billig Mello Carpes

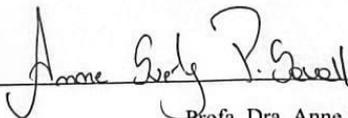
Orientadora

Unipampa



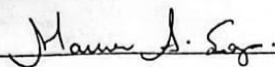
Prof. Dra. Maria Castelló

IIBCE - Montevideo, Uruguai



Prof. Dra. Anne Savall

Unipampa



Profa. Dra. Mauren Souza  
Unipampa



Assinado eletronicamente por **PAMELA BILLIG MELLO CARPES, PROFESSOR MAGISTÉRIO SUPERIOR**, em 24/02/2025, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **ANNE SUELY PINTO SAVALL, PROFESSOR MAGISTERIO SUPERIOR - SUBSTITUTO**, em 24/02/2025, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **MAUREN ASSIS DE SOUZA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 24/02/2025, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1677529** e o código CRC **98EA3146**.

Dedico este trabalho à minha  
avó Elizabeth Carvalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIPAMPA.

À Profa. Dra. Pâmela Billig Mello-Carpes pelas oportunidades e experiências proporcionadas durante esse período no GPFis. És um exemplo para cada um que passa pelo grupo.

Ao Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da UNIPAMPA e seus docentes.

À CAPES, pela bolsa de doutorado e de doutorado sanduíche concedida.

*“Se você busca a verdade, esteja ciente que ela têm muitas facetas. Uma pode estar te enganando à pensar que ela é a face da verdade para tal questão, por mais autêntica que pareça. Não se deixe cegar pelo que a verdade possa parecer, pois outros estarão contando a verdade, de maneira calma e clara, e você deve ouvir à eles também.”*

Neil DeGrasse Tyson

## RESUMO

A privação de cuidados maternos (PM) no início da vida gera déficits de memória que podem perdurar ao longo da vida; o exercício materno (EM) durante a gestação é capaz de prevenir estes déficits. Por outro lado, estudos anteriores demonstraram não ocorrer proteção, ou até mesmo prejuízo na memória de animais submetidos ao destreino (perda da capacidade aeróbica proporcionada pelo treinamento). Parar, diminuir ou manter a intensidade do exercício na gestação são escolhas comuns para futuras mães, o que pode levar ao destreino. Ainda, o enriquecimento ambiental (EA), assim como o exercício, protege animais PM de déficits de memória, o que pode indicar um possível efeito benéfico do EA durante a gestação na memória da prole, podendo ser uma alternativa para mães que não podem se exercitar na gestação. Assim, nossos principais objetivos com esta tese envolvem ampliar o conhecimento sobre os efeitos de diferentes intensidades de exercício antes e/ou durante a gestação sobre o comportamento e memória da mãe (estudo 1), da prole (estudo 2), explorando o envolvimento do balanço oxidativo, assim como os efeitos do EA gestacional sobre o comportamento e memória da prole submetida à PM (estudo 3), explorando o envolvimento do sistema endocanabinoide. Para investigar os efeitos do EM nos estudos 1 e 2, as ratas mães foram divididas em 5 grupos: Não-exercitadas (NE); Exercício pré-gestação (PRÉ); Exercício pré e gestacional com redução da intensidade (RED); Exercício pré e gestacional em igual intensidade (IGUAL), e; Exercício gestacional (GEST). Após o nascimento, a prole foi subdividida em grupo controle (CT) e PM e avaliamos o comportamento materno (tempo e frequência de saída do ninho, *licking* em relação aos filhotes, e *self-grooming*) 30min após cada sessão de PM. As ratas mães foram submetidas aos testes de memória de reconhecimento de objetos (RO) após o desmame (DPN 22), enquanto a prole (fêmeas e machos) foi submetida aos testes na fase adulta (DPN 75). A PM causa aumento de *self-grooming* nas mães. Parar ou diminuir a intensidade do exercício durante a gestação causa destreino nas mães, levando à déficit de RO após o desmame. Manter a intensidade ou começar a correr durante a gestação previne o déficit de memória causado pelo desmame. O grupo PRÉ+PM apresentou aumento da peroxidação lipídica hipocampal sem aumento da atividade da enzima catalase (CAT). A PM não causa déficits de memória na prole de fêmeas, apenas na de machos. Ainda, parar de se exercitar durante a gestação por si só leva à déficit de RO nos filhotes machos e provoca déficit nas fêmeas PRE+PM quando adultas. Para investigar os efeitos do EA durante a gestação e a participação do sistema endocanabinoide nos déficits de memória induzidos pela PM no estudo 3, utilizamos camundongas, que foram alojadas em ambiente padrão ou enriquecido durante a gestação, e a prole foi submetida ou não à PM, com a injeção de agonista de receptores canabinoide ou veículo via intraperitoneal 10 minutos antes das tarefas comportamentais e teste de memória na fase adulta (DPN 80). O EA durante a gestação protegeu a prole de machos PM de déficit de aprendizagem e memória espacial. A injeção de agonista canabinoide piora a memória de machos PM, mas melhora a aprendizagem em fêmeas controle. Concluímos que manter a intensidade (mesmo que baixa), ou iniciar a prática de atividade física durante a gestação são estratégias melhores tanto para as mães quanto para a prole, e o EA durante a gestação também é uma estratégia eficaz para proteger a prole dos danos à memória causados pela PM.

**Palavras-chave:** memória, período neonatal, exercício maternal, comportamento maternal, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

Early- life Maternal separation (MS) causes memory deficits that can persist throughout life; maternal exercise (ME) during pregnancy can prevent these deficits. On the other hand, previous studies have shown that there is no protection or even impairment in the memory of animals subjected to detraining (loss of aerobic capacity provided by training). Stopping, decreasing, starting, or maintaining exercise intensity are common choices for expectant mothers, which can lead to detraining. Additionally, environmental enrichment (EE), like exercise, protects MS animals from memory deficits, which may indicate a potential beneficial effect of EE during pregnancy on offspring memory, and may be an alternative for mothers who cannot exercise while pregnant. Thus, the main objectives of this thesis involve expanding knowledge about the effects of different exercise intensities before and/or during pregnancy on the behavior and memory of mothers (study 1) and their offspring (study 2), exploring the involvement of oxidative balance, as well as gestational EE, on the behavior and memory offspring subjected to MS (study 3), exploring potential involvement of the endocannabinoid system. To investigate the effects of ME in the studies 1 and 2, mother rats were divided into five groups: Non-exercised (NE); Pre-pregnancy exercise (PRE); Pre-pregnancy and pregnancy exercise with reduced intensity (RED); Pre-pregnancy and pregnancy exercise with maintained intensity (EQUAL); and Pregnancy-only exercise (GEST). After birth, the offspring were divided into control (CT) and MS groups, and maternal behavior (time and frequency of nest-leaving, licking of pups, and self-grooming) were assessed 30 minutes after each MS session. Mother rats were subjected to memory tests after weaning (PND 22), while offspring (both females and males) underwent testing in adulthood (PND 75). MS increases self-grooming in mothers. Stopping or reducing exercise intensity during pregnancy causes detraining in mothers, leading to object recognition (OR) deficits after weaning. Maintaining intensity or starting exercise during pregnancy prevents memory deficits caused by weaning. The PRE+MS group showed increased hippocampal lipid peroxidation without an increase in catalase (CAT) enzyme activity. MS does not cause memory deficits in female offspring, only in male. Furthermore, stopping exercise during pregnancy results in OR deficits in male offspring and causes deficits in PRE+MS females in adulthood. In the study 3, to investigate the effects of EE during pregnancy and the role of the endocannabinoid system in MS-induced memory deficits, we used mice, who were housed in standard or enriched environments during pregnancy, and the offspring were subjected or not to MS, with intraperitoneal injections of cannabinoid receptor agonists or vehicle 10 minutes before behavioral tasks and memory tests in adulthood (PND 80). The EE during pregnancy protects male MS offspring from spatial learning and memory deficits. The cannabinoid receptors agonist injection worsens male MS offspring memory; in turn, it improves learning in control females. Thus, we conclude that maintaining intensity (even if low) or starting physical activity during pregnancy are better exercise strategies for both mothers and offspring, and that the EE during pregnancy is also an effective strategy to protect offspring from MS-induced memory damage.

**Keywords:** memory, neonatal period, maternal exercise, maternal behavior, oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal pelo estresse.....	8
Figura 2 – Delineamento experimental e protocolos de exercício físico dos estudos 1 e 2.....	24
Figura 3 – Delineamento experimental e modelo de moradia complexa com exercício físico voluntário empregada durante a gestação no estudo 3.....	32
Figura 4 – Resultados dos testes de $VO_{2máx}$ das mães do estudo 1 .....	38
Figura 5 – Resultados da tarefa de reconhecimento de objetos do estudo 1...40	
Figura 6 – Resultados de comportamento maternal do estudo 1.....	43
Figura 7 – Resultados do teste de preferência maternal do estudo 1.....	45
Figura 8 – Resultados de marcadores de estresse oxidativo do estudo 1.....	47
Figura 9 – Resultados dos testes de $VO_{2máx}$ das mães do estudo 2.....	54
Figura 10 – Resultados da tarefa de reconhecimento de objetos do estudo 2.57	
Figura 11 – Marcadores de estresse oxidativo do estudo 2.....	60
Figura 12 – Resultados da caixa de atividade do estudo 3.....	66
Figura 13 – Resultados do campo aberto do estudo 3.....	68
Figura 14 – Resultado do teste do labirinto em cruz elevado do estudo 3.....	69
Figura 15 – Resultados do labirinto aquático de Morris do estudo 3.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempo de exploração durante a tarefa de reconhecimento de objetos no estudo 1.....	42
Tabela 2 – Campo aberto do estudo.....	49
Tabela 3 – Labirinto em cruz elevado do estudo 1.....	52
Tabela 4 – Tempo de exploração durante a tarefa de reconhecimento de objetos no estudo 2.....	59
Tabela 5 – Campo aberto do estudo 1.....	62
Tabela 6 - Labirinto em cruz elevado do estudo 2.....	63

## LISTA DE SIGLAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico, do inglês *Adrenocorticotropic hormone*

AMPA - receptores alfa-amino-3-hidroximetil-5-4-isoxazolpropiónico

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*

CA – campo aberto

CAT – catalase

CE – córtex entorrinal

CM – comportamento maternal

CPF – cortex pré-frontal

CREB - elemento de resposta a ligação de AMP cíclico, do inglês *cAMP response element-binding protein*

CRF – hormônio liberador da corticotropina, do inglês *corticotrophin release factor*

DPN – dia pós-natal

HP – hipocampo

HPA – hipotálamo-pituitária-adrenal

LCE – labirinto em cruz elevado

LTP – potenciação de longo prazo, do inglês *long-term potentiation*

NMDA - N-metil-D-aspartato

NPV - núcleo paraventricular

PM – privação maternal

RO – reconhecimento de objetos

SNC – sistema nervoso central

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*

TrKB – receptor de tropomiosina quinase B, do inglês *tyrosine receptor kinase B*

MDA – malonildialdeído

SOD – superóxido dismutase

GPx – glutationa peroxidase

CBr – receptores canabinóides

THC – tetraidrocanabidiol

CBD – canabidiol

GAMA – ácido gama-amino butírico, do inglês *gamma-Amino Butyric Acid*

## SUMÁRIO

<b>1. Apresentação .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão da literatura .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Memória .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Estresse neonatal, privação maternal e a prole .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Envolvimento do balanço oxidativo nos déficits de memória causados pela privação maternal .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4 Respostas sexo-dependentes ao estresse e seu papel na PM .....</b>	<b>10</b>
<b>2.5 Envolvimento do sistema endocanabinóide nos déficits de memória causados pela privação maternal.....</b>	<b>12</b>
<b>2.6 Privação maternal, comportamento maternal, e a ligação mãe-filhote.....</b>	<b>14</b>
<b>2.7 Enriquecimento ambiental, exercício maternal e destreino durante a gestação como potenciais moduladores da memória da mãe e da prole.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Justificativa e Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Objetivo geral .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>21</b>
<b>4. Materiais e Métodos .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1 Estudos 1 e 2 .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.1 Manejo dos animais e desenho experimental .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1.2 Protocolos experimentais .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1.3 Análise estatística .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Estudo 3 .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.1 Manejo dos animais e desenho experimental .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2 Protocolos experimentais .....</b>	<b>33</b>
<b>4.2.3 Análise estatística .....</b>	<b>35</b>

<b>5. Resultados .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Estudo 1 .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1.1 Parar ou diminuir a intensidade do exercício durante a gestação causa destreino após o desmame .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1.2 Parar de correr no início da gestação causa déficit de memória na última semana de gestação; manter a intensidade, ou começar a correr durante a gestação, previnem déficit de memória após o desmame .....</b>	<b>39</b>
<b>5.1.3 PM aumenta o tempo das mães no ninho e lambendo os filhotes; a prática de exercício físico antes e/ou durante a gestação previne o aumento do <i>self-grooming</i> após a PM .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.4 Mães que se exercitam durante a gestação preferem sua prole de machos à um macho desconhecido; aquelas que se exercitam somente na gestação preferem sua prole de fêmeas à uma fêmea desconhecida .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1.5 Interromper o exercício no início da gestação aumenta a peroxidação lipídica no hipocampo após o desmame; já a privação maternal eleva os níveis de catalase no hipocampo após o desmame. ....</b>	<b>47</b>
<b>5.1.6 A gestação reduz o comportamento exploratório das mães após o desmame; a prática de exercício físico em qualquer momento antes ou durante a gestação garante um comportamento exploratório semelhante ao nível pré-gestação .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.7 O exercício físico, a PM, ou a sua combinação não alteram o comportamento tipo-ansioso em fêmeas adultas, antes, durante, ou após a gestação .....</b>	<b>50</b>
<b>5.2 Estudo 2 .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2.1 Parar ou reduzir a intensidade do exercício no início da gestação causa destreino das mães após o desmame .....</b>	<b>53</b>
<b>5.2.2 A prole de machos CT e fêmeas PM de mães que param de se exercitar no início da gestação apresentam déficit de memória na</b>	

fase adulta da vida; a PM causa déficit de memória em machos que são prevenidos por exercício em qualquer intensidade durante a gestação .....	56
5.2.3 O EM, a PM e sua combinação não afetam a peroxidação lipídica ou níveis de catalase em fêmeas; ambos grupos de PRE e IGUAL apresentam maiores níveis de catalase que o grupo CT em machos.....	60
5.2.4 O EM e a PM não alteram o comportamento exploratório da prole adulta.....	61
5.2.5 O EM e a PM não alteram o comportamento tipo-ansioso da prole na idade adulta .....	63
5.3 Estudo 3 .....	65
5.3.1 Efeitos de combinações de EA durante a gestação, PM, e infusão de agonista canabinóide sobre a atividade na caixa moradia .....	65
5.3.2 Nem o EA gestacional, nem a PM, nem a infusão de agonista canabinoide, nem suas combinações, afetam o comportamento exploratório em animais jovem-adultos.....	67
5.3.3 EA gestacional, PM, infusão de agonista CBr via i.p, ou suas combinações, não alteram o estado tipo-ansioso dos animais.....	68
5.3.4 A combinação PM+WIN causa déficit de aprendizagem espacial em machos; EA gestacional é capaz de prevenir esse efeito .....	70
6. Discussão.....	73
7. Considerações finais.....	84
8. Referências bibliográficas .....	86
9. Anexo I - Certificado de aprovação no comitê de ética da UNIPAMPA 99	
10. ANEXO II – Certificado de aprovação no comitê de ética da KUL, Bélgica.....	100

## 1. Apresentação

A presente tese tem como objetivo principal investigar os efeitos do exercício maternal e do ambiente enriquecido gestacional sobre a memória e comportamento das mães e da prole privadas de contato e cuidado durante o período neonatal.

Para isso, buscamos estudar os efeitos do treino e destreino durante a gestação na memória e comportamento das mães após o desmame, e da prole privada de cuidado neonatal, avaliando machos e fêmeas, considerando possíveis diferentes respostas de acordo com o sexo na idade adulta. Ainda, também avaliamos como uma estratégia de moradia complexa/ambiente enriquecido durante a gestação, assim como a modulação do sistema endocanabinoide, afeta a memória da prole privada de cuidado neonatal durante a fase jovem-adulta.

Para apresentação dos dados da presente tese, inicialmente apresentamos uma breve Revisão de Literatura, que dará contexto aos principais temas discutidos e pertinentes ao estudo. Após, serão apresentados a Justificativa e os Materiais e Métodos utilizados para realização do mesmo. Em seguida serão apresentados os Resultados divididos em três estudos principais que compõe a presente tese, para melhor visualização e interpretação.

No estudo 1, apresentamos os efeitos do treino e destreino em corrida durante a gestação, assim como da PM, sobre o comportamento maternal durante a fase de privação de contato com a prole, além dos efeitos sobre a memória, comportamento, e ligação mãe-filhote após o desmame. Estes resultados estão incluídos no manuscrito intitulado "*Start, stop, reduce, or maintain? How training and detraining during pregnancy shapes maternal memory and mother-pup interaction after maternal separation*" submetido à revista *Physiology & Behavior*, e em fase de revisão no momento da submissão desta tese.

No estudo 2, apresentamos os efeitos do treino e destreino em corrida durante a gestação, assim como da privação de cuidados maternos, sobre a memória e comportamento da prole de machos e fêmeas já na fase adulta da vida. Estes resultados estão incluídos no manuscrito intitulado "*Maternal*

*Exercise and Detraining During Pregnancy: Sex-Specific and Differential Effects on Offspring Memory Outcomes After Maternal Separation*” submetido à revista *Neuroscience Letters*, e em fase de revisão no momento da submissão desta tese.

Por fim, no estudo 3, apresentamos os efeitos de um modelo de moradia complexa/enriquecimento ambiental, incluindo a prática de exercício voluntário e exercício cognitivo, durante a gestação, assim como a modulação de receptores canabinóides fase jovem-adulta sobre a memória da prole submetida à PM. Os resultados deste estudo estão em fase de complementação por nossa equipe parceira na KUL/Bélgica, para posterior submissão de artigo a um periódico internacional.

## 2. Revisão da literatura

### 2.1 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), sendo um dos processos - se não o, mais importante da vida do ser humano, pois faz de nós, seres humanos, o que fomos, somos, e seremos, interagindo com a realidade à todo momento para moldar as decisões que tomamos.

O processo de formação de memórias é complexo e, tradicionalmente, é composto de três fases principais: aquisição, consolidação e evocação (Izquierdo, 1989). A aquisição corresponde à fase de aprendizagem de uma nova tarefa ou informação, ou seja, o momento no qual a informação é levada ao sistema nervoso central (SNC) por estruturas sensoriais, sejam receptores visuais, de tato, auditivos, térmicos, ou outros. Lá, as informações sensoriais são integradas, interpretadas, e dão início aos processos mnemônicos.

Após a aquisição da memória, se desencadeiam processos bioquímicos que são necessários para a consolidação da memória. A consolidação é essencial para a formação da memória de longa duração, que é dependente de alguns processos. Dois dos principais processos necessários para a formação de uma memória de longa duração (por exemplo, você lembrar do que comeu no domingo passado) são a expressão gênica e a síntese de proteínas que estão envolvidas no processo de potencialização a longo prazo (LTP, do inglês *Long-Term Potentiation*) (Bliss; Gardner-Medwin, 1973), levando assim à modificação de sinapses nas regiões cerebrais nas quais a circuitaria de tal memória é criada (Mcgaugh, 2000).

Após a consolidação, pode ou não ocorrer a fase de evocação da memória, correspondente ao momento em que a informação é recordada e utilizada com um determinado objetivo (Mcgaugh, 2000). Por exemplo, você lembrar da receita da comida que fez naquele churrasco de domingo passado. Dessa forma, também podemos afirmar que uma memória pode ser consolidada, mas nunca evocada. Se não evocada, a memória pode passar por um processo de esquecimento fisiológico, criando, assim, espaço para o armazenamento de outras informações.

Por outro lado, caso a mesma seja utilizada, isto é, evocada, a cada evocação ela pode ser modificada de acordo com seu nível de importância e passar a perdurar por um grande período de tempo, passando pelo processo de reconsolidação, essencial para a persistência da memória (Izquierdo; Furini; Myskiw, 2016). Desse modo, fica óbvio que a persistência da memória depende, inicialmente, da sua consolidação, e, posteriormente, da sua evocação. 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 do recrutamento das redes neurais envolvidas na memória evocada (Dudai; Eisenberg, 2004), com possibilidade de fortalecer as informações previamente adquiridas, ou modificá-las.

Mas nem todas as memórias são persistentes, algumas duram pouco tempo. Sendo assim, podemos classificar memórias de acordo com sua duração, sendo: memória de trabalho, de curta ou de longa duração (Unsworth; Engle, 2007). A 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, e se refere ao tipo de informação que só iremos recordar enquanto necessitamos dela para concluir alguma atividade ou compreender um contexto. Por exemplo, lembrar os nove dígitos de um número de telefone, ou o endereço da casa de alguém quando estamos chegando perto. Este tipo de memória envolve primariamente a ativação do córtex pré-frontal e não depende da alteração de sinapses já estabelecidas, apenas de sua atividade (Lara; Wallis, 2015).

Já a memória de curta duração depende de processos bioquímicos simples que ocorrem entre o córtex-entorrinal (CE) e o hipocampo (HP), podendo durar até cerca de seis horas (Izquierdo; Medina, 1997). Sendo assim, essas memórias são independentes da transcrição gênica e síntese de proteínas (Izquierdo, 1994), e são importantes para garantir o acesso a informações enquanto a memória de longa duração está se formando/consolidando.

Já a memória de longa duração pode durar de horas a décadas, por envolver processos mais complexos como as citadas LTP, transcrição gênica e síntese proteica hipocampal (Redondo; Morris, 2011). Como dito, o principal processo a partir do qual se forma uma memória de longa duração é a potenciação de longa duração (do inglês, *long-term potentiation*, LTP; (Abbas;

Villers; Ris, 2015). A LTP ocorre a partir de alguns processos bioquímicos que ocorrem em sequência. Primeiro, ocorre o aumento dos níveis de cálcio intracelular, pela ativação dos receptores alfa-amino-3-hidroximetil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA) (Minichiello, 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), levando a ativação de receptores de membrana e à mudanças em proteínas que mediam a interação entre células, e, conseqüentemente, formação de memórias (Dunning; During, 2003; Izquierdo; Medina, 1997).

Tais eventos levam à transcrição de mRNAs pré-existentes que geram aumento da expressão de genes relacionados à plasticidade sináptica (Katche; Cammarota; Medina, 2013), que desencadeiam mudanças estruturais e maturação de novas sinapses na circuitaria onde a nova memória poderá ser armazenada, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, *brain-derived neurothrophic factor*; BDNF; (Ardenghi; Barros; Izquierdo; Bevilaqua *et al.*, 1997; Caroni; Chowdhury; Lahr, 2014). O BDNF é uma neurotrofina que tem como receptor ligado a processos de memória o TrKB (Nagappan; Zaitsev; Senatorov; Yang *et al.*, 2009) e sua ligação com este receptor é capaz de induzir LTP e promover a consolidação de memórias de longa duração (Kang; Schuman, 1995).

Por fim, as memórias podem ser classificadas de acordo com seu conteúdo, podendo ser declarativas (semânticas ou autobiográficas) ou procedimentais. Em nosso estudo, focaremos na memória declarativa, que é o tipo de memória que podem ser descritas como sendo memórias de eventos ou fatos que ocorreram, como a memória de reconhecimento. Tal tipo de memória é de extrema importância para a sobrevivência, uma vez que permite a comparação de fatos e eventos com características já conhecidas de outro momento no tempo (Medina; Bekinschtein; Cammarota; Izquierdo, 2008). É este tipo de memória que nos permite reconhecer pessoas e objetos, e atribuir-lhes significado, compreender quem são, de onde conhecemos, e, no caso de objetos, para que servem. No teste da tarefa de reconhecimento de objetos que empregamos durante a presente tese, por exemplo, o animal precisa reconhecer objetos com os quais já teve contato prévio, diferenciando-os daqueles que são novos.

Outra forma de testar a memória declarativa, é utilizando testes de memória espacial, como o Morris Water Maze (MWM; (Morris, 1981)). O MWM é um dos testes padrão ouro para avaliação da memória, sendo utilizado por quase 50 anos, com resultados consistentes ao longo do tempo. Ainda, a memória espacial é dependente do hipocampo (Fritch; Macevoy; Thakral; Jeye *et al.*, 2020), o que a torna especialmente interessante e relevante, visto que grande parte das doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, além da neurodegeneração natural advinda da idade, afetam diretamente o hipocampo, e a dificuldade em evocar memórias espaciais antes consolidadas é um dos principais sintomas aparentes da doença (Jaroudi; Garami; Garrido; Hornberger *et al.*, 2017). No caso do teste empregado no estudo 3 da presente tese, os animais precisam lembrar, com base em dicas espaciais, onde estava localizada uma plataforma submersa sob a água, demonstrando também a importância da memória espacial para a sobrevivência.

## **2.2 Estresse neonatal, privação maternal e a prole**

O estresse é uma resposta fisiológica importante frente à estímulos específicos, necessário para sobrevivência tanto humana quanto animal. Um quadro de estresse fisiológico se desenvolve sempre que algo desagradável, desafiante, ou ameaçador ocorre, podendo ser induzido por estímulos físicos, ambientais, fisiológicos ou psicossociais.

O protocolo de privação maternal (PM) é utilizado há muito tempo como paradigma de estresse neonatal para simular situações em que a prole precisa passar algum tempo sem cuidados. 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) (Agorastos; Pervanidou; Chrousos; Baker, 2019), entre outras, como em períodos que o cuidador ou a própria prole necessita de cuidado em UTIs neonatais e circunstâncias pós-parto semelhantes. Esses cenários frequentemente resultam em períodos prolongados de separação diária entre crianças e seus cuidadores, o que pode impactar o cuidado neonatal e ter efeitos duradouros na prole. Em modelos animais, a PM é tipicamente reproduzida removendo a mãe da gaiola, separando-a dos filhotes.

Um dos principais efeitos da PM é a promoção de alterações na circuitaria do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), alterando a regulação da resposta ao estresse. 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). Tal cenário de estresse promove um aumento na liberação do fator liberador de corticotrofina (do inglês *corticotrophin release factor*, CRF), envolvido nas respostas ao estresse em mamíferos, induzindo respostas tanto do sistema nervoso autônomo quanto do sistema endócrino em conjunto (Sanchez, 2006).

O núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo é o local com maior concentração de fator liberador de CRF no encéfalo (Antoni; Palkovits; Makara; Linton *et al.*, 1983). Após sua ativação em resposta ao estresse pela comunicação com neurônios localizados no núcleo central da amígdala, os neurônios do NPV se projetam ao centro de norepinefrina no *locus coeruleus* (LC), levando à liberação de adrenalina pela medula da glândula adrenal (Syed; Nemeroff, 2017). Por sua vez, os neurônios liberadores de corticotrofina do NPV estimulam a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), ativando o eixo HPA. Então, o ACTH estimula a liberação de glicocorticóides do córtex da adrenal, que agem promovendo a diminuição da ativação do eixo HPA pela estimulação dos receptores de glicocorticóides no encéfalo (Gutman; Nemeroff, 2002) (Figura 1).



à um quadro patológico, como déficits de memória dado ao grande número de receptores esteróides encontrados em algumas regiões cerebrais importantes para a memória, como o hipocampo (Castelló, 2020; Russo; Murrough; Han; Charney *et al.*, 2012). Ainda, o aumento dos níveis de corticosterona induzidos pelo estresse se mostrou capaz de induzir a redução do número de dendritos no hipocampo (Mcewen, 2016), o que pode impactar tanto a memória de reconhecimento, quanto a memória espacial.

### **2.3 Envolvimento do balanço oxidativo nos déficits de memória causados pela privação maternal**

Estresse oxidativo é o termo utilizado para conceituar o desequilíbrio entre a produção de agentes pró-oxidantes e antioxidantes causados por distúrbios celulares (Allen; Bayraktutan, 2009). Entre as reações causadas por tal desbalanço estão a peroxidação lipídica e a diminuição dos níveis de agentes antioxidantes como a catalase (CAT). Tais reações estão envolvidas em diversas doenças neurodegenerativas, assim como nos efeitos da PM, tanto em machos quanto em fêmeas (Malcon; Wearick-Silva; Zaparte; Orso *et al.*, 2020; Soares; Gildawie; Honeycutt; Brenhouse, 2020).

A lipoperoxidação acontece a partir do ataque aos lipídeos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs) que possuem energia para formar radicais orgânicos que reagem com oxigênio e resultam em um radical peroxil. Apesar de ser um processo fisiológico que ocorre naturalmente, quando descompensado, o efeito desses radicais leva à danos estruturais às membranas celulares e à perda de função das células (Reed, 2011). Em sistemas biológicos, um dos produtos finais da peroxidação lipídica é o malonildialdeído (MDA), usado como via principal da mensuração de peroxidação lipídica na técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; (Janero, 1990).

O cérebro é especialmente suscetível à mudanças no balanço oxidativo, uma vez que possui grande concentração de ácidos graxos, com baixa capacidade de reparo celular neuronal. Isso se dá devido ao fato da cadeia respiratória mitocondrial ser a principal fonte de superóxido intracelular (Santos; Borges; Cerejo; Sarmiento *et al.*, 2005). Ainda no cérebro, encontramos a

presença de três principais agentes antioxidantes que são capazes de combater a formação de radicais superóxidos, sendo eles a CAT, a superóxido dismutase (SOD), e a glutatona peroxidase (GPx)(Schad; Fahimi; Volkl; Baumgart, 2003), sendo que a CAT encontrada em todos os tipos celulares cerebrais.

