

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**O USO DO NADO GESTACIONAL EM RATAS MODELO DE
TDAH COMO ALTERNATIVA DE NEUROPROTEÇÃO NA PROLE**

Andréa Tosta

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves- UFRGS

Coorientador: Prof. Dr. Caren Bernardi - UFSCPA

Porto Alegre, 2015.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, por apoiar minhas decisões e por estar do meu lado em todas os momentos da minha vida e principalmente pelo amor incondicional que me deram nesses 23 anos.

Aos meus irmãos Joanna e Rodrigo, por serem meus melhores amigos, maiores orgulhos, serem meus exemplos de gentileza, bondade e determinação e por me fazerem querer ser sempre uma pessoa melhor.

À Patricia Sesterheim por ter me recebido no biotério de braços abertos, por ter me acolhido como filha e ter me ajudado a realizar o meu sonho de juntar duas coisas que eu mais amo, natação e biologia.

À Professora, orientadora e amiga Caren Bernardi por ter me acolhido com tanto carinho e por ter aceitado realizar esse trabalho mesmo estando em um momento muito corrido da sua vida, pela sua bondade e paciência e por estar do meu lado sempre que eu precisei.

Ao Professor e orientador Carlos Alberto Saraiva Gonçalves por ter aceitado fazer parte desse projeto e por ter me dado a oportunidade de conhecer um dos países mais incríveis do mundo, Cuba, onde pude aprender não só sobre a cultura local, mas também, sobre a profissão que quero seguir daqui para frente.

Um agradecimento especial ao Dr. Eduardo Sanches, pela participação em todas as etapas do projeto, pela enorme paciência e principalmente pela amizade, estando no meu lado e me apoiando nos momentos bons e difíceis desse trabalho.

Ao pessoal do Lab 35 pela amizade e pela ajuda sempre que eu precisei.

Ao pessoal do Lab 33 que mesmo não me conhecendo me ajudou no momento mais delicado do projeto e em especial ao João Paulo pela paciência e pela ajuda com os blottings.

À minha família que eu amo tanto e que mesmo longe está sempre me apoiando e me dando o suporte que preciso para realizar meus objetivos.

Aos meus amigos espalhados por esse Brasil, que me fazem sentir muito querida e que me matam de saudade.

E aos meus amigos de Porto Alegre, natação, Colégio Militar e biologia UFRGS, que estiveram presente ativamente na minha vida nesses 7 anos, me dando apoio, me dando a mão e principalmente amizade para poder conseguir seguir em frente e saber que não estou sozinha.

Muito obrigada a todos! Não teria conseguido sem vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	8
1.INTRODUÇÃO	9
1.1 Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH).....	9
1.2 Astrócito.....	13
1.3 Exercício Físico	15
2.OBJETIVOS	18
2.1 Geral.....	18
2.2 Específicos	18
3. METODOLOGIA.....	19
3.1 Aspectos Éticos	19
3.2 Animais.....	19
3.3 Desenho Experimental.....	20
3.4 Protocolo de Nado Materno	21
3.5 Desenvolvimento sensório-motor	21
3.5.1 Reflexo de Endireitamento Postural.....	21
3.5.2 Geotaxia Negativa.....	21
3.5.3 Marcha	22
3.5.4 Teste Olfatório.....	22
3.6 Testes Cognitivos	22
3.6.1 Campo Aberto	22
3.6.2 Labirinto em Cruz Elevado	22
3.6.3 Reconhecimento de Objeto.....	23
3.7 Análises bioquímicas	23
3.7.1 Captação de Glutamato	23
3.7.2 Concentração BDNF e GFAP	24
3.8 Análise Estatística	24
4.RESULTADOS	25
4.1 Pesos.....	25
4.2 Desenvolvimento sensório-motor	25
4.3 Testes Cognitivos	27
4.3.1 Campo Aberto	27
4.3.2 Labirinto em Cruz Elevado	29
4.3.3 Reconhecimento de Objeto.....	30
4.4 Análise Bioquímica	31
4.3.1 Captação de Glutamato	31
4.3.2 Concentração de BDNF e GFAP	32
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	38
7. BIBLIOGRAFIA	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da excitotoxicidade em neurônios glutamatérgico	11
Figura 2. Representação de um corte sagital de cérebro de rato, mostrando as estruturas e as vias dopaminérgicas responsáveis pelos comportamentos observados na linhagem SHR	12
Figura 3. Representação da síntese de glutamato e sinapse tripartite.....	14
Figura 4. Desenho Experimental.....	20
Figura 5. Ganho de Peso.....	25
Figura 6. Desenvolvimento Sensório-motor.....	26
Figura 7. Número de Cruzamentos.	28
Figura 8. Número de Rearings	29
Figura 9. Labirinto em Cruz Elevado.....	29
Figura 10. Tempo de exploração (s) \pm EP dos grupos no objeto 2 na memória de curta duração (3 horas) e na memória de longa duração (24 horas).	30
Figura 11. Captação de Glutamato.....	31
Figura 12. Concentração de BDNF e GFAP	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis analisadas do teste de labirinto em cruz elevado..... 28

