

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

GABRIELA CRISTIANE MENDES GOMES

**EFEITOS DO TREINAMENTO MULTICOMPONENTE SOBRE A MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO E PARÂMETROS OXIDATIVOS HIPOCAMPAIS EM RATAS
SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO MATERNAL**

Uruguiana

2024

GABRIELA CRISTIANE MENDES GOMES

**EFEITOS DO TREINAMENTO MULTICOMPONENTE SOBRE A MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO E PARÂMETROS OXIDATIVOS HIPOCAMPAIS EM RATAS
SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO MATERNAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Pâmela Billig Mello Carpes

Uruguaiana

2024

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) .

G118e Gomes, Gabriela Cristiane Mendes
Efeitos do treinamento multicomponente sobre a memória de reconhecimento e parâmetros oxidativos hipocâmpais em ratas submetidas à privação materna / Gabriela Cristiane Mendes Gomes.
96 p.
Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2024.
"Orientação: Pâmela Billig Mello-Carpes".
1. Estresse neonatal. 2. Exercício Físico. 3. Exercício cognitivo. 4. Reconhecimento de objetos. 5. Hipocampo. I. Título.

GABRIELA CRISTIANE MENDES GOMES

**EFEITOS DO TREINAMENTO MULTICOMPONENTE SOBRE A MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO E PARÂMETROS OXIDATIVOS HIPOCAMPAIS EM RATAS
SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO MATERNAL**

Dissertação **de Mestrado** apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Pampa.

Banca Examinadora:

Profª Drª Pâmela Billig Mello Carpes

Orientadora

Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Profª Drª Cristiane Matté

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Leonardo Magno Rambo

Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Uruguaiana, 08/07/2024

Dedico este trabalho à minha mãe,
Andreia, e minha avó Marta (*in memoriam*),
por me mostraram desde cedo
a importância do cuidado materno.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família. Minha mãe, Andreia, meus tios Paulo e Valeria, minha prima Natália e meu namorado Gabriel, por todo apoio e incentivo. Ao meu afilhado, Théo, que por muitas vezes me ajudou a repor as energias compartilhando um pouco da sua, no auge de seus 1 ano e 6 meses. Os últimos meses não foram fáceis, mas sem vocês, teria sido muito mais difícil.

À professora Pamela, pelas oportunidades que me proporcionou desde a minha iniciação científica, e por confiar em meu potencial ao longo desta trajetória. O mestrado, para mim, um dia já foi sonho, e concretizá-lo sob sua orientação torna-se ainda mais especial. Você nos inspira!

À minha equipe de experimentos: Ben-Hur, Ana Carolina, Karine, Anna Cecília, Pâmella, Larissa e Giulia. Vocês tornaram os experimentos mais leves, e foram, sem dúvida, não apenas os melhores “*personal trainers* de ratos”, mas também uma grande família ao longo dos meses de execução deste projeto.

À minha amiga de infância, Gabrielle, por me mostrar que sempre terei com quem contar. À minha grande amiga Nathalia, por se manter presente mesmo com vários quilômetros de distância entre nós. À Camila, minha eterna dupla dinâmica, mesmo depois de tanto tempo após a conclusão da graduação. Vocês foram essenciais na minha trajetória na pós-graduação!

À Universidade Federal do Pampa, pela oportunidade de obter um ensino público e de qualidade desde a graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade e pelo suporte da equipe de coordenação, professores e demais servidores.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Meus sinceros agradecimentos.

“The flower that blooms in adversity is the most rare and beautiful of all”

(Mulan, 1998)

RESUMO

O cérebro é uma estrutura que inicia seu desenvolvimento no período intrauterino e permanece se desenvolvendo após o nascimento, estando vulnerável às influências externas nos primeiros anos de vida. O estresse neonatal é um dos fatores externos que pode influenciar negativamente o desenvolvimento do Sistema Nervoso, promovendo alterações a curto e longo prazo. A privação materna (PM) é um modelo animal que permite investigar desordens relacionadas ao estresse no início da vida, promovendo alterações neuroanatômicas, neuroquímicas e comportamentais que persistem ao longo da vida. A combinação de exercícios, incluindo físico e cognitivo, chamada de treinamento multicomponente (TM), tem apresentado benefícios em estudos com idosos, mas seus efeitos sobre alterações relacionadas à PM ainda não são claros. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do TM sobre a memória de reconhecimento e parâmetros oxidativos hipocâmpais em ratas fêmeas submetidas à SM. O protocolo de PM foi realizado durante 10 dias, exceto nos grupos controle. Os grupos TM realizaram o protocolo de TM durante seis semanas, já na idade adulta, consistindo na prática alternada de exercício de corrida, de força e cognitivo. A memória de reconhecimento dos animais foi avaliada utilizando a tarefa de reconhecimento de objetos (RO). Foram avaliados os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total do hipocampo das ratas. As ratas submetidas à PM não apresentaram déficits de memória de RO demonstrando que, diferente dos machos, nas fêmeas a PM não interferiu na memória de reconhecimento. A PM aumentou os níveis hipocâmpais de EROs e diminuiu a capacidade antioxidante total do hipocampo. O TM foi capaz de reverter estes efeitos, promovendo a diminuição de EROs e o aumento da capacidade antioxidante total no hipocampo. O TM apresenta um potencial no manejo de alterações no balanço oxidativo relacionadas ao estresse neonatal.

Palavras-chave: Estresse neonatal. Exercício físico. Exercício cognitivo. Reconhecimento de objetos. Hipocampo.

ABSTRACT

The brain is a structure that begins its development in the intrauterine period and remains developing after birth, being vulnerable to external influences in the first years of life. Neonatal stress is one of the external influences that can negatively influence the Nervous System development, promoting short- and long-term alterations. The maternal separation (MS) is an animal model that allows the investigation of disorders related to early life stress, promoting neuroanatomical, neurochemistry, and behavioral alterations that persist throughout life. The combination of exercises, including physical and cognitive, called multicomponent training (MT), has presented benefits in studies with older adults, but its effects on MS-related alterations are still unclear. The present study aimed to investigate the effects of MT on recognition memory and hippocampal oxidative parameters in female rats submitted to SM. The MS protocol was performed for ten days, except in the control groups. The MT groups performed the MT protocol for six weeks in adult life, consisting of the alternate practice of running, strength, and cognitive exercises. The recognition memory of the animals was evaluated using the object recognition task (OR). The hippocampal reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and total antioxidant capacity were evaluated. The MS females did not present OR memory deficits, demonstrating that, unlike males, MS did not interfere with the females' recognition memory. The MS increased the hippocampal ROS levels and decreased the total antioxidant capacity in the hippocampus. MT was able to reverse these effects, promoting the decrease of ROS and the increase of total antioxidant capacity in the hippocampus. MT presents a potential to manage alterations in the oxidative balance related to neonatal stress.

Keywords: Neonatal stress. Physical exercise. Cognitive exercise. Object recognition. Hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Fig. 1 – Formação do tubo neural e da crista neural.....	18
Fig. 2 – Estágios de desenvolvimento cerebral.....	20
Fig. 3 – O eixo HPA	23
Fig. 4 – Classificação das memórias	25
Fig. 5 – Protocolo da tarefa de reconhecimento de objetos.....	28
Fig. 6 – Exercício de força e BDNF.....	31

PARTE II

Fig. 1 – Study experimental design.....	59
Fig. 2 – Multicomponent training and maternal separation on exercise performance and body weight	60
Fig. 3 – Maternal separation did not affect recognition memory or discrimination ability in the object recognition (OR) task in female rats.....	60
Fig. 4 – Maternal separation (MS) alters hippocampal oxidative parameters in female rats. Multicomponent training improved hippocampal oxidative alterations induced by MS.....	61

LISTA DE TABELAS

Parte II

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Table 1 – Effects of maternal separation and multicomponent training on locomotor and exploratory activities, and on anxiety-like behavior.....	61
--	-----------

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
PARTE I	14
1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Desenvolvimento do cérebro	17
2.1.1 Neurodesenvolvimento na gestação	17
2.1.2 Neurodesenvolvimento no período pós-natal.....	19
2.1.2 Neurodesenvolvimento na perspectiva DOHaD.....	20
2.2 Importância do cuidado materno	22
2.2.1 Impactos do cuidado materno sobre a memória	22
2.2.2 Impactos do cuidado materno sobre o balanço oxidativo	24
2.3 Memória	25
2.3.1 Classificação de memórias	25
2.3.2 Memória de reconhecimento.....	27
2.4 Exercício e suas diferentes modalidades	29
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS	35
PARTE II	36
5. MANUSCRITO CIENTÍFICO	36
PARTE III	62
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	66
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	79

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação é composta por um estudo principal, com intuito de investigar os efeitos da combinação de diferentes modalidades de exercício (treinamento multicomponente) sobre a memória de reconhecimento e o equilíbrio oxidativo hipocampal em ratas fêmeas submetidas à um protocolo de privação de cuidados no início da vida. Este estudo experimental foi executado mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição – CEUA/UNIPAMPA (ANEXO I).

A organização da dissertação dispõe-se em três partes. Na “Parte I”, a sessão “Introdução” aborda os conceitos norteadores desta dissertação; na sequência, a “Revisão de literatura” aborda informações e atualizações sobre as temáticas deste estudo. Para isso, a revisão de literatura foi realizada utilizando a base de dados *Pubmed* no período de abril a junho de 2024. Ainda nesta sessão, estão inseridas a “Justificativa” e os “Objetivos”.

A “Parte II” é composta por um manuscrito científico, que apresenta os materiais e métodos, bem como os resultados que compõem esta dissertação. O manuscrito é intitulado: “*Maternal separation does not affect recognition memory in female rats but alters hippocampal oxidative balance, a disorder reverted by a multicomponent training*”, submetido ao periódico científico *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (ANEXO II).

Por fim, a “Parte III” desta dissertação inclui as sessões de “Discussão” e “Conclusão” de nossos principais achados. As referências bibliográficas utilizadas nas partes I e II estão dispostas, em ordem alfabética, ao final da presente dissertação.

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

O início da vida é uma janela de tempo primordial para o desenvolvimento do neonato. Órgãos como cérebro iniciam o seu desenvolvimento ainda no período gestacional, e mantêm seu desenvolvimento desde os primeiros anos de vida até a adolescência, estando suscetível à influência de fatores genéticos e ambientais (RICHMOND et al., 2016). Processos de diferenciação e migração celular, neurogênese, sinaptogênese, poda sináptica e estabilização de circuitos neurais caracterizam não apenas a vasta neuroplasticidade deste período da vida (ISMAIL et al., 2017), mas também a importância do ambiente durante a infância no desenvolvimento cerebral.

A ocorrência de eventos estressores no início da vida, como condições socioeconômicas, levando a complicações em aspectos de bem-estar e nutrição, traumas, situações de abuso e ausência do cuidado materno podem acarretar na manifestação de desordens a curto e longo prazo. Considerando-se a vulnerabilidade do cérebro neste período, modelos animais têm permitido investigar os efeitos do estresse neonatal, dentre os quais a privação materna (PM), demonstrando modificações morfológicas e funcionais em regiões como córtex pré-frontal, amígdala e, hipocampo, disfunções no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), promovendo déficits em diferentes tipos de memória e incidência de distúrbios psíquicos ao longo da vida (ALVES et al., 2022). Ainda, estudos com o modelo de PM têm revelado alterações no comportamento (SUN et al., 2021), em parâmetros oxidativos (MALCON et al., 2020), desordens em sistemas de neurotransmissores (NEVES et al., 2020) e disfunções cognitivas, com impacto sobre a memória e a flexibilidade cognitiva (THOMAS et al., 2016; DE AZEREDO et al., 2017), o que ilustra a importância da busca de intervenções para reversão ou atenuação de desordens relacionadas à PM.

Estratégias farmacológicas e não-farmacológicas têm sido estudadas para reversão ou atenuação dos distúrbios relacionados à PM (MENEZES et al., 2017; MENEZES et al., 2020; GROCHECKI et al., 2022). Neste sentido, o exercício físico é uma intervenção amplamente estudada em modelos animais e em humanos com doenças crônicas, distúrbios cardiovasculares, psíquicos e neurodegenerativos, evidenciando seu potencial neuroprotetor (JIN et al., 2024). O exercício é capaz de

influenciar no funcionamento do hipocampo e na expressão de neurotrofinas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*, da sigla em inglês *BDNF*), promovendo aumento da neurogênese, sinaptogênese e a formação de circuitos neurais, com benefícios já associados à prática tanto por infantes como por idosos (MARTÍN-RODRÍGUEZ et al., 2024). Além disso, já foi demonstrado que uma sessão de exercício promove aumento da liberação de neurotransmissores como norepinefrina e dopamina (VARGAS et al., 2017; LIMA et al., 2021), catecolaminas relacionadas à atenção e processos de consolidação e persistência da memória, o que corrobora para o potencial do exercício como estratégia para melhora da função cognitiva.

Benefícios do exercício físico têm sido descritos a partir da prática de diferentes modalidades. Estudos sobre o exercício aeróbico, geralmente corrida, têm demonstrado aumento dos níveis de *BDNF* em roedores, melhora do fluxo sanguíneo cerebral e de funções cognitivas em humanos (LU et al., 2023; ZHANG; ZHOU; CHEN, 2024). O exercício anaeróbio, geralmente de força/musculação, tem sido associado à melhora do estresse oxidativo, da função cardiovascular, ao ganho de massa muscular e melhora da memória (DE GREGÓRIO et al., 2022; EL ASSAR et al., 2022; POWERS et al., 2023;). O exercício cognitivo, por sua vez, embora não seja uma modalidade de exercício físico, já que consiste em repetidas práticas de uma tarefa cognitivamente desafiadora, com enfoque na manutenção da função cognitiva, também tem demonstrado atuar na promoção da melhora da memória em idosos (GAVELIN et al., 2020). Recentemente, a combinação destas três modalidades, denominada treinamento multicomponente (TM), tem sido alvo de estudos com enfoque na cognição devido aos efeitos positivos observados em idosos (VENEGAS-SANABRIA et al., 2022), contudo, os seus efeitos em modelos de estresse neonatal são pouco conhecidos.

Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que a PM promove déficits na memória de reconhecimento em ratos machos adultos (MENEZES et al., 2017; NEVES et al., 2020). O exercício aeróbico crônico (corrida em esteira) apresentou efeito neuroprotetor sobre desordens na memória e no balanço oxidativo (NEVES et al., 2015), e benefícios também foram observados até mesmo em uma única sessão de exercício realizada na janela temporal de consolidação da memória, promovendo melhora da consolidação e persistência da memória e modulação dos níveis de

norepinefrina (SOSA et al., 2019). Um estudo prévio de nosso laboratório demonstrou o potencial do TM para a prevenção de alterações mnemônicas e sob parâmetros oxidativos induzidos pela neurotoxicidade ao peptídeo β -amilóide (SOARES et al., 2021), mas os efeitos sobre as alterações induzidas pela PM ainda não foram explorados.

Desta forma, tendo em vista o potencial do TM, assim como a relevância de estudos relacionados ao estresse neonatal e suas diferenças relacionadas ao sexo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do TM sobre a memória e o balanço oxidativo hipocampal em ratas fêmeas submetidas ao estresse no início da vida.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Desenvolvimento do cérebro

2.1.1 Neurodesenvolvimento na gestação

O desenvolvimento do cérebro envolve uma série de processos que iniciam já no período embrionário. A fecundação, com a passagem do espermatozóide pela corona radiata do oócito na tuba uterina, leva à formação do zigoto, que, após ser clivado, divide-se em células chamadas de blastômeros, que se unem em agregado conhecido como mórula (GAUSTER et al., 2022). A mórula é envolta por blastômeros formando o trofoblasto, que, cerca de 4 dias após a fecundação, se desloca até o útero, onde se subdivide em trofoblastos (externos, originarão à placenta) e embrioblastos (darão origem ao feto) – nesta etapa, o embrião é nominado blastocisto (HUPPERTZ; HERRLER, 2005). A adesão do blastocisto ao endométrio se dá após o sexto dia, com proliferação e subdivisão do trofoblasto, viabilizando a sua implantação e nutrição (GAUSTER et al, 2022).

A partir da segunda semana de gestação o embrião é caracterizado como uma estrutura oval chamada de disco embrionário, composta por duas camadas de células epiblasticas e hipoblasticas, modificadas no processo de gastrulação após a terceira semana, que levará à diferenciação para células tronco primárias e anexos embrionários (STILES; JERNIGAN, 2010). O processo tem início com a formação da linha primitiva na camada de epiblastos, em formato caudal em relação ao plano mediano do disco embrionário, e se caracteriza pela extensão tanto na extremidade caudal como cranial, resultando no nó primitivo seguido de modificações que levam à formação do mesênquima, tecido a partir do qual parte das células dão início ao processo notocordal (RICE; BARONE, 2000). A partir desta etapa, o embrião apresenta constituição de três camadas, sendo endoderma (do qual se formarão as vísceras), mesoderma (dá origem aos ossos e músculos) e ectoderma (do qual serão constituídos o sistema nervoso e a pele (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2017). A notocorda é importante para o desenvolvimento do embrião, e no que diz respeito ao cérebro, ela promove a formação da região denominada placa neural a partir do espessamento do ectoderma (RICE; BARONE, 2000).

A etapa seguinte é denominada neurulação, que se conclui na quarta semana de gestação com a invaginação da placa neural formando o sulco neural, cujas paredes internas correspondem às pregas neurais que, por sua vez, se fundem e resultam nos tubos neurais que posteriormente se diferenciam levando ao desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) (**Fig. 1**) (RICE; BARONE, 2000; MÉNDEZ-MALDONADO et al., 2020). Nesta fase também ocorre a formação das cristas neurais, estruturas que posteriormente se diferenciarão originando o sistema nervoso periférico (MÉNDEZ-MALDONADO et al., 2020) (**Fig. 1**). Após a quarta semana, as pregas neurais já caracterizam o encéfalo, mas é apenas a partir da vigésima sexta semana que o SNC já está desenvolvido a ponto de executar ações como controle da temperatura corpórea, e algumas funções integrativas a partir da trigésima sétima semana (ELSHAZZLY et al., 2018).

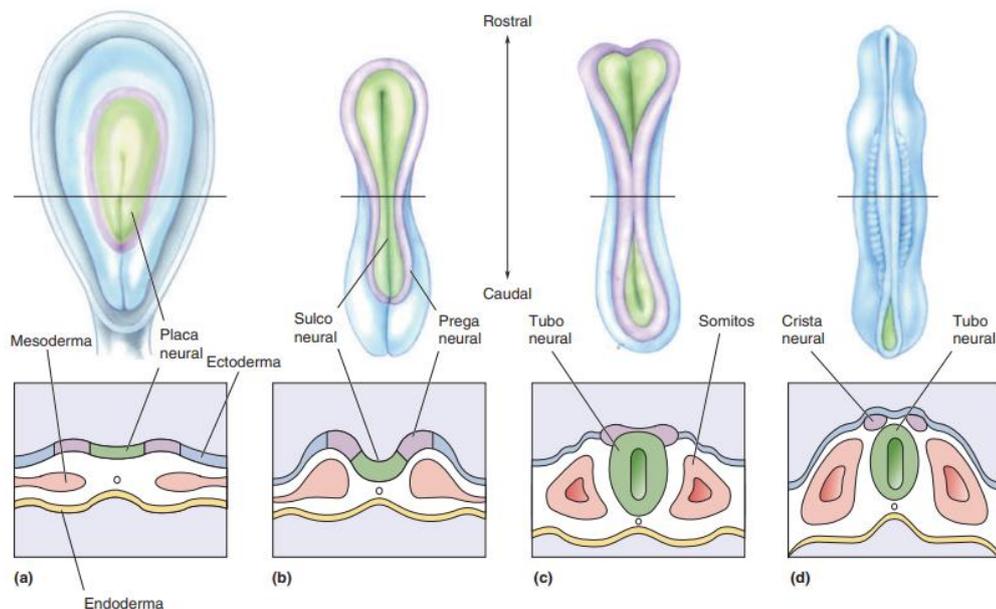


Fig. 1. Formação do tubo neural e da crista neural. a) O sistema nervoso central inicia seu desenvolvimento a partir de uma camada de ectoderma. b) O sulco neural é a etapa primordial no neurodesenvolvimento. c) As pregas neurais presentes no interior do sulco neural se aproximam e se fundem, para formação do tubo neural. d) As porções adjacentes, isto é, dispostas para fora do tubo, consistem na crista neural, que levará à formação do sistema nervoso periférico. Adaptada de Bear, 2017.

Destaca-se que aproximadamente na vigésima semana parte considerável da neurogênese está concluída, no entanto, o hipocampo é uma estrutura que se

caracteriza por apresentar este processo no decorrer da vida (KOLB; GIBB, 2011). Em suma, o desenvolvimento cerebral é caracterizado por processos de neurogênese, proliferação, migração e apoptose celular, sinaptogênese e mielinização, e quaisquer interferências podem ocasionar desordens no desenvolvimento do SNC (RICE; BARONE, 2000).