O desequilíbrio oxidativo verificado no cérebro dos animais submetidos à PM, como o aumento da peroxidação lipídica hipocampal, indica a morte de células na região (Neves; Menezes; Souza; Mello-Carpes, 2015), o que leva ao prejuízo em diferentes tipos de memória na prole, incluindo reconhecimento de objetos, memória espacial e até memória de medo (Carrazoni; Das Neves; Dos Santos Soares; Lima *et al.*, 2023; Czarnabay; Dalmago; Martins; Queiroz *et al.*, 2019; Menezes; Souto Das Neves; Goncalves; Benetti *et al.*, 2020). Essas condições geram mudanças persistentes, tanto em ratos adultos quanto jovens, tanto em fêmeas quanto em machos (Lajud; Torner, 2015; Maghami; Zardoos; Khodagholi; Binayi *et al.*, 2018; Neves; Menezes; Souza; Mello-Carpes, 2015; Suri; Bhattacharya; Vaidya, 2014).

Na presente tese, procuramos entender como o exercício e destreino maternal durante a gestação, assim como a PM, afetam o equilíbrio oxidativo cerebral da prole na fase adulta da vida, e se o mesmo está envolvido nos déficits de memória observados na prole privada de contato neonatal.

#### **2.4 Respostas sexo-dependentes ao estresse e seu papel na PM**

Apesar de a maioria dos estudos com modelos animais utilizar apenas ratos machos, além das diferenças hormonais e estruturais, machos e fêmeas apresentam respostas diferentes ao estresse. Por exemplo, enquanto machos demonstram persistente déficit em memórias dependentes do hipocampo (como memória de reconhecimento e espacial) após um protocolo de estresse crônico, as mesmas respostas não são observadas em fêmeas na vida adulta (Luine; Villegas; Martinez; Mcewen, 1994).

Por sua vez, as fêmeas apresentam resultados melhores em testes de memória episódica e, apesar de efeitos negativos observados no início da vida em machos e fêmeas, as fêmeas apresentam menor suscetibilidade aos efeitos neurodegenerativos causados pelo estresse neonatal após a puberdade (Bath; Nitenson; Lichtman; Lopez *et al.*, 2017; Lundervold; Wollschlager; Wehling,

2014). Uma hipótese do que ocorre nesses casos, levantada recentemente, é de que enquanto ocorrem mudanças morfológicas e funcionais em neurônios gabaérgicos e glutamatérgicos nas regiões CA3-CA1 do hipocampo em machos após a exposição à privação materna, tais processos não ocorrem em fêmeas (Talani; Biggio; Gorule; Licheri *et al.*, 2023). Outra hipótese, já conhecida há algum tempo, é de que apesar de fêmeas demonstrarem uma resposta neuroendócrina aumentada em relação à machos após a exposição a um evento estressor, com aumento de ACTH e corticosterona (Handa; Burgess; Kerr; O'keefe, 1994; Handa; Weiser, 2014), o pico de circulação de tais hormônios demora mais para ser atingido em fêmeas do que machos, o que sugere uma regulação diferente do eixo HPA (Handa; Weiser, 2014).

Além disso, diferentes resultados de memória e comportamento são observados em filhotes machos e fêmeas da mesma idade, devido a diferenças fisiológicas, na estrutura cerebral, nas respostas comportamentais a fatores ambientais e à experiência prévia de PM (Lee; Koe; Ashokan; Mitra, 2020; Tractenberg; Levandowski; De Azeredo; Orso *et al.*, 2016). Por exemplo, fêmeas apresentam uma habilidade maior de lidar com o estresse neuronal induzido pela resposta ao influxo de cálcio em neurônios hipocámpais do que machos, apresentando proteínas de ligação ao cálcio em concentração 4-5 vezes maiores que em machos. Dessa forma, enquanto o estresse gera influxo de cálcio neurotóxico em machos, o mesmo efeito não ocorre em fêmeas (Xu; Hu; Zhang; Gao *et al.*, 2011).

Tais diferenças hormonais, morfológicas e funcionais ajudam a explicar o porque de fêmeas parecerem ser menos afetadas pelo estresse neonatal do que machos, observado pelo menor número de alterações cognitivas após a PM. Na presente tese, tentaremos entender como o balanço oxidativo é influenciado pela PM em ambos sexos da prole, de forma a somar com os dados já publicados anteriormente na literatura.

## **2.5 Envolvimento do sistema endocanabinóide nos déficits de memória causados pela privação maternal**

O sistema endocanabinóide é um dos principais sistemas de neurotransmissores do corpo, com especial envolvimento no desenvolvimento e respostas do SNC (Bouter; Ott; Gunther; Weig *et al.*, 2023; Lu; Mackie, 2021). O sistema endocanabinóide pode ser modulado tanto por moléculas endógenas como os endocanabinóides e seus receptores (CB<sub>1</sub>), quanto por moléculas exógenas como o tetraidrocanabidiol (THC), e o canabidiol (CBD), popularmente conhecidas por ser encontradas na cannabis. Entre os principais CB<sub>1</sub>, podemos citar os receptores CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (Lu; Mackie, 2021).

No SNC, podemos encontrar em maior número os receptores CB<sub>1</sub>, sendo que os mesmos são acoplados à proteína G inibitória em neurônios GABA (do inglês, *Gamma-Amino Butyric Acid*). Quando ativados, os receptores CB<sub>1</sub> inibem o influxo de cálcio, causando diminuição da transmissão sináptica, o que pode levar a diversos efeitos observados em diferentes processos, como respostas à dor, emoções e até mesmo à memória (Drumond; Madeira; Fonseca, 2017; Lu; Mackie, 2021).

Por outro lado, os receptores CB<sub>1</sub> também podem ser encontrados em neurônios glutamatérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos, entre outros (Mackie, 2005), fazendo com a interação de resposta frente à ativação do sistema endocanabinóide seja extremamente complexa. Por sua vez, os receptores CB<sub>2</sub> são encontrados principalmente na microglia, tendo como seu papel principal o envolvimento na resposta inflamatória (Mackie, 2005).

Como esperado, o sistema endocanabinóide também desempenha um papel importante no processo de formação de memórias. A partir do bloqueio de receptores CB<sub>1</sub>, ocorre a facilitação da transmissão sináptica, que por sua vez facilita a evocação de memórias de reconhecimento (Terranova; Storme; Lafon; Perio *et al.*, 1996). Por outro lado, a modulação do sistema endocanabinóide por meio de agonistas de CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> leva à diminuição da atividade hipocampal, o que acaba por gerar déficits de memória e alterações comportamentais em animais adultos (Bouter; Ott; Gunther; Weig *et al.*, 2023).

O agonista de CBr mais estudado é o WIN 55-212 (Lu; Mackie, 2021; Mackie, 2005). O WIN 55 apresenta efeitos diferentes dependendo da dose e região cerebral no qual é empregado e seus efeitos mensurados. Por exemplo, enquanto doses baixas como 0,05mg/kg, 0,2mg/kg e 1mg/kg levam a efeitos como aumento do estado tipo-ansioso, e até a diminuição de atividade serotoninérgica e hiperatividade noradrenérgica (Bambico; Nguyen; Katz; Gobbi, 2010), doses de 0,5mg/kg parecem até oferecer neuroproteção em certos casos contra neurotoxicidade (Tomas-Roig; Agbemenyah; Celarain; Quintana *et al.*, 2020), além de tais efeitos serem dependentes da janela de tempo em qual ocorre a exposição à droga (Bambico; Nguyen; Katz; Gobbi, 2010; Suarez; Llorente; Romero-Zerbo; Mateos *et al.*, 2009).

Sabendo que a modulação do sistema endocanabinóide afeta também o eixo HPA (Morena; Patel; Bains; Hill, 2016), além de participar dos processos de neurogênese e sinaptogênese (Mulder; Aguado; Keimpema; Barabas *et al.*, 2008), é de se esperar que interações entre eventos de estresse como a PM e memória sejam modulados pelos receptores CB1 e CB2.

Levando em consideração que a cannabis é uma das substâncias lícitas/ilícitas (dependendo da região) mais utilizadas mundialmente, e cada vez mais tem sido utilizada em tratamentos de disfunções, incluindo as psiquiátricas, é importante determinar quais mecanismos são ativados pelo seu uso, e como isso impacta a vida de usuários/pacientes. Embora saibamos que situações adversas durante a infância são preditores de abuso de substâncias na vida adulta, poucos estudos avaliam os efeitos na memória da combinação da PM com a modulação do sistema endocanabinóide em ambos os sexos (Papilloud; Guillot De Suduiraut; Zanoletti; Grosse *et al.*, 2018; Zamberletti; Prini; Speziali; Gabaglio *et al.*, 2012).

Na presente tese, avaliamos como a interação da PM e modulação do sistema endocanabinóide por meio do agonista WIN 55-2,1,2 afeta a memória e comportamento dos animais privados de cuidado neonatal durante a fase adulta da vida.

## **2.6 Privação maternal, comportamento maternal, e a ligação mãe-filhote**

Os primeiros dias de vidas dos mamíferos são de extrema importância para o desenvolvimento cerebral, e o estresse causado por fatores ambientais pode influenciar este processo. Em ratos, os primeiros 14 dias de vida são de extrema importância, dada a dependência da mãe e as respostas da prole ao comportamento maternal (Alves; Portugal; Summavielle; Barbosa *et al.*, 2020).

No início da vida, o reconhecimento da mãe se dá pelo aprendizado olfatório do odor dela. O odor da mãe media as respostas de aproximação dos filhotes e o comportamento social da prole dentro do ninho. Além de conforto, o odor sinaliza para a prole que ela está protegida, e dá garantia de calor e cuidado (Mogi; Nagasawa; Kikusui, 2011). Nesse período, comportamentos de cuidado maternal como o *licking* (ato de lambe a região ano-genital da prole), e a alimentação da prole (por meio da amamentação), desempenham um papel fundamental na regulação do eixo HPA dos filhotes, inibindo o aumento dos níveis de glicocorticóides causado por situações de estresse (Champagne; De Kloet; Joels, 2009), o que leva à uma normalização do desenvolvimento neuronal e de circuitariais cerebrais durante essa fase da vida. Reforçar esses comportamentos é importante para que a prole aprenda e busque o contato com a mãe para buscar por alimentação, sendo necessário para o desenvolvimento cognitivo da prole (Sreng; Temime-Roussel; Wortham; Mourre, 2016; Tong; Peace; Cleland, 2014).

Por outro lado, devemos também lembrar que a relação mãe-filhote é recíproca no início da vida da prole, e deve envolver a participação de ambos. Por exemplo, em situações como a PM, quando os filhotes são separados de suas mães, os mesmos tentam sinalizar para a mesma que os recolha através de estímulos olfativos e sonoros, como defecação e vocalizações (Alves; Portugal; Summavielle; Barbosa *et al.*, 2020). Tal sinalização, uma vez que a mãe está de volta na caixa moradia, leva ao recolhimento dos filhotes ao ninho, e ao início do cuidado maternal, por meio do *licking*, amamentação e cobrimento dos mesmos com o corpo (Alves; Portugal; Summavielle; Barbosa *et al.*, 2020; Wilkins; Logan; Kehoe, 1997).

Ainda, é importante observar que existem diferenças de comportamento maternal de acordo com o sexo da prole. Por exemplo, mães parecem ter preferência por cuidar mais da prole de machos por meio do *licking* do que fêmeas (Moore; Chadwick-Dias, 1986). Tal fato pode ser explicado pela resposta mais rápida dos filhotes machos à estimulação das mães, além de um possível odor mais forte dos machos. Além disso, com o passar do tempo, animais que são mais lambidos pelas mães apresentam maior aumento do hormônio ocitocina do que os que são negligenciados, o que também pode interferir na ligação mãe-filhote (Henriques; Szawka; Diehl; De Souza *et al.*, 2014). Tal modulação de resposta pode ser observada pela alteração da sociabilidade da prole com a própria mãe, modificando o vínculo mãe-filhote, o que prejudica ambos (Manassis; Bradley; Goldberg; Hood *et al.*, 1994).

Sendo o comportamento maternal um ato recíproco entre mãe-filhote, além dos déficits causados na prole, é de se esperar que as ratas mães também demonstrem alterações comportamentais causadas pela PM. Por exemplo, Czernabay *et al.* (Czarnabay; Dalmago; Martins; Queiroz *et al.*, 2019) mostraram que a PM é capaz de causar aumento de comportamento maternal, como o *licking* (ato de lambar a prole na região anogenital), indicando um aumento de comportamento relacionado a reforçar à prole o odor do ninho durante o período de privação de cuidados.

Ainda, a PM é capaz de causar alterações do estado de ansiedade e na memória das mães. Estudos demonstraram que o estado tipo-ansioso das mães é reduzido após períodos de PM, mesmo quando acompanhados do aumento de comportamento maternal (Mogi; Nagasawa; Kikusui, 2011; Stamatakis; Kalpachidou; Raftogianni; Zografou *et al.*, 2015), sendo que o aumento do comportamento maternal está ligado ao aumento de receptores serotoninérgicos, enquanto a diminuição do estado tipo-ansioso ligado à normalização do mesmo. Por outro lado, diversos estudos demonstraram que o estado tipo-depressivo é aumentado em mães após a PM (Boccia; Razzoli; Vadlamudi; Trumbull *et al.*, 2007; Maniam; Morris, 2010), sugerindo uma dualidade entre ansiedade e estado tipo-depressivo após a PM.

No entanto, apesar da memória da prole que passa por PM ser exaustivamente estudada, os efeitos da PM na memória das mães ainda é pouco

explorada. Dos poucos estudos que avaliam a memória das mães após a PM, dois utilizaram a tarefa de esQUIVA inibitória e observaram déficit de memória nas mães que passaram pela PM (Aguggia; Suarez; Rivarola, 2013; Sung; Shin; Cho; Baik *et al.*, 2010), sendo acompanhado de aumento de c-Fos na amígdala, e diminuição da proliferação celular no hipocampo. Dos outros dois únicos estudos que avaliaram a memória de mães após a PM, um observou que a memória espacial das mães estava prejudicada um mês após o desmame (Joushi; Sheibani; Esmailpour; Francis-Oliveira *et al.*, 2021), e o outro que tal efeito é revertido numa segunda gestação (Aguggia; Suarez; Rivarola, 2019), demonstrando que o desmame é um período que talvez module o estresse de mães que passaram pela PM, assim como uma adaptação das mães ao efeito da PM numa segunda gestação.

Dado os efeitos da PM no comportamento, relação mãe-filhote, e no pouco estudado tema de memória maternal após PM, nesta tese também iremos buscar esclarecer e elucidar diferentes efeitos da PM no comportamento maternal, ligação mãe-filhote e memória maternal após a PM.

## **2.7 Enriquecimento ambiental, exercício maternal e destreino durante a gestação como potenciais moduladores da memória da mãe e da prole**

Assim como as experiências e o ambiente no período neonatal podem impactar a memória e comportamento da prole ao longo da vida, o ambiente durante o período gestacional e o comportamento maternal durante a gestação podem impactar a cognição da prole e das mães.

O exercício físico é uma estratégia não-farmacológica de baixo custo capaz de promover neuroplasticidade, sendo eficaz tanto na prevenção como 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). A prática de exercício tem se tornado cada vez mais popular entre as mulheres, especialmente durante a gestação, embora a abordagem ideal para a transição entre exercícios antes e

durante a gestação permaneça incerta para muitas (Ekelin; Langeland Iversen; Gronbaek Backhausen; Hegaard, 2018).

Estudos com homens e animais machos demonstram que o tipo e a intensidade do exercício podem influenciar vários parâmetros, incluindo capacidade aeróbica, comportamento e memória, com diferentes efeitos na prevenção de déficits de memória (Lima; Schmidt; Dare; Soares *et al.*, 2022; Lin; Chen; Huang; Chang *et al.*, 2012). A citar, a prole de machos de ratas exercitadas com exercício resistido durante a gestação apresenta melhor desempenho em tarefas de memória do que a prole de ratas não exercitadas, efeito resultante do aumento dos níveis de BDNF (Meireles; Segabinazi; Spindler; Gasperini *et al.*, 2021).

Já é consolidado na literatura que o exercício físico é capaz de aumentar a sobrevivência neuronal e reduzir o estresse oxidativo (Thirupathi; Wang; Lin; Fekete *et al.*, 2021), além do número de neurônios em diversas regiões do cérebro envolvidas na cognição, comportamento e consolidação de memórias, incluindo o hipocampo (Luo; Xiao; Wang; Jiang *et al.*, 2019; Schaefer, 2015; Van Praag; Kempermann; Gage, 1999; Yau; Lau; Zhang; Lee *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo, sabe-se que os efeitos do exercício maternal (EM) na prole dependem do tipo de exercício (Meireles; Segabinazi; Spindler; Gasperini *et al.*, 2021; Yau; Lee; Formolo; Lee *et al.*, 2019), e que interromper abruptamente o exercício pode levar ao destreino (ou seja, a perda de adaptações fisiológicas adquiridas pelo exercício), resultando em uma diminuição de proteínas relacionadas à formação da memória (Radak; Toldy; Szabo; Siamilis *et al.*, 2006).

Estudos recentes sugerem que, em treinamentos com intensidade controlada, reduzir a intensidade do exercício durante a gestação tem efeitos opostos aos de iniciar exercícios na gestação, levando a déficits de memória em filhotes fêmeas logo após o desmame (Carrazoni; Das Neves; Dos Santos Soares; Lima *et al.*, 2023). Esses déficits estão associados a um desequilíbrio oxidativo no hipocampo, incluindo aumento de danos à membrana celular causados por estratégias inadequadas de exercício durante a gestação, que não conseguem contrabalançar os déficits de memória induzidos pela PM na prole (Carrazoni; Das Neves; Dos Santos Soares; Lima *et al.*, 2023).

Além de ser necessário para a persistência de memórias, o BDNF, uma das principais proteínas relacionadas à plasticidade cerebral, atua no processo de separação de padrão nos neurônios durante sua maturação na fase de proliferação neuronal, consegue atravessar a barreira placentária e a barreira hematoencefálica, além de existir correlação entre seus níveis séricos e centrais (Bekinschtein; Kent; Oomen; Clemenson *et al.*, 2013; Klein; Williamson; Santini; Clemmensen *et al.*, 2011; Kodomari; Wada; Nakamura; Wada, 2009; Pan; Banks; Fasold; Bluth *et al.*, 1998). Assim como ocorre aumento dessa neurotrofina em resposta ao exercício, observa-se que ocorre a sua diminuição abaixo dos níveis de grupos sedentários ou após a interrupção súbita da prática de exercício por tempo igual ao do treinamento (Radak; Toldy; Szabo; Siamilis *et al.*, 2006).

Então, sabendo que mães transferem BDNF para seus filhotes através da placenta durante a gestação (Kodomari; Wada; Nakamura; Wada, 2009) e que os efeitos de diferentes intensidades de exercício variam nos resultados da placenta para fêmeas e machos (Ruebel; Borengasser; Zhong; Kang *et al.*, 2023), surge a questão: "Se mulheres param de se exercitar durante a gestação, isso pode ser prejudicial à memória dos filhotes mais tarde na vida?"

Esses fatores fundamentam a hipótese de que o aumento dos níveis de BDNF e de outros marcadores induzidos pelo EM, como seus efeitos sobre o equilíbrio oxidativo, podem agir de forma a proteger e até melhorar a memória das mães e da prole. Ainda, também vai ao encontro de outra hipótese que levantamos, a de que a diminuição significativa da intensidade do exercício no interstício do período pré-gestacional para o gestacional pode ser prejudicial e até causar déficits cognitivos nas duas gerações, pergunta que se pretende responder com a presente tese.

Adicionalmente, embora protocolos planejados de treinamento físico tenham efeitos reconhecidos na cognição, a prática voluntária de exercício físico, associado a um ambiente enriquecido, pode ser uma alternativa interessante, especialmente para promover a prática de atividade física no período gestacional. Estudos recentes demonstraram que a prole de machos e fêmeas de mães que se exercitam de forma voluntária durante a gestação apresentam comportamento tipo-depressivo diminuído, enquanto somente a prole de machos

apresenta melhora de memória, com dimorfismo sexual envolvendo o a maturação e proliferação neuronal hipocampal (Yau; Lee; Formolo; Lee *et al.*, 2019). Tais resultados mostram que, apesar dos dois sexos apresentarem melhoras com o EM, a prole de machos é mais suscetível aos efeitos do EM do que a prole de fêmeas.

Por outro lado, o enriquecimento ambiental (EA) - apesar de ser estudado diretamente em diversas tarefas cognitivas, como a memória espacial e de reconhecimento de objetos (Diniz; De Oliveira; De Lima; Foro *et al.*, 2016; Diniz; Foro; Rego; Gloria *et al.*, 2010; Francis; Diorio; Plotsky; Meaney, 2002; Prado Lima; Schimidt; Garcia; Dare *et al.*, 2018), é pouco explorado como estratégia de proteção ou melhora cognitiva da prole. Dos poucos estudos que trazem os efeitos do EA durante a gestação, podemos observar melhoras no metabolismo celular (Duran-Carabali; Odorcyk; Grun; Schmitz *et al.*, 2024), assim como efeito de proteção contra respostas inflamatórias no cérebro da prole (Schander; Marvaldi; Correa; Wolfson *et al.*, 2021).

Ainda, já foi demonstrado que o EA é capaz de modular a memória espacial de animais a partir de receptores CB1 (Rico-Barrio; Penasco; Lekunberri; Serrano *et al.*, 2021). Um estudo recente que investigou os efeitos do EA e de um protocolo de estresse crônico nos níveis de receptores CB1 hipocampais de ratos Wistar verificou que houve redução dos níveis de CBr1 na região CA1 do hipocampo de machos e fêmeas submetidos aos estresse, enquanto à exposição dos mesmos ao ambiente enriquecido foi capaz de mitigar tal efeito (Dandi; Kesidou; Simeonidou; Spandou *et al.*, 2024).

Tais resultados demonstram que, assim como o exercício físico controlado e voluntário durante a gestação modulam a memória e as respostas ao estresse da prole, o ambiente enriquecido pode apresentar efeitos semelhantes. Desta forma, nesta tese buscaremos elucidar os efeitos do EM na proteção dos déficits de memória relacionados à PM na prole, e o papel do sistema endocanabinóide nestes efeitos.

### **3. Justificativa e Objetivos**

Devido à dificuldade de acompanhamento de estudos com humanos nesta área, o modelo de PM em roedores tem sido utilizado para estudar os efeitos do estresse nos primeiros dias de vida, bem como os mecanismos neurais envolvidos em eventos que se assemelham aos maus tratos durante a infância, institucionalização em orfanatos, ou outros eventos onde a prole seja submetida à períodos sem a possibilidade de contato com algum cuidador (Marco, 2017).

Ainda, é importante ressaltar que sujeitas de pesquisa fêmeas/mulheres ainda não são utilizadas em mesmo número que machos/homens em experimentos, desconsiderando a possibilidade de diferentes respostas de acordo com o sexo, levando em consideração as variáveis fisiológicas. Dessa forma, são poucos os trabalhos que estudam o exercício físico na transição do período pré-gestacional para o período gestacional, assim como as respostas induzidas por diferentes intensidades de exercício durante esse período tão sensível. Também, levando em consideração que nem todas as mães possuem capacidade de realizar exercício físico durante a gestação, é importante avaliar os efeitos do ambiente enriquecido como opção de estratégia durante a gestação como potencial modulador da memória da prole privada de cuidado neonatal.

Não obstante, diferentes respostas dos sexos em testes de memória são demonstradas na literatura, e pouco se sabe das diferenças de resposta do EM e do ambiente enriquecido durante a gestação sobre a cognição de machos e fêmeas da prole.

#### **3.1 Objetivo geral**

À luz dessas considerações, que são altamente relevantes tanto para pesquisas translacionais quanto para aplicações práticas, nosso objetivo principal nesta tese é investigar os efeitos de diferentes estratégias de exercício antes e/ou durante a gestação, assim como o ambiente enriquecido durante a gestação, sobre a memória de mães e filhotes machos e fêmeas adultos expostos à PM, além do comportamento e preferência maternal pela prole.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar se diferentes estratégias de exercício antes e/ou durante a gestação modulam de forma diferente a memória e o comportamento maternal;
- Avaliar se o exercício maternal, assim como a falta de contato neonatal com a prole, alteram aproximação mãe-filhote após o desmame;
- Avaliar se o destreino durante a gestação causa déficit de memória na prole privada de cuidado neonatal;
- Avaliar se o exercício maternal realizado antes e/ou durante a gestação é capaz de proteger a prole dos efeitos deletérios na memória causados pela PM;
- Avaliar se os possíveis efeitos observados são semelhantes ou diferem entre a prole de machos e de fêmeas;
- Avaliar como a PM e diferentes estratégias de exercício antes e/ou durante a gestação modulam o equilíbrio oxidativo hipocampal;
- Avaliar se o enriquecimento ambiental durante a gestação modula a memória e comportamento da prole submetida à PM;
- Avaliar os efeitos da administração de um agonista de receptores canabinóides, e sua combinação com o EA durante a gestação e a PM, sobre a memória da prole.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1 Estudos 1 e 2**

#### **4.1.1 Manejo dos animais e desenho experimental**

Os estudos 1 e 2 foram realizados integralmente na Universidade Federal do Pampa. Para tal, inicialmente, 120 ratas Wistar fêmeas e 40 machos foram adquiridos de um biotério registrado. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (1996) e foram aprovados pelo Comitê de Cuidado e Uso de Animais da Universidade (protocolo 020/2021; Anexo 1). Os animais foram alojados sob condições padrão (ciclo claro/escuro de 12 h,  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $50 \pm 10\%$  de umidade), com acesso livre à alimentação e água.

Após uma semana de adaptação ao ambiente do laboratório, as ratas adultas fêmeas passaram por uma adaptação à esteira por 4 dias. No quinto dia, foi realizado um teste indireto de consumo máximo de oxigênio ( $\text{VO}_{2\text{máx}}$ ; conforme descrito abaixo). Em seguida, as ratas mães foram aleatoriamente distribuídas nos grupos experimentais abaixo ( $n = 12/\text{grupo}$ ), com base nas intervenções com as mães e seus filhotes.

- i. Não exercitadas (NE + CT): mães não submetidas a qualquer protocolo de exercício de corrida e filhotes não submetidos à privação maternal (PM; conforme descrito abaixo);
- ii. Privação maternal (NE + PM): mães não submetidas a exercício de corrida e filhotes submetidos à privação maternal (PM);
- iii. PRE + CT: mães submetidas a exercício de corrida por 4 semanas antes da gestação, sem realizar exercício durante a gestação, e os filhotes não submetidos à privação maternal;
- iv. PRE + PM: mães submetidas a exercício de corrida por 4 semanas antes da gestação, sem realizar exercício durante a gestação, e os filhotes submetidos à privação maternal;
- v. RED + CT: mães submetidas a exercício de corrida por 4 semanas antes da gestação e 3 semanas durante a gestação com intensidade reduzida, e os filhotes não submetidos à privação maternal;

- vi. RED + PM: mães submetidas a exercício de corrida por 4 semanas antes da gestação e 3 semanas durante a gestação com intensidade reduzida, e os filhotes submetidos à privação maternal;
- vii. IGUAL + CT: mães submetidas a exercício de corrida por 4 semanas antes e 3 semanas durante a gestação (na mesma intensidade), e os filhotes não submetidos à privação maternal;
- viii. IGUAL + PM: mães submetidas a exercício de corrida por 4 semanas antes e 3 semanas durante a gestação (na mesma intensidade), e os filhotes submetidos à privação maternal;
- ix. GEST + CT: mães submetidas a exercício de corrida apenas durante as 3 semanas de gestação, e os filhotes não submetidos à privação maternal;
- x. GEST + PM: mães submetidas a exercício de corrida apenas durante as 3 semanas de gestação, e os filhotes submetidos à privação maternal.

Para acasalamento, os animais foram colocados em caixas com 1 macho e 2 fêmeas, durante 72h. Ao início e fim dos ciclos claros foram realizados testes para confirmação da gestação por visualização de plug copulatório (Paronis; Samara; Polyzos; Spyropoulos *et al.*, 2015). Após o acasalamento as ratas voltaram às caixas, com as mesmas ratas que anteriormente, e, após o final do teste de memória na última semana gestacional foram alojadas individualmente.