Tabela 2. Variáveis analisadas do teste de labirinto em cruz elevado..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS

TDAH – Transtorno de Déficit de Atenção / Hiperatividade

CPF –Córtex pré-frontal

LPT - Potencialização de longo prazo

LTD – Depressão de longo prazo

NMDAR - N-metil-Daspartato

BDNF – Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo

GFAP - Glial fibrillary acidic protein

SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensivos

KWY – Wistar Kyoto

DPN - Dia pós-natal

TF: Tempo nos braços fechados

EF: Entrada nos braços fechados

TA: Tempo nos braços abertos

EA: Entrada nos braços abertos

BF: Bolo fecal

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma desordem psiquiátrica caracterizada por desatenção, hiperatividade e impulsividade. O TDAH é o distúrbio neurocomportamental mais comum na infância e está ligado (em cerca de 80% dos casos) a fatores genéticos. O hipocampo está diretamente ligado à atenção e à cognição no hipocampo, duas importantes funções prejudicadas pelo TDAH. Embora o sistema dopaminérgico tenha sido o foco principal dos estudos sobre o TDAH até o momento, estudos demonstram que o sistema glutamatérgico possa estar envolvido. O glutamato é o neurotransmissor mais abundante no sistema nervoso dos vertebrados, participa de funções cognitivas e motoras e modula os sistemas de dopamina e serotonina, além de ser o principal responsável pela excitotoxicidade no SNC. Os Ratos Espontaneamente Hipertensivos – SHR (Spontaneously hypertensive rat) constituem o modelo de TDAH experimental mais utilizado. Em regiões como o hipotálamo e o hipocampo, foi demonstrado que os astrócitos participam ativamente da plasticidade sináptica. A atividade física e o aprendizado provocam alterações na morfologia astrocitária e o exercício físico parece aumentar a expressão de neurotrofinas como o Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) e como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) no córtex frontoparietal e no estriado. A natação é considerada uma excelente forma de exercício físico para gestantes, pois oferece uma carga mínima sobre as articulações e facilita o movimento. Até o presente momento não há relatos na literatura descrevendo os efeitos da natação materna, durante a gestação, e seus efeitos comportamentais e neuroquímicos sobre a prole no transtorno de déficit de atenção/ hiperatividade. Porém, alguns estudos mostram que a atividade física aumenta as funções cognitivas e a neurogênese hipocampal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor do nado gestacional na prole de ratas SHR sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais. Ratas prenhas foram submetidas a um protocolo de nado gestacional e divididas em 4 grupos (SHR NADO e SHR SED e KWY NADO e KWY SED), cujos grupos tratados (NADO), realizaram o protocolo de nado durante os 21 dias da gestação por 20 minutos e os grupos sedentários (SED) apenas foram submetidos ao mesmo ambiente do tratamento, com água na altura de 3 cm por 10 minutos. As análises de desenvolvimento sensorio motor não demonstraram efeito do nado gestacional. Verificou-se que o nado materno não teve efeito sobre o comportamento hiperativo dos animais, porém, promoveu a redução da impulsividade, além de induzir alterações astrocitárias no hipocampo da prole, como o aumento das concentrações de GFAP e da captação de glutamato. Podemos concluir que apesar da evidência do efeito nado gestacional sobre a captação de glutamato e envolvimento dos astrócitos na neuroproteção mais estudos devem ser realizados para finalizar este trabalho.