2.1.2 Neurodesenvolvimento no período pós-natal

Após o nascimento, o cérebro continua a se desenvolver, com processos que se concluem nos primeiros anos ou até as primeiras décadas de vida (VILJETIĆ et al., 2024). Embora considerável parte da neurogênese ocorra no período gestacional, este processo tem sido evidenciado na literatura após o nascimento, com uma vasta neurogênese em regiões como o córtex cingulado e o giro frontal superior no primeiro semestre de vida (GILMORE; KNICKMEYER; GAO, 2018). Ainda, entre o primeiro e o segundo ano após o nascimento também observa-se a formação de novos neurônios em estruturas como bulbo olfatório e no giro denteado do hipocampo, além da proliferação e migração de células progenitoras gliais para regiões como córtex, estriado e hipocampo, onde posteriormente passam pela diferenciação a oligodendrócitos e astrócitos (STILES; JERNIGAN, 2010).

As células progenitoras são associadas à mielinização, promovendo o aumento da expressão proteica de mielina, com início da agregação em torno dos axônios (STILES; JERNIGAN, 2010). Este processo, assim como a neurogênese, inicia no período intrauterino, mas se estende, ora até a infância, ora até a vida adulta, com variabilidade entre as regiões encefálicas (GILMORE; KNICKMEYER; GAO, 2018). No hipocampo, por exemplo, a mielinização tem início na vigésima semana gestacional, mas regiões como o hilo do giro denteado concluem sua mielinização entre a infância e a adolescência; no neocórtex, observa-se apenas na idade adulta (GILMORE; KNICKMEYER; GAO, 2018).

Após o nascimento, o processo de sinaptogênese também continua a acontecer, atingindo seu ápice até os dois primeiros anos de vida (HUTTENLOCHER, 1999), mas podendo estender-se até cerca de 17-25 anos de vida em estruturas como o córtex pré-frontal (ZEISS, 2021). Além disso, ocorrem processos de apoptose de células gliais e a chamada poda sináptica, para refinamento dos circuitos neurais, os

quais se manifestando extensamente durante a infância (HUTTENLOCHER, 1999; STILES; JERNIGAN, 2010).

Em relação às características estruturais, já foram descritos o aumento do volume de substância branca e redução da densidade sináptica na região do córtex durante a infância, além da redução progressiva do tamanho de regiões como tálamo, córtex e núcleo *accumbens* (STILES; JERNIGAN, 2010). Algumas estruturas concluem o seu desenvolvimento apenas após o nascimento. O hipocampo completa seu desenvolvimento até o décimo quinto mês pós-natal, enquanto o córtex pré-frontal o atinge, no mínimo, a partir do décimo ano de vida (RICE; BARONE, 2000).

Ao longo da infância e da adolescência, observa-se também extensa reorganização em circuitos neurais e poda sináptica, além de modificações na densidade de sinapses e de receptores em diferentes sistemas de neurotransmissores até o início da vida adulta (ANDERSEN, 2003). Tendo em vista a complexidade de processos envolvidos na formação e maturação do cérebro, é notória a importância de assegurar-se condições favoráveis para o crescimento do infante. Uma visão geral dos processos mencionados anteriormente é ilustrada na **Fig. 2**.

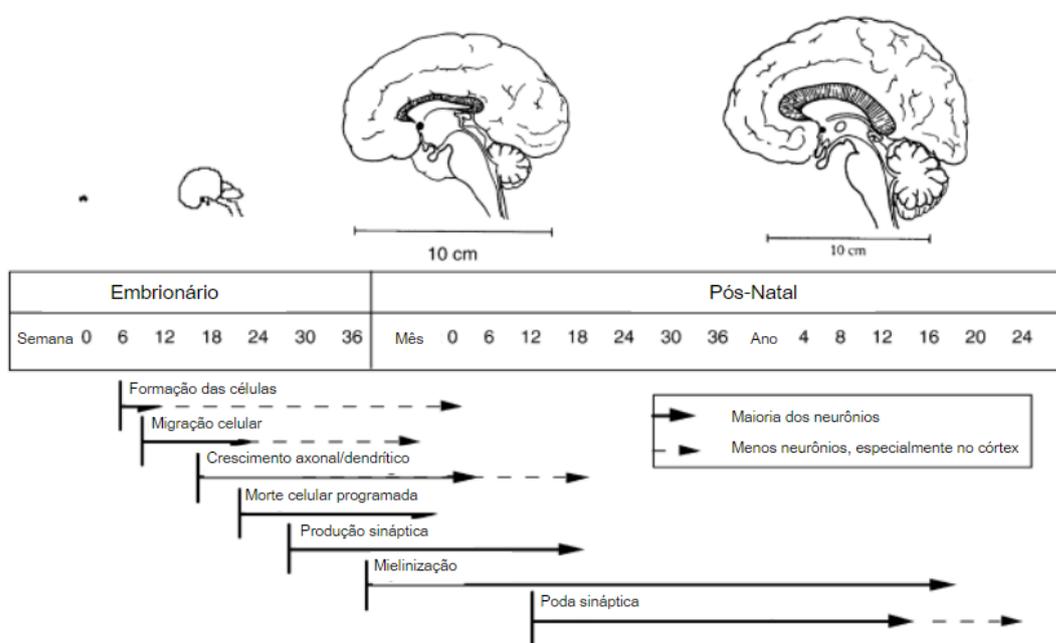


Fig. 2 Estágios do desenvolvimento cerebral. Adaptado de Andersen, 2003.

2.1.3 O neurodesenvolvimento na perspectiva DOHaD

A sequência de processos envolvidos no neurodesenvolvimento fetal e pós-natal ilustra a vulnerabilidade do cérebro a influências externas neste período. No que se refere ao SN, fatores como o estresse podem interferir negativamente no desenvolvimento normal do cérebro, sendo relacionados à manifestação de desordens psiquiátricas ao longo da vida (MANIAM; ANTONIADIS; MORRIS, 2014). Pesquisas com enfoque nessa temática são exemplos de estudos na linha DOHaD (sigla em inglês para *Developmental Origins of Health and Disease*; em português, Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença), que investiga como a exposição a fatores externos, em estágios iniciais do desenvolvimento humano, podem interferir nos estados de saúde e doença, dentro de um curto ou longo período na vida do indivíduo (VAN DER BERGH, 2011).

Os estudos do epidemiologista David James Purslove Barker sobre a origem das doenças impulsionaram, anos mais tarde, a linha de pesquisa *DOHaD*. Os achados de Barker, popularmente chamados de “hipótese de Barker”, elucidaram a influência do ambiente em períodos críticos de desenvolvimento na manifestação de doenças isquêmicas cardíacas ao longo da vida (WADHWA et al., 2009). Quando pensamos na temática voltada para o desenvolvimento cerebral, destaca-se a importância de um ambiente e condições saudáveis, tanto no desenvolvimento fetal (O'DONNELL; MEANEY, 2017) como pós-natal (LAHTI et al., 2010), na saúde mental e na função cognitiva (MARGOLIS; GABARD-DURNAM, 2024).

Isso se dá pela vulnerabilidade do cérebro neste período da vida, com repercussões sobre a função cognitiva de um modo geral, incluindo a aprendizagem, o comportamento e transtornos mentais (KAJANTIE, 2008). Um levantamento de estudos epidemiológicos demonstra a relação de níveis baixos de quociente de inteligência (QI), manifestação de transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH), transtorno do espectro autista e esquizofrenia com distúrbios provocados por eventos adversos na gestação (SILVEIRA; MANFRO, 2015), os quais incluem fatores como exposição ao estresse pré-natal, consumo de substâncias de abuso e condições de subnutrição nesse período (VAN DER BERGH, 2011).

Mecanismos epigenéticos são associados a desordens induzidas por eventos adversos no início da vida, os quais incluem alterações estruturais na cromatina e em histonas, e metilação do ácido desoxirribonucleico (da sigla em inglês *DNA*, para *deoxyribonucleic acid*) (VAN DER BERGH, 2011), demonstrando a relevância de

estratégias para a prevenção de distúrbios no SN. Assim, considerando que tanto o período pré- como o pós-natal representam janelas de tempo primordiais para o desenvolvimento humano (VAN DER BERGH, 2011), podem ser moduladas positivamente, como em estratégias preventivas (MONK; LUGO-CANDELAS; TRUMPPFF, 2019), mas, infelizmente, também de modo negativo, como em situações de adversidades no início da vida (que serão abordadas em tópico subsequente) e que requerem a busca de intervenções para reversão ou atenuação de suas implicações no organismo.

2.2 Importância do cuidado materno

2.2.1 Impactos do cuidado materno sobre a memória

A importância do cuidado materno é notória não apenas em seres humanos, mas em mamíferos altriciais em geral, tendo em vista a necessidade de habituação e sobrevivência da prole dentro do ambiente no qual virá a se desenvolver (BURENKOVA; GRIGORENKO, 2024). Estudos têm demonstrado que não apenas para fins de subsistência, mas a ausência do cuidado materno, dentre outros aspectos como fatores socioeconômicos e exposição materna a substâncias psicoativas durante o período gestacional, tem sido classificada como um evento estressor capaz de modificar o desenvolvimento cerebral, resultando em distúrbios como a manifestações de distúrbios psiquiátricos (MILBOCKER et al., 2021).

Dentre as alterações relacionadas ao estresse neonatal, está a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), cujo funcionamento está esquematizado na **Fig. 3**. Em condições normais, o eixo HPA apresenta fraca resposta ao estresse, mas em modelos como a privação materna (PM), manifesta um aumento da atividade, refletindo no aumento dos níveis de corticosteróides (ESKANDARI et al., 2023). Uma vez que estas moléculas apresentam receptores distribuídos em diferentes regiões encefálicas, altas concentrações de corticosteróides têm sido associadas a alterações mnemônicas e comportamentais (NIWA et al., 2010).

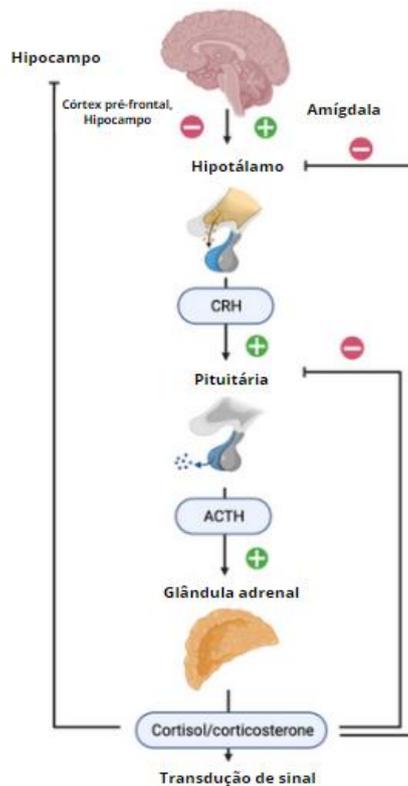


Fig. 3. O eixo HPA. O eixo HPA desempenha importante papel na resposta ao estresse. Em resposta à sinalização hipotalâmica, que se dá por meio da liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH, do inglês *Corticotropin-Releasing Hormone*), a glândula pituitária anterior promove a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH, do inglês *Adrenocorticotropic Hormone*), que por fim estimula a liberação de glicocorticoides pela glândula adrenal, desencadeando respostas pela interação destas moléculas com seus receptores específicos, dispostos em diferentes órgãos e tecidos, como o cérebro (incluindo hipocampo, o córtex pré-frontal e amígdala). Adaptado de Komoltsev & Gulyaeva, 2022.

Estudos mostram, ainda, que o estresse neonatal promove alterações neuroanatômicas, como a redução do corpo caloso, depleção do desenvolvimento de estruturas como o hipocampo e a amígdala, disfunções no cerebelo e estruturas límbicas (TEICHER et al., 2003). Distúrbios em sistemas de neurotransmissores já foram relacionados ao modelo de PM, incluindo os sistemas dopaminérgico (NEVES et al., 2020), canabinóide (2019), glutamatérgico (SUN et al., 2021) e serotoninérgico (SUN et al., 2024), além de alterações em conexões neurais entre a amígdala e o córtex pré-frontal e o hipocampo (MILBOCKER et al., 2021). O hipocampo e o córtex são estruturas importantes em processos de memória, os quais também envolvem liberação de neurotransmissores (SEKERES, MOSCOVITCH; WINOCUR, 2017) e estão relacionados a fatores como emoção e estado de alerta no momento da aquisição de informações (PHELPS, 2006).

Tendo em vista as disfunções encefálicas promovidas pela PM, déficits cognitivos têm sido verificados em animais submetidos a este protocolo, em diferentes tipos de memória, tais como memória espacial (GROCHECKI et al., 2022), de reconhecimento (MENEZES et al., 2017), de trabalho (TRACTENBERG et al., 2020) e aversiva (COUTO-PEREIRA et al., 2019). As variabilidades entre modelos de estresse neonatal e a majoritária publicação de estudos afins com a inclusão apenas de machos em amostras experimentais (ALVES et al., 2022) enfatizam a relevância e a necessidade de mais estudos na temática.

2.2.2 Impactos do cuidado materno sobre o balanço *oxidativo*

O estresse oxidativo é caracterizado por um quadro de desequilíbrio entre os mecanismos de defesa antioxidante e os níveis de moléculas reativas. Alguns exemplos de moléculas reativas, também chamadas de oxidantes, incluem peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, radical hidroxila (TIBERI et al., 2023), enquanto os mecanismos de defesa antioxidante podem ser do tipo enzimático (como superóxido dismutase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase), e não enzimático (que abrangem moléculas endógenas, como glutathione, e exógenas - em geral provenientes da alimentação) (MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018). Compostos oxidativos são produzidos em condições fisiológicas, como a formação de energia na forma de ATP no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, e, em condições saudáveis, ocorre a neutralização destas moléculas pelos mecanismos antioxidantes (SALIM, 2017). Do contrário, estas moléculas serão capazes de interagir e promover danos decorrentes da oxidação de proteínas e lipídios (SALIM, 2017).

O cérebro é uma estrutura com alta demanda energética e produção de compostos oxidantes, no entanto apresenta baixas defesas antioxidantes e vasta porção lipídica, tornando-o, assim, suscetível ao estresse oxidativo (LEE; CHA; LEE, 2020). Não somente a bicamada lipídica, mas também proteínas e nucleotídeos apresentam risco de sofrer interação com moléculas reativas e promover distúrbios no funcionamento cerebral (SALIM, 2017). Observa-se um aumento no estresse oxidativo em desordens psiquiátricas (GONZÁLEZ-PARDO et al., 2020) e com o envelhecimento, período no qual também se manifestam doenças

neurodegenerativas, também capazes de promover este desequilíbrio oxidativo (LEE; CHA; LEE, 2020). Ainda, estudos têm demonstrado uma potencial relação do estresse oxidativo com o estresse neonatal (BENMHAMMED et al., 2019).

A PM tem sido associada a um quadro de desequilíbrio oxidativo em estudos com machos (MENEZES et al., 2017) e com fêmeas (RÉUS et al., 2023). Uma das hipóteses relacionadas sugere alterações na função mitocondrial decorrentes do estresse neonatal, envolvendo depleção da fosforilação oxidativa e aumento de moléculas reativas em estruturas como o hipocampo (GONZÁLEZ-PARDO et al., 2020). Sabendo-se da baixa capacidade antioxidante cerebral, distúrbios em componentes da cadeia de respiração celular e a interação de oxidantes com proteínas e lipídios pode causar comprometimento metabólico, mutações e danos na integridade celular (SALIM, 2017). Com isso, o quadro de estresse oxidativo pode estar associado a déficits cognitivos e incidência de desordens psíquicas decorrentes do estresse neonatal (DIEHL et al., 2012).

2.3 Memória

2.3.1 Classificações de memórias

A memória consiste na aquisição, formação, armazenamento e evocação de informações (IZQUIERDO, 2011), e pode ser classificada conforme seu conteúdo, podendo ser procedurais ou declarativas; sua duração, sendo de curta ou de longa duração (IZQUIERDO et al., 2013); e, de acordo com sua função, como a memória de trabalho (IZQUIERDO, 2011). A **Fig. 3** sintetiza a classificação das memórias.

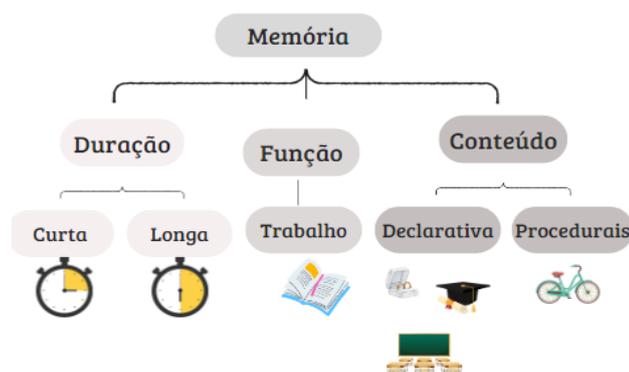


Fig. 4. Classificação das memórias. A memória apresenta classificações de acordo com sua função, duração e conteúdo. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A memória de trabalho, categorizada como uma função executiva, é primordial para o gerenciamento de informações em nosso cotidiano (IZQUIERDO, 2011). Isso se dá pela capacidade de armazenamento temporário e breve de uma informação, sem deixar traços; trata-se de uma habilidade essencial para ações como a leitura de textos, permitindo a duração de uma informação apenas pelos segundos ou pouco minutos necessários para a compreensão de uma frase (IZQUIERDO, 2011). A memória de trabalho envolve modificações no potencial de membrana dos neurônios do córtex pré-frontal, integrando conexões neurais com o hipocampo e a amígdala (IZQUIERDO et al., 2013).

As memórias procedurais, ou implícitas - denominação devido à sua aquisição de modo implícito, são geralmente mais inconscientes e envolvem sobretudo a região do cerebelo e são relacionadas a habilidades motoras, como andar de bicicleta ou dirigir um veículo (IZQUIERDO et al., 2013; BISAZ; TRAVAGLIA; ALBERINI, 2014). As memórias declarativas, ou explícitas, por sua vez, podem abranger memórias episódicas ou autobiográficas, quando envolvem eventos ou pessoas que tenhamos presenciado; ou semânticas, quando envolvem conhecimentos gerais (IZQUIERDO, 2011), e sua formação requer a participação de regiões do lobo temporal - em especial, o hipocampo (IZQUIERDO et al., 2013; BISAZ; TRAVAGLIA; ALBERINI, 2014). Exemplos de memórias episódicas incluem recordações de formatura, enquanto as memórias semânticas abrangem os aprendizados referentes a áreas do conhecimento (IZQUIERDO, 2011).

No que se refere à classificação das memórias em relação à sua duração, a diferenciação se faz não apenas em relação ao tempo pelo qual a informação fica disponível para evocação, mas também devido aos mecanismos bioquímicos distintos que lhes asseguram estabilização e formação (BISAZ; TRAVAGLIA; ALBERINI, 2014). As memórias de curta duração podem durar de segundos a algumas horas, com processamento nas regiões do córtex parietal e entorrinal, e na região CA1 do hipocampo, e envolvem alterações mais relacionadas à atividade eletroquímica neural (IZQUIERDO, 2011). Já as memórias de longa duração podem durar de horas até muitos anos, podendo ser caracterizadas neste caso como memórias remotas (IZQUIERDO, 2011). O hipocampo realiza conexões com o córtex entorrinal e a amígdala, sendo uma estrutura primordial neste processo que envolve fatores como

ativação enzimática, expressão gênica e síntese de proteínas, e pode envolver processos como a potenciação de longa duração para promover a persistência da memória (IZQUIERDO et al., 2013).

A consolidação da memória de longa duração refere-se à estabilização da informação e armazenamento da memória (BISAZ; TRAVAGLIA; ALBERINI, 2014). O processo de consolidação envolve ativação de fatores de transcrição, expressão gênica, síntese proteica e remodelação sináptica (BEKINSCHTEIN et al., 2010) e se completa em minutos a horas, com processos requerentes de síntese proteica (FURINI et al., 2020). Nesta dissertação, nós avaliamos a consolidação da memória de reconhecimento, que se encaixaria na classificação de uma memória episódica declarativa e de uma memória longa duração, já que avaliamos 24h após a aprendizagem, em ratas fêmeas, utilizando, para isto, a tarefa de reconhecimento de objetos.

2.3.2 Memória de reconhecimento

A memória de reconhecimento consiste na capacidade de reconhecer experiências vivenciadas anteriormente, incluindo aspectos espaciais e de exposição a estímulos, objetos, locais e indivíduos familiares (BALDERAS; RODRIGUEZ-ORTIZ; BERMUDEZ-RATTONI, 2015). É notória a necessidade da habilidade de reconhecimento em nosso cotidiano, seja para a identificação de um ente querido, de objetos ou lugares presenciados anteriormente. Para isso, a memória de reconhecimento envolve o hipocampo e diferentes regiões do córtex, incluindo os córtices entorrinal, insular, parahipocampal e perirrinal (BALDERAS; RODRIGUEZ-ORTIZ; BERMUDEZ-RATTONI, 2015; FURINI et al., 2020).