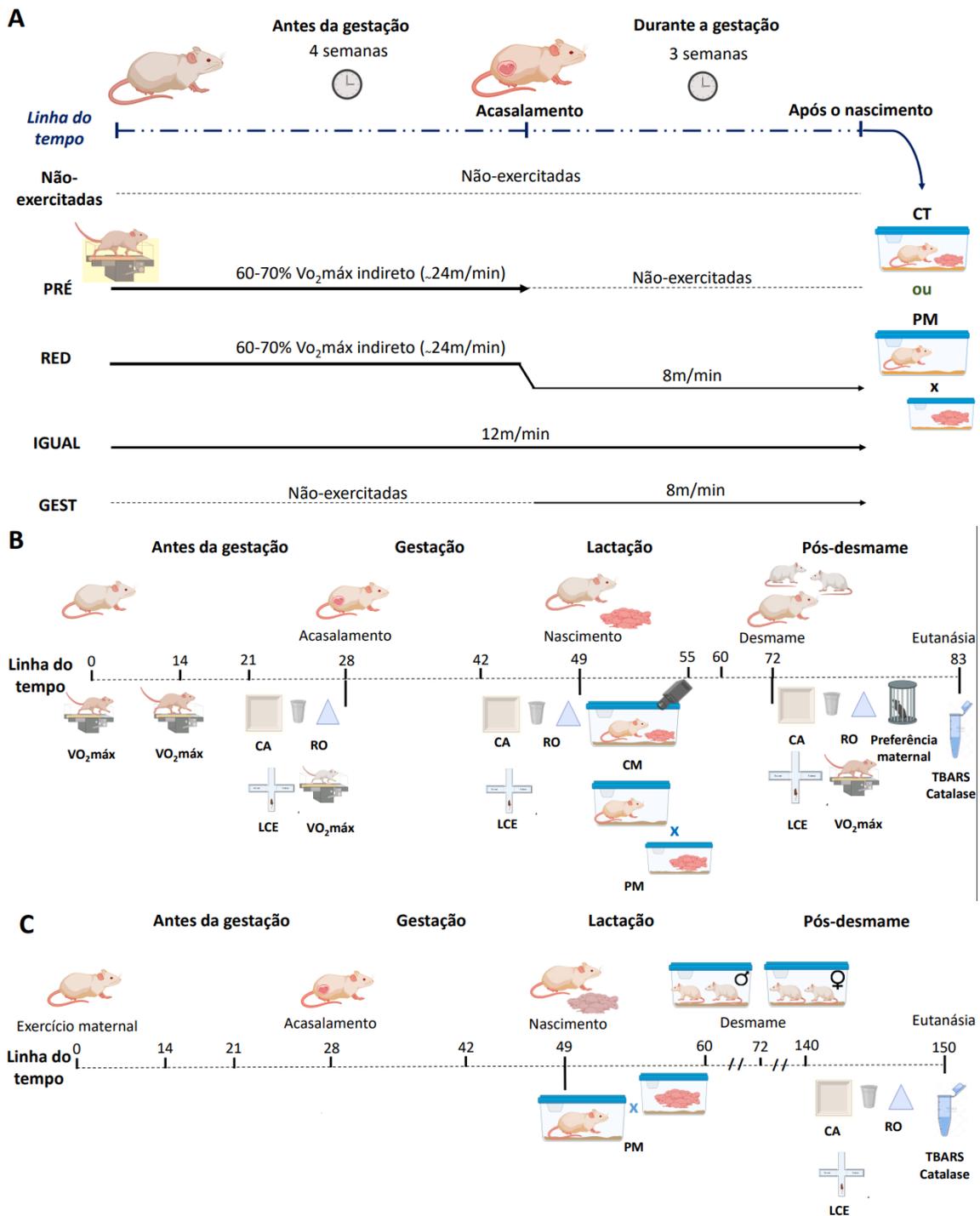
Após o nascimento dos filhotes, o número de filhotes foi padronizado em 8-10 por mães, tentando manter uma proporção de 1:1 macho:fêmea, e as mães e a prole foram novamente dividida em CT (mães e prole mantidas juntas até o desmame) e PM (mãe e prole submetidas à PM durante os 10 primeiros dias de vida; conforme descrito a seguir).

O comportamento maternal de parte das mães CT e PM foi observado durante 30 minutos após o retorno ao ninho do dia pós natal (DPN) 1 ao DPN 5 (no caso das mães PM; mães CT foram observadas em horário equivalente).

A divisão inicial e velocidade de corrida de cada um dos grupos nas diferentes fases antes/durante a gestação (Fig. 2A), além da linha do tempo dos

testes comportamentais, de memória, e bioquímicos com as mães (Fig. 2B) e com a prole (Fig. 2C) está representada na figura 2.

Figura 2. Delineamento experimental e protocolos de exercício físico dos estudo 1 e 2.



Fonte: O autor (2025).

Legenda: Figura 2. **A – Protocolos de exercício maternal.** Os grupos NE não realizaram exercício em nenhum momento. Os grupos PRÉ e RED realizaram o exercício pré-gestação, durante 4 semanas, em intensidade similar. Após o acasalamento, os grupos PRÉ cessaram a prática, enquanto os grupos RED reduziram a velocidade de corrida para 8m/min. As mães dos

grupos IGUAL realizaram tanto o exercício pré-gestação, quanto durante a gestação na velocidade de 12m/min. Já os grupos GEST realizaram o exercício somente durante a gestação na velocidade de 8m/min. **B – Linha temporal dos experimentos realizados com as mães (Estudo 1).** Todos os grupos realizaram 4 testes de  $VO_{2m\acute{a}x}$  indireto: um após uma semana de habituação à esteira, outro após duas semanas de exercício dos grupos PRÉ e RED, outro após 4 semanas de exercício dos grupos PRÉ e RED (antes do acasalamento), e outro após o desmame. Após o nascimento dos filhotes, metade das mães de cada grupo foi submetida a privação de contato com os filhotes por 3 horas por dia, durante os 10 primeiros dias dos filhotes. Após o retorno para a caixa moradia, o comportamento maternal foi filmado por 3 minutos para posterior análise. Após o desmame, as mães passaram pelos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos, labirinto em cruz elevado e preferência maternal. Após o final dos experimentos, as mães foram eutanasiadas para retirada bilateral do hipocampo. **C – Linha temporal dos experimentos com a prole (Estudo 2).** Após o desmame, a prole foi separada em caixas de acordo com o sexo e com o grupo experimental, e foi submetida aos mesmos testes que as mães (exceto preferência maternal), ao alcançar a idade adulta. CA = Campo aberto. RO = Reconhecimento de objetos. LCE = labirinto em cruz elevado. TBARS = teste de peroxidação lipídica. PM = Privação maternal.

Após o desmame (DPN 22), as mães foram submetidas aos testes de campo aberto (CA), reconhecimento de objetos (RO), labirinto em cruz elevado (LCE) e preferência maternal. A prole foi submetida aos mesmos testes (exceto preferência maternal, quando atingiu a idade adulta (DPN 90)).

#### **4.1.2 Protocolos experimentais**

##### **4.1.2.1 Habituação ao exercício físico e medida indireta de consumo de oxigênio ( $VO_{2m\acute{a}x}$ indireto)**

Nos estudos 1 e 2, as ratas mães de todos os grupos foram habituadas a esteira rolante por 4 dias, na velocidade de 10m/min. No quinto dia, a medida do  $VO_{2m\acute{a}x}$  indireta foi realizada utilizando o protocolo de Brooks & White (Brooks; Donovan; White, 1984). As ratas foram colocadas na esteira na velocidade inicial de 3m/min. A cada 3 minutos, a velocidade foi aumentada em 5m/min até as ratas chegarem à exaustão.

O tempo de fadiga em minutos e a velocidade máxima atingida em metros por minuto (m/min) foi anotada, e a última velocidade mantida por pelo menos um minuto foi utilizada para calcular a velocidade equivalente à 60%-70 do  $VO_{2m\acute{a}x}$  indireto de cada animal (Brooks; Donovan; White, 1984).

Novos testes foram realizados com todos os grupos após duas semanas de treino (intra treino), quatro semanas de treino (pré acasalamento), e uma semana após o desmame (pós-desmame).

#### **4.1.2.2 Protocolos de exercício físico**

Nos estudos 1 e 2, as ratas PRÉ e RED foram submetidas a 4 semanas de exercício físico antes do acasalamento, na intensidade de 60-70% do  $VO_{2máx}$  indireto (~24-28m/min), por 50 minutos por dia, 5 dias por semana. A intensidade foi ajustada no começo da terceira semana levando em consideração o teste de  $VO_{2máx}$  realizado no final da segunda semana de treino (~28-31m/min). Após o acasalamento, o grupo PRÉ parou de realizar exercício físico, enquanto o grupo RED reduziu a velocidade para 8m/min durante toda gestação.

O grupo IGUAL realizou tanto o exercício antes, quanto durante a gestação, na velocidade de 12m/min, independente do seu  $VO_{2máx}$  indireto.

O grupo GEST realizou o exercício somente durante a gestação, na velocidade de 8m/min, independente do seu  $VO_{2máx}$  indireto.

Os grupos NE realizaram todos os testes de  $VO_{2máx}$  indireto, mas não realizaram exercício físico em momento nenhum.

#### **4.1.2.3 Privação Maternal (PM)**

Nos estudos 1 e 2, o dia do parto foi considerado como DPN 0. Para o protocolo de privação maternal (PM), as mães foram removidas da gaiola por 3 horas diárias, e a prole transferida para uma sala separada com um ambiente controlado (~29°C e 60% de umidade) para prevenir a perda de calor corporal materno (Benetti; Mello; Bonini; Monteiro *et al.*, 2009) e evitar interferências de odores ou vocalizações ultrassônicas durante esse período.

Ao final de cada sessão de PM, a gaiola dos filhotes era devolvida ao ambiente original, e as mães realocadas com os filhotes. Após o DPN 10, todos os filhotes permaneceram sem perturbações na gaiola com suas respectivas mães até o desmame no DPN 21.

#### **4.1.2.4 Comportamento maternal (CM)**

Nos estudos 1 e 2, do DPN 1 ao DPN 5, o CM foi observado durante os 30 primeiros minutos após o retorno das mesmas a caixa-moradia. Nesse período, o tempo e a frequência for a do ninho, o tempo lambendo os filhotes, e o tempo em *self-grooming* foram observados como parâmetros de CM (Alves; Portugal; Summavielle; Barbosa *et al.*, 2020; Czarnabay; Dalmago; Martins; Queiroz *et al.*, 2019).

#### **4.1.2.5 Tarefa de reconhecimento de objetos (RO)**

Para avaliar a memória de reconhecimento de objetos, nos estudos 1 e 2 foi utilizada a tarefa de RO (Ennaceur; Delacour, 1988), conduzida em uma caixa de madeira com paredes brancas (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.

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 substituído por um novo objeto (C) e os animais colocados novamente no aparato por mais 5 min para livre exploração (sessão de teste). As sessões da tarefa foram filmadas para posterior análise utilizando o software livre Boris (Universidade de Torino, Itália; Olivier Friard, 2016 #152}.

Após análise, o tempo de exploração de cada objeto, em segundos, foi anotado e transformado em porcentagem do tempo total de exploração. Aqui, caso o animal passe mais de 50% do tempo total de exploração explorando o objeto novo (C), é considerado que o animal consolidou a memória, uma vez que reconheceu o objeto já familiar, preferindo explorar o novo.

#### **4.1.2.6 Preferência maternal**

Para avaliar se o exercício antes e/ou durante a gestação, bem como alterações na intensidade do exercício, em conjunto com PM, modificam a preferência materna após o desmame nos estudos 1 e 2, realizamos um teste de

preferência maternal adaptado de Stroobants et al. (Stroobants; Creemers; Bosmans; D'hooge, 2020).

Vinte e quatro horas após a sessão de teste de RO, as mães retornaram ao mesmo aparato de paredes brancas, agora com duas peças cilíndricas, transparentes, medindo 25cm x 25cm, e colocamos um rato com aproximadamente 30 dias de idade dentro de cada cilindro (idade da prole).

No primeiro dia, um macho não familiar e uma fêmea não familiar. No segundo dia, uma fêmea não familiar e uma fêmea familiar (da ninhada). No terceiro dia, um macho não familiar e um macho familiar (da ninhada). No quarto dia, um macho familiar e uma fêmea familiar (ambos da ninhada). As sessões do teste foram filmadas para posterior análise utilizando o software livre Boris (Universidade de Torino, Itália; Olivier Friard, 2016 #152).

Aqui, usamos o mesmo conceito do teste de RO para medir a preferência materna. Caso as mães passassem mais de 50% do tempo total de exploração em um dos animais, ele é considerado o preferido.

#### **4.1.2.7 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 (CA) (Benetti; Mello; Bonini; Monteiro *et al.*, 2009). Para isto, nos estudos 1 e 2 foi utilizado o mesmo aparato que para o RO, agora com o assoalho da caixa dividido em 12 quadrantes com igual área de superfície.

O animal foi gentilmente colocado no aparato e pôde explorá-lo livremente por 5 minutos. A atividade foi gravada, e durante análise posterior utilizando o software Boris (Olivier Friard, 2016) foi registrado o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras, comportamentos que nos roedores denotam exploração.

#### **4.1.2.8 Labirinto em cruz elevado (LCE)**

Para avaliar o comportamento tipo ansioso, utilizamos a tarefa do LCE (File; Pellow, 1985). O labirinto consiste em uma plataforma em cruz, que, nos estudos 1 e 2 tinha 40 centímetros de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura, com dois braços contralaterais do labirinto possuindo paredes elevadas, sendo denominados braços fechados, e os outros dois não possuíam paredes, sendo denominados braços abertos.

Cada animal foi colocado no centro do labirinto e deixado livre para explorá-lo por 5 minutos. Novamente, os testes foram gravados e analisados posteriormente utilizando o software Boris (Olivier Friard, 2016) para registro do tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos. Aqui, assumimos que quanto mais ansioso estiver o animal, menor o tempo de permanência nos braços abertos e o número de entradas nos mesmos (File; Pellow, 1985).

#### **4.1.2.9 Análises bioquímicas do hipocampo**

Nos estudos 1 e 2, 24 horas após o último teste, os animais foram eutanasiados, e o hipocampo bilateral foi dissecado do cérebro e homogeneizado em Tris HCl 50 mM (pH 7,4). As amostras foram centrifugadas a 3000xg por 10 minutos, e os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios.

A concentração total de proteínas foi avaliada usando a quantificação baseada em cobre de acordo com as instruções do fabricante (Bradford, 1976).

A peroxidação lipídica foi mensurada pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para o TBARS (Gutteridge; Tickner, 1978), o sobrenadante (w/v 1:10) foi incubado com ácido tiobarbitúrico 0,8% (pH 3,5), tampão de ácido acético (pH 3,2) e solução de dodecil sulfato de sódio (SDS 8%) a 95°C por 1 hora. A reação colorimétrica foi medida por valores de absorvância em 535 nm e comparada a uma curva padrão.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi avaliada conforme descrito por Aebi (Aebi). O sobrenadante (w/v 1:5) foi incubado com TFK 50 mM (pH 7,0) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e a medição da CAT foi realizada ao longo de 2 minutos. A diferença na

absorbância em 240 nm entre os tempos 0 e 120 segundos, dividida por 2, foi utilizada como medida da atividade da CAT.

#### **4.1.3 Análise estatística**

Para avaliar a distribuição dos dados, nós utilizamos o teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Os resultados da tarefa de RO e de preferência maternal foram analisados utilizando o teste de uma amostra de Student ou Wilcoxon Signed-Rank test, comparado à média teórica de 50%, dependendo da normalidade dos dados.

Os resultados dos testes de CM,  $VO_{2\text{máx}}$ , CA e LCE foram analisados com ANOVA de duas vias de medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey.

Os dados de TBARS foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis seguido de *post-hoc* de Dunn.

Os dados de CAT foram avaliados com ANOVA de uma via com *post-hoc* de Fisher.

## **4.2 Estudo 3**

### **4.2.1 Manejo dos animais e desenho experimental**

O estudo 3 foi realizado integralmente na Katholieke Universiteit Leuven (KUL), Bélgica, durante o período de doutorado sanduíche. Para tal, camundongas prenhas C57BL/6J ( $n = 10$ ) com 90 dias de vida foram obtidas do biotério da Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, FR). Inicialmente, os animais foram mantidos no Biotério da KUL, em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), em ciclo claro/escuro de 12h, com alimento e água à vontade. Todos procedimentos foram realizados de acordo com o comitê de ética em pesquisa animal da instituição (protocolo 024/2023; Anexo 2).

As fêmeas adultas (mães) foram divididas igualmente em dois grupos, de acordo com o ambiente que viveram durante a gestação: enriquecimento ambiental na caixa Marlau (EA) e controle (CT; caixa moradia padrão), onde

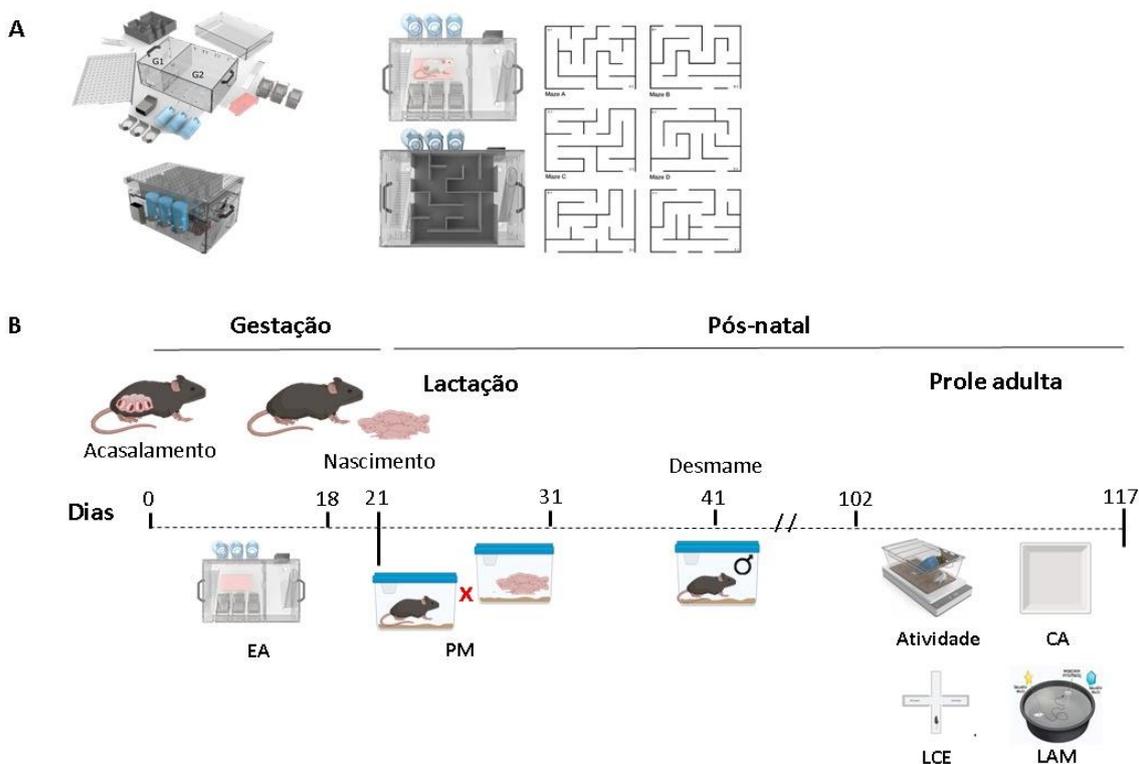
foram mantidas até o 18º dia de gestação. Após, as fêmeas foram alojadas individualmente em caixas moradia padrão.

Após o nascimento da prole, a ninhada de cada mãe foi padronizada em  $n = 8$ , na proporção de 1:1 (macho/fêmea), quando possível. Para a realização dos experimentos com a prole na fase jovem adulta foram utilizados 116 animais (60F/56M) oriundos das proles das fêmeas mães, divididos nos seguintes grupos:

1. Veículo: mães alojadas em caixa moradia padrão durante a gestação, com a prole não submetida à PM na fase neonatal, com infusão do veículo de agonista canabinóide durante os testes na fase adulta (PBS);
2. Privação maternal (PM): mães alojadas em caixa moradia padrão durante a gestação, com a prole submetida à PM na fase neonatal, com infusão do veículo de agonista canabinóide durante os testes na fase adulta (PBS);
3. WIN: mães alojadas em caixa moradia padrão durante a gestação, com a prole não submetida à PM na fase neonatal, mas infundidos com agonista canabinóide (WIN 55-2,1,2; 0,5mg/kg) durante os testes na fase adulta;
4. Enriquecimento ambiental + PM (EA+PM): mães alojadas em ambiente enriquecido durante a gestação, com a prole submetida à PM na fase neonatal, e infundida com o veículo do agonista canabinóide durante os testes na fase adulta (PBS);
5. PM + WIN: mães alojadas em caixa moradia padrão durante a gestação, com a prole submetida à PM na fase neonatal e infundida de agonista canabinóide durante os testes na fase adulta;
6. EA + PM + WIN: mães alojadas em ambiente enriquecido durante a gestação, com a prole submetida à PM na fase neonatal e infundida de agonista canabinóide durante os testes na fase adulta.

O delineamento experimental do estudo 3 está representado na figura 3, a seguir.

Figura 3 - Delineamento experimental e modelo de moradia complexa com exercício físico voluntário empregada no estudo 3



Fonte: O autor (2024).

Figura 3 - **Modelo de moradia complexa com exercício físico voluntário empregada durante à gestação em parte das mães** - Às mães submetidas ao EA foram alojadas em caixas com 6-8 animais até o dia gestacional 18. **B - Delineamento experimental do estudo 3** – I.p = injeções intraperitoneais. Atividade = caixa moradia monitorada por sensores infravermelhos. CA = campo aberto. EA = enriquecimento ambiental. LCE = labirinto em cruz elevado. LAM = Labirinto aquático de Morris. PM = privação maternal

Enquanto as mães EA conviveram com 6-8 animais na caixa Marlau (Fig. 3A), as mães controle foram alojadas na moradia convencional e conviveram com 4 animais até o dia gestacional 18.

Após o nascimento da prole, os animais PM foram submetidos ao mesmo protocolo de PM dos estudos 1 e 2, sendo a mãe retirada da caixa moradia por 3 horas por dia, do dia pós natal 1 ao 10, e retornando à caixa após o final das três horas.

No DPN 21, os animais foram desmamados, e os machos e fêmeas do mesmo grupo foram separados por sexo em caixas moradia convencionias com 4-5 animais em cada caixa, até a idade adulta.

Ao atingir 80 dias de idade, os animais dos grupos WIN foram submetidos à injeções via intraperitoneal do agonista canabinóide WIN 55-2,1,2 (0,5 mg/kg), 10 minutos antes do início dos testes de cada dia, sendo eles performados na seguinte ordem, em dias diferentes: caixa de atividade, campo aberto (CA), labirinto em cruz elevado (LCE), e o labirinto aquático de Morris (LAM).

## **4.2.2 Protocolos experimentais**

### **4.2.2.1 Enriquecimento ambiental com exercício físico voluntário (moradia complexa Marlau)**

No estudo 3, as camundongas dos grupos EA foram alojadas na caixa Marlau durante a gestação (ambiente enriquecido com exercício físico voluntário; Fig. 3A). A caixa Marlau é uma caixa moradia para camundongos dividida em 3 compartimentos: dois no andar de baixo, e um no segundo andar (Fares; Belmeguenai; Sanchez; Kouchi *et al.*, 2013). No primeiro compartimento do primeiro andar, os animais tinham acesso à comida. No segundo compartimento do primeiro andar, os animais tinham acesso à água e à 3 rodas de corrida com um pequeno objeto tipo labirinto no centro do compartimento. Para subir ao segundo andar os animais deveriam subir uma escada e passar por um labirinto (a orientação do labirinto foi trocada duas vezes por semana para instigar o exercício cognitivo a partir da flexibilidade cognitiva espacial) para conseguir acessar a escada que leva ao compartimento da água, novamente no primeiro andar.

### **4.2.2.2 Drogas e protocolo de infusão**

A fim de investigar os efeitos da manipulação do sistema canabinóide na memória de animais privados de cuidado neonatal, assim como sua combinação com o EA durante a gestação, os animais dos grupos WIN foram infundidos intraperitonealmente (via i.p) com o agonista não-seletivo de receptores CB1 e CB2 WIN 55-2,1,2 (0,5 mg/kg), 10-15 minutos antes do início de cada teste, totalizando uma infusão diária entre 08h00 e 10h00 da manhã, em um período de 17 dias; (An; Carrazoni; Souto Das Neves; D'hooge *et al.*, 2024; Tomas-Roig; Agbemenyah; Celarain; Quintana *et al.*, 2020). Os animais

dos grupos não-WIN também foram infundidos via i.p com a mesma solução de diluição da droga (veículo; PBS).

#### **4.2.2.3 Caixa de atividade**

Para analisar a atividade dos animais dentro da caixa moradia, cada animal foi colocado em uma caixa moradia padrão, cercada por 3 sensores infravermelhos ao redor da caixa que mensuraram cada vez que os animais passavam pelos sensores, servindo como parâmetro de atividade (Callaerts-Vegh; Ahmed; Vermaercke; Marynen *et al.*, 2015).

A mensuração do número de sensores cruzados foi realizada a cada 30 minutos, das 10h00 da manhã do dia 1 às 09h00 da manhã do dia 2.

#### **4.2.2.4 Campo aberto**

Logo após serem retirados da caixa de atividades, os animais foram submetidos ao campo aberto (CA; (Callaerts-Vegh; Ahmed; Vermaercke; Marynen *et al.*, 2015)). Diferentemente da tarefa de CA dos estudos 1 e 2, no estudo 3 nós mensuramos a distância total percorrida pelos animais, assim como o tempo que os animais passaram na zona central do aparato (caixa acrílica transparente medindo 50x50x50 cm). Após passarem 30 minutos em um ambiente escuro, a exploração no CA foi mensurada durante 10 minutos, e analisada automaticamente por meio do software EthoVision (Noldus, Holanda).

#### **4.2.2.5 Labirinto em cruz elevado**

Vinte e quatro horas após o CA, os animais foram submetidos ao LCE. Aqui, diferentemente dos estudos 1 e 2, nós mensuramos o tempo que os animais passaram nos braços abertos e fechados do LCE (5cm x 30cm) como parâmetros do estado tipo-ansioso (Callaerts-Vegh; Ahmed; Vermaercke; Marynen *et al.*, 2015), também analisado automaticamente por meio do software do EthoVision (Noldus, Holanda).

#### **4.2.2.6 Labirinto aquático de Morris**

Como medida de memória, no estudo 3, nós utilizamos o labirinto aquático de Morris (LAM) para avaliar a aprendizagem e memória espacial dos animais (An; Carrazoni; Souto Das Neves; D'hooge *et al.*, 2024; Callaerts-Vegh; Ahmed; Vermaercke; Marynen *et al.*, 2015).

O LAM foi realizado em uma piscina circular de 150 cm diâmetro cheia com água. A piscina foi opacificada com tinta branca atóxica, mantida a 26°C, sendo a água e o opacificador trocados à cada 7 dias. Uma plataforma redonda de 15 cm foi escondida 1 cm abaixo da superfície da água em uma posição fixa ao longo de cada semana.

Os animais passaram por 10 sessões de treinamento, e duas sessões de testes. Cada sessão de treinamento consistiu em quatro tentativas para encontrar a plataforma submersa, com intervalo de 15 min entre as tentativas, começando aleatoriamente em uma das quatro posições iniciais a cada dia (lados sul, norte, leste e oeste da piscina). Os camundongos que não conseguiram encontrar a plataforma em 100 segundos foram guiados gentilmente até ela. Ao encontrar a plataforma, os animais permaneciam sobre ela por 30 segundos antes de serem retirados da piscina.

Os animais passaram por 5 dias de aprendizagem consecutivos, com dois dias de descanso antes do primeiro teste de memória espacial. No 8º e 15º dia do LAM, a plataforma foi removida da piscina para o teste de memória espacial. Durante as sessões de aprendizagem, analisamos a média de tempo para encontrar a plataforma nas 4 tentativas diárias. Nas sessões de teste, o tempo de permanência no quadrante alvo (aquele onde antes estava a plataforma) foi analisado como parâmetro de consolidação da memória espacial.

#### **4.2.3 Análise estatística**

As tarefas de CA e LCE foram analisadas utilizando ANOVA de duas vias com *post-hoc* de Tukey.

As análises da caixa de atividade e da fase de aprendizagem do LAM foram realizadas utilizando ANOVA de duas vias de medidas repetidas, com *post-hoc* de Fisher.

Testes 1 e 2 do LAM foram analisados utilizando teste T de uma amostra comparado com média teórica de 25%, representando o QA onde a plataforma se encontrava durante os cinco primeiros dias de aprendizagem. Dessa forma, espera-se que caso o animal tenha aprendido onde a plataforma se encontrava, ele passe mais de 25% do tempo total de teste (100s) no QA.

## **5. Resultados**

Para melhor visualização dos dados, dividimos a presente tese em três estudos, conforme previamente anunciado. Dessa forma, os resultados de cada estudo estão apresentados abaixo de forma separada.

### **5.1 Estudo 1**

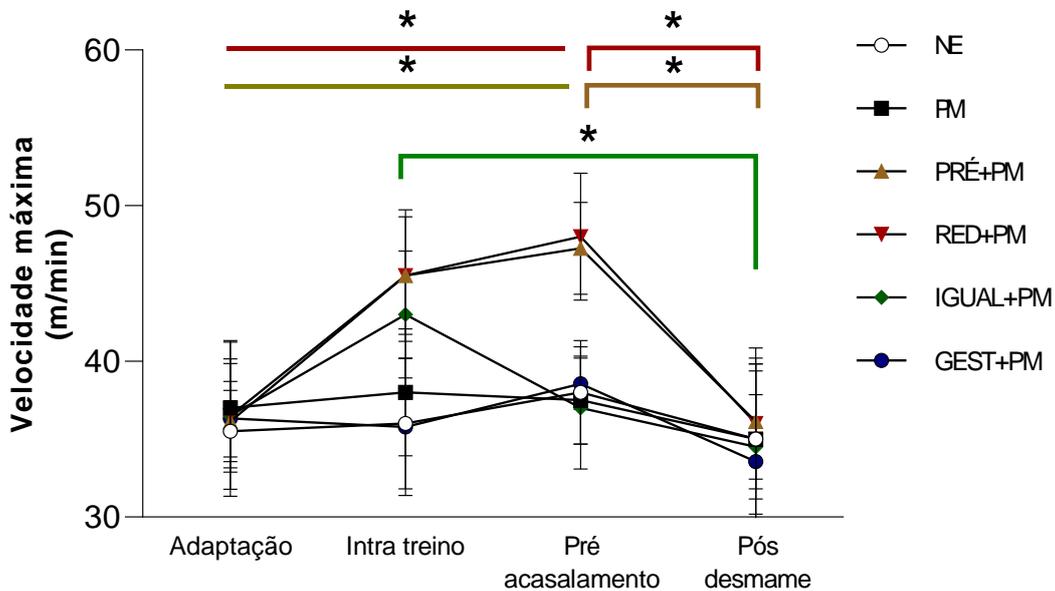
No primeiro estudo que compõe a presente tese investigamos os efeitos do treino aeróbico de corrida e destreino durante a gestação sobre a memória, comportamento, e preferência maternal em três tempos distintos: antes, durante, e após a gestação, nas mães.

#### **5.1.1 Parar ou diminuir a intensidade do exercício durante a gestação causa destreino após o desmame**

Inicialmente, nós avaliamos como os protocolos de exercício físico de corrida afetaram o  $VO_{2máx}$  das fêmeas adultas, investigando se houve diferença entre os grupos em qualquer um dos quatro testes realizados.