Palavras-chave: TDHA, SHR, nado gestacional, astrócitos, glutamato, neuroproteção.

1. INTRODUÇÃO

1.1 TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERAVIDADE (TDAH)

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma desordem psiquiátrica caracterizada pelos seguintes sintomas: desatenção, hiperatividade e impulsividade (Wilens & Dodson, 2004). Pacientes com TDAH frequentemente apresentam prejuízo no desempenho acadêmico, nas relações familiares e no ajuste social (Wilens & Dodson, 2004). O TDAH é o distúrbio neurocomportamental mais comum na infância, segundo a American Academy of Pediatrics, com prevalência de aproximadamente 3 a 9 % das crianças em idade escolar (Bierderman, Faraone, 2005). O diagnóstico do transtorno, durante a infância, é cerca de três vezes superior no sexo masculino do que no sexo feminino (Emond et al, 2008). O TDAH na idade adulta tem sido visto como uma doença *camuflada*, devido ao fato dos sintomas serem mascarados, ocorrendo problemas de relacionamentos afetivos e interpessoais, de organização, problemas de humor, abuso de substâncias, além de outras comorbidades (Barkley, 2002; Phelan, 2005).

Os principais fatores causais identificados são a suscetibilidade genética em interação direta com fatores ambientais. Portanto, a etiologia é multifatorial, dependente de fatores genéticos, adversidades biológicas e psicossociais (Kantak et al., 2008), podendo estar associada a danos cerebrais e à exposição a neurotoxinas (Rosa Neto, 1996). Pesquisas têm relacionado o TDAH à fatores genéticos em pelo menos 80% dos casos; se os pais apresentarem o transtorno, os filhos têm um risco de duas a oito vezes maior de desenvolvê-lo (Kantak et al, 2008). Pesquisas apontam para a influência de genes que codificam componentes dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico, adrenérgico e, mais recentemente, serotoninérgico, como os principais responsáveis pelo TDAH (Rohde & Halpern, 2004).

Normalmente, em atividades como estudo, leitura e outras que exijam concentração, o cérebro aumenta os níveis de ativação da dopamina e norepinefrina, justamente para suprir as exigências. Nos casos típicos de TDAH, a característica psicofisiológica mais comum é a hipofunção/hipoativação do córtex pré-frontal (CPF), na qual há uma deficiência de

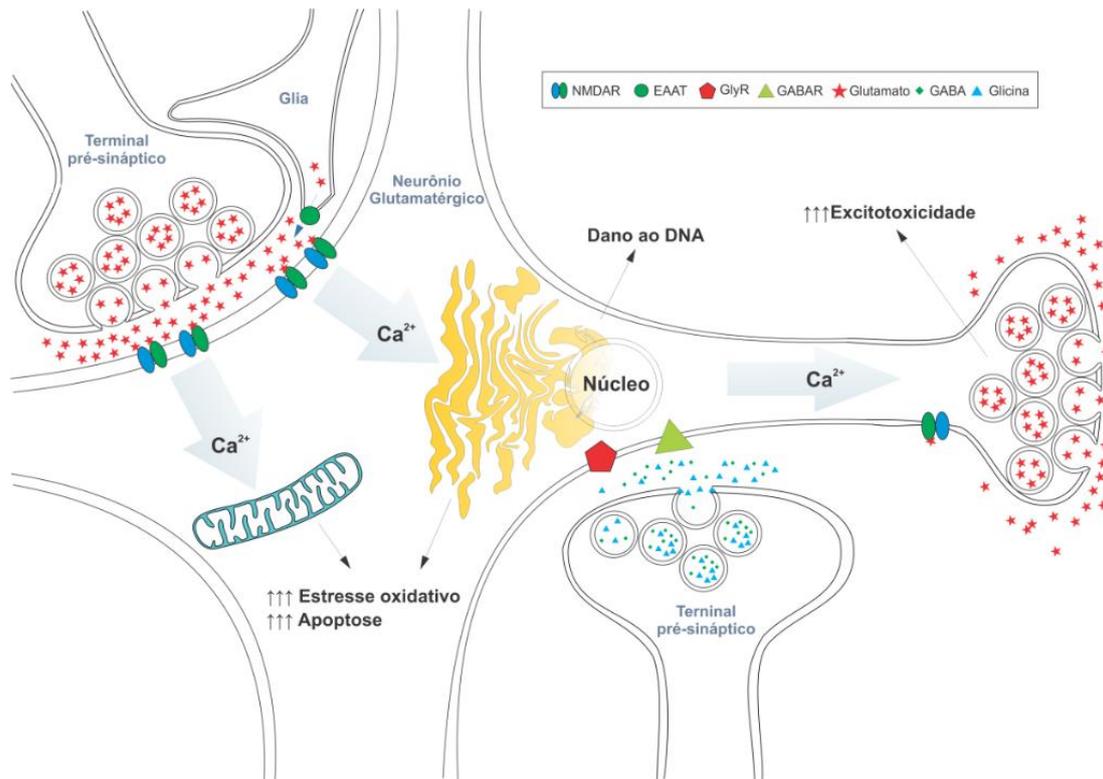
neurotransmissores (dopamina e norepinefrina), especialmente quando as circunstâncias exigem maior esforço mental e, portanto, maior ativação (Arnsten, 1998; Solanto, 1998).