Neste sentido, tarefas cognitivas como o reconhecimento de objetos têm sido utilizadas em modelos animais para investigação de mecanismos envolvidos (FURINI et al., 2020) e desordens relacionadas à formação da memória de reconhecimento (ANTUNES; BIALA, 2012). Essa tarefa se baseia na habilidade de distinguir um objeto familiar de um objeto novo (BALDERAS; RODRIGUEZ-ORTIZ; BERMUDEZ-RATTONI, 2015), o que ocorre devido a fatores como o comportamento exploratório de roedores e uma tendência à preferência por novidade, promovendo maior

exploração de um novo objeto em comparação a um objeto ao qual foi exposto anteriormente, sendo um estímulo atrativo para o animal (ENNACEUR, 2010).

A tarefa de reconhecimento de objetos destaca-se pela sua fácil aplicabilidade, sem a necessidade de uso de recompensas ou punições aos animais, requerendo apenas um período de familiarização ao aparato e treino (ANTUNES; BIALA, 2012). Os objetos utilizados apresentam diferentes cores, texturas e dimensões, destacando-se a importância de selecioná-los cuidadosamente, a fim de minimizar quaisquer preferências a um dos objetos em relação ao outro (ENNACEUR, 2010), o que poderia interferir na avaliação da consolidação da memória. O protocolo da tarefa de reconhecimento de objetos utilizado no presente estudo foi previamente validado pelo nosso grupo de pesquisa (MELLO-CARPES; IZQUIERDO, 2013; MELLO-CARPES et al., 2016; LIMA et al., 2024), e está ilustrado na **Fig. 4**.

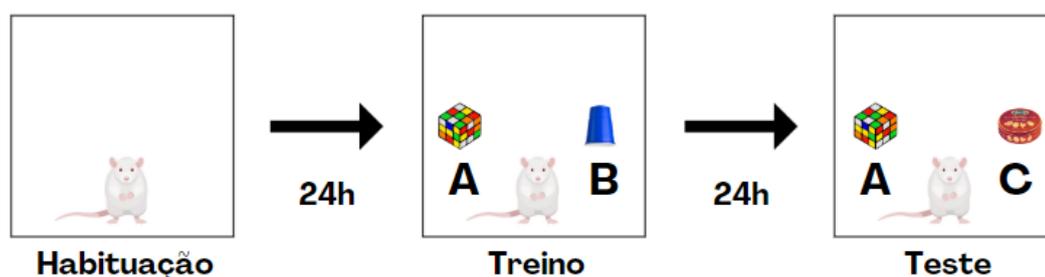


Fig. 5. Protocolo da tarefa de reconhecimento de objetos. Inicialmente, os animais são habituados ao aparato (por tempo variados, a depender do protocolo, por exemplo, 20 minutos/4 dias consecutivos). No dia seguinte, dois objetos distintos (podem ser iguais, a depender do protocolo), nominados “A” e “B”, são inseridos no interior do aparato para livre exploração durante 5 minutos. 24h após, substitui-se o objeto “B” por um objeto novo, “C”, e avalia-se a consolidação da memória. Os objetos utilizados no presente estudo são ilustrados na ilustração, sendo: A – cubo mágico; B – copo de plástico; C – lata de metal. Protocolo adaptado de Ennaceur & Delacour, 1988. Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Neste sentido, em nosso laboratório foi desenvolvida uma padronização das combinações na tarefa de reconhecimento de objetos, viabilizando não apenas a avaliação da consolidação da memória 24h após sua aquisição, mas também sua persistência em até 21 dias (VARGAS et al., 2017). Na sessão de treino, espera-se que o animal explore os dois objetos por tempo similar, independente de os dois serem iguais ou diferentes, tendo em vista que ambos até então eram desconhecidos. 24h

após ocorre a substituição de um dos objetos por um novo, e o animal é exposto a aos dois objetos para livre exploração, quando se avalia a consolidação da memória.

Em animais saudáveis, espera-se que o animal dispenda um maior tempo de exploração ao objeto novo em relação objeto familiar (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Observa-se um esquecimento fisiológico na avaliação da memória de reconhecimento a partir do sétimo dia (LIMA et al., 2021). No presente trabalho, foi avaliada apenas a consolidação da memória, isto é, sua formação 24h após a sua aquisição, devido à possibilidade de um efeito de destreinamento na função cognitiva dos animais (RADAK et al., 2006), já que aqui nossa variável independente foi o TM. Tendo em vista que o treinamento dos animais foi finalizado anteriormente às tarefas de memória e de controle comportamental, a realização de testes em uma janela de tempo superior poderia apresentar influência da interrupção do exercício na aprendizagem, efeito observado na memória aversiva e em parâmetros como neurogênese, neuroplasticidade e estresse oxidativo hipocampal (RADAK et al., 2006; KIM et al., 2013).

2.4. Exercício e suas diferentes modalidades

A ausência de atividades físicas, dentre outros fatores genéticos e comportamentais, tem sido apontada como promotora ou aceleradora de desordens como a demências e algumas doenças crônicas (THOMPSON et al., 2020). Neste sentido, o exercício físico é uma intervenção que tem sido amplamente estudada para o manejo de diversas desordens, como por exemplo, o declínio na função cognitiva (SKOVBJERG et al., 2024), demonstrando efeitos positivos em protocolos com roedores (SKOVBJERG et al., 2024) e com humanos (ŚWIATOWY et al., 2021), em suas diferentes modalidades de treinamento.

Por outro lado, há algumas décadas tem sido sugerido um efeito pró-oxidante do exercício em razão do aumento da demanda de oxigênio (KAWAMURA; MURAOKA, 2018), podendo saturar os mecanismos de defesa antioxidante. Vale ressaltar que este aumento varia conforme a modalidade, duração e intensidade do exercício (KRUK et al., 2022), além do potencial de modular a adaptação ao estresse oxidativo (THIRUPATHI et al., 2021), o que demonstra que, apesar dos benefícios, o exercício também apresenta um potencial efeito estressor e que deve ser

considerado, tendo em vista que o presente estudo aborda um protocolo de estresse neonatal.

Diferentes protocolos de exercício físico têm sido utilizados para investigação de seus efeitos sobre a memória, apresentando variações conforme a intensidade e a duração (EL ASSAR et al., 2022). Alguns mecanismos relacionados ao exercício e a memória foram descritos através de ensaios bioquímicos e análises por imagem, *via* ressonância magnética. O aumento da expressão de *BDNF*, da espessura das substâncias branca e cinzenta, das dimensões do hipocampo, e de processos como neurogênese, sinaptogênese e angiogênese, além da diminuição de citocinas pró-inflamatórias e do estresse oxidativo (CASSILHAS; TUFIK; MELLO, 2016; PINHO; AGUIAR; RADÁK, 2019; SILVA et al., 2024), têm sido relacionados à melhora da função cognitiva promovida pelo exercício físico.

O exercício aeróbico é uma das modalidades de exercício mais estudadas, com observação da promoção da melhora de diferentes tipos de memória tanto em protocolos crônicos como agudos. O exercício de corrida em esteira demonstrou ser capaz de promover a melhora da consolidação e persistência da memória em ratos machos (LIMA et al., 2021) e ratas fêmeas (SIGARAN et al., 2024) saudáveis em apenas uma sessão de treinamento, quando está é realizada logo após a aprendizagem, na janela temporal de consolidação da memória. O mesmo foi observado em ratos machos submetidos à PM (SOSA et al., 2019). Os benefícios do exercício aeróbico crônico também têm sido observados em modelos de doenças neurodegenerativas, promovendo a reversão (DARÉ et al., 2020) e a prevenção de déficits da memória de reconhecimento induzidas pela neurotoxicidade pelo peptídeo β -amilóide em ratos machos (DARÉ et al., 2019), além da reversão do declínio cognitivo induzido pela PM em ratos machos (NEVES et al., 2015). Os efeitos deste tipo de exercício têm sido amplamente documentados em estudos com modelos de estresse neonatal (CAMPBELL et al., 2024), no entanto, observa-se a necessidade do estudo de outras modalidades diante das alterações relacionadas à PM.

O exercício anaeróbico – cujo modelo predominante na literatura é o de exercício de força - tem demonstrado efeitos no condicionamento físico, na memória e parâmetros oxidativos. Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram sua eficácia na prevenção de déficits cognitivos na memória de reconhecimento em modelo animal de doença de Alzheimer (SCHIMIDT et al., 2021) e de neuroinflamação

induzida por lipopolissacarídeo (DE GREGÓRIO et al., 2021). Ainda, tem sido evidenciado o potencial desta modalidade em promover o aumento da expressão de BDNF, tanto no músculo esquelético como em estruturas encefálicas (PINHO; AGUIAR; RÁDAK, 2019), o que pode estar associado ao seu efeito na cognição. A **Fig. 6** ilustra alguns mecanismos envolvidos na expressão de BDNF promovida pelo exercício de força. No que se refere ao modelo de PM e esta modalidade de exercício, um estudo prévio investigou o efeito de sua prática gestacional sobre o desenvolvimento da prole, demonstrando efeitos sexo-dependentes no aumento de células neuronais e balanço redox (DOS SANTOS et al., 2023).

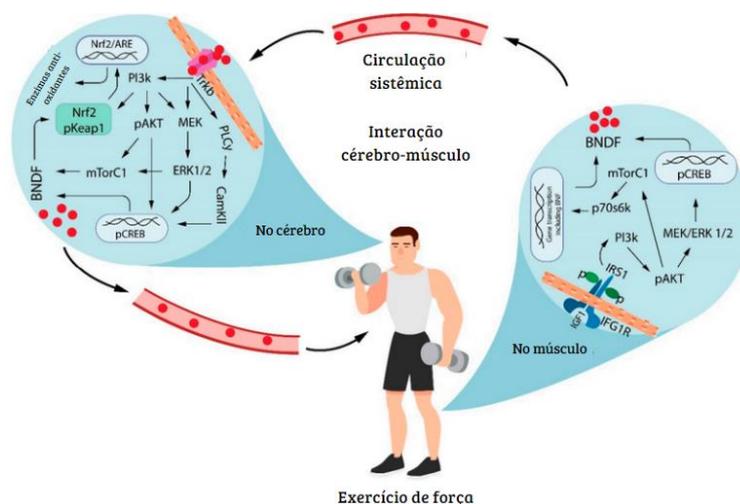


Fig. 6. Exercício de força e BDNF. O BDNF é uma neurotrofina associada à processos como plasticidade sináptica, neurogênese e sobrevivência celular, e o aumento de sua expressão tem sido associado a modalidades de exercício, como o de força. Ocorre a formação de BDNF a partir da ativação de vias como CREB (sigla em inglês para Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao AMP Cíclico) e a fosforilação de mTor (do inglês *mammalian target of rapamycin*). Adaptado de PINHO; AGUIAR; RÁDAK, 2019.

Além das diferentes modalidades de exercício físico, o treinamento cognitivo também merece destaque quando se busca melhorar as funções cognitivas. O exercício cognitivo abrange tarefas cognitivas desafiadoras praticadas repetidamente, com o intuito promover a manutenção ou melhora da função cognitiva (GAVELIN et al., 2020). Um estudo com idosos associou o treinamento cognitivo à atenuação do declínio cognitivo (BEYER et al., 2024); outro, em adultos, demonstrou a capacidade deste tipo de exercício de promover a melhora da memória espacial e aumento dos níveis de *BDNF* (WADDINGTON et al., 2024). Anteriormente, nosso laboratório demonstrou que um protocolo de exercício cognitivo é capaz de prevenir déficits na

memória de reconhecimento, bem como diminuir as espécies reativas e a lipoperoxidação em um modelo animal de doença de Alzheimer (DARÉ et al., 2019). Em relação ao estresse neonatal, um estudo prévio reportou o potencial deste tipo de intervenção em melhorar as funções executivas em infantes e pré-adolescentes com idade entre 6 e 11 anos (SPAWTON-RICE; WALKER, 2020).

Desta forma, cada modalidade de exercício supracitada tem demonstrado capacidade de promover a melhora da memória quando praticada individualmente, no entanto, estudos têm proposto a prática combinada de diferentes modalidades visando possíveis efeitos somáticos. Estes protocolos, denominados treinamento multicomponente (TM) (VENEGAS-SANABRIA et al., 2022), têm sido implementados sobretudo na comunidade idosa, com a premissa de promover a melhora em aspectos físicos e mentais pela associação dos diferentes tipos de exercício (GAVELIN et al., 2021) e têm relacionado a combinação dos exercícios à melhora da memória, da função física e de comportamentos do tipo depressivos (TARAZONA-SANTABALBINA et al., 2016). Um estudo prévio de nosso laboratório demonstrou o potencial do TM em promover a prevenção de déficits na memória de reconhecimento e alterações no balanço oxidativo hipocampal em um modelo de neurotoxicidade induzido pelo peptídeo β -amilóide (SOARES et al., 2021). Tendo em vista as alterações cognitivas e no balanço oxidativo relacionadas ao estresse neonatal, os estudos ilustram o potencial papel do TM no manejo de alterações induzidas pelo modelo de PM.

3. JUSTIFICATIVA

Eventos estressores estão presentes em nosso cotidiano e requerem capacidade adaptativa diante de seus acontecimentos (VAN BODEGOM; HOMBERG; HENCKENS, 2017). No entanto, quando estes eventos acontecem ainda no início da vida podem promover desordens a curto e longo prazo (LEE; JUNG, 2023). O cérebro é uma estrutura que continua a se desenvolver após o nascimento (BALE et al., 2010), e estudos têm demonstrado que a exposição ao estresse ainda no período neonatal pode interferir no desenvolvimento cerebral, promovendo alterações cognitivas e comportamentais na prole (HE et al., 2020; LEE; JUNG, 2023), evidenciando não apenas o risco da manifestação de déficits de memória, mas também a predisposição a desordens, como transtornos de ansiedade (WANG et al., 2020). Modelos animais, como os de PM, viabilizam a investigação de desordens relacionadas ao estresse neonatal, assim como estratégias para atenuação ou reversão destes efeitos (NISHI, 2020). Déficits em diferentes memórias, como a de reconhecimento de objetos, têm sido relatados (PINHEIRO et al., 2015; WANG et al., 2020; SUN et al., 2021), mas estudos sobre PM com fêmeas ainda são minoritários (ALVES et al., 2022), o que ilustra a relevância deste estudo.

Discrepâncias cerebrais relacionadas ao sexo têm sido descritas na literatura (GEGENHUBER; TOLLKUHN, 2020), e fatores genéticos, hormonais e ambientais têm sido relacionados aos resultados observados, incluindo desde a manifestação de desordens psiquiátricas até a dimensão de estruturas encefálicas (CHUNG; AUGER, 2013). Dentre as diferenças descritas, destacam-se aspectos comportamentais, neuroanatômicos (como as dimensões cerebrais), bioquímicos (como a expressão de receptores responsivos a hormônios esteroidais), e genéticos (relativos a discrepâncias cromossômicas) (GEGENHUBER; TOLLKUHN, 2020), evidenciando a necessidade da inclusão de fêmeas em pesquisas para melhor compreensão dos resultados e sua adequada generalização (GEGENHUBER; TOLLKUHN, 2019).

Sabe-se que o exercício físico é uma intervenção não-farmacológica, não invasiva e economicamente viável para a prevenção e o tratamento de doenças crônicas. Estudos também têm demonstrado seu potencial na promoção da melhora da função cognitiva, atribuída a mecanismos como o aumento da expressão de neurotrofinas, incluindo o *BDNF*, e de processos como sinaptogênese e angiogênese

(CASSILHAS; TUFIK; MELLO, 2016). Tem sido reportada a capacidade do exercício aeróbico de reverter os déficits cognitivos induzidos pelo modelo de PM (CAMPBELL et al., 2022), no entanto, as publicações disponíveis incluem majoritariamente machos. Ademais, compreensão dos efeitos de outras modalidades de exercício, bem como de sua combinação, sobre a PM ainda é limitada. Resultados de estudos que propõe a combinação da prática de diferentes modalidades de exercício têm demonstrado potencial sobre a função cognitiva em humanos (GAVELIN et al., 2020; VENEGAS-SANABRIA et al., 2022). Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o TM é capaz de prevenir os déficits cognitivos relacionados à um modelo de doença de Alzheimer (SOARES et al., 2021).

Neste contexto, o presente trabalho contribui para o entendimento dos efeitos do TM sobre desordens induzidas pelo estresse neonatal, utilizando um modelo de PM, em ratas fêmeas, contribuindo para fornecer evidências que ajudarão a suprir uma lacuna na literatura científica atualmente disponível.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

O objetivo geral desta dissertação é investigar os efeitos do treinamento multicomponente sobre a memória de reconhecimento e o balanço oxidativo hipocampal em ratas submetidas à privação materna.

4.2. Específicos

Dentre os objetivos específicos desta dissertação estão:

- Verificar, em ratas fêmeas, os efeitos da privação materna sobre a memória de reconhecimento e o estresse oxidativo hipocampal;
- Verificar os efeitos do treinamento multicomponente sobre a memória de reconhecimento de objetos de ratas fêmeas;
- Verificar os efeitos do treinamento multicomponente sobre parâmetros oxidativos hipocampais (níveis de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total).

PARTE II

5. Manuscrito científico submetido ao periódico *Biochemistry, Pharmacology and Behavior*

MATERNAL SEPARATION DOES NOT AFFECT RECOGNITION MEMORY IN FEMALE RATS BUT ALTERS HIPPOCAMPAL OXIDATIVE BALANCE, A DISORDER REVERTED BY A MULTICOMPONENT TRAINING

Gabriela Cristiane Mendes Gomes¹, Ben-Hur Souto das Neves¹, Karine Ramires Lima¹, Ana Carolina de Souza da Rosa¹, Larissa de Almeida Dias¹, Giulia Azevedo Martinez¹, Pâmella Andréa Machado da Silva Laranja¹, Anna Cecília Perretto¹, Marcelo Gomes de Gomes^{1 2}, Pâmela Billig Mello Carpes^{1*}

¹Physiology Research Group, Stress, Memory and Behavior Lab, Federal University of Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil.

²Center of Sciences, Technologies and Health, Department of Health Sciences, Federal University of Santa Catarina, Araranguá, SC, Brazil.

*Corresponding author

pamelacarpes@unipampa.edu.br

BR 472 km 592 - Po box 118 - ZIP 97501-970, Uruguaiana, RS, Brazil.

Declaration of interest: none.

HIGHLIGHTS

- Maternal separation (MS) does not induce memory deficits in adult female rats.
- MS increases hippocampal ROS in female rats.
- MS reduces hippocampal total antioxidant capacity in female rats.
- Multicomponent training (MCT) avoids increasing hippocampal ROS in MS female rats.
- MCT protects hippocampal total antioxidant capacity in MS female rats.

ABSTRACT

Maternal separation (MS) is a model of early life stress that promotes anatomical, neurochemical, and neuroendocrine alterations in the nervous system. Physical exercise is a non-pharmacological intervention with general health benefits that improve brain function. However, the impact of a combination of exercise modalities nominated multicomponent training (MCT) in front of MS effects remains unclear. Also, the effects of MS and MCT in females are very little explored. We investigated the effects of MCT in recognition memory and hippocampal oxidative balance in female rats submitted to MS. The MS protocol did not induce memory deficits in adult female rats but increased reactive oxidative species (ROS) and reduced total antioxidant capacity in the hippocampus. MCT improved hippocampal redox balance, reduced lipid peroxidation and ROS, and increased total antioxidant capacity. These findings demonstrate that despite MS did not induce memory deficits, it altered redox balance in female rats, suggesting the efficacy of MCT against MS-induced oxidative stress alterations.

Keywords: Early life stress, Exercise, Hippocampus, Object recognition, Redox balance, Sex dimorphism.

INTRODUCTION

Brain development begins during pregnancy and remains for the first years of life, involving stages that include cellular differentiation and maturation of brain structures, neurogenesis, and synaptic pruning (LUBRANO, PARISI & CETIN, 2024). These processes are influenced by genetic and environmental factors, such as stress, and in early life, are associated with alterations in brain function and cognitive and behavioral disorders (BOLTON et al., 2017). In this sense, animal models have been used to investigate the effects of early life stress, such maternal separation (MS), demonstrating memory deficits, disorders on neurotransmitter systems and hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis response, as well as alterations in neuronal cells function (ALVES et al., 2022) and oxidative stress (BENMHAMMED et al., 2019), what emphasizes the importance of maternal care in the normal brain development.