Em relação à velocidade máxima de corrida dos grupos durante os testes verificamos, através de uma ANOVA de duas vias, um efeito significativo para tempo ( $F_{(2.838,144.8)} = 34,77$ ,  $p < 0,0001$ ; Fig. 4) e intervenção ( $F_{(5,518)} = 11,83$ ,  $p < 0,0001$ ; Fig. 4), além de interação entre os fatores (tempo x intervenção:  $F_{(15, 153)} = 4,947$ ,  $p < 0,0001$ ; Fig. 4).

Figura 4 - Desempenho no teste incremental de corrida antes e após a gestação do estudo 1



Fonte: O autor (2024).

**Figura 4 – Desempenho no teste incremental de corrida antes e após a gestação.** Correr a 60-70% do  $VO_{2máx}$  indireto aumenta a velocidade máxima após 4 semanas de treinamento. Interromper a corrida no início da gestação retorna o desempenho ao nível pré-treinamento após o desmame; sendo que reduzir a intensidade do exercício durante a gestação evita esse declínio. \* $p < 0,05$  ANOVA de dois fatores para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey. Linhas coloridas indicam os grupos com diferenças. Dados apresentados como média  $\pm$  DP,  $n = 5-7$  por grupo. Adaptação: teste após 1 semana de adaptação à esteira; Intra treino: após 2 semanas; Pré-acasalamento: após 4 semanas; Pós-desmame: 3 semanas após o parto. NE = não-exercitadas. PM = privação materna. PRÉ+PM mães que se exercitaram somente antes da gestação e passaram pela privação de contato com os filhotes. RED+PM = mães que reduziram a intensidade do exercício na gestação e passaram pela privação de contato com os filhotes. IGUAL+PM = mães que mantiveram a intensidade do exercício na gestação e passaram pela privação de contato com os filhotes. GEST+PM = mães que realizaram o exercício somente durante a gestação e passaram pela privação de contato com os filhotes.

No primeiro teste de  $VO_{2máx}$  indireto, não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Fig. 4 Adaptação). No segundo teste (após duas semanas de treinamento dos grupos PRÉ+PM e RED+PM), todos os grupos que treinaram antes da gestação (PRÉ+PM, RED+PM e IGUAL+PM) apresentaram maior capacidade aeróbica em comparação aos grupos NE e PM ( $p < 0,05$  para todas as comparações; Fig. 4 Intra treino). No teste realizado quatro semanas após o início do treinamento (pré acasalamento), as diferenças dos grupos PRÉ+PM e RED+PM em relação a NE e PM persistiram ( $p < 0,05$  para todas as comparações; Fig. 4 Pré-acasalamento), enquanto não houve mais diferença entre IGUAL+PM e os grupos NE e PM (vs NE:  $p = 0,98$ ; vs PM:

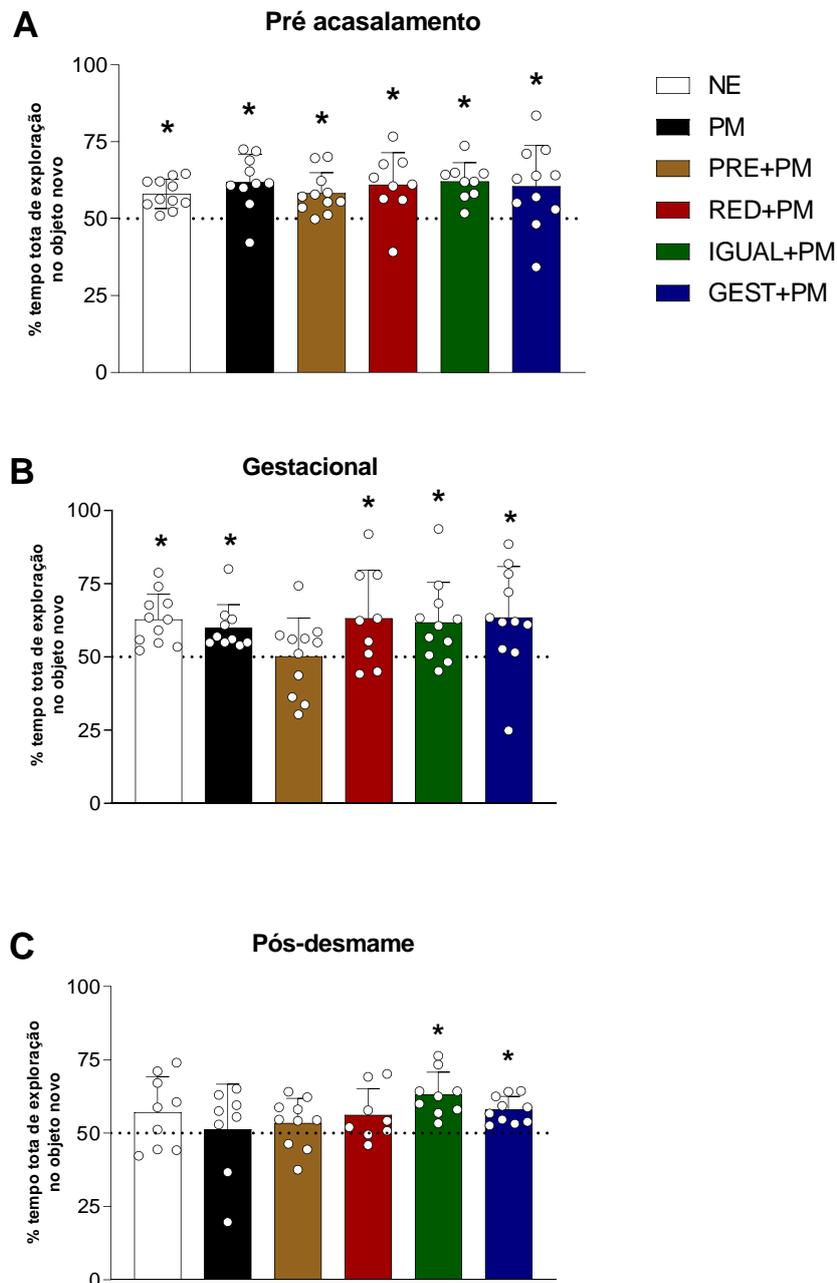
$p = 0,99$ ; Fig. 4 Pré-acasalamento). Após o desmame (4 semanas após o parto), todos os grupos retornaram ao mesmo nível de capacidade aeróbica, sem diferença entre os grupos ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Fig. 4 Pós-desmame).

Em seguida, investigamos como a capacidade aeróbica dos grupos mudou ao longo do tempo dos testes. NE, PM e GEST+PM não alteraram sua velocidade máxima ( $VO_{2máx}$  indireto) em nenhum tempo ( $p > 0,05$  para todas as comparações). PRE+PM e RED+PM aumentaram sua velocidade máxima após duas semanas de treinamento (PRE+PM:  $p = 0,004$ ; RED+PM:  $p = 0,009$ ), mantendo a diferença até o teste antes do acasalamento (PRE+PM:  $p = 0,0006$ ; RED+PM:  $p = 0,0001$ ). Como hipotetizado, o  $VO_{2máx}$  indireto de tais grupos retornaram ao nível do grupo NE após o desmame ( $p = 0,99$  para ambos), denotando destreino durante a gestação/lactação. Por outro lado, IGUAL+PM apresentou um resultado surpreendente, com uma diminuição em seu desempenho máximo após o desmame em comparação a duas semanas após o início do exercício ( $p = 0,005$ ), demonstrando destreino.

### **5.1.2 Parar de correr no início da gestação causa déficit de memória na última semana de gestação; manter a intensidade, ou começar a correr durante a gestação, previnem déficit de memória após o desmame**

No primeiro teste de RO (pré acasalamento), todos os grupos exploraram por mais de 50% do tempo total de exploração o novo objeto (NE:  $t_{(10)} = 4,514$ ;  $p = 0,004$ ; PM:  $t_{(9)} = 2,828$ ;  $p = 0,03$ ; PRE+PM:  $t_{(10)} = 2,844$ ;  $p = 0,046$ ; RED+PM:  $t_{(8)} = 2,783$ ;  $p = 0,049$ ; IGUAL+PM:  $t_{(8)} = 3,842$ ;  $p = 0,018$ ; GEST+PM:  $t_{(10)} = 4,087$ ;  $p = 0,015$ ; Fig. 5A), demonstrando que as fêmeas de todos os grupos não apresentavam problemas de consolidação de memória de reconhecimento antes do acasalamento.

Figura 5 – Resultados da tarefa de reconhecimento de objetos do estudo 1



Fonte: O autor (2024).

**Figura 5 – Efeitos do exercício maternal antes e/ou durante a gestação na memória de reconhecimento de objetos de fêmeas antes, durante e após a gestação.** **A** – Performance similar no teste de reconhecimento de objetos (RO), com memória consolidada nas ratas de todos os grupos antes da gestação. **B** – Parar de se exercitar no início da gestação causa déficit de memória de RO ao final da gestação. **C** – Ratas apresentam déficit de memória após o desmame. Realizar exercício antes da gestação e manter a intensidade dele durante, assim como iniciar a prática ao início da gestação, previnem o déficit de memória de RO. Os pontos demonstraram a porcentagem de tempo que cada mãe passou explorando o objeto novo. \*  $p < 0,05$  teste de uma amostra de Student comparado à média teórica de 50%. Dados mostrados como Média  $\pm$  DP ( $n = 7-12$  por grupo). NE = não-exercitadas. PM = privação maternal. PRÉ+PM

mães que se exercitaram somente antes da gestação e passaram pela privação de contato com os filhotes. RED+PM = mães que reduziram a intensidade do exercício na gestação e passaram pela privação de contato com os filhotes. IGUAL+PM = mães que mantiveram a intensidade do exercício na gestação e passaram pela privação de contato com os filhotes. GEST+PM = mães que realizaram o exercício somente durante a gestação e passaram pela privação de contato com os filhotes.

No teste realizado na última semana de gestação, todos os grupos, exceto o PRÉ, exploraram por mais de 50% do tempo total de exposição o objeto novo (NE:  $t_{(10)} = 3,879$ ;  $p = 0,008$ ; PM:  $t_{(9)} = 2,815$ ;  $p = 0,048$ ; PRE+PM:  $t_{(11)} = 2,19$ ;  $p = 0,072$ ; RED+PM:  $t_{(8)} = 3,222$ ;  $p = 0,032$ ; IGUAL+PM:  $t_{(10)} = 2,830$ ;  $p = 0,047$ ; GEST+PM:  $t_{(10)} = 3,784$ ;  $p = 0,02$ ; Fig. 5B), o que denota déficit de memória neste grupo.

Já no teste realizado após o desmame, tanto as mães que mantiveram a intensidade de exercício durante a gestação (IGUAL+PM:  $t_{(8)} = 3,519$ ;  $p = 0,008$ ; Fig. 5C), quanto as que começaram a se exercitar durante a gestação (GEST+PM:  $t_{(9)} = 4,103$ ;  $p = 0,014$ ; Fig. 5C) demonstraram consolidar a memória de RO. Por outro lado, as ratas do grupo NE ( $t_{(8)} = 1,962$ ;  $p = 0,10$ ; Fig. 3C), PM ( $t_{(7)} = 1,154$ ;  $p = 0,30$ ; Fig. 5C) e PRE+PM ( $t_{(9)} = 0,477$ ;  $p = 0,657$ ; Fig. 5C) demonstraram déficit de memória, explorando por tempo similar ambos objetos. Tal resultado demonstra que há déficit de memória após o desmame, e que manter a intensidade ou começar a se exercitar durante a gestação pode prevenir tal déficit.

Nós também comparamos o tempo total de exploração na tarefa de RO entre os grupos, como um parâmetro controle. Uma ANOVA de duas vias de medidas repetidas com post-hoc de Tukey demonstrou não haver diferenças entre eles ( $p > 0,05$  para todas comparações; Tabela 1).

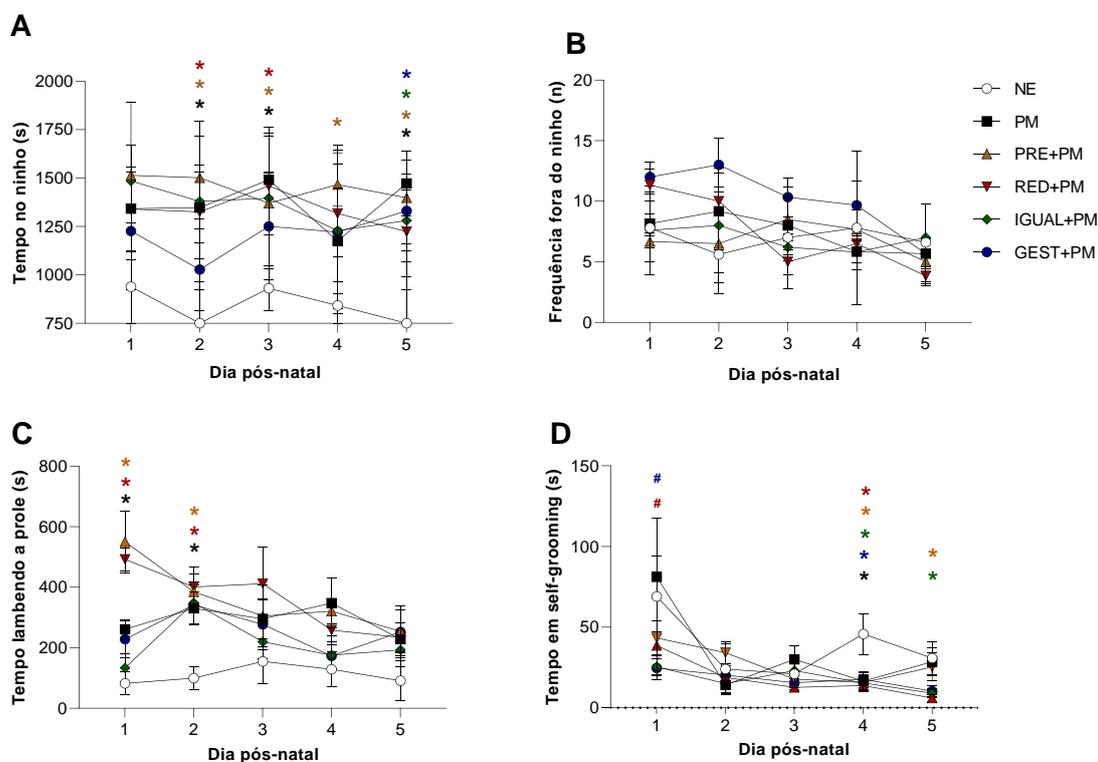
Reconhecimento de objetos		Grupos					P	
		NE	PM	PRE+PM	RED+PM	IGUAL+PM	GEST+PM	Valor
Pré acasalamento	Tempo total de exploração na sessão de treino (s)	37,71 ± 12,88	23,71 ± 6,67	32,80 ± 9,497	42,40 ± 7,470	43,20 ± 12,99	47,20 ± 14,96	0,22
	Tempo total de exploração na sessão de teste (s)	33,29 ± 12,65	33,86 ± 7,42	42,60 ± 10,11	43,20 ± 7,791	43,40 ± 4,336	46,60 ± 29,55	0,572
Última semana de gestação	Tempo total de exploração na sessão de treino (s)	29,65 ± 18,48	29,43 ± 10,81	47,00 ± 18,54	53,00 ± 30,44	42,40 ± 19,58	38,17 ± 21,85	0,22
	Tempo total de exploração na sessão de teste (s)	28,43 ± 8,71	33,29 ± 11,84	31,80 ± 20,55	38,60 ± 21,73	37,80 ± 32,18	43,20 ± 13,10	0,572
Pós-desmame	Tempo total de exploração na sessão de treino (s)	31,57 ± 14,55	29,86 ± 8,63	25,80 ± 17,66	41,40 ± 12,28	54,2 ± 18,31	42,20 ± 16,92	0,22
	Tempo total de exploração na sessão de teste (s)	41,00 ± 16,08	42,80 ± 26,75	34,80 ± 10,33	44,00 ± 10,56	63,80 ± 15,99	36,40 ± 24,13	0,572

**Tabela 1** – A privação maternal e o exercício maternal não alteram a exploração de objetos antes, durante ou após a gestação. Dados drescritos na forma de Média ± DP (n = 7-11 por grupo). NE = Mães controle; PM = Mães submetidas à privação maternal; PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM; RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM. P > 0,05 em todos os testes de ANOVA de duas vidas de medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey.

### 5.1.3 PM aumenta o tempo das mães no ninho e lambendo os filhotes; a prática de exercício físico antes e/ou durante a gestação previne o aumento do *self-grooming* após a PM

Quanto ao tempo que as mães passaram no ninho, ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou efeito da PM ( $F_{(5, 28)} = 8,691$ ;  $p < 0.0001$ ). *Post-hoc* de Tukey não demonstrou diferença entre os grupos no primeiro dia pós-natal ( $p > 0,05$  para todas as comparações). No segundo dia, as ratas dos grupos PM ( $p = 0,007$ ; Fig. 6A), PRE+PM ( $p = 0,0039$ ; Fig. 6A) e RED+PM ( $p = 0,0032$ ; Fig. 6A) passaram mais tempo no ninho em comparação ao grupo NE, diferença que permaneceu no terceiro dia (PM:  $p = 0.01$ ; PRE+PM:  $p = 0.005$ ; RED+PM:  $p = 0.01$ ; Fig. 6A). No quarto dia, o grupo PRE+PM ainda permaneceu mais tempo no ninho comparado ao grupo NE ( $p = 0.02$ ; Fig. 6A). No quinto dia, os grupos PM ( $p = 0,012$ ; Fig. 6A), PRE+PM ( $p = 0,032$ ; Fig. 6A), GEST+PM ( $p = 0,047$ ; Fig. 6A) e IGUAL+PM ( $p = 0,044$ ; Fig. 6A) passaram mais tempo no ninho em comparação ao grupo NE.

Figura 6 – Resultados do teste de comportamento maternal do estudo 1



Fonte: O autor (2024).

**FIGURE 6 – Comportamento maternal após a PM nos cinco primeiros dias de vida. A –** Tempo que as mães passaram no ninho. **B –** Número de vezes que as mães deixaram o ninho.

**C** – Tempo que as mães passaram lambendo a prole. **D** – Tempo em *self-grooming*. \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo NE. #  $p < 0.05$  comparado ao grupo PM. ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido de *post-hoc* de Tukey. Dados mostrados como Média  $\pm$  DP (n = 5-7 por grupo). NE = Mães controle; PM = Mães submetidas à privação maternal; PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM; RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM.

ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou efeito do tempo para o número de saídas das mães do ninho ( $F_{(3,493, 97,80)} = 4,555$ ;  $p = 0.003$ ). Porém, *post-hoc* de Tukey não demonstrou diferença na frequência de saída do ninho entre os grupos em nenhum dos dias avaliados, assim como não houve diferença intra-grupo ao longo do tempo ( $p > 0,05$  para todas as comparações em todos os dias; Fig. 6B).

Em relação ao tempo gasto lambendo os filhotes, ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou interação de fatores (tempo x intervenção:  $F_{(20, 112)} = 2,000$ ;  $p = 0.012$ ). *Post-hoc* de Tukey mostrou diferenças entre os grupos ao longo dos dias. No primeiro dia, as ratas PM ( $p = 0,045$ ; Fig. 6C) e RED+PM ( $p = 0,0003$ ; Fig. 6C) passaram mais tempo lambendo os filhotes do que as ratas NE. Além disso, as ratas RED+PM passaram mais tempo lambendo os filhotes do que as PM ( $p = 0,0321$ ; Fig. 6C), GEST+PM ( $p = 0,001$ ; Fig. 6C) e PRE+PM ( $p = 0,0152$ ; Fig. 6C). No segundo dia, as ratas dos grupos PM ( $p = 0.04$ ; Fig. 6C), PRE+PM ( $p = 0,0479$ ; Fig. 6C) e RED+PM ( $p = 0.036$ ; Fig. 6C) passaram mais tempo lambendo os filhotes do que o grupo NE. Não houve diferença entre os grupos no terceiro, quarto e quinto dias ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Fig. 6C). Ainda, o único grupo a demonstrar mudança no tempo em *licking* ao longo do tempo foi o grupo RED+PM, que diminuiu o tempo nos dias 4 ( $p = 0.01$ ; Fig. 6C) e 5 ( $p = 0.04$ ; Fig. 6C) quando comparado ao dia 1.

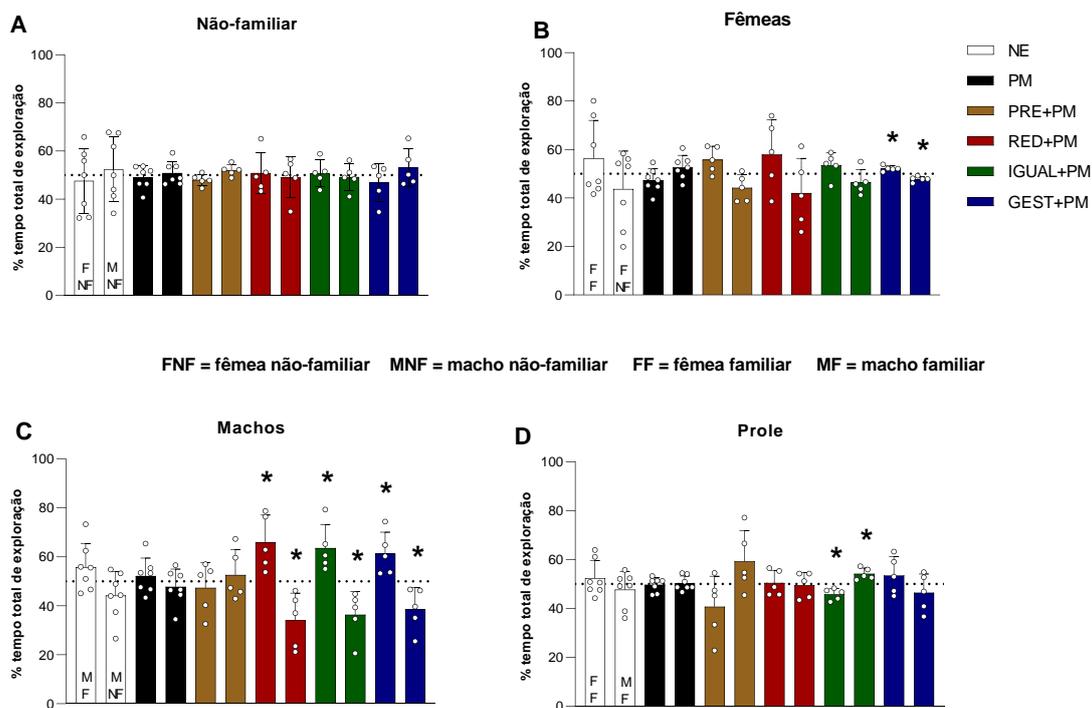
Quanto ao tempo gasto em *self-grooming*, ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou interação de fatores (tempo x intervenção:  $F_{(20, 112)} = 2,829$ ;  $p = 0.0003$ ). *Post-hoc* de Tukey mostrou que no primeiro dia o grupo PM passou mais tempo em *self-grooming* que os grupos IGUAL+PM ( $p = 0.041$ ; Fig. 6D) e GEST+PM ( $p = 0.039$ ; Fig. 6D). Não houve diferença entre grupos nos dias 2 e 3 ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Fig. 6D). No entanto, todos os grupos que se exercitaram passaram menos tempo em *self-grooming* em comparação

ao NE no quarto dia (NE vs.: PRE+PM  $p = 0,017$ ; RED+PM  $p = 0,046$ ; IGUAL+PM  $p = 0,031$ ; GEST+PM  $p = 0,024$ ; Fig. 6D). No quinto dia, as ratas dos grupos PRE+PM ( $p = 0,035$ ; Fig. 6D) e IGUAL+PM ( $p = 0,026$ ; Fig. 6D) ainda passaram menos tempo em *self-grooming* em comparação ao grupo NE. O único grupo a demonstrar diminuição do *self-grooming* ao longo do tempo foi o grupo PM, diminuindo o tempo nos dias 2 ( $p = 0.032$ ; Fig. 6D) e 3 ( $p = 0.039$ ; Fig. 6D) comparado ao primeiro dia.

#### 5.1.4 Mães que se exercitam durante a gestação preferem sua prole de machos à um macho desconhecido; aquelas que se exercitam somente na gestação preferem sua prole de fêmeas à uma fêmea desconhecida

No primeiro dia de teste de preferência maternal, nós avaliamos se havia preferência das mães entre machos e fêmeas não-familiares. Nenhum grupo mostrou preferência por algum dos sexos, explorando por cerca de 50% do tempo o animal de cada um deles (NE:  $t_{(6)} = 0,466$ ;  $p = 0,657$ ; PM:  $t_{(6)} = 0,492$ ;  $p = 0,639$ ; PRE+PM:  $t_{(4)} = 1,875$ ;  $p = 0,134$ ; RED+PM:  $t_{(4)} = 0,228$ ;  $p = 0,83$ ; IGUAL+PM:  $t_{(4)} = 0,338$ ;  $p = 0,421$ ; GEST+PM:  $t_{(4)} = 0,895$ ;  $p = 0,421$ ; Fig. 7A).

Figura 7 – Resultados do teste de preferência maternal do estudo 1



Fonte: O autor (2024).

**FIGURE 7 – Preferência maternal. A** – Avaliação da preferência entre fêmea não-familiar e macho não-familiar. **B** – Avaliação da preferência entre fêmea familiar e fêmea não-familiar. **C** – Avaliação da preferência entre macho familiar e macho não-familiar. **D** – Avaliação da preferência entre fêmea familiar e macho familiar. \*  $p < 0,05$  Teste t de Student comparado à media teórica de 50%. Dados descritos como Média  $\pm$  DP ( $n = 5-7$  por grupo). NE = Mães controle; PM = Mães submetidas à privação maternal; PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM; RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM.

No segundo dia, avaliamos a preferência entre uma fêmea familiar e uma não familiar. Apenas o grupo de mães que se exercitou durante a gestação mostrou preferência por sua prole, explorando por de 50% do tempo total de exploração a fêmea familiar (GEST+PM:  $t_{(4)} = 4,442$ ;  $p = 0,011$ ; Fig. 7B). Todos os outros grupos não mostraram preferência por nenhum animal (NE:  $t_{(6)} = 1,063$ ;  $p = 0,328$ ; PM:  $t_{(6)} = 1,463$ ;  $p = 0,193$ ; PRE+PM:  $t_{(4)} = 2,636$ ;  $p = 0,074$ ; RED+PM:  $t_{(4)} = 1,242$ ;  $p = 0,282$ ; IGUAL+PM:  $t_{(4)} = 1,511$ ;  $p = 0,205$ ; Fig. 7B).

No terceiro dia, avaliamos a preferência entre um macho familiar e um não familiar. Todos os grupos que se exercitaram durante a gestação mostraram preferência por sua prole (RED+PM:  $t_{(4)} = 3,191$ ;  $p = 0,0332$ ; IGUAL+PM:  $t_{(4)} = 3,172$ ;  $p = 0,0338$ ; GEST+PM:  $t_{(4)} = 2,879$ ;  $p = 0,0451$ ; Fig. 7C), enquanto os grupos que não realizaram exercício durante a gestação não mostraram preferência por nenhum animal (NE:  $t_{(6)} = 1,559$ ;  $p = 0,170$ ; PM:  $t_{(6)} = 0,809$ ;  $p = 0,449$ ; PRE+PM:  $t_{(4)} = 0,563$ ;  $p = 0,603$ ; Fig. 7C).

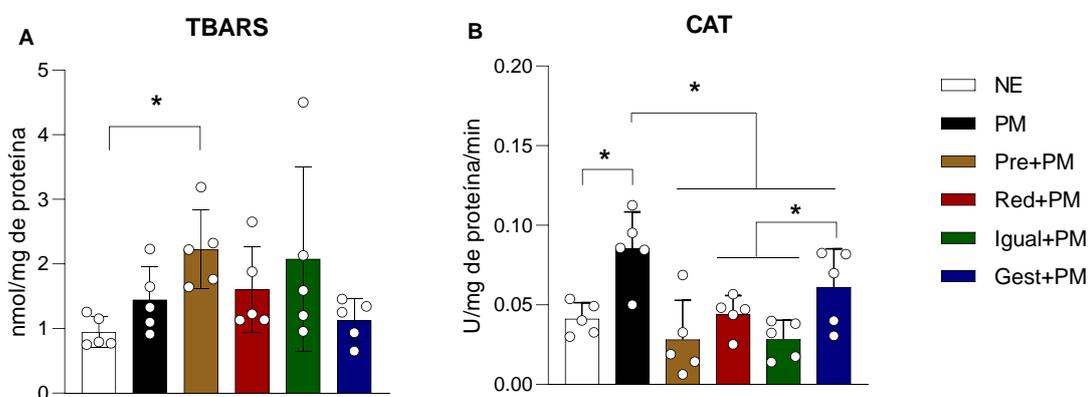
No quarto dia, avaliamos a preferência pelo sexo dentro da prole (macho familiar vs. fêmea familiar). O grupo de mães que manteve a mesma intensidade de exercício antes e durante a gestação mostrou preferência pelos filhotes machos (IGUAL+PM:  $t_{(4)} = 3,994$ ;  $p = 0,0162$ ; Fig. 7D). Todos os outros grupos não mostraram preferência pelo sexo dentro da prole (NE:  $t_{(6)} = 0,829$ ;  $p = 0,438$ ; PM:  $t_{(6)} = 0,662$ ;  $p = 0,544$ ; PRE+PM:  $t_{(4)} = 1,663$ ;  $p = 0,171$ ; RED+PM:  $t_{(4)} = 0,306$ ;  $p = 0,771$ ; GEST+PM:  $t_{(4)} = 1,031$ ;  $p = 0,360$ ; Fig. 7D).

### 5.1.5 Interromper o exercício no início da gestação aumenta a peroxidação lipídica no hipocampo após o desmame; já a privação maternal eleva os níveis de catalase no hipocampo após o desmame.

Analizamos a peroxidação lipídica (usando TBARS) e os níveis de catalase (CAT) após o desmame para compreender como as intervenções poderiam afetar o equilíbrio oxidativo no hipocampo, fornecendo evidências de um possível mecanismo envolvido nos desfechos comportamentais. ANOVA de duas vias com *post-hoc* de Kruskal-Wallis mostrou diferença entre os grupos no teste de TBARS ( $H = 11,82$ ;  $p = 0,037$ ; Fig. 8A). Apesar da PM não alterar a peroxidação lipídica hipocampal, o *post-hoc* de Dunn mostrou que as ratas do grupo PRE+PM apresentaram aumento na peroxidação lipídica em comparação ao grupo NE ( $p = 0,0236$ ; Fig. 8A). Nenhuma outra diferença significativa foi encontrada ( $p > 0,05$  para todas as outras comparações).

ANOVA de uma via também mostrou que havia diferença entre os grupos para os níveis de CAT ( $F_{(5, 24)} = 6,971$ ,  $p = 0,0004$ ; Fig. 8B). A PM aumentou os níveis de CAT em comparação ao grupo CT ( $p = 0,001$ ; Fig. 8B). Os grupos PRE+PM, RED+PM, IGUAL+PM e GEST+PM não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle NE, mas mostraram redução na atividade de CAT em relação ao grupo PM ( $p < 0,05$  para todas as comparações contra PM; Fig. 8B). Além disso, verificamos que o grupo GEST+PM apresentou maior atividade de CAT em comparação aos grupos PRE+PM e IGUAL+PM ( $p < 0,05$  para ambas as comparações; Fig. 8B).

Figura 8 – Resultados de marcadores de estresse oxidativo do estudo 1



Fonte: O autor (2024).

**FIGURA 8 – Marcadores de equilíbrio oxidativo no hipocampo após o desmame mudam em mães submetidas à PM e a diferentes protocolos de exercício físico. A – A PM não altera a peroxidação lipídica hipocampal das mães, mas interromper a prática de corrida no início da gestação aumenta este marcador de dano oxidativo. \*p < 0,05 teste de Dunn. B – A PM eleva níveis de CAT, e iniciar exercícios na gestação aumenta CAT comparado a interromper ou manter intensidade. \*p < 0,05 teste de Tukey. Dados mostrados como média ± DP (n = 5 por grupo). NE = Mães controle; PM = Mães submetidas à privação materna; PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM; RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM.**

### **5.1.6 A gestação reduz o comportamento exploratório das mães após o desmame; a prática de exercício físico em qualquer momento antes ou durante a gestação garante um comportamento exploratório semelhante ao nível pré-gestação**

Inicialmente, comparamos o número de cruzamentos dos diferentes nos quadrantes virtuais. Uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou uma interação de fatores (tempo e grupo:  $F_{(10, 56)} = 2,981$ ;  $p = 0,004$ ; Tabela 2), com efeito para o grupo ( $F_{(5, 28)} = 8,117$ ;  $p < 0,0001$ ; Tabela 2) e para o tempo ( $F_{(1,528, 42,79)} = 321,8$ ;  $p < 0,0001$ ; Tabela 2). Não houve diferença entre os grupos nos testes antes e durante a gestação ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Tabela 2). No entanto, as comparações múltiplas de Tukey mostraram diferenças no teste CA após o desmame. Os grupos RED+PM e IGUAL+PM cruzaram mais quadrantes virtuais em comparação com os grupos NE e PM (RED+PM vs. NE:  $p = 0,0039$ ; RED+PM vs. PM:  $p = 0,0035$ ; IGUAL+PM vs. NE:  $p = 0,005$ ; IGUAL+PM vs. PM:  $p = 0,0045$ ; Tabela 2).

Teste de campo aberto		Grupos						p
		NE	PM	PRE+PM	RED+PM	IGUAL+PM	GEST+PM	Valor
Pré acasalamento	Cruzamentos (n)	91,55 ± 13,46	94,80 ± 7,61	90,55 ± 5,38	98,89 ± 22,76	100,4 ± 22,72	105,4 ± 27,74	0,0001
	Elevações (n)	21,64 ± 7,61	23,10 ± 7,47	20,91 ± 7,90	21 ± 7,01	17,71 ± 3,71	20,86 ± 6,42	0,0196
Última semana de gestação	Cruzamentos (n)	40,27 ± 6,78	35,50 ± 4,39	29,82 ± 5,52	40,56 ± 6,2	46,18 ± 4,56	28,73 ± 6,34	0,0001
	Elevações (n)	11,60 ± 2,81	13,10 ± 4,46	11,20 ± 2,95	12,2 ± 4,14	14,4 ± 5,98	11 ± 3,64	0,0196
Pós-desmame	Cruzamentos (n)	31,50 ± 9,1	46,44 ± 22,98	*#53,20 ± 12,88	*#67,75 ± 9,16	57,78 ± 23,87	*#50,2 ± 12,73	0,0001
	Elevações (n)	15,25 ± 4,31	18,11 ± 4,32	23,20 ± 7,12	26,25 ± 7,51	17,22 ± 7,5	15,4 ± 4,43	0,0196

**Tabela 2** – A gestação reduz o comportamento exploratório; a prática de exercício físico antes ou durante a gestação retoma a exploração aos níveis pré-gestação após o desmame. Dados expressos como média ± DP (n = 8-11 por grupo). NE = Mães controle; PM = Mães submetidas à privação maternal; PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM; RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM. ANOVA de duas vidas de medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey. NE = Mães controle; PM = Mães submetidas à privação maternal; PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM; RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM.

Depois, analisamos se havia diferença dentro dos grupos ao longo dos testes. Todos os grupos cruzaram menos quadrantes virtuais durante a gestação em comparação com antes da gestação (NE:  $p < 0,0001$ ; PM:  $p < 0,0001$ ; PRE+PM:  $p < 0,0001$ ; RED+PM:  $p = 0,0007$ ; IGUAL+PM:  $p = 0,008$ ; GEST+PM:  $p = 0,005$ ; Tabela 2). Quando comparamos o número de cruzamentos após o desmame com os durante a gestação, observamos que todos os grupos que realizaram exercícios cruzaram mais quadrantes após o desmame (PRE+PM:  $p = 0,003$ ; RED+PM:  $p = 0,006$ ; IGUAL+PM:  $p = 0,009$ ; GEST+PM:  $p = 0,034$ ; Tabela 2).

Em seguida, comparamos o número de elevações realizados pelos grupos durante os testes no CA. Uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou um efeito para o tempo ( $F_{(1,844, 51,63)} = 30,12$ ;  $p < 0,0001$ ; Tabela 2). No entanto, o pós-teste de Tukey não mostrou nenhuma diferença entre os grupos ( $p > 0,05$  para todas as comparações). Quando realizamos uma comparação intragrupo ao longo do tempo, vimos que os grupos NE, PM e IGUAL+PM realizaram mais elevações antes da gestação do que na última semana de gestação (NE:  $p = 0,007$ ; PM:  $p = 0,02$ ; IGUAL+PM:  $p = 0,001$ ; Tabela 2). Os grupos PRE+PM e RED+PM realizaram mais elevações após o desmame do que antes da gestação (PRE+PM:  $p = 0,02$ ; RED+PM:  $p = 0,041$ ; Tabela 2). O grupo GEST+PM não apresentou diferenças entre os testes ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Tabela 2).

#### **5.1.7 O exercício físico, a PM, ou a sua combinação não alteram o comportamento tipo-ansioso em fêmeas adultas, antes, durante, ou após a gestação**

Analisamos se havia diferença no tempo gasto nos braços abertos entre os grupos e dentro dos grupos ao longo do tempo utilizando o LCE. Uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou que não houve diferença em nenhuma das comparações ( $F_{(10, 56)} = 0,399$ ;  $p = 0,927$ ; Tukey:  $p > 0,05$  para todas as comparações; Tabela 3).

Em seguida, analisamos se havia diferença no número de entradas nos braços abertos entre os grupos nos testes e dentro dos grupos ao longo do

tempo. Uma ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou efeito para o tempo ( $F_{(1,671, 46,79)} = 8,11$ ;  $p = 0,001$ ) e para o grupo ( $F_{(5, 28)} = 2,65$ ;  $p = 0,044$ ), mas sem interação entre os fatores ( $F_{(10, 56)} = 0,66$ ;  $p = 0,752$ ). No entanto, o pós-teste de Tukey não mostrou nenhuma diferença entre os grupos ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Tabela 3).

Labirinto em cruz elevado		Grupos					p Valor	
		NE	PM	PRE+PM	RED+PM	IGUAL+PM		GEST+PM
Pré acasalamento	Tempo nos braços abertos (s)	107,3 ± 29,99	98,13 ± 43,11	100 ± 22,54	112,3 ± 29,81	101 ± 15,69	108,4 ± 21,60	0,932
	Entradas nos braços abertos (n)	7,429 ± 1,718	8,0 ± 2,50	8,26 ± 3,30	11,88 ± 2,29	8,5 ± 2,2	9,44 ± 3,28	0,732
Última semana de gestação	Tempo nos braços abertos (s)	91,29 ± 26,25	82,25 ± 32,43	103 ± 16,23	98,13 ± 12,39	103,5 ± 30,58	102,8 ± 33,04	0,932
	Entradas nos braços abertos (n)	7,714 ± 2,812	7,87 ± 3,62	7,85 ± 2,03	8,62 ± 3,06	8,62 ± 1,92	8,22 ± 2,48	0,732
Pós-desmame	Tempo nos braços abertos (s)	98,14 ± 14,79	96,13 ± 11,57	103,4 ± 24,09	104,4 ± 19,23	93,5 ± 13,19	105,7 ± 34,34	0,932
	Entradas nos braços abertos (n)	9,571 ± 2,070	11,25 ± 2,76	9,85 ± 4,59	11,63 ± 4,06	11,63 ± 4,06	9,4 ± 2,61	0,732

**Tabela 3 – Nem a privação maternal (PM), nem o exercício afetaram o tempo gasto ou o número de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em nenhum momento avaliado.** NE = Mães não submetidas à exercício físico. PM = Mães submetidas à privação maternal. PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM. RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM. IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à MS. GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM. ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. Os dados são expressos como média ± DP (n = 7-9 por grupo). NE = Mães controle; PM = Mães submetidas à privação maternal; PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM; RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM; GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM.

## **5.2 Estudo 2**

No segundo estudo que compõe a presente tese, investigamos os efeitos do treino aeróbico e destreino durante a gestação, assim como da PM, sobre a memória e comportamento da prole de ambos os sexos já na fase adulta da vida.

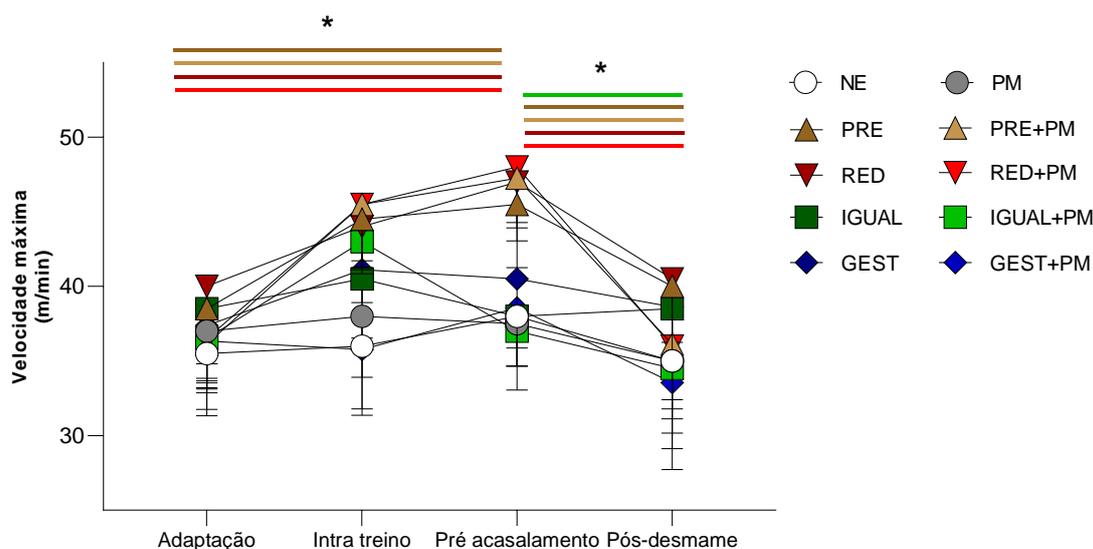
No presente estudo, além de avaliar os impactos do EM e da PM sobre a prole, um dos nossos objetivos foi avaliar se o EM por si só poderia melhorar a memória da prole. Para isso, 4 grupos foram adicionados em comparação ao estudo 1: PRÉ+CT, RED+CT, IGUAL+CT, e GEST+CT.

### **5.2.1 Parar ou reduzir a intensidade do exercício no início da gestação causa destreino das mães após o desmame**

Embora esta análise já tenha sido considerada no primeiro estudo, foi realizada novamente considerando que o segundo estudo inclui mais grupos experimentais.

Inicialmente, analisamos se havia diferenças na capacidade aeróbica das mães nos três momentos em que foram testadas: um mês antes da gestação (quando apenas os grupos PRE, RED e IGUAL começaram a se exercitar), duas semanas antes da gestação, imediatamente antes do acasalamento, e após o desmame. Uma ANOVA de dois fatores para medidas repetidas revelou efeitos significativos para o fator tempo ( $F_{(2,921, 248,3)} = 45,09$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 9), e intervenção ( $F_{(9, 85)} = 11,17$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 9), além de interação entre os fatores ( $F_{(27, 255)} = 3,69$ ;  $p < 0,0001$ ; Fig. 9).

Figura 9 – Resultados dos testes de  $VO_{2\text{máx}}$  das mães do estudo 2



Fonte: O autor (2024).

**Figura 9 - Correr a 60-70% do  $VO_{2\text{máx}}$  indireto aumentou a velocidade máxima de corrida após duas semanas de treinamento. Parar ou reduzir a intensidade da corrida durante a gestação causou destreino após o desmame.**  $p < 0,05$ , ANOVA de dois fatores para medidas repetidas seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. As cores das linhas indicam os grupos nos quais foram encontradas diferenças entre os testes. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP ( $n = 8-10$  por grupo). Adaptação = teste realizado após uma semana de adaptação à esteira; Intra treino = teste realizado após duas semanas de treinamento; Pré-acasalamento = teste realizado após quatro semanas de treinamento; Pós-desmame = teste realizado após o desmame. NE = Mães não submetidas à exercício físico. NE = mães não-exercitadas. PM = Mães submetidas à privação materna. PRE = mães exercitadas somente antes da gestação, não submetidas à PM. RED = mães que reduziram a intensidade do exercício de antes para durante a gestação. IGUAL = mães que realizaram exercício antes e durante a gestação em igual intensidade. GEST = mães que se exercitaram somente durante a gestação. PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM. RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM. IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM. GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM.

No primeiro momento de teste do estudo (adaptação), as ratas de todos os grupos apresentaram valores similares de  $VO_{2\text{máx}}$  indireto ( $p > 0,05$  para todas as comparações ANOVA de dois fatores para medidas repetidas).

Duas semanas após o início dos exercícios, as mães dos grupos PRE+CT ( $p = 0,003$ ), PRE+PM ( $p = 0,003$ ), RED+CT ( $p = 0,005$ ), RED+PM ( $p = 0,002$ ) e IGUAL+PM ( $p = 0,003$ ) demonstraram maior capacidade aeróbica em comparação ao grupo NE+CT (Fig. 9). Além disso, os grupos PRE+CT ( $p = 0,02$ ), PRE+PM ( $p = 0,02$ ), RED+CT ( $p = 0,04$ ) e RED+PM ( $p = 0,02$ ) apresentaram maior capacidade aeróbica em comparação ao grupo NE+PM. Por fim, os grupos

PRE+PM ( $p = 0,005$ ), RED+PM ( $p = 0,004$ ) e IGUAL+PM ( $p = 0,044$ ) demonstraram maior capacidade aeróbica em comparação ao grupo GEST+PM (Fig. 9).

Antes do acasalamento, os grupos PRE+CT, PRE+PM, RED+CT e RED+PM mantiveram melhor capacidade aeróbica em comparação aos grupos NE+CT (PRE+CT  $p = 0,01$ ; PRE+PM  $p = 0,0004$ ; RED+CT  $p = 0,001$ ; RED+PM  $p = 0,0004$ ) e NE+PM (PRE+CT  $p = 0,004$ ; PRE+PM  $p = 0,0001$ ; RED+CT  $p = 0,0004$ ; RED+PM  $p = 0,0002$ ) (Fig. 9). Ambos os grupos PRE também apresentaram capacidade aeróbica superior aos grupos IGUAL ( $p < 0,05$  para todas as comparações; Fig. 9).

Após o desmame, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Fig. 9).

Quando analisamos a mudança de capacidade aeróbica de cada grupo, observamos que NE+CT e NE+PM não apresentaram mudanças na capacidade aeróbica ao longo do tempo ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Fig. 9). Já as ratas dos grupos PRE+CT, PRE+PM, RED+CT e RED+PM aumentaram a capacidade aeróbica no momento pré-acasalamento em comparação ao primeiro teste (PRE+CT  $p = 0,02$ ; PRE+PM  $p = 0,02$ ; RED+CT  $p = 0,01$ ; RED+PM  $p = 0,001$ ; Fig. 9). Contudo, após o desmame, todos os grupos retornaram aos níveis iniciais (Adaptação vs. Pós-desmame: PRE+CT  $p = 0,906$ ; PRE+PM  $p > 0,99$ ; RED+CT  $p = 0,99$ ; RED+PM  $p = 0,99$ ; Fig. 9), indicando destreinamento durante a gestação ou lactação.

As ratas dos grupos IGUAL+CT e IGUAL+PM não apresentaram aumento na capacidade aeróbica após 4 semanas de treinamento em baixa intensidade (Habitação vs. Pré-acasalamento: IGUAL+CT  $p = 0,99$ ; IGUAL+PM  $p = 0,99$ ; Fig. 9). Contudo, o grupo IGUAL+PM mostrou destreinamento após o desmame (Intra treino vs. Pós-desmame: IGUAL+PM  $p = 0,005$ ; Fig. 9) enquanto o IGUAL+CT não ( $p = 0,58$ ; Fig. 9), sugerindo que o estresse causado pela PM pode impactar a capacidade aeróbica devido ao estresse durante a lactação.

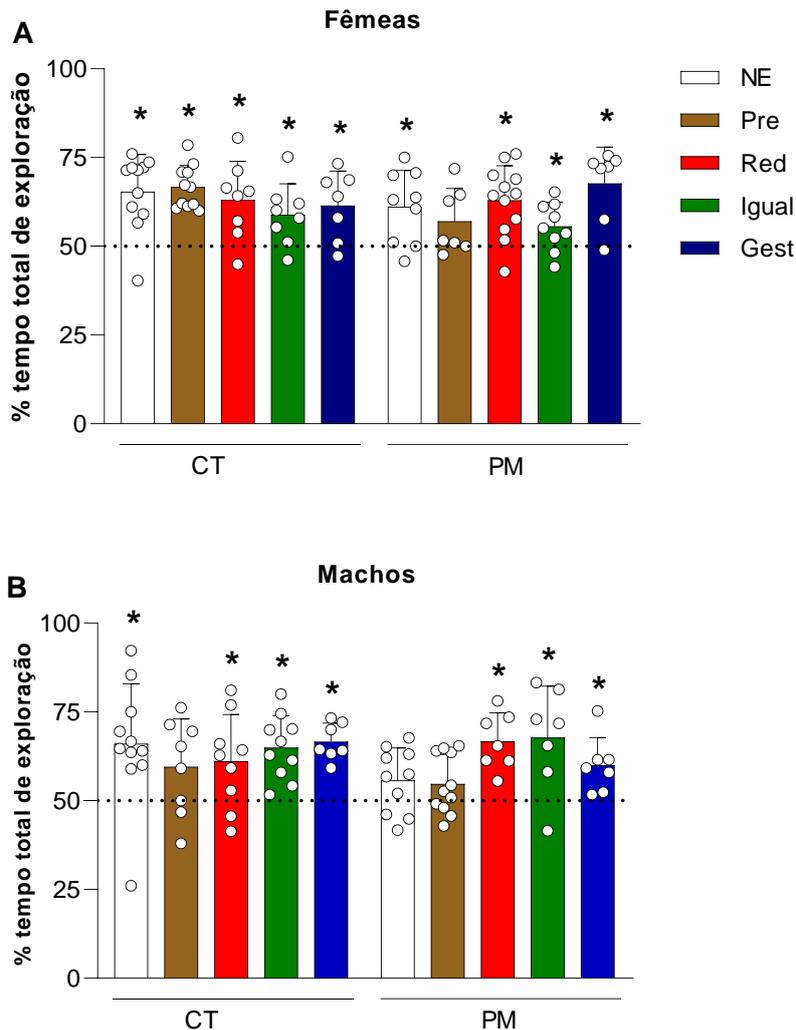
Apesar de não realizar exercício antes da gestação, o grupo GEST+CT mostrou aumento na capacidade aeróbica antes do acasalamento em comparação ao primeiro teste (Adaptação vs. Pré-acasalamento:  $p = 0,043$ ; Fig.

9), embora essa diferença não tenha persistido após o desmame (Pré-acasalamento vs. Pós-desmame:  $p = 0,52$ ; Fig. 9). Por fim, as ratas do grupo GEST+PM não apresentaram mudanças na capacidade aeróbica em nenhum momento ( $p > 0,05$  para todas as comparações; Fig. 9).

### **5.2.2 A prole de machos CT e fêmeas PM de mães que param de se exercitar no início da gestação apresentam déficit de memória na fase adulta da vida; a PM causa déficit de memória em machos que são prevenidos por exercício em qualquer intensidade durante a gestação**

Em relação à prole de fêmeas, todos os grupos, exceto o PRE+PM, demonstraram consolidação da memória, explorando por mais de 50% do tempo total de exploração o objeto novo, indicando capacidade de lembrar o objeto apresentado 24 horas antes (CT:  $t_{(10)} = 4,84$ ;  $p = 0,0007$ ; PM:  $t_{(8)} = 3,27$ ;  $p = 0,011$ ; PRE:  $t_{(10)} = 9,07$ ;  $p < 0,0001$ ; PRE+PM:  $t_{(4)} = 2,02$ ;  $p = 0,089$ ; RED:  $t_{(7)} = 3,35$ ;  $p = 0,012$ ; RED+PM:  $t_{(11)} = 4,61$ ;  $p = 0,0007$ ; IGUAL:  $t_{(7)} = 2,89$ ;  $p = 0,023$ ; IGUAL+PM:  $t_{(8)} = 2,46$ ;  $p = 0,039$ ; GEST:  $t_{(4)} = 3,12$ ;  $p = 0,02$ ; GEST+PM:  $t_{(4)} = 4,56$ ;  $p = 0,0038$ ; Fig. 10A). Esses resultados sugerem que a combinação de as mães interromperem o exercício no início da gestação, gerando destreino, e serem separadas de sua prole por algumas horas diariamente (PM) afeta negativamente a consolidação da memória na prole de fêmeas.

Figura 10 – Resultados da tarefa de reconhecimento de objetos do estudo 2



Fonte: O autor (2024).

Figura 10 – **O regime de exercício físico das mães durante a gestação afeta de forma diferente a memória de reconhecimento de objetos (RO) da prole de fêmeas e de machos na idade adulta.** **A** – Porcentagem do tempo gasto explorando o novo objeto durante o teste de RO em fêmeas. **B** – Porcentagem do tempo gasto explorando o novo objeto durante o teste de RO em machos. Os pontos representam a porcentagem do tempo total de exploração de cada animal dedicada ao novo objeto. NE = mães não-exercitadas. CT = prole controle. PM = Mães submetidas à privação materna. PRE = mães exercitadas somente antes da gestação, não submetidas à PM. RED = mães que reduziram a intensidade do exercício de antes para durante a gestação. IGUAL = mães que realizaram exercício antes e durante a gestação em igual intensidade. GEST = mães que se exercitaram somente durante a gestação. \* p < 0,05, teste t de Student comparado a uma média teórica de 50%. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 7–12 por grupo).

Em relação à prole de machos, a PM causou déficits de memória (CT:  $t_{(10)} = 3,14$ ;  $p = 0,01$ ; PM:  $t_{(9)} = 1,97$ ;  $p = 0,079$ ; Fig. 10A). Interromper os exercícios no início da gestação, combinado ou não com PM, também levou a déficits de

reconhecimento de objetos (RO) (PRE:  $t_{(7)} = 2,0$ ;  $p = 0,085$ ; PRE+PM:  $t_{(10)} = 1,86$ ;  $p = 0,092$ ; Fig. 10A). Por outro lado, todos os outros protocolos de exercício foram capazes de manter a memória de animais controle não submetidos à PM, e de prevenir os déficits de memória induzidos por PM na prole masculina (RED:  $t_{(8)} = 2,54$ ;  $p = 0,034$ ; RED+PM:  $t_{(4)} = 5,50$ ;  $p = 0,001$ ; IGUAL:  $t_{(9)} = 5,23$ ;  $p = 0,0005$ ; IGUAL+PM:  $t_{(4)} = 3,25$ ;  $p = 0,01$ ; GEST:  $t_{(4)} = 8,41$ ;  $p = 0,0002$ ; GEST+PM:  $t_{(4)} = 3,35$ ;  $p = 0,001$ ; Fig. 10A).

Além disso, a ANOVA de dois fatores não revelou diferenças no tempo total gasto explorando os objetos durante o teste de RO na prole feminina (PM:  $F_{(1,79)} = 0,002$ ;  $p = 0,96$ ; EM:  $F_{(4,79)} = 0,93$ ;  $p = 0,44$ ; Interação:  $F_{(4,79)} = 1,02$ ;  $p = 0,40$ ; Tabela 4). Contudo, foi encontrado efeito da PM nos machos ( $F_{(1,77)} = 5,61$ ;  $p = 0,02$ ; Exercício:  $F_{(4,77)} = 2,43$ ;  $p = 0,054$ ; Interação:  $F_{(4,77)} = 1,19$ ;  $p = 0,32$ ; Tabela 4), embora o teste post hoc de Tukey não tenha revelado diferenças significativas entre os grupos.

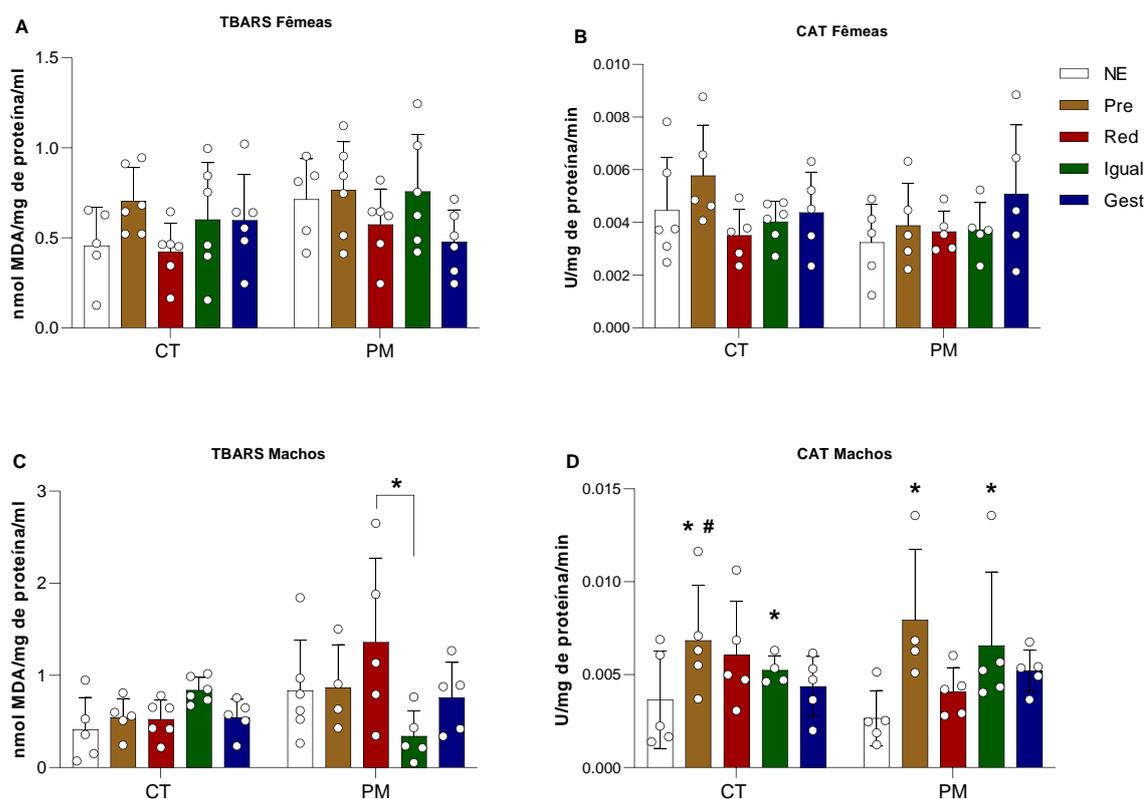
Tempo total de exploração no teste de RO		Grupos					P Valor
		NE	PRE	RED	IGUAL	GEST	
Fêmeas	Controle (s)	60,73 ± 22,33	59,55 ± 23,12	69 ± 27,97	43 ± 21,43	62,71 ± 29	0,321
	PM (s)	56,11 ± 23,12	53,57 ± 16,42	62 ± 16,05	61,89 ± 20,97	62,57 ± 29	
Machos	Controle (n)	48,0 ± 22,59	52,88 ± 29,09	38,85 ± 13,17	51,0 ± 21,10	72,86 ± 21,75	0,401
	PM (n)	44,0 ± 10,65	44,73 ± 13,40	41,14 ± 7,24	38,43 ± 13,17	47,43 ± 21,98	

Tabela 4 – A privação materna e o regime de exercício físico materno durante a gestação não alteram o tempo total de exploração na tarefa de reconhecimento de objetos pelos filhos na idade adulta. Dados expressos como média ± DP (n = 7-12 por grupo). NE = Não exercitado. PM = Privação materna. PRE = Filhos de mães que se exercitaram apenas antes da gestação e não foram submetidas à PM. PRE+PM = Filhos de mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM. RED = Filhos de mães que se exercitaram antes e reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e não foram submetidas à PM. RED+PM = Filhos de mães que se exercitaram antes e reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM. IGUAL = Filhos de mães que se exercitaram antes e durante a gestação na mesma intensidade e não foram submetidas à PM. IGUAL+PM = Filhos de mães que se exercitaram antes e durante a gestação na mesma intensidade e foram submetidas à PM. GEST = Filhos de mães que se exercitaram apenas durante a gestação e não foram submetidas à PM. GEST+PM = Filhos de mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM. ANOVA de dois fatores seguida de *post-hoc* de Tukey.