One of the structures most affected by MS is the hippocampus. This structure develops from the third week of pregnancy until the first years of life and has a key role in the

modulation of memory, learning, and emotional processes (WHITE et al., 2024). The hippocampus is primordial for recognition memory, but disturbances in forming this structure have been reported in rodents (TEICH et al., 2003) and humans (FRODL et al., 2017) exposed to early life stress. MS-related deficits in hippocampal-dependent memory have been described (SUN et al., 2021; GROCHECKI et al., 2022), so strategies to improve memory function became relevant. However, studies using MS mainly include males as subjects (ALVES et al., 2022), and only in the last decade was an increase in female inclusion in research in general (GEGENHUBER & TOLLKUHN, 2020), emphasizing the need for MS studies, including female sex.

Exercise is a non-pharmacological intervention studied due to its benefits in front of non-communicable diseases like diabetes, dementia, and cardiovascular disorders (CASSILHAS; TUFIK; MELLO, 2016). Concerning cognitive improvement, physical exercise is associated with enhancement of angiogenesis, neurogenesis, synaptic plasticity, modulation of neurotrophic factors expression, inflammation, neurotransmitter systems, and reduction of oxidative stress (MANDOLESI et al., 2018). While aerobic exercise has been associated with improved cognitive function and increased hippocampus size in older adults, strength training has been associated with enhanced attention and executive functions and modulation of cholinergic function (LIMA et al., 2018; PUJARI, 2024). Cognitive exercise, in turn, promotes the maintenance of cognitive and social function, and its association with physical exercise modalities, nominated multicomponent training (MCT), has been showing benefits to older persons (GAVELIN et al., 2020).

Previously, our laboratory demonstrated that aerobic exercise was able to improve recognition memory and oxidative stress in male rats submitted to MS (NEVES et al., 2015) and to promote the learning of a recognition memory task when a single session was performed after the memory acquisition (SOSA et al., 2019). We also showed in male rats the efficacy of MCT in preventing memory deficits and hippocampal oxidative stress in a model of neurotoxicity induced by β -Amyloid peptide (SOARES et al., 2021), but the effects of other modalities in front of early life stress, as well their effect in female subjects, still unclear. From this perspective, here we aim to evaluate the effects of MCT on recognition memory and hippocampal oxidative balance in female rats submitted to MS.

MATERIAL AND METHODS

1. *Animals*

Thirteen pregnant female Wistar rats (± 90 days old) were obtained from the Vivarium of the Federal University of Pampa (RS/Brazil) and maintained in a 12 h light/12 h dark cycle (light phase started at 7h and disconnected at 19h), with controlled temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) and air humidity ($60 \pm 5\%$). Pregnant female rats were individually housed with food and water access available *ad libitum*. Their pups were used in the experiments described here. The birth of the pups was considered the post-natal day zero (PND-0). The maternal separation (MS) groups were submitted to MS protocol from PND-1 to PND-10. On PND-21, all the animals were weaned and housed in regular cages ($n = 4$ females/cage), when the male pups were donated to other studies.

All the procedures were approved by the institutional Committee on Animals Use and Care (IRB 008/2023). Female rats from litters were randomly divided into four groups: I) Control (CT), rats not submit to MS and MCT protocols; II) Maternal Separation (MS), rats submitted to MS but not to MCT; III) Multicomponent training (MCT), rats not submit to MS and that realized MCT; and IV) MS+MCT, rats submitted to MS and MCT ($n = 10 - 12$ animals per group). The experimental design is described below in **Fig. 1**.

2. *Maternal Separation (MS)*

Pregnant female rats were individually maintained in house boxes until birth (named day zero). The MS protocol was performed only in MS groups for 10 days - from PND-1 to PND-10, the mothers were removed from the house box daily for 3 hours. The pups were kept in another room with a controlled temperature (32°C) for maternal heat compensation during this period. CT animals were not manipulated, remaining in their home cage (BENETTI et al., 2009). On the 21st day, all the animals were weaned, and the females were allocated in plastic boxes with 4 animals per cage.

3. *Multicomponent Training (MCT)*

The MCT consists of the alternated practice of three exercises: aerobic, strength, and cognitive, six times per week for six weeks. Each modality will be described below.

3.1 *Aerobic exercise*

Aerobic exercise was performed in an appropriate treadmill for rats with six individual lanes (Scienlabor, SP/Brazil). Initially, the animals were habituated to the apparatus for 10 minutes for five days. On 1st day, the treadmill remained switched off for environment familiarization. The speed ranged from 2 to 8 m/min in the following days. On the 6th day, maximal indirect oxygen consumption (VO₂) was determined based on the work volume (m/min) of the animals, consisting of the increase of three m/min every five minutes until the fatigue state (BROOKS & WHITE, 1978). The intensity was individually established, considering 60-70% of the indirect VO₂. This measurement was repeated during the third and sixth weeks of training to verify and adjust the exercise intensity. The running sessions were alternately performed two times per week for six weeks, lasting 50 minutes with increasing intensity in the first ten minutes, followed by 30 minutes of constant speed at 60-70% of indirect VO₂ and a subsequent decrease of intensity in the last ten minutes (MELLO et al., 2009).

3.2 *Strength Exercise*

This modality was realized using a vertical ladder in wood and iron (1.1 × 0.18 m, 2 cm grip, inclination of 80°) with three individual housing chambers at the top. First, the rats from the MCT groups were habituated to the apparatus for two days, in four trials consisting of the initial allocation in the housing chamber, followed by the climbing on the ladder above, below the half, and in the base of the ladder, with an interval of 60s between the trials. To determine the load individually, the rats performed the maximum load test with an initial load of 75% of their body weight and an addition of 30g to each rise until the fatigue state. The last load transported was defined as the maximum load, and the sessions consisted of 8 series with 12 repetitions of 50%, 75%, 90%, and 100% of the maximum load (SOUZA et al., 2014). The maximum load test was repeated in the third and sixth weeks of the MCT for load adjustments. The strength exercise sessions alternated with other kinds of exercise twice a week for six weeks.

3.3 *Cognitive Exercise*

The cognitive exercise was executed based on an adaptation of the Barnes Maze Test, based on Rossi Dare et al. (2019). The apparatus consisted of a circle platform (108 cm diameter) located 70cm above the floor level. In the periphery of the platform, twenty possible escape holes (10 cm diameter) were equally distributed, and only one led to the right escape hole. A negative stimulus (a fluorescent light) was allocated above the animal to motivate the escape cage's finding, and geometrical shapes were placed around the platform, contributing to spatial memory. In the training sessions, the animal has three attempts of 90 seconds to find the escape hole in each one. During the trials, the number of wrongs and the time in seconds until the finding were accounted for. The escape was modified based on the learning curve. After the change of the escape place, the animals needed to reconsolidate their spatial memory, a process that demands cognitive flexibility. The cognitive exercise was performed alternately two times per week for six weeks.

4. *Memory and Behavioral Tests*

4.1 *Object Recognition (OR) Task*

The apparatus comprises an open field box (50 × 50 × 39 cm). Initially, the animals were habituated to the equipment by free exploration for twenty minutes daily for four days. On the 5th day, the OR training session was performed, placing two different objects inside the box, and the animals had five minutes to explore. The next day, in the testing, one of the objects was exchanged for a new one, and the animals were free to explore for five minutes (ENNACEUR & DELACOUR, 1988). The training and test sessions were recorded with a digital camera for further analysis. This test is based on distinguishing a new object from a new one and spending more time on the new object in the training session. The objects' exploration time was registered in seconds and converted to a percentage of the total exploration time. We also calculate the discrimination index (DI) to evaluate the ability to distinguish the new from the familiar object based on the difference in the time of exploration: $DI = [(Time\ exploring\ the\ new\ object - Time\ exploring\ the\ familiar\ object) / Total\ exploration\ time]$.

4.2 *Open Field (OF)*

The apparatus comprises an open field box (50 × 50 × 50 cm). The floor had black lines delimiting twelve quadrants. During the test, we registered the number of crossings through the quadrants, and rearings, the activity when the animal remains only with two legs in the ground, for five minutes (BONINI et al., 2006). The apparatus was cleaned with alcohol 70% between the sessions.

4.3 *Elevated Plus Maze (EPM)*

The EPM apparatus consisted of a platform with two open arms (50 × 10 cm) and two closed arms (50 × 10 × 40 cm). The animal was allocated in the center of the apparatus, and for five minutes, the number of entries and the time spent in each arm were accounted (PELLOW et al., 1985). For each animal, the equipment was cleaned with alcohol 70%.

5. *Biochemical Assays*

For the sample preparation, the animals were euthanized for decapitation without anesthesia. The brains were removed, and the hippocampus was bilaterally dissected, weighted, and homogenized with Tris HCl 50Mm, pH 7.4 (1:5 p/v) solution. The samples were centrifuged at 2400g for ten minutes, and the supernatant (S1) was destined for assays described below.

5.1 *Reactive Oxygen Species (ROS)*

The ROS content was determined using a spectrofluorimetric method with 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). The samples were incubated in a dark environment with 5 µL of DCFH-DA 1 mM. The intracellular levels evaluation of ROS was realized based on the measurement of DCFH-DA oxidation, which produces the fluorescent compound dichlorodihydrofluorescein (DCF). The measures were performed with excitement at 480 nm and emission at 520 nm, thirty minutes after the DCFH-DA in the environment. The results are expressed as a percentage of control in arbitrary units (AU) (Ali, LeBel & Bondy, 1992).

5.2 *Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)*

We performed the TBARS assay to determine the lipid peroxidation. An aliquot of S1 was incubated with thiobarbituric acid 0.8%, acetic acid buffer pH 3.2, and sodium dodecyl sulfate 8% at 95°C for two hours. The measures were performed using a spectrophotometer at a wavelength of 532 nm, and data are expressed in nmol of malondialdehyde per mg of protein (Ohkawa, Ohishi & Yagi, 1979).

5.3 *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)*

To determine total antioxidant capacity, initially, we prepared a working reagent with acetate buffer, 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TPTZ) solution, and FeCl₃.6H₂O solution. A standard curve with Trolox in a range of 15-240 Mm was used. The FRAP reagent was added to S1 (1:10 p/v), and the points were inserted into the standard curve on a microplate. The microplate was incubated at 37°C for fifteen minutes before the measures, in a wavelength of 593 nm. The results were expressed as nmol Fe²⁺ TPTZ/g tissue (BENZIE & STRAIN, 1996).

6. *Statistical analysis*

The normality of the data was evaluated using the Shapiro-Wilk test. For OR analysis, the time of exploration of the objects was converted to a percentage of the total exploration time and compared to a theoretical mean of 50% using a one-sample t-test.

The discrimination indexes (DI) were compared between the groups using two-way ANOVA (MCT and MS), followed by Tukey's post-hoc analysis for multiple comparisons.

OF and EPM were analyzed using two-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc for multiple comparisons (MCT and MS). The biochemistry assays were analyzed using a two-way ANOVA (MCT and MS) followed by Tukey's post-hoc for multiple comparisons.

In all analyses, significant differences were considered when $P < 0.05$.

RESULTS

1. Multicomponent groups present improved aerobic and strength performance

To verify the conditioning and the need for adjustments in the exercise intensity, MCT groups performed indirect VO_2 maximum and maximum load tests for aerobic and anaerobic exercise, respectively.

Intra-group indirect VO_2 maximum data did not present interaction ($F_{(2,34)} = 1.918$, $P = 0.1624$), but showed an effect of time ($F_{(2,34)} = 7.770$, $P = 0.0017$) and MS ($F_{(1,17)} = 4.695$, $P = 0.0448$). The MCT protocol increased the aerobic capacity in the MCT group in the third ($P = 0.0049$) and sixth testing ($P = 0.0004$) compared to the first session. No differences between the sessions were detected in the MS+MCT group ($P > 0.05$). Inter-group comparisons showed that the MCT group presented a lower indirect VO_2 maximum in the first session than the MS+MCT group ($P = 0.0157$, **Fig. 2A**). No differences were detected in the third and sixth weeks between the groups ($P > 0.05$, **Fig. 2A**).

Load maximum analyzes did not show interaction ($F_{(2,36)} = 1.023$, $P = 0.3697$) and effects of MS ($F_{(1,18)} = 0.5917$, $P = 0.4517$), but presented effect of time ($F_{(2,36)} = 55.56$, $P < 0.0001$). We detected an increase in load maximum capacity from each session in the MCT group ($P = 0.0003$ for 1st vs. 3rd week; $P < 0.0001$ for 3rd vs. 6th week; $P < 0.0001$ for 1st vs. 6th week). MS+MCT group did not show a significant difference in the first week compared to the third week ($P = 0.1192$) but presented an increase in the sixth week compared to the third week ($P = 0.0011$) and in the sixth compared to the first week ($P < 0.0001$). No differences were detected between the groups in the test sessions ($P > 0.05$ in groups' comparison, **Fig. 2B**).

2. Maternal separation and multicomponent training effects on body mass

The body mass analyses showed an effect of the time ($F_{(1,439,56.11)} = 446.3$ $P < 0.0001$), revealing an increase of body mass in each measurement in CT, MS, and MCT groups ($P < 0.05$). MS+MCT group presents an increase in the first week compared to the third ($P = 0.0001$) and to the sixth weeks ($P < 0.0001$), but no differences were observed in the third week compared to the sixth week ($P = 0.0537$). No interaction ($F_{(6,78)} = 1.601$, $P = 0.1580$) or intervention effect was detected ($F_{(3,39)} = 0.1923$, $P = 0,9010$),

demonstrating that neither MS nor MCT protocols affected the animals development (**Fig. 2.C**).

3. Maternal separation did not induce memory deficits in female rats

We used the OR task for recognition memory evaluation. In the training, the animals from different groups explored the two objects for a similar time (CT $t_{(11)} = 0.3237$, $P = 0.7522$; MS $t_{(11)} = 0.02853$, $P = 0.9778$; MCT $t_{(10)} = 0.6453$, $P = 0.5332$; MS+MCT $t_{(7)} = 1.180$, $P = 0.2765$, **Fig. 3A**), what is expected, considering that both were unfamiliar to them until this session. As a memory parameter, we used the DI to calculate the ability to distinguish the objects and did not observe interaction or effect of MS and MCT (Interaction $F_{(1,39)} = 0.3354$, $P = 0.3354$; MS $F_{(1,39)} = 1.569$, $P = 0.2178$; MCT $F_{(1,39)} = 0.2307$, $P = 0.2307$, **Fig. 3B**). Twenty-four hours later, we tested the memory consolidation, replacing one of the objects for a new one. All the groups spend more than 50% of the total exploration time exploring the new object, "C" (CT $t_{(11)} = 5.607$, $P = 0,0002$; MS $t_{(11)} = 5.962$, $P < 0.0001$; MCT $t_{(10)} = 8.031$, $P < 0.0001$; MS+MCT $t_{(7)} = 6.059$, $P = 0.0005$, **Fig. 3C**), demonstrating the memory consolidation even in MS groups. Again, we did not find any impact of factors (MS $F_{(1,39)} = 0.6885$, $P = 0.4117$; MCT $F_{(1,39)} = 1.305$, $P = 0.2602$, **Fig. 3D**) or interaction between the factors on the discrimination ability measured by DI ($F_{(1,39)} = 0.009900$, $P = 0.6647$, **Fig. 3D**).

4. Effects of maternal separation and multicomponent training in the redox balance

ROS analyzes evidenced an effect of MCT ($F_{(1,26)} = 14.61$; $P = 0.0007$), but not MS effects ($F_{(1,26)} = 0.7050$, $P = 0.4088$) or interaction between the factors ($F_{(1,26)} = 2.933$; $P = 0.0987$). Individual comparisons showed that MS rats present higher ROS levels than MCT ($P = 0.0102$). The MCT group presented reduced ROS levels compared to CT rats ($P = 0.0021$ for MC vs. CT rats, **Fig. 4A**).

In TBARS, performed to verify lipid peroxidation, an effect of MCT ($F_{(1,23)} = 8.359$, $P = 0.0082$), but no effect of MS ($F_{(1,23)} = 0.7454$) was detected. There was no interaction between the factors ($F_{(1,23)} = 0.0005528$, $P = 0.9814$). *Post-hoc* analyses did not identify differences in the individual comparisons between the groups (**Fig. 4B**).

In the total antioxidant capacity, we observed the effect of MS and interaction ($F_{(1,25)} = 5.451$, $P = 0.0279$ for MS; $F_{(1,25)} = 39.31$, $P < 0.0001$ for interaction), but no effect of MCT ($F_{(1,26)} = 1.188$; $P = 0.2861$). MS reduced the total antioxidant capacity in rats' hippocampus compared to the CT group ($P = 0.0001$ for MS vs. CT rats). The training increased the total antioxidant capacity in the hippocampus of MS rats once MS+MCT presented higher levels than MS ($P = 0.0102$ for MS+MCT vs. MS rats, **Fig. 4C**).

5. Behavioral control tests

MS or MCT protocols did not affect the locomotor ability of the animals in the OF test ($P > 0.05$ in the groups' comparison). Moreover, MS or MCT did not alter the number of entries and the time spent in the open arms in the EPM test ($P > 0.05$) (**Table 1**).

DISCUSSION

Here, we investigated the impact of MS on the memory of female rats and the influence of MCT on cognition and hippocampal oxidative parameters. MS is a model of neonatal stress that reveals an impairment of normal brain development that culminates in memory deficits in male rodents. The hippocampus is one of the brain regions affected by MS, and its role in cognitive function comes to mnemonic deficits attributed to its model in different types of memory, such as recognition memory (ROCHA et al., 2021). Previous studies in our lab showed that MS is related to short-term and long-term memory deficits in adult male rats in the OR task (MENEZES et al., 2017; MENEZES et al., 2020). This impairment is reported in adolescent and adult rats by other researchers (KOTLINSKA et al., 2023; SUN et al., 2024), but some discrepancies in animal performance according to sex and age reveal possible sex- and age-dependent effects of MS on recognition memory (ALVES et al., 2022).

The exercise practice shows cognitive benefits associated with well-being and biochemical mechanisms involved (FESTA, MEDORI, & MACRÌ, 2023). The increase of synaptic plasticity, neurogenesis, angiogenesis, cerebral vascularization, and BDNF expression are examples of brain modulation by exercise (CEFIS et al., 2023). The improvement of mitochondria function and the inflammatory response is also reported

and associated with neuronal integrity (LU et al., 2023). Findings have demonstrated the improvement of cognitive function associated with exercise from children to older people (AUGUSTO-OLIVEIRA et al., 2023), which emphasizes the potential of exercise in front of different scenarios, such as scholar or in more extreme cases, like neurodegenerative diseases (FESTA, MEDORI, & MACRÌ, 2023). Studies with a single exercise report the improvement of cognitive function and/or neurochemical and neuroanatomical modulation varying in the performance according to factors like type, intensity, and duration (MANDOLESI et al., 2018; MARTÍN-RODRÍGUEZ et al., 2024) and the combination of different modalities allows the maintenance of body and brain health (GAVELIN et al., 2021), and could be an interesting strategy in different age ranges. Considering the memory impairment and cerebral dysfunctions associated with MS and the improvement of brain function by exercise, this becomes a viable intervention for the attenuation of early life-related disorders.

In this study, MS did not affect the OR consolidation of adult female rats. Studies about MS and memory have shown that this early-life event promotes cognitive impairments in adult life in male rats, deficits reverted by aerobic exercise in chronic and acute training (NEVES et al., 2015; SOSA et al., 2019). Unlike males, adult female rats OR memory was not disturbed by MS, supposing the development of resilience mechanisms which could modulate the cognitive function. The literature suggests that mnemonic deficits in recognition memory could have an age-dependent effect in female rodents. Recognition memory deficits induced by MS were reported in Balb/c female mice during late adolescence (de AZEREDO et al., 2017). On the other hand, a recent study by our group evaluated the OR memory in pre-pubertal Wistar female rats and showed that MS induces cognitive deficits (CARRAZONI et al., 2023).

The mechanisms related to the memory deficits observed in MS rats are not completely clear, but one hypothesis suggests an important role of disorders in hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (SPIERS et al., 2015), alteration of the catalase activity (MALCON et al., 2020) and mitochondrial respiratory chain (MARKOVIĆ et al., 2017). These alterations are found in structures involved in memory processes (AGORASTOS et al., 2019; NISHI, 2020). Another research demonstrates a potential memory improvement of MS-related memory deficits in Balb/c female mice submitted

to treadmill exercise for three weeks in adolescence (WEARICK-SILVA et al., 2017). Here, although we did not observe memory deficits, we verified an increase of oxidative stress induced by MS in females' hippocampus. MS did not affect the lipid peroxidation but increased the ROS levels and reduced the total antioxidant capacity. In our research, MCT reduced lipoperoxidation and ROS levels and improved the total antioxidant capacity in the hippocampus of female MS rats. In adult male rats, in which MS increased the hippocampal and prefrontal lipoperoxidation, aerobic exercise (running on a treadmill) was able to reverse this effect (NEVES et al., 2015). In pre-pubertal female rats, the maternal running exercise prevented the lipid peroxidation increase induced by MS (CARRAZONI et al., 2023). In both sexes, Réus et al. (2021) verified that an intervention with an enriched environment, including running wheels as one of the stimulations, in MS rats promoted differences in serum oxidative parameters according to stage life evaluated. Superoxide dismutase (SOD) activity, for example, increased on PND-31 and 41, especially in female rats, suggesting an adaptive response for homeostasis maintenance.

Exercise is a non-pharmacological intervention that is related to a lot of health benefits, including neuroprotective effects. Physical exercise induces the activation of signaling pathways, leading to the expression and activation of BDNF from CREB and mTOR phosphorylation (RADAK et al., 2016). BDNF release promotes nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activation, an important redox balance regulator protein maintenance (PINHO et al. 2022). In this sense, the influence of exercise on the brain redox state has been investigated, but the majority focus on aerobic training. We applied a combination of three exercise modalities, a protocol previously tested in an Alzheimer's disease model, reducing hippocampal lipoperoxidation and increasing the total antioxidant capacity in the hippocampus of male rats (SOARES et al., 2021). As well as MS, Alzheimer's neurodegenerative disorder promotes oxidative imbalance, and the improvement of the redox state demonstrates the potential of MCT as a non-pharmacological strategy in different scenarios of oxidative misbalance.

A recent study in MS young adult female rats showed that voluntary exercise was able to attenuate the BDNF methylation in the prefrontal cortex, which was altered by neonatal stress, mentioning the memory assessment as a future perspective

(CAMPBELL, DONOGHUE & ROTH, 2024). Concerning exercise, memory and early life adversity models, including the MS, are observed in most studies applying aerobic exercise and considering only male rats in the study samples (CAMPBELL et al., 2022). A pilot study investigated the effects of cognitive exercise in children exposed to early life stress and showed a positive impact on working memory performance (SPAWTON-RICE & WALKER, 2022). Regarding strength training and MS, dos Santos et al. (2023) demonstrate its effects when performed by the mother; the male MS offspring showed greater susceptibility to behavioral alterations than female offspring; the maternal strength exercise managed the alterations in male offspring. In this sense, further cognitive and strength training studies are necessary in front of MS-related effects, with the female subject included and considering different age ranges in the experimental protocols.

Together, our data and the ones available in the literature reinforce the importance of studies including female subjects once genetics, behavioral, neuroanatomical, and neurochemical differences among the sexes have been reported (KUNDAKOVIC & TICKERHOOF, 2024). Sex differences in redox balance and an influence of sex hormones were described (TIBERI et al., 2023), which also could be associated with processes essential for memory consolidation, such as the long-term potentiation (LTP) (IQBAL et al., 2024). In this perspective, our study contributes to comprehending MS-related effects in front of memory and oxidative stress in the female sex.

CONCLUSION

MS does not induce recognition memory deficits in adult female rats but alters hippocampal redox balance, increasing ROS and reducing total antioxidant capacity. MCT was able to reverse the negative effects on oxidative balance, increasing the total antioxidant capacity and decreasing ROS and lipid peroxidation. These findings contribute to the better comprehension of sex-dependent MS effects on memory and brain redox status and the potential of MCT in front of alterations induced by early life stress.

ACKNOWLEDGMENTS

Gabriela Cristiane Mendes Gomes: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Ben-Hur Souto das Neves:** Writing – review & editing, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Karine Ramires Lima:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Ana Carolina de Souza da Rosa:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Larissa de Almeida Dias:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Giulia Azevedo Martinez:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Pâmella Andréa Machado da Silva Laranja Pinto:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Anna Cecília Perretto Vieira de Souza:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Marcelo Gomes de Gomes:** Writing – review & editing, Investigation, Data curation. **Pâmela Billig Mello-Carpes:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization.

FUNDING

This study was financed by research grants from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS/RS/Brazil) and the Federal University of Pampa.

REFERENCES

Agorastos, A., Pervanidou, P., Chrousos, G. P., & Baker, D. G. (2019). Developmental trajectories of early life stress and trauma: A narrative review on neurobiological aspects beyond stress system dysregulation. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 10, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00118>

Ali, S. F., LeBel, C. P., & Bondy, S. C. (1992). Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *NeuroToxicology*, 13(3).

Alves, J., de Sá Couto-Pereira, N., de Lima, R. M. S., Quillfeldt, J. A., & Dalmaz, C. (2022). Effects of Early Life Adversities upon Memory Processes and Cognition in

Rodent Models. In *Neuroscience* (Vol. 497, pp. 282–307). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.04.023>

Baudin, A., Blot, K., Verney, C., Estevez, L., Santamaria, J., Gressens, P., Giros, B., Otani, S., Daugé, V., & Naudon, L. (2012). Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98(3), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.08.004>

Benetti, F., Mello, P. B., Bonini, J. S., Monteiro, S., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2009). Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27(1). <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2008.09.200>

Benmhammed, H., el Hayek, S., Berkik, I., Elmostafi, H., Bousalham, R., Mesfioui, A., Ouichou, A., & el Hessni, A. (2019). Animal models of early-life adversity. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2011, pp. 143–161). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9554-7_10

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1). <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Bolton, J. L., Molet, J., Ivy, A., & Baram, T. Z. (2017). New insights into early-life stress and behavioral outcomes. In *Current Opinion in Behavioral Sciences* (Vol. 14, pp. 133–139). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.12.012>

Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R., Zinn, C. G., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Hormones and Behavior*, 50(2), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.03.016>

Brooks, G. A., & White, T. P. (1978). Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology Respiratory Environmental and Exercise Physiology*, 45(6). <https://doi.org/10.1152/jappl.1978.45.6.1009>

Carrazoni, G. S., das Neves, B. H. S., dos Santos Soares, M., Lima, K. R., & Mello-Carpes, P. B. (2023). Starting maternal exercise, unlike reducing the intensity of exercise during pregnancy, prevents memory deficits in female offspring subject to maternal deprivation. *Brain Research*, 1808. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148337>

Cassilhas, R. C., Tufik, S., & de Mello, M. T. (2016). Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 5, pp. 975–983). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2102-0>

Cefis, M., Chaney, R., Wirtz, J., Méloux, A., Quirié, A., Leger, C., Prigent-Tessier, A., & Garnier, P. (2023). Molecular mechanisms underlying physical exercise-induced brain BDNF overproduction. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 16). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1275924>

de Azeredo, L. A., Wearick-Silva, L. E., Viola, T. W., Tractenberg, S. G., Centeno-Silva, A., Orso, R., Schröder, N., Bredy, T. W., & Grassi-Oliveira, R. (2017). Maternal separation induces hippocampal changes in cadherin-1 (CDH-1) mRNA and recognition memory impairment in adolescent mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 141, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2017.04.006>

dos Santos, A. S., Segabinazi, E., de Almeida, W., Faustino, A. M., Bronauth, L. P., dos Santos, T. M., Ferreira, F. S., Wyse, A. T. S., Marcuzzo, S., & Pereira, L. O. (2023). Resistance exercise was safe for the pregnancy and offspring's development and partially protected rats against early life stress-induced effects. *Behavioural Brain Research*, 445. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114362>

Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1). [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)

Festa, F., Medori, S., & Macrì, M. (2023). Move Your Body, Boost Your Brain: The Positive Impact of Physical Activity on Cognition across All Age Groups. In *Biomedicines* (Vol. 11, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061765>

Frodl, T., Janowitz, D., Schmaal, L., Tozzi, L., Dobrowolny, H., Stein, D. J., Veltman, D. J., Wittfeld, K., van Erp, T. G. M., Jahanshad, N., Block, A., Hegenscheid, K., Völzke, H., Lagopoulos, J., Hatton, S. N., Hickie, I. B., Frey, E. M., Carballo, A., Brooks, S. J., ... Grabe, H. J. (2017). Childhood adversity impacts on brain subcortical structures relevant to depression. *Journal of Psychiatric Research*, 86, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2016.11.010>

Gavelin, H. M., Dong, C., Minkov, R., Bahar-Fuchs, A., Ellis, K. A., Lautenschlager, N. T., Mellow, M. L., Wade, A. T., Smith, A. E., Finke, C., Krohn, S., & Lampit, A. (2021). Combined physical and cognitive training for older adults with and without cognitive impairment: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 66). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101232>

Gegenhuber, B., & Tollkuhn, J. (2020). Signatures of sex: Sex differences in gene expression in the vertebrate brain. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* (Vol. 9, Issue 1). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/wdev.348>

Grochecki, P., Smaga, I., Surowka, P., Marszalek-Grabska, M., Kalaba, P., Dragacevic, V., Kotlinska, P., Filip, M., Lubec, G., & Kotlinska, J. H. (2022). Novel Dopamine Transporter Inhibitor, CE-123, Ameliorates Spatial Memory Deficits Induced by Maternal Separation in Adolescent Rats: Impact of Sex. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810718>

Iqbal, J., Huang, G. di, Xue, Y. X., Yang, M., & Jia, X. J. (2024). Role of estrogen in sex differences in memory, emotion and neuropsychiatric disorders. In *Molecular Biology Reports* (Vol. 51, Issue 1). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09374-z>

Kotlinska, J. H., Grochecki, P., Michalak, A., Pankowska, A., Kochalska, K., Suder, P., Ner-Kluza, J., Matosiuk, D., & Marszalek-Grabska, M. (2023). Neonatal Maternal Separation Induces Sexual Dimorphism in Brain Development: The Influence on Amino Acid Levels and Cognitive Disorders. *Biomolecules*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/biom13101449>

Kundakovic, M., & Tickerhoof, M. (2024). Epigenetic mechanisms underlying sex differences in the brain and behavior. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 47, Issue 1, pp. 18–35). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.09.007>

Lima, M. G. P., Schimidt, H. L., Garcia, A., Daré, L. R., Carpes, F. P., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. B. (2018). Environmental enrichment and exercise are better than social enrichment to reduce memory deficits in amyloid beta neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), E2403–E2409. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718435115>

Lu, Y., Bu, F. Q., Wang, F., Liu, L., Zhang, S., Wang, G., & Hu, X. Y. (2023). Recent advances on the molecular mechanisms of exercise-induced improvements of cognitive dysfunction. In *Translational Neurodegeneration* (Vol. 12, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40035-023-00341-5>

Lubrano, C., Parisi, F., & Cetin, I. (2024). Impact of Maternal Environment and Inflammation on Fetal Neurodevelopment. In *Antioxidants* (Vol. 13, Issue 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antiox13040453>

Malcon, L. M. C., Wearick-Silva, L. E., Zaparte, A., Orso, R., Luft, C., Tractenberg, S. G., Donadio, M. V. F., de Oliveira, J. R., & Grassi-Oliveira, R. (2020). Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male Balb/cJ mice. *Experimental Brain Research*, 238(9), 2097–2107. <https://doi.org/10.1007/s00221-020-05859-y>

Mandolesi, L., Polverino, A., Montuori, S., Foti, F., Ferraioli, G., Sorrentino, P., & Sorrentino, G. (2018). Effects of physical exercise on cognitive functioning and wellbeing: Biological and psychological benefits. In *Frontiers in Psychology* (Vol. 9, Issue APR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2018.00509>

Marković, B., Radonjić, N. v., Jevtić, G., Stojković, T., Velimirović, M., Aksić, M., Poleksić, J., Nikolić, T., Aleksić, D., Radonjić, V., Filipović, B., & Petronijević, N. D. (2017). Long-term effects of maternal deprivation on redox regulation in rat brain: Involvement of NADPH oxidase. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7390516>

Martín-Rodríguez, A., Gostian-Ropotin, L. A., Beltrán-Velasco, A. I., Belando-Pedreño, N., Simón, J. A., López-Mora, C., Navarro-Jiménez, E., Tornero-Aguilera, J. F., & Clemente-Suárez, V. J. (2024). Sporting Mind: The Interplay of Physical Activity and Psychological Health. In *Sports* (Vol. 12, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/sports12010037>

Mello, P. B., Benetti, F., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2009). Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(3), 364–369. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.04.004>

Menezes, J., Neves, B. H., Souza, M., & Mello-Carpes, P. B. (2017). Green tea protects against memory deficits related to maternal deprivation. *Physiology and Behavior*, 182, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.010>

Menezes, J., Souto das Neves, B. H., Gonçalves, R., Benetti, F., & Mello-Carpes, P. B. (2020). Maternal deprivation impairs memory and cognitive flexibility, effect that is avoided by environmental enrichment. *Behavioural Brain Research*, 381. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112468>

Neves, B. H., Menezes, J., Souza, M. A., & Mello-Carpes, P. B. (2015). Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation. *Physiology and Behavior*, 152, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.09.019>

Nishi, M. (2020). Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 21, Issue 19). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/ijms21197212>

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. In *Journal of Neuroscience Methods* (Vol. 14). [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)

Pinho, R. A., Aguiar, A. S., & Radák, Z. (2019). Effects of resistance exercise on cerebral redox regulation and cognition: An interplay between muscle and brain. In *Antioxidants* (Vol. 8, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox8110529>

Pujari, V (2024). Moving to Improve Mental Health - The Role of Exercise in Cognitive Function: A Narrative Review. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science*, 16(Suppl 1), S26–S30. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_614_23

Radak, Z., Suzuki, K., Higuchi, M., Balogh, L., Boldogh, I., & Koltai, E. (2016). Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. *Free Radical Biology and Medicine*, 98, 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.024>

Réus, G. Z., Abitante, M. S., Manosso, L. M., de Moura, A. B., Borba, L. A., Botelho, M. E. M., Darabas, A. C., Demo, J. P., Behenck, J. P., Arent, C. O., Garbossa, L., Joaquim, L., Cardoso, T. A., Petronilho, F., & Quevedo, J. (2023). Environmental Enrichment Rescues Oxidative Stress and Behavioral Impairments Induced by Maternal Care Deprivation: Sex- and Developmental-Dependent Differences. *Molecular Neurobiology*, 60(12), 6757–6773. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02588-3>

Rocha, M., Wang, D., Avila-Quintero, V., Bloch, M. H., & Kaffman, A. (2021). Deficits in hippocampal-dependent memory across different rodent models of early life stress: systematic review and meta-analysis. *Translational Psychiatry*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01352-4>

Rossi Dare, L., Garcia, A., Alves, N., Ventura Dias, D., de Souza, M. A., & Mello-Carpes, P. B. (2019). Physical and cognitive training are able to prevent recognition memory deficits related to amyloid beta neurotoxicity. *Behavioural Brain Research*, 365, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.007>

Soares, C. B., Daré, L. R., Lima, K. R., Lopes, L. F., Santos, A. G. D., Schimidt, H. L., Carpes, F. P., Lloret, A., Viña, J., & Mello-Carpes, P. B. (2021). Multicomponent Training Prevents Memory Deficit Related to Amyloid- β Protein-Induced Neurotoxicity. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 83(1), 143–154. <https://doi.org/10.3233/JAD-210424>

Sosa, P. M., Neves, B. H. S., Carrazoni, G. S., Gomes, G. M., del Rosso, G., Ramborger, B. P., Rohers, R., & Mello-Carpes, P. B. (2019). Maternal Deprivation Induces Memory Deficits That Are Reduced by One Aerobic Exercise Shot Performed

after the Learning Session. *Neural Plasticity*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/3608502>

Souza, M. V. C., Leite, R. D., Lino, A. D. de S., de Cássia, R. M., Bernardes, C. F., de Araújo, H. S. S., Bouskella, E., Shiguemoto, G. E., Perez, S. E. de A., & Kraemer-Aguiar, L. G. (2014). Resistance training improves body composition and increases matrix metalloproteinase 2 activity in biceps and gastrocnemius muscles of diet-induced obese rats. *Clinics*, 69(4), 265–270. [https://doi.org/10.6061/clinics/2014\(04\)08](https://doi.org/10.6061/clinics/2014(04)08)

Spawton-Rice, J. H., & Walker, Z. (2022). Do cognitive training applications improve executive function in children with adverse childhood experiences? A pilot study. *Applied Neuropsychology: Child*, 11(3), 373–382.
<https://doi.org/10.1080/21622965.2020.1854094>

Spiers, J. G., Chen, H. J. C., Sernia, C., & Lavidis, N. A. (2015). Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *In Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue JAN). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00456>

Sun, X., Zhang, Y., Li, X., Liu, X., & Qin, C. (2021). Early-Life Neglect Alters Emotional and Cognitive Behavior in a Sex-Dependent Manner and Reduces Glutamatergic Neuronal Excitability in the Prefrontal Cortex. *Frontiers in Psychiatry*, 11.
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.572224>

Teicher, M. H., Andersen, S. L., Polcari, A., Anderson, C. M., Navalta, C. P., & Kim, D. M. (2003). The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 27(1–2), 33–44.
[https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00007-1)

Tiberi, J., Cesarini, V., Stefanelli, R., Canterini, S., Fiorenza, M. T., & la Rosa, P. (2023). Sex differences in antioxidant defence and the regulation of redox homeostasis

in physiology and pathology. *Mechanisms of Ageing and Development*, 211. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111802>

Wearick-Silva, L. E., Marshall, P., Viola, T. W., Centeno-Silva, A., de Azeredo, L. A., Orso, R., Li, X., Donadio, M. v., Bredy, T. W., & Grassi-Oliveira, R. (2017). Running during adolescence rescues a maternal separation-induced memory impairment in female mice: Potential role of differential exon-specific BDNF expression. *Developmental Psychobiology*, 59(2), 268–274. <https://doi.org/10.1002/dev.21487>

White, T. A., Miller, S. L., Sutherland, A. E., Allison, B. J., & Camm, E. J. (2024). Perinatal compromise affects development, form, and function of the hippocampus part one; clinical studies. *In Pediatric Research*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41390-024-03105-7>

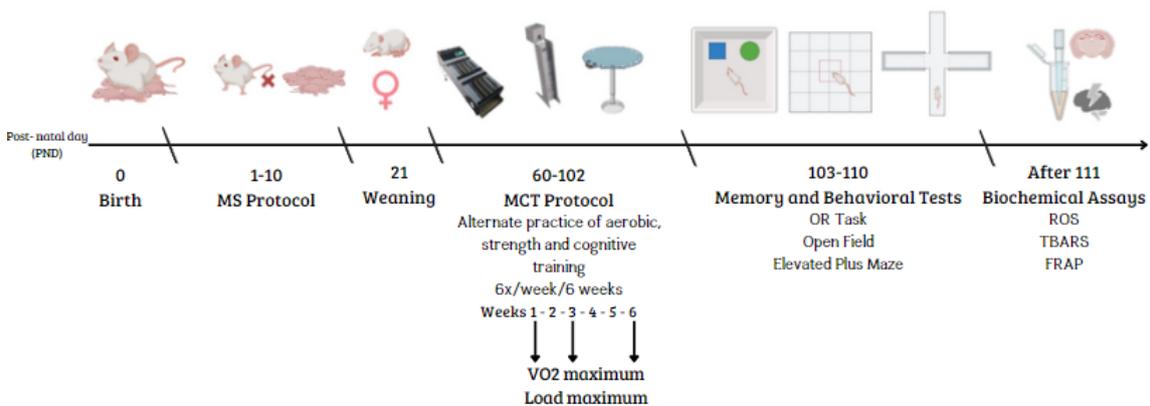


Fig. 1. Study experimental design. The birthday was considered the post-natal day (PND) zero (PND-0). Maternal separation (MS) protocol was performed in MS groups from PND-1 to PND-10. All the animals were weaned on PND-21, and female rats were randomly divided into groups according to the intervention (n = 4 animals per cage). From PND-60 to PND-102, an equivalent period of six weeks, exercised groups performed multicomponent training (MCT), consisting of the alternate practice of aerobic, strength, and cognitive exercises. In the first, third, and sixth weeks of MCT, VO₂ maximum and load maximum tests were applied. From PND-103 to PND-110, recognition memory and behavioral control tasks were performed (object recognition task, open field, and elevated plus maze tests). After PND-111, the rats were euthanized, and biochemical assays were performed to evaluate hippocampal oxidative parameters.