### 5.2.3 O EM, a PM e sua combinação não afetam a peroxidação lipídica ou níveis de catalase em fêmeas; ambos grupos de PRE e IGUAL apresentam maiores níveis de catalase que o grupo CT em machos

Não observamos efeitos do EM ou da PM no dano à membrana celular hipocampal (TBARS;  $F_{(4, 48)} = 1,015$ ;  $p = 0,408$ ; Fig. 11A) ou nos níveis de CAT ( $F_{(1, 46)} = 1,409$ ;  $p = 0,241$ ; Fig. 11B) em fêmeas.

Figura 11 – Resultados de marcadores de estresse oxidativo do estudo 2



Fonte: O autor (2024).

**FIGURA 11 – O EM e a PM provocam alterações no equilíbrio oxidativo hipocampal da prole masculina adulta, mas não na feminina.** A – Dano oxidativo à membrana celular (TBARS) hipocampal em fêmeas. B – Níveis de catalase (CAT) hipocampal na prole feminina. C – Dano oxidativo à membrana celular (TBARS) hipocampal em machos. D – Níveis de catalase (CAT) hipocampal na prole de machos. NE = prole de mães não-exercitadas. CT = prole controle. PM = prole submetida à privação materna. PRE = prole de mães exercitadas somente antes da gestação, não submetidas à PM. RED = prole de mães mães que reduziram a intensidade do exercício de antes para durante a gestação. IGUAL = prole de mães mães que realizaram exercício antes e durante a gestação em igual intensidade. GEST = prole de mães mães que se exercitaram somente durante a gestação. \* $p < 0,05$  teste *post-hoc* de Tukey em comparação com NE+CT. # $p < 0,05$  teste *post-hoc* de Tukey em comparação com NE+PM. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP ( $n = 4-6$  por grupo).

Por outro lado, observamos um efeito do PM nos resultados de TBARS em machos ( $F_{(4, 42)} = 4,856$ ;  $p = 0,033$ ; Fig. 11C), com uma interação entre os fatores ( $F_{(4, 42)} = 3,603$ ;  $p = 0,01$ ; Fig. 11C). O *post-hoc* de Tukey mostrou que a prole de machos do grupo RED+PM apresentou aumento no dano à membrana em comparação com à do grupo IGUAL+PM ( $p = 0,0141$ ; Fig. 11C).

Quando analisamos os níveis de CAT nos machos, observamos um efeito significativo do EM ( $F_{(4, 42)} = 3,703$ ;  $p = 0,011$ ; Fig. 11D). O *post-hoc* de Tukey indicou que os grupos PRE+CT ( $p = 0,0006$ ), IGUAL+CT ( $p = 0,016$ ), PRE+PM ( $p = 0,0037$ ) e IGUAL+PM ( $p = 0,037$ ) apresentaram níveis mais altos de CAT em comparação com NE+CT (Fig. 11C). Além disso, os ratos do grupo PRE+CT também apresentaram níveis mais elevados de CAT do que o grupo NE+PM ( $p = 0,002$ ; Fig. 11C).

#### **5.2.4 O EM e a PM não alteram o comportamento exploratório da prole adulta**

Inicialmente analisamos se os possíveis efeitos do EM e da PM no comportamento exploratório e locomotor da prole de fêmeas no CA. ANOVA de dois fatores não mostrou efeito do EM ( $F_{(4, 81)} = 0,32$ ;  $p = 0,86$ ; Tabela 5) nem da PM ( $F_{(1, 81)} = 0,345$ ;  $p = 0,55$ ; Tabela 5) sobre os cruzamentos ou elevações (EM:  $F_{(4, 80)} = 0,66$ ;  $p = 0,61$ ; PM:  $F_{(1, 80)} = 0,415$ ;  $p = 0,52$ ; Tabela 5). Resultados semelhantes foram observados na prole de machos. Nem o EM nem a PM tiveram qualquer efeito no comportamento da prole de machos na idade adulta, conforme número de cruzamentos (EM:  $F_{(4, 76)} = 0,48$ ;  $p = 0,74$ ; PM:  $F_{(1, 76)} = 2,26$ ;  $p = 0,13$ ; Tabela 5) ou elevações (EM:  $F_{(4, 77)} = 0,67$ ;  $p = 0,61$ ; PM:  $F_{(1, 77)} = 0,098$ ;  $p = 0,75$ ; Tabela 5).

Campo aberto		Grupos					P Valor	
		NE	PRE	RED	IGUAL	GEST		
Fêmeas	Cruzamentos (s)	CT	72,27 ± 18,14	65,45 ± 15,08	64,38 ± 23,57	64,44 ± 23,08	67 ± 20,13	0,71
		PM	69,7 ± 16,23	72,29 ± 21,65	73,92 ± 23,2	70,56 ± 18,58	59,71 ± 21,41	
	Elevações (n)	CT	11,36 ± 3,95	11,45 ± 6,51	9,69 ± 3,33	11,11 ± 3,4	12,86 ± 5,08	0,42
		PM	10,44 ± 3,64	9,42 ± 4,54	13,25 ± 7,04	13,89 ± 5,06	13 ± 6,83	
Machos	Cruzamentos (s)	CT	57,45 ± 15,56	54,25 ± 14,21	73,56 ± 22,43	57,89 ± 20,36	62,14 ± 17,85	0,36
		PM	67,4 ± 17,27	67,91 ± 19,02	62,73 ± 22,48	66 ± 22,7	73,29 ± 20,94	
	Elevações (n)	CT	13,09 ± 4,92	12,13 ± 5,71	10,78 ± 5,19	10,70 ± 3,91	10,71 ± 4,46	0,91
		PM	12,10 ± 5,58	12,10 ± 5,78	12,43 ± 3,35	10,14 ± 3,71	10,14 ± 5,24	

**Tabela 5 – A privação materna e o exercício não alteram o comportamento exploratório e locomotor da prole de ratos machos e fêmeas.** Dados expressos como média ± DP (n = 7-12 por grupo). CT = prole de mães controle. PM = Mães submetidas à privação materna. PRE+PM = Mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM. RED+PM = Mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM. IGUAL+PM = Mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM. GEST+PM = Mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM. ANOVA de dois fatores seguida de *post-hoc* de Tukey.

### **5.2.5 O EM e a PM não alteram o comportamento tipo-ansioso da prole na idade adulta**

Não observamos nenhum efeito de qualquer intervenção no tempo gasto nos braços abertos (EM:  $F_{(4, 81)} = 1,15$ ;  $p = 0,33$ ; PM:  $F_{(1, 81)} = 0,67$ ;  $p = 0,41$ ; Tabela 6) ou no número de entradas nos braços abertos (EM:  $F_{(4, 81)} = 0,62$ ;  $p = 0,64$ ; PM:  $F_{(1, 81)} = 1,38$ ;  $p = 0,24$ ; Tabela 6) na prole de fêmeas, ou de machos (Tempo: EM:  $F_{(4, 76)} = 1,1$ ;  $p = 0,36$ ; PM:  $F_{(1, 76)} = 0,09$ ;  $p = 0,76$ ; Entradas: EM:  $F_{(4, 76)} = 0,77$ ;  $p = 0,54$ ; PM:  $F_{(1, 76)} = 2,06$ ;  $p = 0,15$ ; Tabela 6). O teste *post-hoc* de Tukey também não revelou diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos sexos ( $p > 0,05$  para todas as comparações).

Labirinto em cruz elevado		Grupos					P Valor	
		NE	PRE	RED	IGUAL	GEST		
Fêmeas	Tempo nos braços abertos (s)	CT	81,55 ± 26,89	82,55 ± 39,72	99,25 ± 43,17	83,67 ± 34,72	81,29 ± 19,56	0,72
		PM	75,20 ± 25,39	96,86 ± 27,02	95,42 ± 17,46	95,44 ± 20,48	90,43 ± 15,51	
	Entradas nos braços abertos (n)	CT	11,36 ± 3,95	11,45 ± 6,51	9,69 ± 3,33	11,11 ± 3,4	12,86 ± 5,08	0,58
		PM	10,44 ± 3,64	9,42 ± 4,54	13,25 ± 7,04	13,89 ± 5,06	13 ± 6,83	
Machos	Tempo nos braços abertos (s)	CT	81,55 ± 26,89	82,55 ± 39,72	99,25 ± 43,17	83,67 ± 34,72	81,29 ± 19,56	0,91
		PM	75,20 ± 25,39	96,86 ± 27,02	95,42 ± 17,46	95,44 ± 20,48	90,43 ± 15,51	
	Entradas nos braços abertos (n)	CT	8,9 ± 4,36	8,27 ± 4,31	8,12 ± 5,56	9,11 ± 6,03	8,14 ± 2,73	0,88
		PM	11,20 ± 5,8	7,71 ± 3,45	15,25 ± 17,45	8,22 ± 3,86	10 ± 5,5	

**Table 6 – Nem a privação maternal (PM) nem o exercício afetaram o tempo gasto ou o número de entradas nos braços abertos no EPM em qualquer momento.** Dados expressos como média ± DP (n = 7-12 por grupo). NE = prole de mães não exercitadas. PM = prole de mães submetidas à privação maternal. CT = prole controle, não submetida à PM. PRE+PM = prole de mães que se exercitaram apenas antes da gestação e foram submetidas à PM. RED+PM = prole de mães que reduziram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM. IGUAL+PM = prole de mães que mantiveram a intensidade do exercício durante a gestação e foram submetidas à PM. GEST+PM = prole de mães que se exercitaram apenas durante a gestação e foram submetidas à PM. ANOVA de dois fatores seguida de *post-hoc* de Tukey.

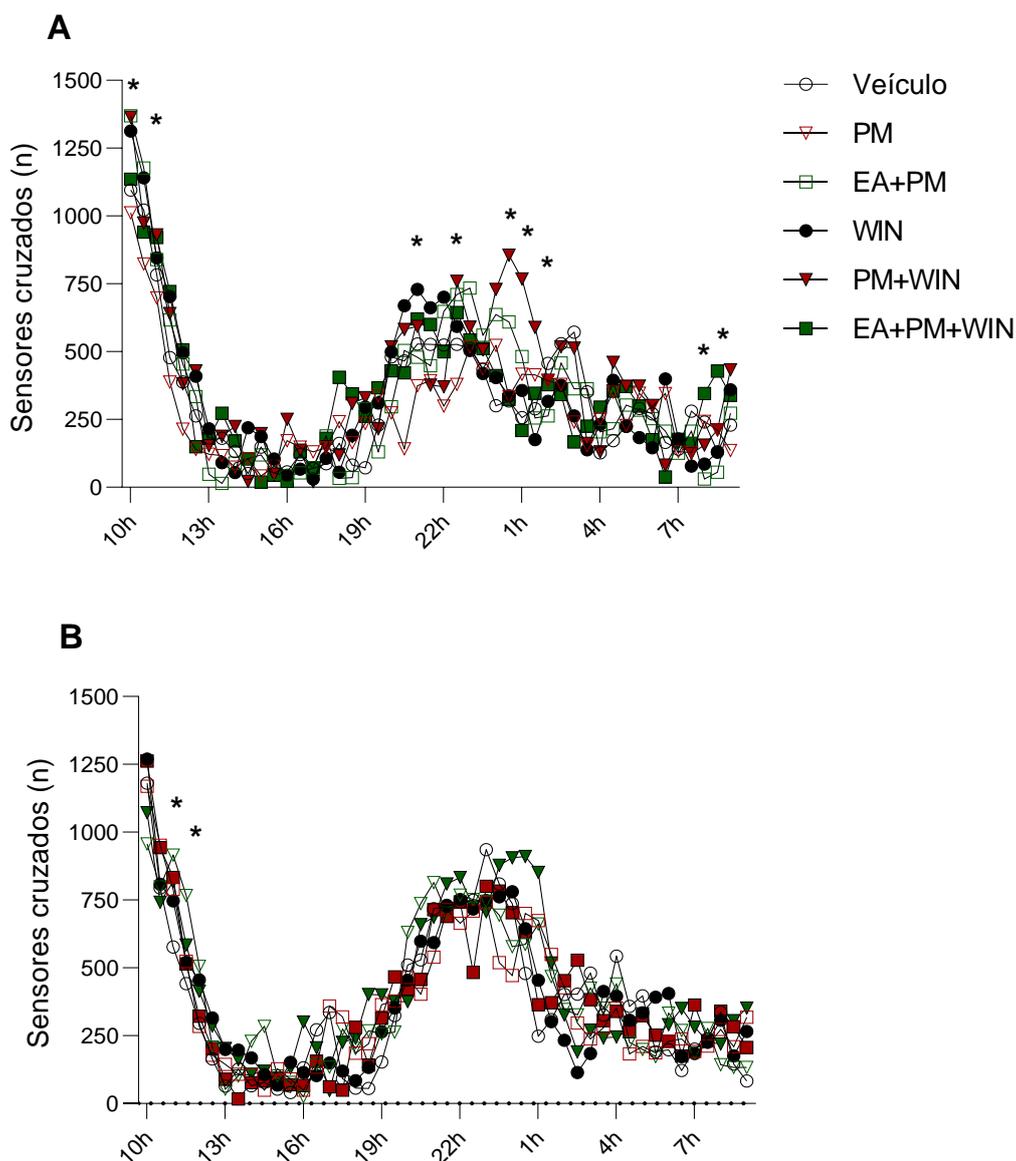
### **5.3 Estudo 3**

No terceiro estudo que compõe a presente tese investigamos os efeitos da moradia complexa, uma intervenção que inclui prática de exercício físico voluntário, e de exercício cognitivo associados ao enriquecimento ambiental, sobre a memória e comportamento da prole de ambos os sexos submetida à PM, já na fase adulta da vida.

#### **5.3.1 Efeitos de combinações de EA durante a gestação, PM, e infusão de agonista canabinóide sobre a atividade na caixa moradia**

ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostrou que houve efeito do tempo durante as 23h de teste de atividade na caixa moradia ( $F_{(15,28, 611,1)} = 34,17$ ;  $p < 0,0001$ ). O *post-hoc* demonstrou que os filhotes machos PM que receberam injeção de WIN 55 se moveram mais dentro da caixa moradia que o grupo PM e Veículo na primeira meia hora pós injeção (Fig. 12A; 10h;  $p = 0,04$ ). Ainda, a prole EA+PM também se moveu mais que a prole PM na primeira hora pós injeção (Fig. 12A; 10h;  $p = 0,03$ ).

Figura 12 – Resultados da caixa de atividades do estudo 3



Fonte: O autor (2024).

**Figura 12 - A – Sensores cruzados na caixa de atividades durante 23h após a injeção ou não de WIN 55 em machos.** A prole PM+WIN se move mais durante o dia, e a prole EA+PM se move mais durante a noite comparados à prole PM. **B - Sensores cruzados na caixa de atividades durante 23h após a injeção ou não de WIN 55 em fêmeas.** O grupo EA+PM move-se mais na caixa moradia comparado ao grupo veículo 1h após a injeção de veículo em ambos os grupos. Veículo = animais que receberam injeção de PBS. PM = animais que foram submetidos à privação materna. EA = prole de mães que viveram em ambiente enriquecido durante a gestação. WIN = animais que receberam injeção de WIN 55-2,1,2. \*  $p < 0,05$ . ANOVA de duas vias de medidas repetidas com *post-hoc* de Fisher. Dados mostrados como média  $\pm$  DP (n = 7-10 por grupo).

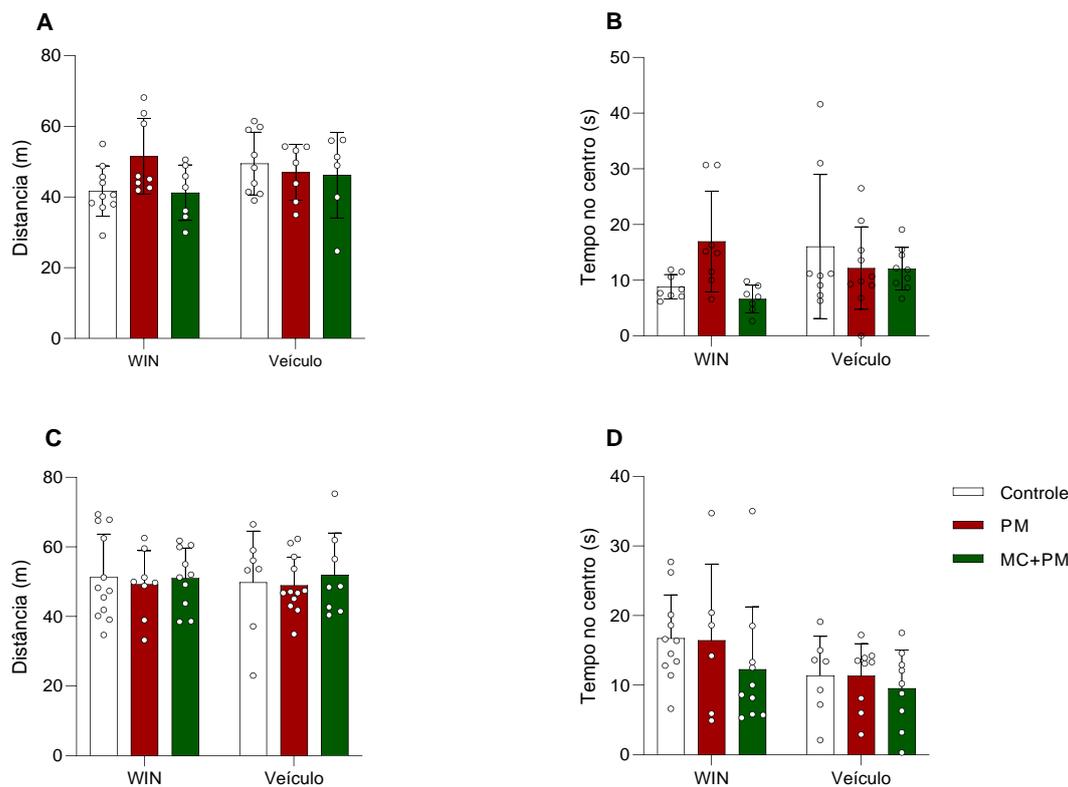
Ainda, por algumas vezes durante o período noturno, o grupo WIN se moveu mais na caixa moradia em comparação à prole PM (Fig. 12A; 20h30,  $p = 0.001$ ; 22h,  $p = 0,03$ ) e a prole PM+WIN (00h,  $p = 0.035$ ; 0h30,  $p = 0.0004$ ). Por fim, o grupo EA+PM+WIN se movimentou mais na caixa moradia durante a primeira hora do ciclo claro (22h após a injeção) comparado ao grupo EA+PM (Fig. 12A; 8h,  $p = 0.03$ ; 8h30,  $p = 0,02$ ) e PM (Fig. 12A; 8h,  $p = 0,01$ ).

Analisando o comportamento das fêmeas na caixa moradia encontramos efeito do tempo ( $F_{(15,05, 707,8)} = 36,80$ ). O *post-hoc* demonstrou que o grupo EA+PM moveu-se mais na caixa de atividades uma hora após a injeção quando comparado ao grupo veículo (11h,  $p = 0,03$  e 11h30,  $p = 0,04$ ; Fig. 12B), sem maiores diferenças ao longo do restante do tempo de teste.

### **5.3.2 Nem o EA gestacional, nem a PM, nem a infusão de agonista canabinoide, nem suas combinações, afetam o comportamento exploratório em animais jovem-adultos**

Quando avaliamos o comportamento exploratório do animais a partir da distância percorrida no CA, não encontramos efeitos dos tratamentos nos machos ( $F_{(2, 41)} = 2,046$ ;  $p = 0,14$ ; Fig. 13A), nem diferenças entre os grupos no *post-hoc* ( $p > 0,05$  para todas comparações). Apesar da ANOVA de duas vias ter mostrado interação de fatores (WIN x PM x EA;  $F_{(2, 44)} = 3,260$ ;  $p = 0,04$ ; Fig. 13B) para o tempo que os animais passaram no centro do CA durante o teste, o teste *post-hoc* não encontrou diferenças entre os grupos ( $p > 0,05$  para todas comparações).

Figura 13 – Resultados do teste de campo aberto do estudo 3



Fonte: O autor (2024).

**Figura 13. A e B – Distância percorrida e tempo no centro durante o teste de campo aberto (10min) após a injeção de WIN 55 ou veículo em machos.** Sem efeitos para EA, PM ou injeções. **C e D - Distância percorrida e tempo no centro durante o teste de campo aberto (10min) após a injeção de WIN 55 ou veículo em fêmeas.** Sem efeitos para EA, PM ou injeções. Veículo = animais que receberão injeção de PBS. PM = animais que foram submetidos à privação maternal. EA = prole de mães que viveram em ambiente enriquecido durante a gestação. WIN = animais que receberam injeção de WIN 55-2,1,2. ANOVA de duas vias com *post-hoc* de Tukey. Dados mostrados como média  $\pm$  DP (n = 6-10 por grupo).

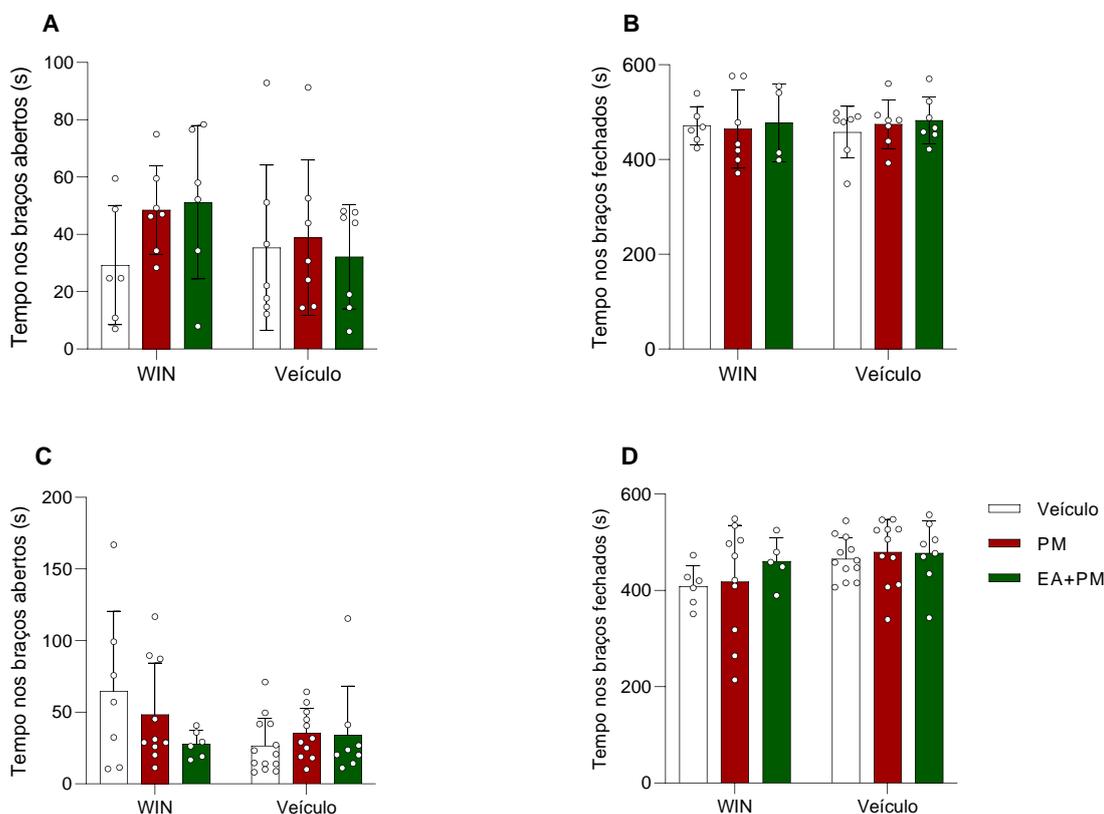
Ao avaliarmos as fêmeas, não encontramos nenhum efeito ou diferenças tanto na distância percorrida durante o teste ( $F_{(1, 35)} = 0,024$ ;  $p = 0,87$ ; Fig. 13C) e no tempo que os animais passaram na região central do aparato ( $F_{(2, 46)} = 0,1844$ ;  $p = 0,83$ ; Fig. 13D).

### 5.3.3 EA gestacional, PM, infusão de agonista CBr via i.p, ou suas combinações, não alteram o estado tipo-ansioso dos animais

Ao avaliar o estado tipo-ansioso dos animais observamos que, para a prole de animais machos, não houve efeito ou interação entre os fatores no tempo que os animais passaram nos braços abertos ( $F_{(2, 34)} = 0,9522$ ;  $p = 0,39$ ;

Fig. 14A), assim como tempo que os animais passaram nos braços fechados ( $F_{(2, 32)} = 0,1372$ ;  $p = 0,87$ ; Fig. 14B).

Figura 14 – Resultados do labirinto em cruz elevado do estudo 3



Fonte: O autor (2024).

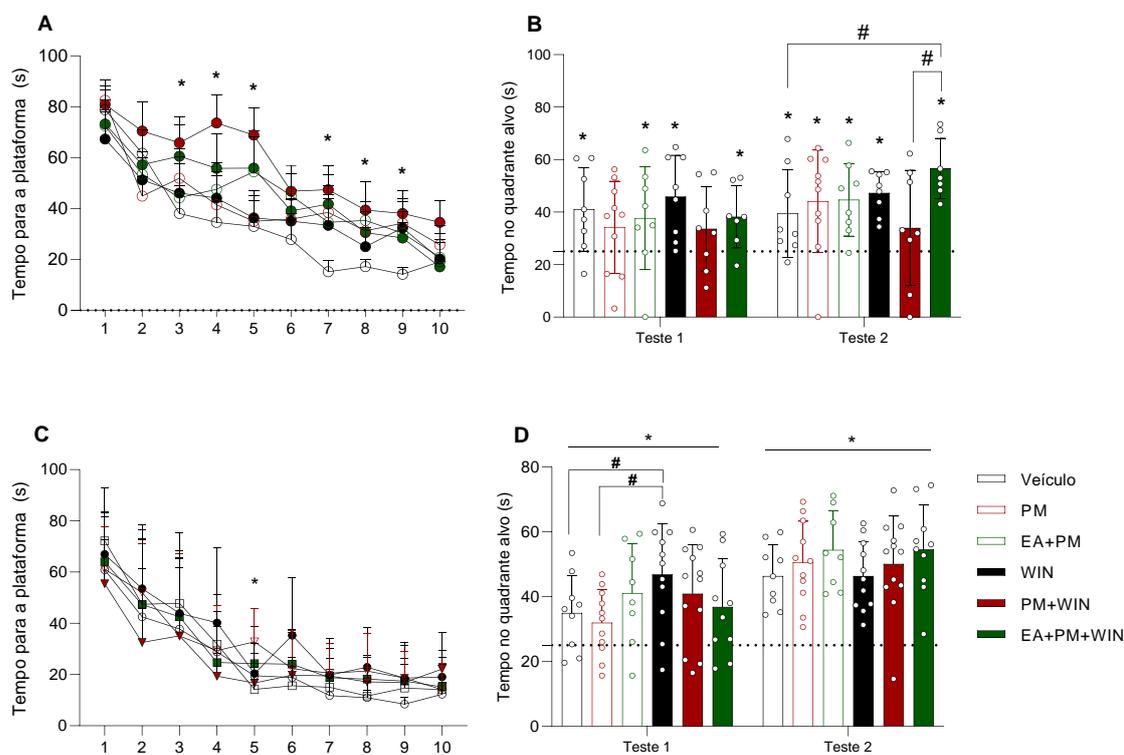
**Figura 14. A e B – Tempo nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado (10min) após a injeção de WIN 55 ou veículo em machos.** Sem efeitos para EA, PM ou injeções. **C e D - Tempo nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado (10min) após a injeção de WIN 55 ou veículo em fêmeas.** Sem efeitos para EA, PM ou injeções. Veículo = animais que receberam injeção de PBS. PM = animais que foram submetidos à privação materna. EA = prole de mães que viveram em ambiente enriquecido durante a gestação. WIN = animais que receberam injeção de WIN 55-2,1,2. ANOVA de duas vias de medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey. Dados mostrados como média  $\pm$  DP (n = 6-11 por grupo).

Resultado similar foi observado nas fêmeas, nas quais não encontramos efeito para os tratamentos nem no tempo nos braços abertos ( $F_{(2, 49)} = 2,098$ ;  $p = 0,13$ ; Fig. 14C), nem nos braços fechados ( $F_{(2, 46)} = 0,4031$ ;  $p = 0,67$ ; Fig. 14D). Também não encontramos diferenças entres os grupos em nenhum dos parâmetros avaliados ( $p > 0.05$  para todas comparações).

### 5.3.4 A combinação PM+WIN causa déficit de aprendizagem espacial em machos; EA gestacional é capaz de prevenir esse efeito

Por último, analisamos se alguma intervenção teve efeito sobre a aprendizagem e memória espacial dos animais. Ao analisar o resultado dos machos encontramos efeito do tempo ( $F_{(2,060, 84,48)} = 33,17$ ;  $p < 0,0001$ ). O *post-hoc* mostrou que a combinação PM+WIN causou déficit de aprendizagem espacial nos dias 4, 5, 7, 8, 9 ( $p < 0,05$  para todas comparações vs. Veículo; Fig. 15A). Enquanto o EA gestacional foi capaz de prevenir tal efeito ( $p > 0,05$  para todas comparações EA+PM+WIN vs Veículo nos dias 4, 5, 7, 8, 9; Fig. 15A).

Figura 15 – Resultados do labirinto aquático de Morris do estudo 3



Fonte: O autor (2024).

**Figura 15. A – Tempo para encontrar a plataforma submersa no labirinto aquático de Morris após a injeção de WIN 55 ou veículo em machos.** A injeção de WIN em machos PM causa déficit de aprendizagem. **B – Tempo no quadrante alvo durante os testes de memória espacial.** Os machos PM demonstraram déficit de memória no primeiro teste, enquanto o grupo PM+WIN demonstrou déficit de memória em ambos os testes de memória espacial. **C – Tempo para encontrar a plataforma submersa no labirinto aquático de Morris após a injeção de WIN 55 ou veículo em fêmeas.** Nem a MC, nem a PM, nem injeções de WIN ou veículo causam déficit ou melhora de aprendizagem em fêmeas. **D - Tempo no quadrante alvo durante os testes de memória espacial.** A fêmeas PM passam menos tempo no quadrante alvo comparado ao grupo WIN no primeiro teste. Mesmo assim, todos os grupos aprenderam a localização da

plataforma. Veículo = animais que receberão injeção de PBS. PM = animais que foram submetidos à privação materna. EA = prole de mães que viveram em ambiente enriquecido durante a gestação. WIN = animais que receberam injeção de WIN 55-2,1,2. \*  $p < 0.05$ . ANOVA de duas vias de medidas repetidas com *post-hoc* de Fisher (A e C) e Tukey (B e D). Dados mostrados como média  $\pm$  DP (n = 6-10 por grupo).

Ao verificarmos o desempenho no primeiro teste de memória espacial, observamos que o grupo Veículo passou mais de 25% do tempo total de teste no QA ( $t_{(7)}=2,724$   $p = 0,029$ ; Fig. 15B), demonstrando consolidação da memória. Já os grupos PM ( $t_{(9)}=1,669$   $p = 0,129$ ; Fig. 15B) e PM+WIN ( $t_{(7)}=1,517$   $p = 0,173$ ; Fig. 15B) apresentaram déficit de memória, denotado por não passarem mais de 25% do tempo total de teste no QA. O EA gestacional foi capaz de prevenir o déficit induzido pela PM, já que o grupo EA+PM+WIN passou mais de 25% do tempo total de teste no QA ( $t_{(6)}=7,27$   $p = 0,0003$ ; Fig. 15B).

Quando analisamos os resultados do segundo teste de memória espacial, verificamos que o grupo PM conseguiu consolidar a memória ( $t_{(9)} = 3,108$ ,  $p = 0,012$ ; Fig. 15B). Porém, o grupo PM+WIN ainda apresentou déficit de memória, mesmo após 10 dias de treino ( $t_{(7)} = 1,155$ ,  $p = 0,28$ ; Fig. 15B).

Ainda, analisamos se algum grupo performou melhor que os outros durante os testes de memória. Verificamos que houve efeito do tempo ( $F_{(1, 43)} = 6,130$ ;  $p = 0,017$ ), e o *post-hoc* mostrou que no segundo teste de memória espacial, o grupo EA+PM+WIN performou melhor que os grupos Veículo ( $p = 0,04$ ; Fig. 15B) e PM+WIN ( $p = 0,008$ ; Fig. 15B).

Após, analisamos o desempenho das fêmeas durante as sessões de aprendizagem. Verificamos efeito para o tempo ( $F_{(4,334, 199,4)} = 54,02$ ;  $p < 0,0001$ ), e o *post-hoc* mostrou que, no quinto dia, o grupo PM apresentou déficit de aprendizagem, demorando mais tempo para encontrar a plataforma comparado ao grupo Veículo ( $p = 0,027$ ; Fig. 15C), sendo que também demorou mais que o grupo EA+PM ( $p = 0,002$ ; Fig. 15C). Por fim, no mesmo dia, o grupo PM+WIN demorou mais que o grupo PM ( $p = 0,006$ ; Fig. 15C), demonstrando um agravamento do déficit de aprendizagem causado no grupo PM pela infusão de WIN 55. Ainda, de forma inesperada, no dias 8 e 9, o grupo WIN precisou de menos tempo para encontrar a plataforma comparado ao grupo veículo (dia 8,  $p = 0,04$ ; dia 9,  $p = 0,04$ ; Fig. 15C), demonstrando uma facilitação da aprendizagem espacial induzida pela infusão de WIN 55 em animais fêmeas.

Por fim, analisamos os efeitos dos tratamentos e suas interações na memória espacial das fêmeas. Todos os grupos de fêmeas consolidaram a memória espacial, e demonstraram lembrar da localização da plataforma nos dois testes, passando mais de 25% do tempo total de teste no QA ( $p < 0,05$  para todas as comparações). Ao compararmos se algum grupo performou melhor que outro, verificamos que o grupo WIN performou melhor que os grupos Veículo ( $p = 0,04$ ; Fig. 15D) e PM ( $p = 0,009$ ; Fig. 15D) no primeiro teste de memória. Não houve diferença entre os grupos no segundo teste ( $p > 0,05$  para todas as comparações).

## 6. Discussão

De forma geral, nossos resultados mostram que tanto o EM, quando realizado de forma estratégica durante a gestação, quanto o EA nesta fase, são capazes de proteger a prole privada de cuidado neonatal dos déficits de memória de reconhecimento e espacial causados pela PM. Ainda, demonstramos que nenhuma das intervenções com as mães afeta o comportamento exploratório ou o estado tipo-ansioso da prole. Ainda, o EM, especialmente quando realizado em igual intensidade do período anterior para durante a gestação, assim como quando iniciado durante a gestação, se mostra capaz de modular tanto o comportamento materno, quanto a relação mãe-filhote após o desmame, sendo benéfico para ambos. Por outro lado, observamos que a modulação de receptores canabinóides a partir do agonista de CB1 e CB2 WIN 55-2,1,2 é capaz de piorar a memória da prole PM em machos, ao mesmo tempo que, a mesma dose, gera melhoras na memória espacial de fêmeas não-PM.

Especificamente em relação ao estudo 1, nossos resultados mostram que parar de se exercitar no início da gestação leva a destreza após o desmame, causando déficit de memória durante a última semana de gestação nas mães. Ainda, o desmame causa déficit de memória em mães, sendo que parar ou reduzir a intensidade do exercício durante a gestação não foi suficiente para prevenir esse déficit, enquanto iniciar ou manter a intensidade do exercício foi.

Além disso, os grupos de mães que pararam ou reduziram a intensidade do exercício durante a gestação aumentam o comportamento materno direcionado aos filhotes. Por outro lado, todos os grupos que se exercitaram mostraram menos autolimpeza após a PM em comparação com as mães não exercitadas, o que pode ser indicador de um comportamento menos ansioso. Por fim, o grupo de mães que parou de se exercitar durante a gestação foi o único que não mostrou preferência por seus filhotes machos no teste de preferência materna.

Apesar da crença popular, a gestação por si só não causou déficit de memória na semana do parto no nosso estudo. Este resultado está de acordo com a literatura, que mostra que, embora mulheres grávidas com certa frequência relatem perda de memória no final da gestação, testes objetivos não mostram diferenças entre mulheres grávidas e não grávidas, exceto por um

pequeno efeito na memória de trabalho (Brown; Schaffir, 2019; Janes; Casey; Huntsdale; Angus, 1999). Isso pode se dar devido à má qualidade do sono ou até mesmo à crença em um mito que tem sido perpetuado por muito tempo e tem impacto debatível na vida cotidiana (Brown; Schaffir, 2019).

Por outro lado, nossos resultados mostram que parar de se exercitar durante a gestação promove déficit de memória durante a última semana gestacional. Embora não tenhamos medido o  $VO_{2máx}$  no final da gestação e tampouco os níveis de BDNF, acreditamos que possa ter havido perda de adaptações fisiológicas promovidas pelo exercício durante a gestação, e esta possa levar à diminuição dos níveis de BDNF nas mães (Fernandes; Calegare; Cavalcante-Silva; D'almeida, 2015; Radak; Toldy; Szabo; Siamilis *et al.*, 2006). O fato de que o grupo que apenas reduziu a intensidade, mas manteve a prática do exercício físico durante a gestação não mostrar tal prejuízo na memória reforça esse argumento.

Um achado crítico do nosso estudo é que o período pós-desmame parece ser um estressor mais significativo para as mães do que o final da gestação, já que todos os grupos que não se exercitaram durante a gestação, submetidos ou não à PM, apresentaram déficit de memória nesse período. De alguma forma, os grupos que se exercitaram em qualquer intensidade durante a gestação evitaram esse efeito no período pós-desmame.

Ainda, observamos que parar de se exercitar no início da gestação aumenta a peroxidação lipídica das mães após o desmame, o que é acompanhado do déficit de memória de reconhecimento. Por outro lado, a PM por si só aumentou os níveis de CAT em relação ao grupo de mães NE e todos os grupos exercitados, mesmo apresentando déficit de memória. Tais resultados, combinados com a consolidação da memória de reconhecimento somente nas mães que realizaram o exercício em igual intensidade antes e durante a gestação, assim como as que iniciaram o exercício na gestação, demonstra que outros mecanismos podem estar envolvidos na prevalência da consolidação da memória em mães com boa escolha de estratégia de EM.

Um estudo recente mostrou que mães submetidas à PM apresentam déficits de aprendizado e memória espacial de uma semana a um mês após o desmame (Joushi; Sheibani; Esmaeilpour; Francis-Oliveira *et al.*, 2021); o

mesmo efeito foi observado na memória testada na tarefa de esquivar inibitória (Aguggia; Suarez; Rivarola, 2013; Sung; Shin; Cho; Baik *et al.*, 2010) sendo acompanhado de diminuição de proliferação celular, assim como aumento do processo de apoptose celular hipocampal. Embora esses estudos tenham avaliado outros tipos de memória, levando em consideração que o exercício é conhecido por aumentar a proliferação celular nessa estrutura (Van Praag; Kempermann; Gage, 1999; Yau; Lau; Zhang; Lee *et al.*, 2012), este pode ser um dos mecanismos pelo qual o exercício durante a gestação mantém a memória das mães intacta após o desmame, o que não aconteceria nos grupos que não se exercitam.

Uma das novidades dos nossos estudos é que somos os primeiros a investigar esses efeitos na memória de RO e na preferência materna pela prole. No estudo 1, realizamos a avaliação de preferência materna por último para evitar estresse adicional antes dos testes de CA, RO e LCE, já que as mães veriam seus filhotes novamente, o que poderia desencadear uma carga de estresse excessiva, afetando o comportamento e, portanto, os resultados obtidos.

O que encontramos mais perto da mesma análise é um estudo anterior que avaliou a preferência dos filhotes por seus pais ou adultos desconhecidos de ambos os sexos (Stroobants; Creemers; Bosmans; D'hooge, 2020), mostrando que fêmeas preferem contato com suas mães, enquanto os machos não diferem no tempo de contato com uma fêmea adulta desconhecida e com a mãe. Aqui, ao testar a preferência das mães, observamos que mães dos grupos CT, PM e PRE+PM não mostraram preferência por seus filhotes em relação a ratos machos/fêmeas desconhecidos da mesma idade que seus filhotes. Por outro lado, os grupos que se exercitaram durante a gestação preferiram seus filhotes machos em relação a um macho desconhecido. Pesquisas futuras são recomendadas para estudar os possíveis mecanismos por trás desses efeitos, sendo potenciais alvos alterações nos níveis de estrogênio, ocitocina e lactogênios, que podem ser modulados pelo exercício e sinalizar um vínculo materno maior entre mães e seus filhotes (Bridges, 2015; Scatliffe; Casavant; Vittner; Cong, 2019).

Em relação aos resultados do CM, não nos surpreende que mães submetidas à PM tenham passado mais tempo com os filhotes no ninho após o período de PM, já que isso foi previamente verificado por outros pesquisadores (Alves; Portugal; Summavielle; Barbosa *et al.*, 2020; Czarnabay; Dalmago; Martins; Queiroz *et al.*, 2019). No entanto, descobrimos que parar de se exercitar antes da gestação não foi capaz de prevenir completamente essas alterações (persistem em 2 dos 5 primeiros dias de vida), enquanto os outros tipos de exercício foram capazes de mitigar tal efeito. Ainda assim, diminuir a intensidade do exercício parece aumentar o tempo de *licking* dos filhotes durante os primeiros dias de vida. Esses resultados são importantes pois o aumento do CM parece ser um mecanismo de defesa das mães submetidas à PM em relação aos filhotes, promovendo alterações no neurodesenvolvimento deles, mas mesmo assim não é capaz de superar os efeitos duradouros da PM na cognição da prole (Czarnabay; Dalmago; Martins; Queiroz *et al.*, 2019), e, conforme nossos resultados, também não é capaz de manter ou melhorar a memória das mães intacta após o desmame.

Talvez o achado mais importante do nosso estudo primeiro estudo em relação ao CM seja que qualquer forma de exercício antes ou durante a gestação pode diminuir o comportamento semelhante à ansiedade das mães após a PM nos primeiros dias após o parto. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a autolimpeza das mães como uma medida de comportamento semelhante à ansiedade em um cenário naturalista onde elas cuidam de seus filhotes (para a revisão mais recente e completa sobre CM em roedores, veja (Alves; Portugal; Summavielle; Barbosa *et al.*, 2020). Embora se possa dizer que a autolimpeza também é um comportamento de sobrevivência, não podemos distinguir os dois objetivos deste comportamento em nosso estudo; pode ser conhecimento empírico que as mães se sentem ansiosas ao cuidar de sua prole, mas acreditamos que testamos isso objetivamente aqui.

Os mecanismos por trás do comportamento materno semelhante à ansiedade durante o período em que cuidam de seus filhos são numerosos. Fatores como o aumento de células positivas para c-Fos e a maior atividade neuronal na amígdala (Aguggia; Suarez; Rivarola, 2013), além dos níveis de corticosterona (Tractenberg; Levandowski; De Azeredo; Orso *et al.*, 2016),

parecem desempenhar um papel essencial nesse tipo de comportamento. Como o exercício pode modular ambos fatores, hipotetizamos que estes podem ser alguns dos mecanismos de ação quando observamos que mães que se exercitaram durante a gestação não apresentaram aumento na autolimpeza após a PM.

Em conjunto, os resultados do nosso primeiro estudo são importantes, uma vez que a maioria dos estudos sobre PM negligencia o comportamento das mães ao avaliar alterações de memória e comportamento induzidas pela PM na prole. Mais importante ainda, estudos utilizando sujeitos do sexo feminino, especialmente mães, são raros e ainda necessários por várias razões (Loprinzi; Frith, 2018), como diferenças bioquímicas e fisiológicas entre os sexos em resposta ao exercício (Ansdell; Thomas; Hicks; Hunter *et al.*, 2020). Além disso, estudos com mulheres, especialmente durante um período crítico da vida, como gestação e pós-desmame, são difíceis de realizar em humanos devido ao tempo necessário para acompanhar as mães, bem como à dependência de autorrelatos e outros fatores que podem influenciar negativamente os resultados.

Quanto aos filhotes, no nosso segundo estudo mostramos que a PM induz déficits de memória na idade adulta em machos, mas não em fêmeas. No entanto, todos os protocolos de exercício, exceto a interrupção do exercício no início da gestação, foram capazes de prevenir esse déficit. Embora não tenhamos observado diferenças na peroxidação lipídica no hipocampo da prole, encontramos níveis aumentados de CAT nos grupos PRE e IGUAL. Isso sugere que o EM pode ajudar a combater os efeitos da PM no cérebro da prole, sendo a manutenção da intensidade do exercício, mesmo que mais baixa, durante toda a gestação mais eficaz do que realizar um exercício mais intenso antes da gestação e interrompê-lo abruptamente no início desta.

Essa descoberta apoia ainda mais a ideia emergente de que o EM pode programar o equilíbrio oxidativo cerebral da prole até a idade adulta, provavelmente modulando a maquinaria bioenergética celular e aumentando a atividade mitocondrial (Klein; Hoppe; Saccomori; Dos Santos *et al.*, 2019) – o que pode levar à redução nos níveis de  $H_2O_2$  no cérebro, uma vez que a cadeia respiratória das mitocôndrias é a principal fonte de superóxido intracelular. Neste estudo, selecionamos TBARS e CAT como medidas do equilíbrio oxidativo

porque o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é um marcador importante de dano neuronal e demonstrou ser alterado na prole adulta após MS (Malcon; Wearick-Silva; Zaparte; Orso *et al.*, 2020; Santos; Borges; Cerejo; Sarmiento *et al.*, 2005; Soares; Gildawie; Honeycutt; Brenhouse, 2020). Além disso, o CAT, em coordenação com o SOD e o GPX, atua como uma defesa primária contra os radicais superóxido e está presente em todos os tipos de células cerebrais (Schad; Fahimi; Volkl; Baumgart, 2003). No entanto, outro estudo investigando os efeitos da natação durante a gestação sobre os níveis de CAT não encontrou aumento significativo em comparação ao grupo controle, e, embora esta medida tenha sido realizada no cerebelo, merece atenção (Klein; Hoppe; Saccomori; Gindri Dos Santos *et al.*, 2020). Em contraste, nós observamos que os protocolos de exercício PRE e IGUAL aumentam os níveis de CAT no hipocampo. Acreditamos que esse efeito pode ser devido à redução do  $VO_{2máx}$  observada em ambos os grupos. O aumento nos níveis de CAT pode representar uma resposta compensatória destinada a contrabalançar um possível aumento nos TBARS, que poderia resultar de um desequilíbrio na maquinaria celular causado pelo destreinamento combinado com a PM.

Essa hipótese também explica por que não observamos níveis elevados de TBARS em nenhum dos grupos, contrariando nossas expectativas após o destreinamento. Estudos futuros para comparar corrida e natação durante a gestação podem ser interessantes para determinar se estas diferentes modalidades promovem efeitos diferenciais em várias regiões do cérebro, se a corrida também afeta o cerebelo, e se algum dos exercícios mostra efeitos superiores na manutenção do equilíbrio oxidativo de todo o cérebro.

Recente, realizamos um estudo no qual demonstramos que a PM induz déficits de memória em fêmeas imediatamente após o desmame (Carrazoni; Das Neves; Dos Santos Soares; Lima *et al.*, 2023). Esse período é importante do ponto de vista translacional, pois marca o ponto em que a prole se torna independente, e memória e comportamento ganham maior relevância. Por outro lado, ao contrário do que ocorre com machos e já é bem descrito na literatura (Cater; Majdic, 2022; Menezes; Souto Das Neves; Goncalves; Benetti *et al.*, 2020; Neves; Barbosa; Rosa; Picua *et al.*, 2020; Sosa; Neves; Carrazoni; Gomes *et al.*, 2019), observamos nos estudos desta tese que os déficits de memória

induzidos pela PM não persistem na idade adulta em fêmeas. Várias explicações possíveis podem justificar isso, uma das quais é que a PM repetida leva ao aumento da proliferação celular no hipocampo das fêmeas um mês após o desmame (Lee; Koe; Ashokan; Mitra, 2020) ao contrário do que ocorre nos machos após o desmame (Monroy; Hernandez-Torres; Flores, 2010; Ohta; Suzuki; Warita; Kaji *et al.*, 2017).

No entanto, não encontramos estudos que comparassem o equilíbrio oxidativo no hipocampo de machos e fêmeas em resposta à PM e ao EM. Assim, nosso estudo pode ser o primeiro a comparar alguns desses parâmetros, oferecendo *insights* sobre os efeitos da prática e da intensidade do exercício durante a gestação no cérebro da prole, diferente de outros protocolos de exercício que utilizaram rodas de corrida ou natação, estratégias que dificilmente são mensuradas pela distância, tempo e intensidade controlados do exercício, como fizemos aqui (Fernandes; Calegare; Cavalcante-Silva; D'almeida, 2015; Ruebel; Borengasser; Zhong; Kang *et al.*, 2023).

Talvez nossa principal e nova descoberta sobre a prole é que interromper o exercício durante a gestação leva a déficits de memória em machos, mesmo na idade adulta. Acreditamos que isso ocorre devido à perda de adaptações fisiológicas nas mães durante a gestação (destreino), resultando em uma diminuição de marcadores e proteínas-chave de memória necessários para a consolidação de memória de longo prazo e resiliência ao estresse, como o BDNF. Embora não tenhamos mensurado os níveis de BDNF em nosso estudo, já foi demonstrado que o BDNF é transferido via placenta, e essa redução nos níveis da proteína poderia impactar negativamente o desenvolvimento cerebral da prole (Fernandes; Calegare; Cavalcante-Silva; D'almeida, 2015; Kodomari; Wada; Nakamura; Wada, 2009; Radak; Toldy; Szabo; Siamilis *et al.*, 2006). Isso pode explicar porque o protocolo PRE não conseguiu prevenir o déficit de memória de reconhecimento induzido pela PM em nosso estudo, enquanto todos os outros protocolos de exercício realizados durante a gestação, independentemente da intensidade, foram eficazes.

Em humanos já se sabe do efeito negativo do destreino tanto em fatores musculares, quanto cardíacos e metabólicos, como a diminuição do  $VO_{2máx}$  e alterações de enzimas da cadeia respiratória (Henriksson; Reitman, 1977).

Recentemente, o aumento do 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 EM não é somente dependente do aumento de  $VO_{2máx}$ , mas também pode ser advinda da alteração do funcionamento mitocondrial na prole provocado pelo EM. Tal fato explica como mesmo os grupos que não apresentaram  $VO_{2máx}$  aumentado (IGUAL e GEST) conseguiram proteger a prole dos efeitos deletérios da PM.

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 com o 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).

Outro ponto importante é que, enquanto as mães do grupo IGUAL+PM também experimentaram destreinamento durante a gestação e lactação, isso não foi suficiente para induzir déficits de memória na prole. Isso sugere que o estresse associado a PM pode exacerbar os efeitos do destreinamento, e a extensão da perda de capacidade aeróbica materna pode influenciar os resultados de memória da prole. Especificamente, enquanto as mães do grupo PRE+PM experimentaram uma redução de 23,5% na capacidade de corrida (de 47,2 para 36,1), as mães do grupo IGUAL+PM tiveram uma redução de 6,7% (de 37 para 34,5). Isto pode indicar que existe um limiar crítico de destreinamento entre esses dois pontos, além do qual o destreinamento materno leva a déficits de memória na prole e alterações na cadeia respiratória. Com base na perda de velocidade máxima de corrida durante os testes de  $VO_{2máx}$  nos grupos RED+CT (14%) e RED+EM (25%), isso reforça que manter o exercício durante a gestação é fundamental para prevenir alterações de memória induzidas pelo destreinamento na prole adulta, independentemente da intensidade do exercício.

É claro que nosso estudo tem limitações, como não avaliar o  $VO_{2max}$  indireto durante a lactação e alguns dos mecanismos aqui citados. No entanto, tentamos projetar um estudo que se assemelhe ao máximo à vida real; uma vez que as mães podem sentir medo ou insegurança em praticar exercícios após descobrir que estão grávidas, isso poderia influenciar a prática e sua intensidade. Por fim, seria ótimo avaliar marcadores maternos durante o período de PM, mas é difícil avaliar marcadores neuroquímicos sem eutanasiar as mães ou realizar uma cirurgia, o que deixaria os filhotes desamparados e reduziria o número de animais, fatores limitados por questões éticas. Também seria útil realizar um teste de LCE durante o período de PM para avaliar se a autolimpeza era um comportamento de ansiedade ou de limpeza, no entanto, não realizamos esse teste para evitar mais separações dos filhotes. Dado esses pontos, estamos confiantes de que nosso desenho experimental tenta se assemelhar ao máximo com a vida real.

Ainda, apesar de um número de amostra que pode ser considerado pequeno de animais testados, consideramos isso uma força do nosso estudo. Ao limitar o número de animais por ninhada, minimizamos os efeitos relacionados à ninhada. Ainda, embora se possa argumentar que analisar o ciclo estral em fêmeas teria sido útil, já foi demonstrado que a memória de reconhecimento em fêmeas é estável ao longo do ciclo estral e não difere dos machos (Markham; Juraska, 2007), assim, evitamos causar o estresse de mais esta medida nas ratas. Além disso, embora não tenhamos analisado os neurotransmissores ou receptores específicos envolvidos nas respostas observadas, reforçamos que nosso estudo reflete cenários da vida real, onde fatores ambientais, como escolhas de exercício feitas por mães ativas ou sedentárias durante a gestação podem ter efeitos duradouros na prole.

Por fim, no estudo 3, demonstramos que a PM e que a modulação de receptores canabinóides CB1 e CB2 pelo agonista WIN 55-2,1,2 causam prejuízos à memória espacial da prole de machos, sendo que o EA gestacional é capaz de proteger a prole de tais efeitos. Por outro lado, enquanto a PM não apresenta efeitos específicos em fêmeas, a administração via i.p de WIN 55 parece ter efeito benéfico na memória espacial da prole de fêmeas, denotando

um efeito dimórfico-sexual da ativação de CBr1 e 2 na prole adulta de animais PM.

Cabe mencionar, que estudos passados já demonstraram que o EA, quando realizado com a prole, é capaz de mitigar os efeitos da PM sobre a flexibilidade cognitiva espacial em machos na fase adulta (Menezes; Souto Das Neves; Goncalves; Benetti *et al.*, 2020). Estudos que utilizaram o mesmo modelo de enriquecimento ambiental/moradia complexa que o nosso (Fares; Belmeguenai; Sanchez; Kouchi *et al.*, 2013), mostraram que a vivência dentro da caixa moradia Marlau é capaz de aumentar a massa cortical, assim como induzir a neurogênese em maior nível comparado à animais de caixa moradia padrão. Dessa forma, podemos hipotetizar que o mesmo ocorre quando o EA é realizado com as mães durante a gestação. Levando em consideração que a PM causou diminuição do BDNF na prole, e que o EA reverteu tal efeito na prole, podemos hipotetizar que a partir do EA gestacional, ocorre a transferência e modulação dos níveis de proteína hipocampal na prole PM, o que também pode levar a proteção da mesma quando nos referimos à aprendizagem e memória espacial.

O sistema endocanabinóide vem sendo estudado há mais de 30 anos (Devane; Hanus; Breuer; Pertwee *et al.*, 1992; Matsuda; Lolait; Brownstein; Young *et al.*, 1990), sendo que na última década tem sido relacionado há muitos processos fisiológicos, como a aprendizagem e memória (Drumond; Madeira; Fonseca, 2017; Kruk-Slomka; Dzik; Budzynska; Biala, 2017), especialmente focando nos efeitos da modulação de receptores CB1, uma vez que estudos mostram que sua ativação leva à diminuição da excitação sináptica, levando à hipótese de que a ativação de tal seria prejudicial à memória (Drumond; Madeira; Fonseca, 2017).

Como demonstrado no nosso estudo, com o dimorfismo sexual resultante da infusão de mesma dose do agonista de CBr1 WIN 55-2,1,2, que piora a memória de machos mas melhora a de fêmeas PM, e notado na introdução da presente tese, a ativação de receptores canabinóides depende de vários fatores, como idade, dose, e tempo de ativação, sendo capaz de modular tanto a transmissão gabaérgica quanto glutamatérgica (Mackie, 2005), gerando tantos efeitos cerebrais benéficos como a proteção contra a demielinização induzida

(Tomas-Roig; Agbemenyah; Celarain; Quintana *et al.*, 2020) quanto déficits de memória em animais jovens (An; Carrazoni; Souto Das Neves; D'hooge *et al.*, 2024). Como visto anteriormente em machos, a administração de um antagonista de CBr1 antes da realização da tarefa leva a melhora da memória espacial (Lichtman, 2000). Corroborando com tal achado, no nosso estudo 3, a administração de um agonista de CBr1 levou ao prejuízo da aprendizagem e memória espacial em machos e melhora da mesma em fêmeas.

Tais efeitos em machos, mais acentuados que em fêmeas, talvez sejam explicados pelo fato que a PM induz redução de receptores canabinóides em machos de forma mais agressiva que em fêmeas logo após a PM (Suarez; Llorente; Romero-Zerbo; Mateos *et al.*, 2009), o que parece persistir até a vida adulta (Morena; Patel; Bains; Hill, 2016; Suarez; Llorente; Romero-Zerbo; Mateos *et al.*, 2009), além do fato de que fêmeas apresentam menor nível de enzimas que sintetizam endocanabinóides do que machos quando atingem a puberdade (Marco, 2014). Considerando tais fatores, podemos hipotetizar que a resposta de machos e fêmeas à estimulação do sistema endocanabinóide depende da dose e da forma de administração da mesma, uma vez que suspostamente fêmeas adultas apresentam menores níveis de endocanabinóides endógenos que machos. Assim, quando infundidos com drogas como o WIN 55, levaria machos à danos na memória, enquanto encontraríamos a janela ideal para estimulação de forma benéfica na memória de fêmeas pela modulação de receptores CB1 e CB2.

Cabe mencionar, ainda, que nossas descobertas são particularmente relevantes no contexto de doenças como Alzheimer, que continuam afetando milhões de pessoas a cada ano, e vários estudos sugerem a PM como um fator potencial que contribui para o desenvolvimento de tais doenças neurodegenerativas (Tanaka; Hirai; Hosokawa; Saito *et al.*, 2021). Dessa forma, estamos confiantes de que estudos futuros revelarão mecanismos adicionais subjacentes aos resultados observados aqui, como modificações epigenéticas e a transferência transplacentária de marcadores bioenergéticos-chave.

## 7. Considerações finais

Levando em consideração os resultados apresentados nesta tese, foi possível concluir que diferentes estratégias de exercício antes e/ou durante a gestação, assim como o ambiente enriquecido durante a gestação, resultam em diferentes desfechos na memória em mães, e filhotes machos e fêmeas adultos expostos à PM, além de modificar o comportamento e preferência maternal pela prole.