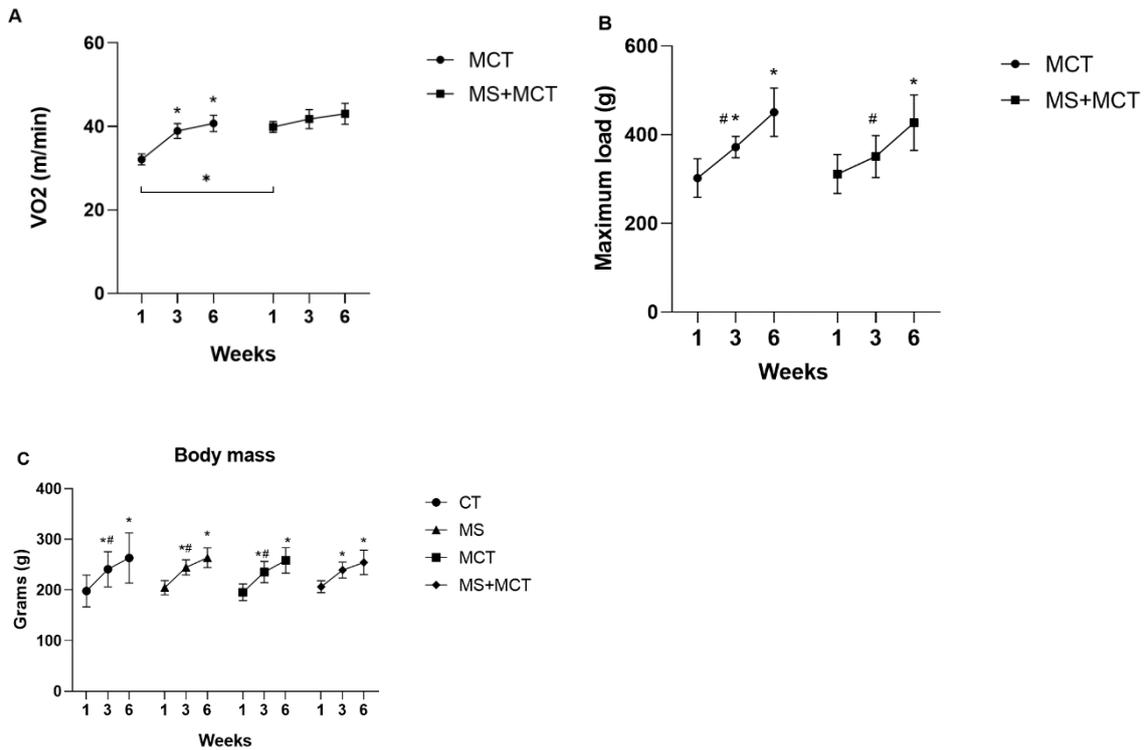


Fig. 2. Multicomponent training and maternal separation on exercise performance and body weight. A. VO₂ maximum indirect measurement for aerobic capacity assessment. Data expressed as mean ± SD. *P < 0.05, intra-groups and inter-groups comparison to the first week of MCT. B. Maximum load test measurement for anaerobic gain evaluation. Data expressed as mean ± SD. *P < 0.05, compared to the first week of MCT; #P < 0.05, compared to the third week of MCT. C. Body weight measurement for control assessment. Data expressed as mean ± SD. *P < 0.05, compared to the first week of MCT; #P < 0.05, compared to the third week of MCT, in two-way ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* (n = 8 – 12/group).

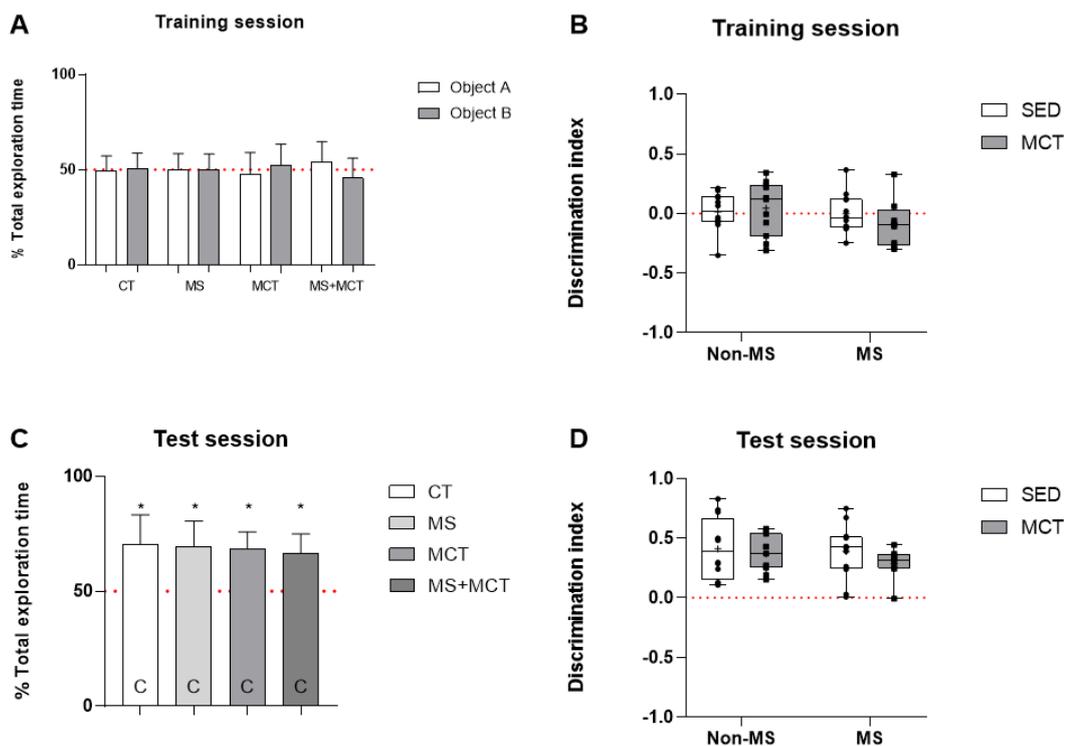


Fig. 3. Maternal separation did not affect recognition memory or discrimination ability in the object recognition (OR) task in female rats. A and C. Performance in the training and test sessions,

respectively, for memory evaluation. Data expressed as mean \pm SD. *P < 0.05 in one sample t-test (theoretical mean of 50%) (n = 8 – 12/group). B and D. Inter-groups comparison, using discrimination index (ID). Data expressed as mean \pm SD. Non-MS = groups that were not submitted to MS (CT or MCT); SED = groups that did not perform MCT (CT and MS); MCT = groups that performed MCT (MCT or MS+MCT).

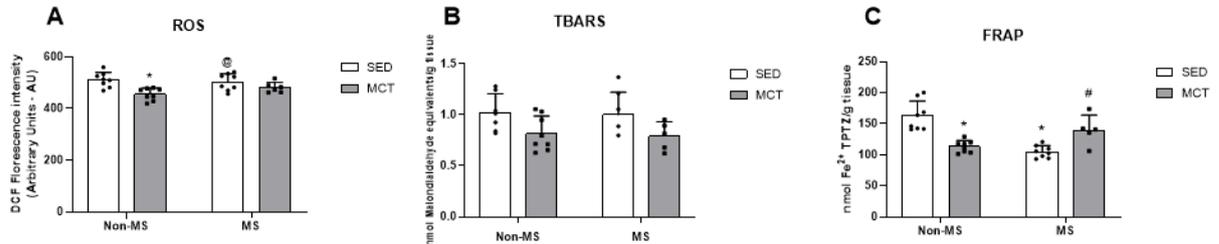


Fig. 4. Maternal separation (MS) alters hippocampal oxidative parameters in female rats. Multicomponent training improved hippocampal oxidative alterations induced by MS. A. Levels of DCF fluorescence for ROS determination. B. TBARS measurement for lipid peroxidation assessment. C. FRAP measurement for total antioxidant capacity assessment. Data expressed as mean \pm SD. *P < 0.05, compared to CT; #P < 0,05, compared to MS, @ P < 0.05, compared to MCT, in two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* (n = 5– 8/group). TBARS: Thiobarbituric acid reactive substance; DCF: Dichlorofluorescein; ROS: Reactive oxidative species; FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power; TPTZ: 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride; Non-MS = groups that were not submitted to MS (CT or MCT); SED = groups that did not perform MCT (CT and MS); MCT = groups that performed MCT (MCT or MS+MCT).

	CT	MS	MCT	MS+MCT	Two-way ANOVA		
					Interaction P value	MS P value	MCT P value
Open field							
Crossings (n)	74.83 \pm 22.05	95.50 \pm 23.79	89.27 \pm 18.82	87.63 \pm 18.26	0.0961	0.1540	0.6187
Rearings (n)	20.92 \pm 7.29	26.50 \pm 9.30	23.73 \pm 7.73	26.50 \pm 9.43	0.5919	0.1161	0.5919
Elevated plus maze							
Time in open arms (s)	132.08 \pm 31.42	132.67 \pm 36.13	138.23 \pm 37.50	145.75 \pm 20.43	0.7355	0.6925	0.3504
Entrances in open arms (n)	7.42 \pm 2.11	7.00 \pm 2.00	7.55 \pm 2.73	8.38 \pm 2.39	0.3878	0.7738	0.2984

Table 1. Effects of maternal separation and multicomponent training on locomotor and exploratory activities, and on anxiety-like behavior. Data are expressed as mean \pm SD of the number of crossings and rearings in the open field, and the time spent, and the number of entries in the open arms of the elevated plus maze. No differences were detected between the groups. P > 0.05 in two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* (n = 8–12/group).

PARTE III

6. DISCUSSÃO

Tendo em vista a incidência de diferentes tipos de estresse neonatal, como a ausência de cuidados no início da vida, e os efeitos promissores do exercício físico e cognitivo frente a disfunções cognitivas, o presente trabalho investigou os efeitos da combinação de três modalidades de exercício – corrida, força e cognitivo - sobre a memória de reconhecimento e parâmetros oxidativos hipocampais. Para isso, utilizamos o treinamento multicomponente com prática alternada de corrida, exercício de força e exercício cognitivo durante 6 semanas, e avaliamos a consolidação da memória de reconhecimento utilizando a tarefa de reconhecimento de objetos. Nossos achados demonstram que a privação materna não induz déficits na memória de reconhecimento na prole de ratas fêmeas, mas altera o balanço redox, diminuindo a capacidade antioxidante total. Em contrapartida, o treinamento multicomponente é capaz de diminuir os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumentar a capacidade antioxidante de ratas separadas maternalmente.

Déficits cognitivos associados à PM têm sido documentados, sobretudo na prole de ratos machos, incluindo déficits na memória espacial (ESKANDARI et al., 2022), aversiva (MELLO et al., 2009), de trabalho (BANQUERI et al., 2021) e de reconhecimento, neste caso tanto na memória de curta como na memória de longa duração (NEVES et al., 2015; MENEZES et al., 2020). O declínio cognitivo pode estar associado a disfunções no hipocampo, tendo em vista que alterações nesta estrutura têm sido relacionadas a este modelo (DIEHL et al., 2012), incluindo desde a redução de seu tamanho (TEICHER et al., 2003) até distúrbios em sistemas de neurotransmissores como o dopaminérgico, cujos receptores são amplamente expressos em estruturas como o hipocampo e desempenham importante papel em processos mnemônicos (NEVES et al., 2020).

É importante destacar que variações entre os resultados encontrados em estudos nesta área podem estar relacionadas aos protocolos de PM utilizados, os quais podem diferir na sua duração em dias e horas, e na idade dos animais no período de testes comportamentais (ALVES et al., 2022). Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, utilizando um modelo de PM de 3h por dia, ao longo de 10 dias, demonstramos déficits de memória relacionados à PM, que foram revertidos pelo

exercício aeróbico, tanto em protocolo crônico (NEVES et al., 2015) quanto agudo (SOSA et al., 2019), realizado na janela temporal da consolidação – ambos os estudos foram realizados em ratos machos adultos. No presente estudo, utilizando ratas adultas submetidas à PM verificamos que elas foram capazes de consolidar a memória de reconhecimento de objetos. Em camundongos fêmeas, foram observados déficits induzidos pela PM na tarefa de RO na adolescência (DE AZEREDO et al., 2017), revelando um possível efeito diferente que poderia ser associado à espécie. No entanto, um estudo com ratas jovens desenvolvido em nosso laboratório, também encontrou déficits de memória nas ratas pré-pubescentes (CARRAZONI et al., 2023).

No que diz respeito ao exercício físico, em camundongos fêmeas separadas matematicamente, o exercício aeróbico foi capaz de reverter déficits na memória de reconhecimento na adolescência (WEARICK-SILVA et al., 2017). Estes resultados sugerem que os efeitos mnemônicos da PM estão relacionados à idade e também a formação de mecanismos de resiliência ao longo da vida, uma vez que fêmeas mais jovens apresentaram déficits de memória, enquanto no presente estudo o mesmo não foi observado em ratas adultas. Os efeitos do exercício frente a doenças crônicas e neurodegenerativas são bem documentados na literatura (THOMPSON et al., 2020). Nos últimos anos há um crescente aumento de estudos sobre o exercício e a função cognitiva, com benefícios descritos tanto em protocolos agudos como crônicos (FESTA; MEDORI, MACRI, 2023).

O exercício é capaz de modular a atividade neuronal e a ativação de sistemas de neurotransmissores, promovendo o aumento da expressão de *BDNF*, uma das principais neurotrofinas relacionadas à melhora da cognição, sendo capaz de induzir processos de neurogênese, angiogênese e plasticidade sináptica (CEFIS et al., 2023). O exercício também atua sobre o balanço oxidativo em diversos tecidos corporais. No SN, alguns dos mecanismos incluem a liberação de *BDNF* promovendo a ativação do gene *Nrf2*, responsável pela regulação da expressão de enzimas antioxidantes (PINHO; AGUIAR; RADÁK, 2019). Atualmente, os efeitos relatados do exercício físico não se limitam aos estudos com modelos de exercício aeróbico, mas também tem investigado o efeito do exercício de força sobre a cognição, demonstrando que ele tem potencial para promover a melhora da memória (BERBERT-GOMES et al., 2024). Quando se fala em melhora cognitiva, além do exercício físico, é inegável pensar nos efeitos do treinamento cognitivo. Estudos também têm demonstrado o potencial

neuroprotetor desta modalidade em modelos animais e humanos (DARÉ et al., 2019; LOOCK; SCHWABE, 2024).

Considerando os benefícios das diferentes modalidades de exercício, é intuitivo pensar que a sua associação poderia incrementar os benefícios de sua prática isolada. Esta associação é possível quando se propõe o TM. Anteriormente, o TM demonstrou ser capaz de prevenir a manifestação de déficits na memória de reconhecimento, tanto de objetos como social, e de promover a diminuição da peroxidação lipídica, bem como o aumento da capacidade antioxidante total e dos níveis de glutathiona em um modelo de doença de Alzheimer (SOARES et al., 2021), no entanto, até então, não haviam estudos acerca dos efeitos do TM em modelos de PM. Assim, nossos achados apresentam o TM como uma estratégia terapêutica em diferentes cenários, incluindo o estresse neonatal.

Os mecanismos de ação do TM no modelo de estresse neonatal pela PM podem ser diversos; um deles inclui o equilíbrio oxidativo. A formação de espécies reativas ocorre fisiologicamente e existem mecanismos para a manutenção do balanço redox. No entanto, o quadro de estresse oxidativo se manifesta quando as concentrações de moléculas reativas se sobrepõem aos mecanismos antioxidantes, sendo este um quadro característico de doenças como câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas (TIBERI et al., 2023). Contudo, alterações no balanço redox têm sido descritas também em modelos de estresse neonatal, incluindo disfunções na respiração celular (MARKOVIĆ et al., 2017), supressão da atividade de enzimas como superóxido dismutase e catalase, e a carbonilação de proteínas (RÉUS et al., 2017).

No presente estudo, nós avaliamos os níveis de EROs, peroxidação lipídica e capacidade antioxidante hipocámpais, e demonstramos a diminuição da capacidade antioxidante total induzidos pela PM, a qual foi revertida pelo TM. Previamente, foram observadas alterações sobre diferentes parâmetros oxidativos, como a peroxidação lipídica em amostras de soro de ratos machos e fêmeas submetidos à PM (RÉUS et al., 2023), às quais foram revertidas em parte pela exposição a um ambiente enriquecido que incluiu, dentre outros estímulos, rodas de corrida que possibilitaram o exercício de forma voluntária. No referido estudo, as ratas fêmeas apresentaram aumento da peroxidação lipídica após o 61º dia de vida, mas não redução pelo protocolo de enriquecimento ambiental. Destaca-se que os autores relacionam o aumento da enzima superóxido dismutase em fêmeas à um possível papel de

manutenção da homeostase ao longo do desenvolvimento (RÉUS et al., 2023). Em ratas pré-pubescentes separadas matematicamente e cujas mães realizaram um protocolo de exercício aeróbico durante a gestação, foi demonstrado um aumento da capacidade antioxidante total promovida pelo exercício pré-gestação e gestacional (CARRAZONI et al., 2023). Os resultados demonstram alterações no balanço oxidativo induzidas pela PM em diferentes estágios da vida, e o potencial do exercício na terapêutica de desordens relacionadas ao estresse neonatal.

A maioria dos estudos relacionados ao exercício e à privação materna apresenta enfoque na modalidade aeróbica, com benefícios observados na sua prática em diferentes protocolos (CAMPBELL et al., 2022). No que se refere à outras modalidades, um estudo prévio demonstrou os efeitos da prática do exercício anaeróbico no período gestacional sobre o comportamento e parâmetros bioquímicos da prole (DOS SANTOS et al., 2023), enquanto recentemente os dados de um estudo piloto de treinamento cognitivo em infantes foi publicado, apresentando efeitos promissores sobre a função executiva (SPAWTON; RICE, 2022). Diante disso, observa-se a necessidade de futuros estudos sobre os efeitos dos treinamentos de força e cognitivo, a fim de avaliar os seus efeitos de modo individual sobre o estresse neonatal.

Tomados em conjunto, nossos achados sugerem dimorfismos sexuais nos efeitos da PM sobre a memória de reconhecimento, já que a PM não induziu alterações na consolidação da memória em ratas fêmeas adultas, diferente do observado e já consolidado na literatura para ratos machos adultos (VIVINETTO; SUÁREZ; RIVAROLA, 2013; NEVES et al., 2015; SOSA et al., 2019; MENEZES et al., 2020; NEVES et al., 2020). Em contrapartida, a PM alterou no estado oxidativo hipocampal, promovendo a redução da capacidade antioxidante total hipocampal das fêmeas. O TM foi capaz de atenuar as desordens no balanço oxidativo induzidas pela PM, promovendo redução da peroxidação lipídica e o aumento da capacidade antioxidante total do hipocampo. Assim, nossos achados demonstram os efeitos promissores do TM como alternativa para o manejo de desordens no balanço oxidativo relacionadas à PM.

7. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados apresentados nesta dissertação permitem concluir que a privação materna não induziu déficits cognitivos na memória de reconhecimento em ratas fêmeas, mas alterou o balanço oxidativo hipocampal promovendo a diminuição da capacidade antioxidante total. O treinamento multicomponente, por sua vez, foi capaz de reverter estas alterações, aumentando a capacidade antioxidante total, diminuindo não apenas espécies reativas, mas também a peroxidação lipídica hipocampal.

Estes achados contribuem para a compreensão dos efeitos da privação materna sobre a memória no sexo feminino, e demonstram o potencial do treinamento multicomponente no manejo de distúrbios no balanço oxidativo relacionados ao estresse no início da vida.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados demonstraram a ocorrência de efeitos sexo-dependentes induzidos pela privação de cuidados no início da vida, com a ausência de déficits cognitivos na memória de reconhecimento em ratas submetidas à privação materna, diferente do que é evidenciado em ratos submetidos ao mesmo protocolo. Embora não altere a consolidação da memória, o modelo de PM diminuiu a capacidade antioxidante total do tecido hipocampal das ratas, quadro que foi atenuado pelo protocolo de exercício, que ainda atenuou os níveis de EROs e a peroxidação lipídica. Diante dos resultados evidenciados, como perspectivas a curto prazo, estão:

- Executar uma avaliação imuno-histoquímica no hipocampo das ratas, para avaliação da neurogênese e dos níveis de BDNF;
- Avaliar a atividade enzimática de sistemas de defesa antioxidante - ainda a definir qual – a fim de tornar ainda mais robusta a compreensão da interação entre a PM, o TM, e o balanço oxidativo hipocampal.

Como perspectivas a longo prazo, destacamos:

- Avaliar os efeitos da PM e do TM sobre a memória e parâmetros oxidativos hipocampais em machos;
- Investigar os possíveis efeitos sexo-dependentes do TM sobre os a memória e o balanço oxidativo em animais submetidos à PM;
- Realizar estudos com a PM e os protocolos de exercício de força e cognitivo implementados individualmente, contribuindo no entendimento dos efeitos de cada modalidade sobre o estresse neonatal de maneira isolada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. et al. Effects of Early Life Adversities upon Memory Processes and Cognition in Rodent Models. **Neuroscience**, v. 497, p. 282-307, 2022.

ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: Point of vulnerability or window of opportunity? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, n. 1-2, p. 3-18, 2003.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, p. 93-110, 2012.

BALDERAS, I.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. J.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 285, p. 213–222, 2015.

BALE, T. L. et al. **Early life programming and neurodevelopmental disorders.** **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 4, p. 314-319, 2010.

BANQUERI, M. et al. Early life stress due to repeated maternal separation alters the working memory acquisition brain functional network. **Stress**, v. 24, n. 1, p. 87-95, 2021.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso.** Artmed editora, 2017.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Reviews: BDNF and memory formation and storage. **Neuroscientist**, v. 14, n. 2, p. 147-156, 2008.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of long-term memory storage: New insights into its molecular signatures in the hippocampus and related structures. **Neurotoxicity Research**, v. 18, p. 377-385, 2010.

BENMHAMMED, H. et al. Animal models of early-life adversity. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2019. v. 2011, p. 143–161.

BERBERT-GOMES, C. et al. An acute bout of resistance exercise increases BDNF in hippocampus and restores the long-term memory of insulin-resistant rats. **Experimental Brain Research**, v. 242, n. 4, p. 901–912, 2024.

BEYER, J. L. et al. Enhancing Brain Health and Well-Being in Older Adults: Innovations in Lifestyle Interventions. **Current Psychiatry Reports**, 6 jun. 2024.

BISAZ, R.; TRAVAGLIA, A.; ALBERINI, C. M. The neurobiological bases of memory formation: From physiological conditions to psychopathology. **Psychopathology**, v. 47, n. 6, p. 347–356, 2014.

BURENKOVA, O. V.; GRIGORENKO, E. L. The role of epigenetic mechanisms in the long-term effects of early-life adversity and mother–infant relationship on physiology and behavior of offspring in laboratory rats and mice. **Developmental Psychobiology**, 1 abr. 2024.

CAMPBELL, T. S. et al. Early Life Stress Affects Bdnf Regulation: A Role for Exercise Interventions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11729, 2022.

CAMPBELL, T. S.; DONOGHUE, K.; ROTH, T. L. Unlocking the epigenome: Stress and exercise induced Bdnf regulation in the prefrontal cortex. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 103, 1 maio 2024.

CARRAZONI, G. S. et al. Starting maternal exercise, unlike reducing the intensity of exercise during pregnancy, prevents memory deficits in female offspring subject to maternal deprivation. **Brain Research**, v. 1808, 2023.

CASSILHAS, R. C.; TUFIK, S.; DE MELLO, M. T. Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, p. 975-983, 2016.

CEFIS, M. et al. Molecular mechanisms underlying physical exercise-induced brain BDNF overproduction. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 16, 2023.

CHUNG, W. C. J.; AUGER, A. P. Gender differences in neurodevelopment and epigenetics. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, 2013.

COLLIGNON, A. et al. Sex, hormones and cerebrovascular function: from development to disorder. **Fluids and Barriers of the CNSBioMed Central**, 2024.

COUTO-PEREIRA, N. DE S. et al. Resilience and vulnerability to trauma: Early life interventions modulate aversive memory reconsolidation in the dorsal hippocampus. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 134, 2019.

DAMIANI, D. et al. Sexo cerebral: um caminho que começa a ser percorrido. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, p. 37-45, 2005.

DARÉ, L. R. et al. Physical and cognitive training are able to prevent recognition memory deficits related to amyloid beta neurotoxicity. **Behavioural Brain Research**, v. 365, p. 190–197, 3 jun. 2019.

DARÉ, L. R. et al. The Reversal of Memory Deficits in an Alzheimer's Disease Model Using Physical and Cognitive Exercise. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, 2020.

DE AZEREDO, L. A. et al. Maternal separation induces hippocampal changes in cadherin-1 (CDH-1) mRNA and recognition memory impairment in adolescent mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 141, p. 157–167, 1 maio 2017.

DE GREGÓRIO, E. et al. Neuroprotective effects of strength training in a neuroinflammatory animal model. **BMC Neuroscience**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2022.

DIEHL, L. A. et al. Long-lasting effects of maternal separation on an animal model of post-traumatic stress disorder: Effects on memory and hippocampal oxidative stress. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 4, p. 700–707, 2012.

DOS SANTOS, A. S. et al. Resistance exercise was safe for the pregnancy and offspring's development and partially protected rats against early life stress-induced effects. **Behavioural Brain Research**, v. 445, p. 114362, 2023.

EL ASSAR, M. et al. Effect of Physical Activity/Exercise on Oxidative Stress and Inflammation in Muscle and Vascular Aging. **International Journal of Molecular Sciences** 2022.

ELSHAZZLY, M. et al. **Embryology, central nervous system**. StatPearls, 2023.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, 1988.

ENNACEUR, A. One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. **Behavioural Brain Research**, v. 215, n. 2, p. 244-254, 2010.

ESKANDARI, F. et al. Maternal separation induced resilience to depression and spatial memory deficit despite intensifying hippocampal inflammatory responses to chronic social defeat stress in young adult male rats. **Behavioural Brain Research**, v. 425, 2022.

ESKANDARI, F. et al. Investigating the Effects of Maternal Separation on Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Glucose Homeostasis under Chronic Social

Defeat Stress in Young Adult Male Rat Offspring. **Neuroendocrinology**, v. 113, n. 3, p. 361–380, 2023.

FESTA, F.; MEDORI, S.; MACRÌ, M. Move Your Body, Boost Your Brain: The Positive Impact of Physical Activity on Cognition across All Age Groups. **Biomedicines**, v. 11, n. 6, p. 1765, 2023.

FURINI, C. R. G. et al. Molecular Mechanisms in Hippocampus Involved on Object Recognition Memory Consolidation and Reconsolidation. **Neuroscience**, v. 435, p. 112–123, 2020.

GAUSTER, M. et al. Early human trophoblast development: from morphology to function. **Cellular and Molecular Life**, v. 79, n. 6, p. 345, 2022.

GAVELIN, H. M. et al. Cognition-Oriented Treatments for Older Adults: a Systematic Overview of Systematic Reviews. **Neuropsychology Review**, v. 30, n. 2, p. 167-193, 2020.

GAVELIN, H. M. et al. Combined physical and cognitive training for older adults with and without cognitive impairment: A systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. **Ageing Research Reviews**, v. 66, p. 101232, 2021.

GEGENHUBER, B.; TOLLKUHN, J. Sex differences in the epigenome: A cause or consequence of sexual differentiation of the brain? **Genes**, v. 10, n. 6, p. 432, 2019.

GEGENHUBER, B.; TOLLKUHN, J. Signatures of sex: Sex differences in gene expression in the vertebrate brain. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 9, n. 1, p. e348, 2020.

GILMORE, J. H.; KNICKMEYER, R. C.; GAO, W. Imaging structural and functional brain development in early childhood. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 3, p. 123-137, 2018.

GONZÁLEZ-PARDO, H. et al. Sex-specific effects of early life stress on brain mitochondrial function, monoamine levels and neuroinflammation. **Brain Sciences**, v. 10, n. 7, p. 1–17, 1 jul. 2020.

GROCHECKI, P. et al. Novel Dopamine Transporter Inhibitor, CE-123, Ameliorates Spatial Memory Deficits Induced by Maternal Separation in Adolescent Rats: Impact of Sex. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, 1 set. 2022.

HE, K. et al. Impact of maternal separation on dopamine system and its association with Parkinson's disease. **NeuroMolecular Medicine**, v. 22, p. 335-340, 2020.

HUTTENLOCHER, P. R. Synaptogenesis in human cerebral cortex and the concept of critical periods. **The role of early experience in infant development**, p. 15-28, 1999.

ISMAIL, F. Y.; FATEMI, A.; JOHNSTON, M. V. Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. **European Journal of Paediatric**, 2017.

IZQUIERDO, I. A. **Memória**. Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória-Tipos e mecanismos-Achados recentes. **Revista USP**, 2013.

JIN, L. et al. Exerkines and cardiometabolic benefits of exercise: from bench to clinic. **EMBO Molecular Medicine**, p. 1-13, 2024.

KAJANTIE, E. Early-life events. Effects on aging. **Hormones**, v. 7, n. 2, p. 101-113, 2008.

KAWAMURA, T.; MURAOKA, I. Exercise-induced oxidative stress and the effects of antioxidant intake from a physiological viewpoint. **Antioxidants**, v. 7, n. 9, p. 119, 2018.

KIM, Y.-M. et al. Sudden detraining deteriorates swimming training-induced enhancement of short-term and spatial learning memories in mice. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 9, n. 2, p. 243–249, 2013.

KOLB, B.; GIBB, R. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 265, 2011.

KRUK, J. et al. Antioxidative properties of phenolic compounds and their effect on oxidative stress induced by severe physical exercise. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 72, n. 1, p. 19, 2022.

LAHTI, J. et al. Prenatal growth, postnatal growth and trait anxiety in late adulthood - The Helsinki Birth Cohort Study. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 121, n. 3, p. 227–235, 2010.

LEE, K. H.; CHA, M.; LEE, B. H. Neuroprotective effect of antioxidants in the brain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7152, 2020.

LEE, S. H.; JUNG, E. M. Adverse effects of early-life stress: Focus on the rodent neuroendocrine system. **Neural Regeneration Research**, 1 fev. 2024.

LIMA, K. R. et al. One single physical exercise session improves memory persistence by hippocampal activation of D1 dopamine receptors and PKA signaling in rats. **Brain Research**, v. 1762, 1 jul. 2021.

LIMA, K. R. et al. Acute physical exercise prevents memory amnesia caused by protein synthesis inhibition in rats' hippocampus. **Neurochemistry International**, v. 176, 2024.

LOOCK, K.; SCHWABE, L. Cognitive training prevents stress-induced working memory deficits. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, 2024.

LU, Y. et al. Recent advances on the molecular mechanisms of exercise-induced improvements of cognitive dysfunction. **Translational Neurodegeneration**, 1 dez. 2023.

MALCON, L. M. C. et al. Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male Balb/cJ mice. **Experimental Brain Research**, v. 238, n. 9, p. 2097–2107, 2020.

MANIAM, Jayanthi; ANTONIADIS, Christopher; MORRIS, Margaret J. Early-life stress, HPA axis adaptation, and mechanisms contributing to later health outcomes. **Frontiers in endocrinology**, v. 5, p. 80176, 2014.

MARGOLIS, E. T.; GABARD-DURNAM, L. J. Prenatal influences on postnatal neuroplasticity: Integrating DOHaD and sensitive/critical period frameworks to understand biological embedding in early development. **Infancy**, 2024.

MARKOVIĆ, B. et al. Long-term effects of maternal deprivation on redox regulation in rat brain: Involvement of NADPH oxidase. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, p. 7390516, 2017.

MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. et al. Sporting Mind: The Interplay of Physical Activity and Psychological Health. **Sports**, v. 12, n. 1, p. 37, 2024.

MELLO, P. B. et al. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 3, p. 364–369, 2009.

MELLO-CARPES, P. B.; IZQUIERDO, I. The nucleus of the solitary tract→nucleus paragigantocellularis→*Locus Coeruleus*→CA1 region of dorsal hippocampus pathway

is important for consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 56–63, 2013.

MELLO-CARPES, P. B. et al. Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 127, p. 84–92, 2016.

MÉNDEZ-MALDONADO, K. et al. Neurogenesis From Neural Crest Cells: Molecular Mechanisms in the Formation of Cranial Nerves and Ganglia. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 635, 2020.

MENEZES, J. et al. Green tea protects against memory deficits related to maternal deprivation. **Physiology and Behavior**, v. 182, p. 121–127, 1 dez. 2017.

MENEZES, J. et al. Maternal deprivation impairs memory and cognitive flexibility, effect that is avoided by environmental enrichment. **Behavioural Brain Research**, v. 381, 2 mar. 2020.

MILBOCKER, K. A. et al. Glia-Driven Brain Circuit Refinement Is Altered by Early-Life Adversity: Behavioral Outcomes. **Frontiers in Behavioral**, 2 dez. 2021.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018.

MONK, C.; LUGO-CANDELAS, C.; TRUMPPFF, C. Prenatal Developmental Origins of Future Psychopathology: Mechanisms and Pathways. **Annual review of clinical psychology**, v. 15, p. 16–17, 2019.

NEVES, B. H. et al. Physical exercise prevents short and long-term deficits on aversive and recognition memory and attenuates brain oxidative damage induced by maternal deprivation. **Physiology and Behavior**, v. 152, p. 99–105, 1 dez. 2015.

NEVES, B. H. S. et al. On the role of the dopaminergic system in the memory deficits induced by maternal deprivation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 173, 2020.

NISHI, M. Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 19, p. 7212, 2020.

NIWA, M. et al. Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 4, p. 459–477, maio 2011.

O'DONNELL, K. J.; MEANEY, M. J. Fetal origins of mental health: The developmental origins of health and disease hypothesis. **American Journal of Psychiatry**, v. 174, n. 4, p. 319–328, 2017.

OLDHAM, S.; FORNITO, A. The development of brain network hubs. **Developmental Cognitive Neuroscience**, 1 abr. 2019.

PHELPS, E. A. Emotion and cognition: Insights from studies of the human amygdala. **Annual Review of Psychology**, v. 57, p. 27–53, 2006.

PINHEIRO, R. M. C. et al. Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate. **Journal of Neural Transmission**, v. 122, n. 5, p. 709–719, 2015.

PINHO, R. A.; AGUIAR, A. S.; RADÁK, Z. Effects of resistance exercise on cerebral redox regulation and cognition: An interplay between muscle and brain. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, p. 529, 2019.

POWERS, S. K. et al. Exercise Training and Skeletal Muscle Antioxidant Enzymes: An Update. **Antioxidants**, 1 jan. 2023.

RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 4, p. 387–392, 2006.

RÉUS, G. Z. et al. Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 95, p. 196–207, 1 dez. 2017.

RÉUS, G. Z. et al. Environmental Enrichment Rescues Oxidative Stress and Behavioral Impairments Induced by Maternal Care Deprivation: Sex- and Developmental-Dependent Differences. **Molecular Neurobiology**, v. 60, n. 12, p. 6757–6773, 1 dez. 2023.

RICE, D.; BARONE, S. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, jun. 2000.

RICHMOND, S. et al. Development of brain networks and relevance of environmental and genetic factors: A systematic review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 1 dez. 2016.

SALIM, S. Oxidative stress and the central nervous system. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201-205, 2017.

SEKERES, M. J.; MOSCOVITCH, M.; WINOCUR, G. Mechanisms of memory consolidation and transformation. **Cognitive neuroscience of memory consolidation**, p. 17-44, 2017.

SCHIMIDT, H. L. et al. Strength training or green tea prevent memory deficits in a β -amyloid peptide-mediated Alzheimer's disease model. **Experimental Gerontology**, v. 143, p. 111186, 2021.

SIGARAN, G. J. et al. Acute physical exercise enhances memory persistence in female rats. **Brain Research**, v. 1827, p. 148760, 2024.

SILVEIRA, P. P.; MANFRO, G. G. Retrospective studies. **Perinatal Programming of Neurodevelopment** In: Advances in Neurobiology, 2015. v. 10, p. 251–267.

SKOVBJERG, G. et al. Atlas of exercise-induced brain activation in mice. **Molecular Metabolism**, v. 82, p. 101907, 2024.

SOARES et al. Multicomponent training prevents memory deficit related to amyloid- β protein-induced neurotoxicity. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 83, n. 1, p. 143-154, 2021.

SOSA, P. M. et al. Maternal Deprivation Induces Memory Deficits That Are Reduced by One Aerobic Exercise Shot Performed after the Learning Session. **Neural Plasticity**, v. 2019, 2019.

SPAWTON-RICE, J. H.; WALKER, Z. Do cognitive training applications improve executive function in children with adverse childhood experiences? A pilot study. **Applied Neuropsychology: Child**, v. 11, n. 3, p. 373–382, 2022.

SPIERS, J. G. et al. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, p. 124588, 2015.

STILES, J.; JERNIGAN, T. L. The basics of brain development. **Neuropsychology Review**, dez. 2010.

SUN, X. et al. Early-Life Neglect Alters Emotional and Cognitive Behavior in a Sex-Dependent Manner and Reduces Glutamatergic Neuronal Excitability in the Prefrontal Cortex. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, 26 jan. 2021.

SUN, T. et al. Activation of GPR55 Ameliorates Maternal Separation-Induced Learning and Memory Deficits by Augmenting 5-HT Synthesis in the Dorsal Raphe Nucleus of Juvenile Mice. **ACS omega**, 2024.

ŚWIATOWY, W. J. et al. Physical activity and DNA methylation in humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12989, 2021.

TARAZONA-SANTABALBINA, F. J. et al. A Multicomponent Exercise Intervention that Reverses Frailty and Improves Cognition, Emotion, and Social Networking in the Community-Dwelling Frail Elderly: A Randomized Clinical Trial. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 17, n. 5, p. 426–433, 2016.

TEICHER, Martin H. et al. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 27, n. 1-2, p. 33-44, 2003.

THIRUPATHI, A. et al. Effect of Different Exercise Modalities on Oxidative Stress: A Systematic Review. **BioMed Research International**, v. 2021, n. 1, p. 1947928, 2021.

THOMAS, A. W. et al. Early maternal separation impacts cognitive flexibility at the age of first independence in mice. **Developmental Cognitive Neuroscience**, v. 18, p. 49–56, 1 abr. 2016.

THOMPSON, W. R. et al. Exercise Is Medicine. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v. 14, n. 5, p. 511-523, 2020.

TIBERI, J. et al. Sex differences in antioxidant defence and the regulation of redox homeostasis in physiology and pathology. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 211, p. 111802, 2023.

TRACTENBERG, S. G. et al. Vulnerable and resilient cognitive performance related to early life stress: The potential mediating role of dopaminergic receptors in the medial prefrontal cortex of adult mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 80, n. 1, p. 13–27, 2020.

VAN BODEGOM, M.; HOMBERG, J. R.; HENCKENS, M. J. A. G. Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, p. 87, 2017.

VAN DEN BERGH, B. R. H. Developmental programming of early brain and behaviour development and mental health: a conceptual framework. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 53, p. 19-23, 2011.

VARGAS, L. S. et al. One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v. 329, p. 120–126, 2017.

VENEGAS-SANABRIA, L. C. et al. Effect of multicomponent exercise in cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis. **BMC Geriatrics**, v. 22, n. 1, 2022.

VILJETIĆ, B. et al. Lipid Rafts: The Maestros of Normal Brain Development. **Biomolecules**, v. 14, n. 3, p. 362, 2024.

WADDINGTON, E. E. et al. Orienteering combines vigorous-intensity exercise with navigation to improve human cognition and increase brain-derived neurotrophic factor. **PLoS ONE**, v. 19, n. 5, p. e0303785, 2024.

WADHWA, P. D. et al. Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, p. 358-368, 2009.

WANG, A. et al. Early-life stress alters synaptic plasticity and mTOR signaling: correlation with anxiety-like and cognition-related behavior. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 590068, 2020.

WANG, D. et al. Systematic review and meta-analysis: effects of maternal separation on anxiety-like behavior in rodents. **Translational Psychiatry**, v. 10, n. 1, 2020.

WEARICK-SILVA, L. E. et al. Running during adolescence rescues a maternal separation-induced memory impairment in female mice: Potential role of differential exon-specific BDNF expression. **Developmental Psychobiology**, v. 59, n. 2, p. 268–274, 1 mar. 2017.

ZEISS, C. J. Comparative Milestones in Rodent and Human Postnatal Central Nervous System Development. **Toxicologic Pathology**, v. 49, n. 8, p. 1368–1373, 2021.

ZHANG, W.; ZHOU, C.; CHEN, A. A systematic review and meta-analysis of the effects of physical exercise on white matter integrity and cognitive function in older adults. **GeroScience**, v. 46, n. 2, p. 2641–2651, 1 abr. 2024.

ANEXOS

ANEXO I. Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CERTIDÃO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 008/2023

Título: Efeitos do treinamento multicomponente sobre a memória de ratos machos e fêmeas submetidos à privação de cuidados no início da vida

Data da aprovação: 20/04/2023

Período de vigência do projeto: 01/03/2025

Pesquisadores(a): Pâmela Billig Mello Carpes

Campus: Uruguaiana

Telefone: 55 996612454

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie / Linhagem / Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	De 90 dias: ~50F e ~50M/ De 120 dias ;~13 F Total ~113
Peso / Idade	300 a 350 e 350 a 400g / 90 dias e 120 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana.



Assinado eletronicamente por **ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU NEIS**,
Coordenador(a), em 28/04/2023, às 14:16, 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, informando o código verificador 1112635 e o código CRC 7AF4A9F3.

ANEXO II. Normas da revista *Pharmacology Biochemistry and Behavior*

Writing and Formatting

File format

We ask you to provide editable source files for your entire submission (including figures, tables and text graphics). Some guidelines:

- Save files in an editable format, using the extension .doc/.docx for Word files and .tex for LaTeX files. A PDF is not an acceptable source file.
- Lay out text in a single-column format.
- Use spell-check and grammar-check functions to avoid errors.

We advise you to read our "[Step-by-step guide to publishing with Elsevier](#)".