Especificamente, nossas principais conclusões incluem:

- Interromper o exercício no início da gestação provoca efeitos de destreinamento após o desmame e não protege as mães submetidas à privação maternal contra déficits de memória na última semana gestacional, além de causar déficit de memória na prole de machos, e causar prejuízo à memória da prole de fêmeas PM;
- Todas as mães que se exercitaram apresentam, pelo menos por um dia, comportamento menos ansioso ao retornar para casa após o período de privação maternal comparado ao grupo PM;
- Mães que se exercitam durante a gestação preferem o contato com filhotes machos do que com um macho desconhecido; já mães que não se exercitam durante a gestação exploram seus filhotes e animais desconhecidos da mesma idade e sexo de maneira semelhante;
- A privação maternal tem efeitos dependentes do sexo na memória de RO, causando déficits de memória em machos, mas não em fêmeas;
- Manter a prática de exercícios com intensidade constante ou iniciar exercícios durante a gestação pode prevenir os efeitos da PM. Dessa forma, a extensão da perda de desempenho aeróbico durante a gestação e a lactação parece influenciar os déficits de memória induzidos pela privação maternal nos filhotes, com o exercício em qualquer intensidade durante a gestação sendo mais benéfico do que a interrupção total;
- Interromper o exercício ou manter a mesma intensidade durante a gestação aumenta os níveis de CAT na prole, possivelmente como um mecanismo compensatório para mitigar os efeitos observados nos filhotes privados de cuidado neonatal;

- O enriquecimento ambiental durante a gestação é capaz de prevenir os déficits de memória espacial induzidos pela modulação de receptores CB1/2 na prole machos privada de cuidado neonatal;
- A modulação do sistema endocanabinóide por meio de agonista de receptores CB1 e CB2 é capaz de melhorar a aprendizagem e memória espacial em fêmeas controle.

Assim, diferentes intervenções com as mães durante a gestação, como o exercício maternal e o enriquecimento ambiental, são estratégias seguras, viáveis, e que devem ser levadas em consideração, sendo tais estratégias benéficas tanto para as mães quanto para a prole, com potencial de mitigar possíveis efeitos de situações de estresse no início da vida.

Ainda, concluímos que tanto o exercício maternal, a privação de cuidado neonatal, o enriquecimento ambiental, e a modulação do sistema canabinóide, afetam de formas diferentes a prole de machos e fêmeas, fato que deve ser levado em consideração, principalmente no desenho de estudos e na administração de drogas em ambos os sexos, que, segundo nossos resultados, podem levar à resultados diferentes em opostos.

## 8. Referências bibliográficas

. In: **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Washington (DC), 1996.

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.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984.

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.

AGUGGIA, J. P.; SUAREZ, M. M.; RIVAROLA, M. A. Early maternal separation: neurobehavioral consequences in mother rats. **Behav Brain Res**, 248, p. 25-31, Jul 1 2013.

AGUGGIA, J. P.; SUAREZ, M. M.; RIVAROLA, M. A. Multiparity Dampened the Neurobehavioral Consequences of Mother-Pup Separation Stress in Dams. **Neuroscience**, 416, p. 207-220, Sep 15 2019.

ALLEN, C. L.; BAYRAKTUTAN, U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **Int J Stroke**, 4, n. 6, p. 461-470, Dec 2009.

ALVES, R. L.; PORTUGAL, C. C.; SUMMAVIELLE, T.; BARBOSA, F. *et al.* Maternal separation effects on mother rodents' behaviour: A systematic review. **Neurosci Biobehav Rev**, 117, p. 98-109, Oct 2020.

AN, D.; CARRAZONI, G. S.; SOUTO DAS NEVES, B. H.; D'HOOGHE, R. *et al.* The Sobering Sting: Oleoyl Serotonin Is a Novel Stephanoconus Snail Venom-Derived Antagonist of Cannabinoid Receptors That Counteracts Learning and Memory Deficits. **Biomedicines**, 12, n. 2, Feb 18 2024.

ANSDELL, P.; THOMAS, K.; HICKS, K. M.; HUNTER, S. K. *et al.* Physiological sex differences affect the integrative response to exercise: acute and chronic implications. **Exp Physiol**, 105, n. 12, p. 2007-2021, Dec 2020.

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.

BAMBICO, F. R.; NGUYEN, N. T.; KATZ, N.; GOBBI, G. Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission. **Neurobiol Dis**, 37, n. 3, p. 641-655, Mar 2010.

BATH, K. G.; NITENSON, A. S.; LICHTMAN, E.; LOPEZ, C. *et al.* Early life stress leads to developmental and sex selective effects on performance in a novel object placement task. **Neurobiol Stress**, 7, p. 57-67, Dec 2017.

BEKINSCHTEIN, P.; KENT, B. A.; OOMEN, C. A.; CLEMENSON, G. D. *et al.* BDNF in the dentate gyrus is required for consolidation of "pattern-separated" memories. **Cell Rep**, 5, n. 3, p. 759-768, Nov 14 2013.

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.

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.

BOCCIA, M. L.; RAZZOLI, M.; VADLAMUDI, S. P.; TRUMBULL, W. *et al.* Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. **Psychoneuroendocrinology**, 32, n. 1, p. 65-71, Jan 2007.

BOUTER, C.; OTT, F. W.; GUNTHER, D.; WEIG, L. *et al.* Chronic exposure to a synthetic cannabinoid alters cerebral brain metabolism and causes long-lasting behavioral deficits in adult mice. **J Neural Transm (Vienna)**, 130, n. 8, p. 1013-1027, Aug 2023.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

BRIDGES, R. S. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. **Front Neuroendocrinol**, 36, p. 178-196, Jan 2015.

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.

BROWN, E.; SCHAFFIR, J. "Pregnancy Brain": A Review of Cognitive Changes in Pregnancy and Postpartum. **Obstet Gynecol Surv**, 74, n. 3, p. 178-185, Mar 2019.

CALLAERTS-VEGH, Z.; AHMED, T.; VERMAERCKE, B.; MARYNEN, P. *et al.* Nxf7 deficiency impairs social exploration and spatio-cognitive abilities as well as hippocampal synaptic plasticity in mice. **Front Behav Neurosci**, 9, p. 179, 2015.

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.

CARRAZONI, G. S.; DAS NEVES, B. S.; DOS SANTOS SOARES, M.; LIMA, K. R. *et al.* Starting maternal exercise, unlike reducing the intensity of exercise during pregnancy, prevents memory deficits in female offspring subject to maternal deprivation. **Brain Res**, 1808, p. 148337, Jun 1 2023.

CASTELLÓ, M. **Experiencias adversas en la infancia**. IBE-UNESCO. 2020.

CATER, M.; MAJDIC, G. How early maternal deprivation changes the brain and behavior? **Eur J Neurosci**, 55, n. 9-10, p. 2058-2075, May 2022.

CHAMPAGNE, D. L.; DE KLOET, E. R.; JOELS, M. Fundamental aspects of the impact of glucocorticoids on the (immature) brain. **Semin Fetal Neonatal Med**, 14, n. 3, p. 136-142, Jun 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.

DANDI, E.; KESIDOU, E.; SIMEONIDOU, C.; SPANDOU, E. *et al.* Sex-Specific Differences and the Role of Environmental Enrichment in the Expression of Hippocampal CB(1) Receptors following Chronic Unpredictable Stress. **Brain Sci**, 14, n. 4, Apr 3 2024.

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.

DEVANE, W. A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R. G. *et al.* Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, 258, n. 5090, p. 1946-1949, Dec 18 1992.

DINIZ, D. G.; DE OLIVEIRA, M. A.; DE LIMA, C. M.; FORO, C. A. *et al.* Age, environment, object recognition and morphological diversity of GFAP-immunolabeled astrocytes. **Behav Brain Funct**, 12, n. 1, p. 28, Oct 10 2016.

DINIZ, D. G.; FORO, C. A.; REGO, C. M.; GLORIA, D. A. *et al.* Environmental impoverishment and aging alter object recognition, spatial learning, and dentate gyrus astrocytes. **Eur J Neurosci**, 32, n. 3, p. 509-519, Aug 2010.

DRUMOND, A.; MADEIRA, N.; FONSECA, R. Endocannabinoid signaling and memory dynamics: A synaptic perspective. **Neurobiol Learn Mem**, 138, p. 62-77, Feb 2017.

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.

DURAN-CARABALI, L. E.; ODORCYK, F. K.; GRUN, L. K.; SCHMITZ, F. *et al.* Maternal environmental enrichment protects neonatal brains from hypoxic-ischemic challenge by mitigating brain energetic dysfunction and modulating glial cell responses. **Exp Neurol**, 374, p. 114713, Apr 2024.

EKELIN, M.; LANGELAND IVERSEN, M.; GRONBAEK BACKHAUSEN, M.; HEGAARD, H. K. Not now but later - a qualitative study of non-exercising pregnant women's views and experiences of exercise. **BMC Pregnancy Childbirth**, 18, n. 1, p. 399, Oct 11 2018.

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.

FARES, R. P.; BELMEGUENAI, A.; SANCHEZ, P. E.; KOUCHI, H. Y. *et al.* Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. **PLoS One**, 8, n. 1, p. e53888, 2013.

FERNANDES, L.; CALEGARE, B. F.; CAVALCANTE-SILVA, V.; D'ALMEIDA, V. Detraining in pregnancy and/or lactation modulates neuropeptidergic hypothalamic systems in offspring mice. **Endocrine**, 50, n. 3, p. 715-724, Dec 2015.

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.

FRANCIS, D. D.; DIORIO, J.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. **J Neurosci**, 22, n. 18, p. 7840-7843, Sep 15 2002.

FRITCH, H. A.; MACEVOY, S. P.; THAKRAL, P. P.; JEYE, B. M. *et al.* The anterior hippocampus is associated with spatial memory encoding. **Brain Res**, 1732, p. 146696, Apr 1 2020.

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

GUTTERIDGE, J. M.; TICKNER, T. R. The characterisation of thiobarbituric acid reactivity in human plasma and urine. **Anal Biochem**, 91, n. 1, p. 250-257, Nov 1978.

HANDA, R. J.; BURGESS, L. H.; KERR, J. E.; O'KEEFE, J. A. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Horm Behav**, 28, n. 4, p. 464-476, Dec 1994.

HANDA, R. J.; WEISER, M. J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Front Neuroendocrinol**, 35, n. 2, p. 197-220, Apr 2014.

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.

HENRIQUES, T. P.; SZAWKA, R. E.; DIEHL, L. A.; DE SOUZA, M. A. *et al.* Stress in neonatal rats with different maternal care backgrounds: monoaminergic and hormonal responses. **Neurochem Res**, 39, n. 12, p. 2351-2359, Dec 2014.

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.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radic Biol Med**, 9, n. 6, p. 515-540, 1990.

JANES, C.; CASEY, P.; HUNTSDALE, C.; ANGUS, G. Memory in pregnancy. I: Subjective experiences and objective assessment of implicit, explicit and working memory in primigravid and primiparous women. **J Psychosom Obstet Gynaecol**, 20, n. 2, p. 80-87, Jun 1999.

JAROUDI, W.; GARAMI, J.; GARRIDO, S.; HORNBERGER, M. *et al.* Factors underlying cognitive decline in old age and Alzheimer's disease: the role of the hippocampus. **Rev Neurosci**, 28, n. 7, p. 705-714, Oct 26 2017.

JOUSHI, S.; SHEIBANI, V.; ESMAEILPOUR, K.; FRANCIS-OLIVEIRA, J. *et al.* Maternal separation impairs mother's cognition 1 month beyond the separation. **Int J Dev Neurosci**, 81, n. 7, p. 605-615, Nov 2021.

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, A. B.; WILLIAMSON, R.; SANTINI, M. A.; CLEMMENSEN, C. *et al.* Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. **Int J Neuropsychopharmacol**, 14, n. 3, p. 347-353, Apr 2011.

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.

KLEIN, C. P.; HOPPE, J. B.; SACCOMORI, A. B.; GINDRI DOS SANTOS, B. *et al.* Protective effect of maternal exercise against amyloid-beta neurotoxicity in the male rat offspring's cerebellum. **J Dev Orig Health Dis**, 11, n. 5, p. 521-532, Oct 2020.

KODOMARI, I.; WADA, E.; NAKAMURA, S.; WADA, K. Maternal supply of BDNF to mouse fetal brain through the placenta. **Neurochem Int**, 54, n. 2, p. 95-98, Feb 2009.

KRUK-SLOMKA, M.; DZIK, A.; BUDZYNSKA, B.; BIALA, G. Endocannabinoid System: the Direct and Indirect Involvement in the Memory and Learning Processes-a Short Review. **Mol Neurobiol**, 54, n. 10, p. 8332-8347, Dec 2017.

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.

LEE, Y. J.; KOE, A. S.; ASHOKAN, A.; MITRA, R. Female rats are resilient to the behavioral effects of maternal separation stress and exhibit stress-induced neurogenesis. **Heliyon**, 6, n. 8, p. e04753, Aug 2020.

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.

LICHTMAN, A. H. SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. **Eur J Pharmacol**, 404, n. 1-2, p. 175-179, Sep 15 2000.

LIM, H. S.; YOON, K. N.; CHUNG, J. H.; LEE, Y. S. *et al.* Chronic Ultraviolet Irradiation to the Skin Dysregulates Adrenal Medulla and Dopamine Metabolism In Vivo. **Antioxidants (Basel)**, 10, n. 6, Jun 7 2021.

LIMA, K. R.; SCHMIDT, H. L.; DARE, L. R.; SOARES, C. B. *et al.* Concurrent exercise does not prevent recognition memory deficits induced by beta-amyloid in rats. **Physiol Behav**, 243, p. 113631, Jan 1 2022.

LIN, T. W.; CHEN, S. J.; HUANG, T. Y.; CHANG, C. Y. *et al.* Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. **Neurobiol Learn Mem**, 97, n. 1, p. 140-147, Jan 2012.

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

LU, H. C.; MACKIE, K. Review of the Endocannabinoid System. **Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging**, 6, n. 6, p. 607-615, Jun 2021.

LUINE, V.; VILLEGAS, M.; MARTINEZ, C.; MCEWEN, B. S. Repeated stress causes reversible impairments of spatial memory performance. **Brain Res**, 639, n. 1, p. 167-170, Mar 7 1994.

LUNDERVOLD, A. J.; WOLLSCHLAGER, D.; WEHLING, E. Age and sex related changes in episodic memory function in middle aged and older adults. **Scand J Psychol**, 55, n. 3, p. 225-232, Jun 2014.

LUO, Y.; XIAO, Q.; WANG, J.; JIANG, L. *et al.* Running exercise protects oligodendrocytes in the medial prefrontal cortex in chronic unpredictable stress rat model. **Transl Psychiatry**, 9, n. 1, p. 322, Nov 28 2019.

MACKIE, K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. **Handb Exp Pharmacol**, n. 168, p. 299-325, 2005.

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.

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**, 238, n. 9, p. 2097-2107, Sep 2020.

MANASSIS, K.; BRADLEY, S.; GOLDBERG, S.; HOOD, J. *et al.* Attachment in mothers with anxiety disorders and their children. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, 33, n. 8, p. 1106-1113, Oct 1994.

MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. **Behav Brain Res**, 208, n. 1, p. 72-79, Mar 17 2010.

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.

MARKHAM, J. A.; JURASKA, J. M. Social recognition memory: influence of age, sex, and ovarian hormonal status. **Physiol Behav**, 92, n. 5, p. 881-888, Dec 5 2007.

MATSUDA, L. A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J.; YOUNG, A. C. *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, 346, n. 6284, p. 561-564, Aug 9 1990.

MCEWEN, B. S. Stress-induced remodeling of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Res**, 1645, p. 50-54, Aug 15 2016.

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

MEDINA, J. H.; BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behav Brain Res**, 192, n. 1, p. 61-69, Sep 1 2008.

MEIRELES, A. L. F.; SEGABINAZI, E.; SPINDLER, C.; GASPERINI, N. F. *et al.* Maternal resistance exercise promotes changes in neuroplastic and epigenetic marks of offspring's hippocampus during adult life. **Physiol Behav**, 230, p. 113306, Mar 1 2021.

MENEZES, J.; SOUTO DAS NEVES, B. H.; GONCALVES, R.; BENETTI, F. *et al.* Maternal deprivation impairs memory and cognitive flexibility, effect that is avoided by environmental enrichment. **Behav Brain Res**, 381, p. 112468, Mar 2 2020.

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

MOGI, K.; NAGASAWA, M.; KIKUSUI, T. Developmental consequences and biological significance of mother-infant bonding. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 35, n. 5, p. 1232-1241, Jul 1 2011.

MONROY, E.; HERNANDEZ-TORRES, E.; FLORES, G. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. **J Chem Neuroanat**, 40, n. 2, p. 93-101, Oct 2010.

MOORE, C. L.; CHADWICK-DIAS, A. M. Behavioral responses of infant rats to maternal licking: variations with age and sex. **Dev Psychobiol**, 19, n. 5, p. 427-438, Sep 1986.

MORENA, M.; PATEL, S.; BAINS, J. S.; HILL, M. N. Neurobiological Interactions Between Stress and the Endocannabinoid System. **Neuropsychopharmacology**, 41, n. 1, p. 80-102, Jan 2016.

MORRIS, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, 12, n. 2, p. 239-260, 1981.

MULDER, J.; AGUADO, T.; KEIMPEMA, E.; BARABAS, K. *et al.* Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 25, p. 8760-8765, Jun 24 2008.

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.

NEVES, B. S.; BARBOSA, G.; ROSA, A. C. S.; PICUA, S. S. *et al.* On the role of the dopaminergic system in the memory deficits induced by maternal deprivation. **Neurobiol Learn Mem**, 173, p. 107272, Sep 2020.

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.

OLIVIER FRIARD, M. G. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. **Methods in ecology and evolution**, 2016.

PAN, W.; BANKS, W. A.; FASOLD, M. B.; BLUTH, J. *et al.* Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. **Neuropharmacology**, 37, n. 12, p. 1553-1561, Dec 1998.

PAPILLOU, A.; GUILLOT DE SUDUIRAUT, I.; ZANOLETTI, O.; GROSSE, J. *et al.* Peripubertal stress increases play fighting at adolescence and modulates nucleus accumbens CB1 receptor expression and mitochondrial function in the amygdala. **Transl Psychiatry**, 8, n. 1, p. 156, Aug 15 2018.

PARONIS, E.; SAMARA, A.; POLYZOS, A.; SPYROPOULOS, C. *et al.* Maternal weight as an alternative determinant of the gestational day of Wistar rats housed in individually-ventilated cages. **Lab Anim**, 49, n. 3, p. 188-195, Jul 2015.

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.

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.

REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radic Biol Med**, 51, n. 7, p. 1302-1319, Oct 1 2011.

RICO-BARRIO, I.; PENASCO, S.; LEKUNBERRI, L.; SERRANO, M. *et al.* Environmental Enrichment Rescues Endocannabinoid-Dependent Synaptic Plasticity Lost in Young Adult Male Mice after Ethanol Exposure during Adolescence. **Biomedicines**, 9, n. 7, Jul 16 2021.

RUEBEL, M. L.; BORENGASSER, S. J.; ZHONG, Y.; KANG, P. *et al.* Maternal Exercise Prior to and during Gestation Induces Sex-Specific Alterations in the Mouse Placenta. **Int J Mol Sci**, 24, n. 22, Nov 17 2023.

RUSSO, S. J.; MURROUGH, J. W.; HAN, M. H.; CHARNEY, D. S. *et al.* Neurobiology of resilience. **Nat Neurosci**, 15, n. 11, p. 1475-1484, Nov 2012.

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.

SANTOS, A.; BORGES, N.; CEREJO, A.; SARMENTO, A. *et al.* Catalase activity and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) production in a rat model of diffuse axonal injury. Effect of gadolinium and amiloride. **Neurochem Res**, 30, n. 5, p. 625-631, May 2005.

SARA, S. J. Locus Coeruleus in time with the making of memories. **Curr Opin Neurobiol**, 35, p. 87-94, Dec 2015.

SCATLIFFE, N.; CASAVANT, S.; VITNER, D.; CONG, X. Oxytocin and early parent-infant interactions: A systematic review. **Int J Nurs Sci**, 6, n. 4, p. 445-453, Oct 10 2019.

SCHAD, A.; FAHIMI, H. D.; VOLKL, A.; BAUMGART, E. Expression of catalase mRNA and protein in adult rat brain: detection by nonradioactive in situ hybridization with signal amplification by catalyzed reporter deposition (ISH-CARD) and immunohistochemistry (IHC)/immunofluorescence (IF). **J Histochem Cytochem**, 51, n. 6, p. 751-760, Jun 2003.

SCHAEFERS, A. T. U. Environmental enrichment and working memory tasks decrease hippocampal cell proliferation after wheel running--A role for the prefrontal cortex in hippocampal plasticity? **Brain Res**, 1624, p. 125-133, Oct 22 2015.

SCHANDER, J. A.; MARVALDI, C.; CORREA, F.; WOLFSON, M. L. *et al.* Maternal environmental enrichment modulates the immune response against an inflammatory challenge during gestation and protects the offspring. **J Reprod Immunol**, 144, p. 103273, Apr 2021.

SOARES, A. R.; GILDAWIE, K. R.; HONEYCUTT, J. A.; BREHOUSE, H. C. Region-specific effects of maternal separation on oxidative stress accumulation in parvalbumin neurons of male and female rats. **Behav Brain Res**, 388, p. 112658, Jun 18 2020.

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.

SRENG, L.; TEMIME-ROUSSEL, B.; WORTHAM, H.; MOURRE, C. Chemical Identification of "Maternal Signature Odors" in Rat. **Chemical Senses**, 42, n. 3, p. 211-222, 2016.

STAMATAKIS, A.; KALPACHIDOU, T.; RAFTOGIANNI, A.; ZOGRAFOU, E. *et al.* Rat dams exposed repeatedly to a daily brief separation from the pups exhibit increased maternal behavior, decreased anxiety and altered levels of receptors for estrogens (ERalpha, ERbeta), oxytocin and serotonin (5-HT1A) in their brain. **Psychoneuroendocrinology**, 52, p. 212-228, Feb 2015.

STROOBANTS, S.; CREEMERS, J.; BOSMANS, G.; D'HOOGE, R. Post-weaning infant-to-mother bonding in nutritionally independent female mice. **PLoS One**, 15, n. 1, p. e0227034, 2020.

SUAREZ, J.; LLORENTE, R.; ROMERO-ZERBO, S. Y.; MATEOS, B. *et al.* Early maternal deprivation induces gender-dependent changes on the expression of hippocampal CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors of neonatal rats. **Hippocampus**, 19, n. 7, p. 623-632, Jul 2009.

SUNG, Y. H.; SHIN, M. S.; CHO, S.; BAIK, H. H. *et al.* Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. **Neurosci Lett**, 470, n. 1, p. 86-90, Feb 5 2010.

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.

TALANI, G.; BIGGIO, F.; GORULE, A. A.; LICHERI, V. *et al.* Sex-dependent changes of hippocampal synaptic plasticity and cognitive performance in C57BL/6J mice exposed to neonatal repeated maternal separation. **Neuropharmacology**, 222, p. 109301, Jan 1 2023.

TANAKA, T.; HIRAI, S.; HOSOKAWA, M.; SAITO, T. *et al.* Early-life stress induces the development of Alzheimer's disease pathology via angiopathy. **Exp Neurol**, 337, p. 113552, Mar 2021.

TERRANOVA, J. P.; STORME, J. J.; LAFON, N.; PERIO, A. *et al.* Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. **Psychopharmacology (Berl)**, 126, n. 2, p. 165-172, Jul 1996.

THIRUPATHI, A.; WANG, M.; LIN, J. K.; FEKETE, G. *et al.* Effect of Different Exercise Modalities on Oxidative Stress: A Systematic Review. **Biomed Res Int**, 2021, p. 1947928, 2021.

TOMAS-ROIG, J.; AGBEMENYAH, H. Y.; CELARAIN, N.; QUINTANA, E. *et al.* Dose-dependent effect of cannabinoid WIN-55,212-2 on myelin repair following a demyelinating insult. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 590, Jan 17 2020.

TONG, M. T.; PEACE, S. T.; CLELAND, T. A. Properties and mechanisms of olfactory learning and memory. **Front Behav Neurosci**, 8, p. 238, 2014.

TRACTENBERG, S. G.; LEVANDOWSKI, M. L.; DE AZEREDO, L. A.; ORSO, R. *et al.* An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. **Neurosci Biobehav Rev**, 68, p. 489-503, Sep 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.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, 2, n. 3, p. 266-270, Mar 1999.

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.

WILKINS, A. S.; LOGAN, M.; KEHOE, P. Postnatal pup brain dopamine depletion inhibits maternal behavior. **Pharmacol Biochem Behav**, 58, n. 4, p. 867-873, Dec 1997.

XU, H.; HU, W.; ZHANG, X.; GAO, W. *et al.* The effect of different maternal deprivation paradigms on the expression of hippocampal glucocorticoid receptors, calretinin and calbindin-D28k in male and female adolescent rats. **Neurochem Int**, 59, n. 6, p. 847-852, Nov 2011.

YAU, S. Y.; LAU, B. W.; ZHANG, E. D.; LEE, J. C. *et al.* Effects of voluntary running on plasma levels of neurotrophins, hippocampal cell proliferation and learning and memory in stressed rats. **Neuroscience**, 222, p. 289-301, Oct 11 2012.

YAU, S. Y.; LEE, T. H.; FORMOLO, D. A.; LEE, W. L. *et al.* Effects of Maternal Voluntary Wheel Running During Pregnancy on Adult Hippocampal Neurogenesis, Temporal Order Memory, and Depression-Like Behavior in Adult Female and Male Offspring. **Front Neurosci**, 13, p. 470, 2019.

ZAMBERLETTI, E.; PRINI, P.; SPEZIALI, S.; GABAGLIO, M. *et al.* Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. **Neuroscience**, 204, p. 245-257, Mar 1 2012.

**9. Anexo I - Certificado de aprovação no comitê de ética da UNIPAMPA**



**Pró-Reitoria de Pesquisa**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**  
Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA/ENSINO**  
**ADENDO DE PRAZO**

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos de diferentes intensidades de exercício antes e/ou durante a gestação sobre o comportamento, memória e flexibilidade cognitiva das mães e da prole submetida à privação materna", registrada com o nº 020/2021, sob a responsabilidade de Pâmela Billig Mello-Carpes - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal - Concea, e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa (CEUA/UNIPAMPA) a extensão do prazo de vigência para **01/08/2024**.

<b>Finalidade</b>	<b>( ) Ensino ( X ) Pesquisa</b>		
<b>Espécie / Linhagem / Raça</b>	Ratos Wistar		
<b>Nº de animais</b>	45 Machos e 160 Fêmeas	260 Machos e 260 Fêmeas	40 Machos e 40 Fêmeas
<b>Peso / Idade</b>	250 a 400g / 3 a 4 meses	250 a 400g / 0 a 76 dias	80g / 0 a 10 dias
<b>Sexo</b>	Machos e Fêmeas		
<b>Origem</b>	Biotério da UFSM (modificação)		

10. ANEXO II – Certificado de aprovação no comitê de ética da KUL, Bélgica

PPL: 034/2023 "Behavioral evaluation of maternal deprivation: influence of the endocannabinoid system", (v.26.0), Approved/Approved

← Back to overview  Review  Attachments  Action  Workflow

Project category	0.6.0	6.0	Submit	D'Hooge, Rudi	14-Nov-2022	<input checked="" type="checkbox"/>
General info	0.7.0	7.0	Revision after Eligibility	Vermiers, Liesbeth	15-Nov-2022	<input checked="" type="checkbox"/>
Personnel	0.8.0	8.0	Submit to PI after EC revision	Vegh, Zuzanna	15-Dec-2022	<input checked="" type="checkbox"/>
Project	0.9.0	9.0	Submit	D'Hooge, Rudi	15-Dec-2022	<input checked="" type="checkbox"/>
Species	0.10.0	10.0	Revision after Eligibility	Vermiers, Liesbeth	15-Dec-2022	<input checked="" type="checkbox"/>
Animal experiment	0.11.0	11.0	Submit to PI after EC revision	Vegh, Zuzanna	16-Dec-2022	<input checked="" type="checkbox"/>
No. of Animals	0.12.0	12.0	Submit	D'Hooge, Rudi	16-Dec-2022	<input checked="" type="checkbox"/>
3 R's	0.13.0	13.0	EC Secretary	Vermiers, Liesbeth	19-Dec-2022	<input checked="" type="checkbox"/>
Health, Safety and Environment	0.14.0	14.0	EC members review	Dewil, Erna	03-Jan-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
Non Technical Summary	0.15.0	15.0	EC Secretary	Clayts, Eliza	17-Jan-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
Workflow History	0.16.0	16.0	Revision after EC	Dewil, Erna	19-Jan-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	0.17.0	17.0	Submit to PI after EC revision	Vegh, Zuzanna	02-Feb-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	0.18.0	18.0	Revision after EC	D'Hooge, Rudi	02-Feb-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	0.19.0	19.0	Submit to PI after EC revision	D'Hooge, Rudi	02-Feb-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	0.20.0	20.0	Revision after EC	D'Hooge, Rudi	02-Feb-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	0.21.0	21.0	Submit to PI after EC revision	D'Hooge, Rudi	03-Feb-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	0.22.0	22.0	EC Secretary	D'Hooge, Rudi	03-Feb-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	0.23.0	23.0	EC members review	Dewil, Erna	23-Feb-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	0.24.0	24.0	EC Secretary	Dewil, Erna	23-Mar-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	0.25.0	25.0	EC president	Dewil, Erna	23-Mar-2023	<input checked="" type="checkbox"/>
	1.0.0	26.0	Approved	Zwijpen, An	24-Mar-2023	<input checked="" type="checkbox"/>