Title page

You are required to include the following details in the title page information:

- Article title. Article titles should be concise and informative. Please avoid abbreviations and formulae, where possible, unless they are established and widely understood, e.g., DNA).
- Author names. Provide the given name(s) and family name(s) of each author. The order of authors should match the order in the submission system. Carefully check that all names are accurately spelled. If needed, you can add your name between parentheses in your own script after the English transliteration.
- Affiliations. Add affiliation addresses, referring to where the work was carried out, below the author names. Indicate affiliations using a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the corresponding address. Ensure that you provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the email address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence for your article at all stages of the refereeing and publication process and also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about your results, data, methodology and materials. It is important that the email address and contact details of your corresponding author are kept up to date during the submission and publication process.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in your article was carried out, or the author was visiting during that time, a "present address" (or "permanent address") can be indicated by a footnote to the author's name. The address where the author carried out the work must be retained as their main affiliation address. Use superscript Arabic numerals for such footnotes.

Abstract

You are required to provide a concise and factual abstract. The abstract should briefly state the purpose of your research, principal results and major conclusions. Some guidelines:

- Abstracts must be able to stand alone as abstracts are often presented separately from the article.
- Avoid references. If any are essential to include, ensure that you cite the author(s) and year(s).
- Avoid non-standard or uncommon abbreviations. If any are essential to include, ensure they are defined within your abstract at first mention.

Keywords

You are required to provide 1 to 7 keywords for indexing purposes. Keywords should be written in English. Please try to avoid keywords consisting of multiple words (using “and” or “of”).

We recommend that you only use abbreviations in keywords if they are firmly established in the field.

Highlights

You are required to provide article highlights at submission.

Highlights are a short collection of bullet points that should capture the novel results of your research as well as any new methods used during your study. Highlights will help increase the discoverability of your article via search engines. Some guidelines:

- Submit highlights as a separate editable file in the online submission system with the word “highlights” included in the file name.
- Highlights should consist of 3 to 5 bullet points, each a maximum of 85 characters, including spaces.

We encourage you to view example [article highlights](#) and read about the benefits of their inclusion.

Graphical abstract

You are encouraged to provide a graphical abstract at submission.

The graphical abstract should summarize the contents of your article in a concise, pictorial form which is designed to capture the attention of a wide readership. A graphical abstract will help draw more attention to your online article and support readers in digesting your research. Some guidelines:

- Submit your graphical abstract as a separate file in the online submission system.

- Ensure the image is a minimum of 531 x 1328 pixels (h x w) or proportionally more and is readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi.
- Our preferred file types for graphical abstracts are TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

We encourage you to view [example graphical abstracts](#) and read about the benefits of including them.

Tables

Tables must be submitted as editable text, not as images. Some guidelines:

- Place tables next to the relevant text or on a separate page(s) at the end of your article.
- Cite all tables in the manuscript text.
- Number tables consecutively according to their appearance in the text.
- Please provide captions along with the tables.
- Place any table notes below the table body.
- Avoid vertical rules and shading within table cells.

We recommend that you use tables sparingly, ensuring that any data presented in tables is not duplicating results described elsewhere in the article.

Figures, images and artwork

Figures, images, artwork, diagrams and other graphical media must be supplied as separate files along with the manuscript. We recommend that you read our detailed [artwork and media instructions](#). Some excerpts:

When submitting artwork:

- Cite all images in the manuscript text.
- Number images according to the sequence they appear within your article.
- Submit each image as a separate file using a logical naming convention for your files (for example, Figure_1, Figure_2 etc).
- Please provide captions along with the artwork.
- Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX, text graphics may also be embedded in the file.

Artwork formats

When your artwork is finalized, "save as" or convert your electronic artwork to the

formats listed below taking into account the given resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations:

- Vector drawings: Save as EPS or PDF files embedding the font or saving the text as “graphics.”
- Color or grayscale photographs (halftones): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 300 dpi (for single column: min. 1063 pixels, full page width: 2244 pixels).
- Bitmapped line drawings: Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 1000 dpi (for single column: min. 3543 pixels, full page width: 7480 pixels).
- Combinations bitmapped line/halftones (color or grayscale): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 500 dpi (for single column: min. 1772 pixels, full page width: 3740 pixels).

Please do not submit:

- files that are too low in resolution (for example, files optimized for screen use such as GIF, BMP, PICT or WPG files).
- disproportionately large images compared to font size, as text may become unreadable.

Figure captions

All images must have a caption. A caption should consist of a brief title (not displayed on the figure itself) and a description of the image. We advise you to keep the amount of text in any image to a minimum, though any symbols and abbreviations used should be explained.

Provide captions in a separate file.

Color artwork

If you submit usable color figures with your accepted article, we will ensure that they appear in color online.

Please ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision. Learn more about [color and web accessibility](#).

For articles appearing in print, you will be sent information on costs to reproduce color in the printed version, after your accepted article has been sent to production. At this stage, please indicate if your preference is to have color only in the online version of your article or also in the printed version.

Generative AI and Figures, images and artwork

Please read our [policy on the use of generative AI and AI-assisted tools in figures, images and artwork](#), which states:

- We do not permit the use of Generative AI or AI-assisted tools to create or alter images in submitted manuscripts.
- The only exception is if the use of AI or AI-assisted tools is part of the research design or methods (for example, in the field of biomedical imaging). If this is the case, such use must be described in a reproducible manner in the methods section, including the name of the model or tool, version and extension numbers, and manufacturer.
- The use of generative AI or AI-assisted tools in the production of artwork such as for graphical abstracts is not permitted. The use of generative AI in the production of cover art may in some cases be allowed, if the author obtains prior permission from the journal editor and publisher, can demonstrate that all necessary rights have been cleared for the use of the relevant material, and ensures that there is correct content attribution.

Supplementary material

We encourage the use of supplementary materials such as applications, images and sound clips to enhance research. Some guidelines:

- Cite all supplementary files in the manuscript text.
- Submit supplementary materials at the same time as your article. Be aware that all supplementary materials provided will appear online in the exact same file type as received. These files will not be formatted or typeset by the production team.
- Include a concise, descriptive caption for each supplementary file describing its content.
- Provide updated files if at any stage of the publication process you wish to make changes to submitted supplementary materials.
- Do not make annotations or corrections to a previous version of a supplementary file.
- Switch off the option to track changes in Microsoft Office files. If tracked changes are left on, they will appear in your published version.

We recommend you upload research data to a suitable specialist or generalist repository. Please read our [guidelines on sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

Video

This journal accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. We encourage you to include links to video or animation files within articles. Some guidelines:

- When including video or animation file links within your article, refer to the video or animation content by adding a note in your text where the file should be placed.
- Clearly label files ensuring the given file name is directly related to the file content.
- Provide files in one of our [recommended file formats](#). Files should be within our preferred maximum file size of 150 MB per file, 1 GB in total.
- Provide "stills" for each of your files. These will be used as standard icons to personalize the link to your video data. You can choose any frame from your video or animation or make a separate image.
- Provide text (for both the electronic and the print version) to be placed in the portions of your article that refer to the video content. This is essential text, as video and animation files cannot be embedded in the print version of the journal.

We publish all video and animation files supplied in the electronic version of your article.

For more detailed instructions, we recommend that you read our [guidelines on submitting video content to be included in the body of an article](#).

Research data

Research data

We are committed to supporting the storage of, access to and discovery of research data, and our [research data policy](#) sets out the principles guiding how we work with the research community to support a more efficient and transparent research process.

Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Please read our [guidelines on sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

Option C: Research data deposit, citation and linking

For this journal, the following instructions from our [research data guidelines](#) apply.

Option C: Research data deposit, citation and linking (or a Research Data Availability Statement)

You are **required** to:

- Deposit your research data in a relevant data repository.
- Cite and link to this dataset in your article.

- If this is not possible, make a statement explaining why research data cannot be shared.

Data statement

To foster transparency, you are encouraged to state the availability of any data at submission.

Ensuring data is available may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you can state the reason why (e.g., your research data includes sensitive or confidential information such as patient data) during the submission process. This statement will appear with your published article on ScienceDirect.

Read more about the importance and benefits of providing a [data statement](#).

Data linking

Linking to the data underlying your work increases your exposure and may lead to new collaborations. It also provides readers with a better understanding of the described research.

If your research data has been made available in a data repository there are a number of ways your article can be linked directly to the dataset:

- Provide a link to your dataset when prompted during the online submission process.
- For some data repositories, a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.
- You can also link relevant data or entities within the text of your article through the use of identifiers. Use the following format: Database: 12345 (e.g. TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Learn more about [linking research data and research articles in ScienceDirect](#).

Research Elements

This journal enables the publication of research objects (e.g. data, methods, protocols, software and hardware) related to original research in [Elsevier's Research Elements journals](#).

Research Elements are peer-reviewed, open access journals which make research objects findable, accessible and reusable. By providing detailed descriptions of objects and their application with links to the original research article, your research objects can be placed into context within your article.

You will be alerted during submission to the opportunity to submit a manuscript to one of the Research Elements journals. Your Research Elements article can be prepared by you, or by one of your collaborators.

Article structure

Article sections

- Divide your article into clearly defined and numbered sections. Number subsections 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), then 1.2, etc.
- Use the numbering format when cross-referencing within your article. Do not just refer to "the text."
- You may give subsections a brief heading. Headings should appear on a separate line.
- Do not include the article abstract within section numbering.

Introduction

The introduction should clearly state the objectives of your work. We recommend that you provide an adequate background to your work but avoid writing a detailed literature overview or summary of your results.

Material and methods

The materials and methods section should provide sufficient details about your materials and methods to allow your work to be reproduced by an independent researcher. Some guidelines:

- If the method you used has already been published, provide a summary and reference the originally published method.
- If you are quoting directly from a previously published method, use quotation marks and cite the source.
- Describe any modifications that you have made to existing methods.

Results

Results should be clear and concise. We advise you to read the sections in this guide on supplying tables, artwork, supplementary material and sharing research data.

Discussion

The discussion section should explore the significance of your results but not repeat them. You may combine your results and discussion sections into one section, if appropriate. We recommend that you avoid the use of extensive citations and discussion of published literature in the discussion section.

Conclusion

The conclusion section should present the main conclusions of your study. You may have a stand-alone conclusions section or include your conclusions in a subsection of your discussion or results and discussion section.

Glossary

Please provide definitions of field-specific terms used in your article, in a separate list.

Abbreviations

Abbreviations which are not standard in the field should be defined in a footnote on the first page of your article.

Abbreviations which are essential to include in your abstract should be defined at first mention in your abstract, as well as in a footnote on the first page of your article.

Before submission we recommend that you review your use of abbreviations throughout your article to ensure that it is consistent.

Acknowledgements

Include any individuals who provided you with help during your research, such as help with language, writing or proof reading, in the acknowledgements section. Acknowledgements should be placed in a separate section which appears directly before the reference list. Do not include acknowledgements on your title page, as a footnote to your title, or anywhere else in your article other than in the separate acknowledgements section.

Author contributions: CRediT

Corresponding authors are required to acknowledge co-author contributions using CRediT (Contributor Roles Taxonomy) roles:

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Funding acquisition
- Investigation
- Methodology
- Project administration
- Resources
- Software
- Supervision
- Validation
- Visualization
- Writing – original draft
- Writing – review and editing

Not all CRediT roles will apply to every manuscript and some authors may contribute through multiple roles.

We advise you to read [more about CRediT](#) and view an [example of a CRediT author statement](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendices

We ask you to use the following format for appendices:

- Identify individual appendices within your article using the format: A, B, etc.
- Give separate numbering to formulae and equations within appendices using formats such as Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc. and in subsequent appendices, Eq. (B.1), Eq. (B. 2) etc. In a similar way, give separate numbering to tables and figures using formats such as Table A.1; Fig. A.1, etc.

References

References within text

Any references cited within your article should also be present in your reference list and vice versa. Some guidelines:

- References cited in your abstract must be given in full.

- We recommend that you do not include unpublished results and personal communications in your reference list, though you may mention them in the text of your article.
- Any unpublished results and personal communications included in your reference list must follow the standard reference style of the journal. In substitution of the publication date add “unpublished results” or “personal communication.”
- References cited as “in press” imply that the item has been accepted for publication.

Linking to cited sources will increase the discoverability of your research.

Before submission, check that all data provided in your reference list are correct, including any references which have been copied. Providing correct reference data allows us to link to abstracting and indexing services such as Scopus, Crossref and PubMed. Any incorrect surnames, journal or book titles, publication years or pagination within your references may prevent link creation.

We encourage the use of Digital Object Identifiers (DOIs) as reference links as they provide a permanent link to the electronic article referenced. See the example below, though be aware that the format of such citations should be adapted to follow the style of other references in your paper.

DOI link example (for an article not yet in an issue):

VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>.

Reference format

This journal does not set strict requirements on reference formatting at submission. Some guidelines:

- References can be in any style or format as long as the style is consistent.
- Author names, journal or book titles, chapter or article titles, year of publication, volume numbers, article numbers or pagination must be included, where applicable.
- Use of DOIs is recommended.

Our journal reference style will be applied to your article after acceptance, at proof stage. If required, at this stage we will ask you to correct or supply any missing reference data.

Reference style

All citations in the text should refer to:

- Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication.
- Two authors: both authors' names and the year of publication.
- Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations can be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa. Examples: "as demonstrated (Allan, 2020a, 2020b; Allan and Jones, 2019)" or "as demonstrated (Jones, 2019; Allan, 2020). Kramer et al. (2023) have recently shown".

The list of references should be arranged alphabetically and then chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Handgraaf, T., Lupton, R.A., 2020. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.sc.2020.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Handgraaf, T., Lupton, R.A., 2022. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in a book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2023. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 2023. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2023).

Reference to a dataset:

Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions [dataset]. Mendeley Data, v1.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88) [software]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations

We ask you to abbreviate journal names according to the [List of Title Word Abbreviations \(LTWA\)](#).

Web references

When listing web references, as a minimum you should provide the full URL and the date when the reference was last accessed. Additional information (e.g. DOI, author names, dates or reference to a source publication) should also be provided, if known.

You can list web references separately under a new heading directly after your reference list or include them in your reference list.

Data references

We encourage you to cite underlying or relevant datasets within article text and to list data references in the reference list.

When citing data references, you should include:

- author name(s)
- dataset title
- data repository
- version (where available)
- year
- global persistent identifier

Add [dataset] immediately before your reference. This will help us to properly identify the dataset. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

We ask you to mark preprints clearly. You should include the word “preprint” or the name of the preprint server as part of your reference and provide the preprint DOI.

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, use the formal publication as your reference.

If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but they are not yet formally published, you may reference the preprint.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in popular reference management software products. These include products that support [Citation Style Language \(CSL\)](#) such as [Mendeley Reference Manager](#).

If you use a citation plug-in from these products, select the relevant journal template and all your citations and bibliographies will automatically be formatted in the journal style. We advise you to **remove all field codes** before submitting your manuscript to any reference management software product.

If a template is not available for this journal, follow the format given in examples in the reference style section of this Guide for Authors.

Submitting your Manuscript

Submission checklist

Before completing the submission of your manuscript, we advise you to read our submission checklist:

- One author has been designated as the corresponding author and their full contact details (email address, full postal address and phone numbers) have been provided.
- All files have been uploaded, including keywords, figure captions and tables (including a title, description and footnotes) included.
- Spelling and grammar checks have been carried out.
- All references in the article text are cited in the reference list and vice versa.
- Permission has been obtained for the use of any copyrighted material from other sources, including the Web.
- For gold open access articles, all authors understand that they are responsible for payment of the article publishing charge (APC) if the manuscript is accepted. Payment of the APC may be covered by the corresponding author's institution, or the research funder.

Submit online

Our online submission system guides you through the process steps of entering your manuscript details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process.

Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the editor's decision and

requests for revision, is sent by email.

Please follow this link to [submit your paper].

After Receiving a Final Decision

Article Transfer Service

If your manuscript is more suitable for an alternative Elsevier journal, you may receive an email asking you to consider transferring your manuscript via the [Elsevier Article Transfer Service](#).

The recommendation could come from the journal editor, a dedicated [in-house scientific managing editor](#), a tool-assisted recommendation or a combination.

If you agree with the recommendation, your manuscript will be transferred and independently reviewed by the editors of the new journal. You will have the opportunity to make revisions, if necessary, before the submission is complete at the destination journal.

Publishing agreement

Authors will be asked to complete a publishing agreement after acceptance. The corresponding author will receive a link to the online agreement by email. We advise you to read [Elsevier's policies related to copyright](#) to learn more about our copyright policies and your, and your employer's/institution's, additional rights for subscription and gold open access articles.

License options

Authors will be offered [open access user license options](#) which will determine how you, and third parties, can reuse your gold open access article. We advise that you review these options and any funding body license requirements before selecting a license option.

Open access

We refer you to our [open access information page](#) to learn about open access options for this journal.

Permission for copyrighted works

If excerpts from other copyrighted works are included in your article, you must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) within your article using [Elsevier's permission request and license form \(Word\)](#).

Proof correction

To ensure a fast publication process we will ask you to provide proof corrections within two days.

Corresponding authors will be sent an email which includes a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to Word. You can edit text, comment on figures and tables and

answer questions raised by our copy editor. Our web-based proofing service ensures a faster and less error-prone process.

You can choose to annotate and upload your edits on the PDF version of your article, if preferred. We will provide you with proofing instructions and available alternative proofing methods in our email.

The purpose of the proof is to check the typesetting, editing, completeness and correctness of your article text, tables and figures. Significant changes to your article at the proofing stage will only be considered with approval of the journal editor.

Share Link

A customized [Share Link](#), providing 50 days free access to the final published version of your article on [ScienceDirect](#), will be sent by email to the corresponding author. The Share Link can be used to share your article on any communication channel, such as by email or on social media.

For an extra charge, you will be provided with the option to order paper offprints. A link to an offprint order form will be sent by email when your article is accepted for publication.

A Share Link will not be provided if your article is published gold open access. The final published version of your gold open access article will be openly available on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Responsible sharing

We encourage you to share and promote your article to give additional visibility to your work, enabling your paper to contribute to scientific progress and foster the exchange of scientific developments within your field. Read more about how to [responsibly share and promote your article](#).

Resources for Authors

Elsevier's Researcher Academy

If you would like help to improve your submission or navigate the publication process, support is available via "[Researcher Academy](#)."

Researcher Academy offers free e-learning modules, webinars, downloadable guides and research writing and peer review process resources.

Language and editing services

We recommend that you write in American or British English but not a combination of both.

If you feel the English language in your manuscript requires editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English, you may wish to use the [English Language Editing service](#) provided by Elsevier's Author Services.

ANEXO III. Comprovante de submissão do artigo ao periódico.

E-mail de Universidade Federal do Pampa - PBB-D-24-00245 - Conf...ing your submission to Pharmacology, Biochemistry and Behavior 18/06/2024 10:27



Pamela Billig Mello Carpes <pamelacarpes@unipampa.edu.br>

PBB-D-24-00245 - Confirming your submission to Pharmacology, Biochemistry and Behavior

1 mensagem

Pharmacology, Biochemistry and Behavior <em@editorialmanager.com> 18 de junho de 2024 às 10:26
Responder a: "Pharmacology, Biochemistry and Behavior" <support@elsevier.com>
Para: Pamela Billig Mello-Carpes <pamelacarpes@unipampa.edu.br>

This is an automated message.

MATERNAL SEPARATION DOES NOT AFFECT RECOGNITION MEMORY IN FEMALE RATS BUT ALTERS HIPPOCAMPAL OXIDATIVE BALANCE, A DISORDER REVERTED BY A MULTICOMPONENT TRAINING

Dear Dra. Mello-Carpes,

We have received the above referenced manuscript you submitted to Pharmacology, Biochemistry and Behavior. It has been assigned the following manuscript number: **PBB-D-24-00245**.

To track the status of your manuscript, please log in as an author at <https://www.editorialmanager.com/pbb/>, and navigate to the "Submissions Being Processed" folder.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Pharmacology, Biochemistry and Behavior

FAQ: How can I reset a forgotten password?
https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/kw/editorial+manager/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, then you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated Scientific Managing Editor, a tool assisted recommendation, or a combination. For more details see the journal guide for authors.

At Elsevier, we want to help all our authors to stay safe when publishing. Please be aware of fraudulent messages requesting money in return for the publication of your paper. If you are publishing open access with Elsevier, bear in mind that we will never request payment before the paper has been accepted. We have prepared some guidelines (<https://www.elsevier.com/connect/authors-update/seven-top-tips-on-stopping-apc-scams>) that you may find helpful, including a short video on Identifying fake acceptance letters (<https://www.youtube.com/watch?v=o5I8thD9XIE>). Please remember that you can contact Elsevier's Researcher Support team (<https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>) at any time if you have questions about your manuscript, and you can log into Editorial Manager to check the status of your manuscript (https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/29155/c/10530/supporthub/publishing/kw/status/).#AU_PBB#

To ensure this email reaches the intended recipient, please do not delete the above code

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Remove my information/details). Please contact the publication office if you have any questions.