Estudos recentes demonstram que o desenvolvimento anormal e funcionamento das redes neurais no TDAH, não está mais restrito apenas ao CPF mas também envolve o estriado e o hipocampo (Castellanos, Giedd, Hamburger, Marsh, & Rapoport, 1996). O hipocampo é uma estrutura responsável pela consolidação de novas memórias, a partir da potencialização de longo prazo (LPT) e depressão de longo prazo (LTD). Faz parte do sistema límbico, juntamente com a amígdala, que interpreta emocionalmente os eventos do dia-a-dia de uma maneira neutra ou positiva (funcionamento adequado) ou de uma maneira negativa, depressiva (funcionamento hiperativado). O hipocampo está diretamente ligado à atenção e a cognição no hipocampo, duas importantes funções prejudicadas pelo TDAH (Swanson JM et al, 1998; Hunziker MH, Saldana RL e Neuringer A, 1996; Sonuga-Barke EJ, 2003).

Embora o sistema dopaminérgico tenha sido o foco principal dos estudos sobre o TDAH até o momento, estudos demonstram que o sistema glutamatérgico parece estar envolvido nesta patologia e tem recebido atenção nas pesquisas experimentais (Adler LA et al, 2012). O glutamato é o neurotransmissor mais abundante no sistema nervoso dos vertebrados (Meldrum, 2000), participa de ambas funções cognitiva e motora e modula os sistemas de dopamina e serotonina (Miyamoto et al, 2001), além de ser o principal causador de excitotoxicidade no SNC (Figura 1) (H. H. Lee et al., 2006). Estudos animais tem mostrado que a desregulação desse sistema também provoca o desenvolvimento do TDAH (Adams et al., 2004). Devido ao seu papel na plasticidade sináptica, o glutamato está envolvido em funções cognitivas, tais como aprendizagem e memória no cérebro (McEntee, W. J.; Crook, T. H., 1993). A plasticidade conhecida como LTP no hipocampo, é realizada por sinapses glutamatérgicas (Okubo et al., 2010).

A ação do glutamato é medida, principalmente, através dos receptores N-metil-Daspartato (NMDAR) e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ácido (AMPA). NMDAR são complexos heteroméricos diferencialmente expressos em todo o desenvolvimento do sistema nervoso central. Vários subtipos distintos de NMDAR foram identificados (Adams et al., 2004). O sistema glutamatérgico também possui um papel importante na regulação da função motora. Hiperatividade pode ser induzida pela interrupção farmacológica dos NMDAR (Conlay et al., 1989; Corbett et al., 1995).



(<http://www.institutonocell.org.br/wp-content/uploads/2014/12/excitotoxicidade.png>)

Figura 1. Representação da excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos. Em resumo, durante a casacata excitotóxica ocorre uma grande liberação de glutamato, gerando um aumento no influxo de Ca^{+2} através do receptor de NMDA. Um grande aumento do Ca^{+2} dentro da célula gera um acúmulo na mitocôndria, podendo, assim, desencadear um estresse oxidativo na célula levando-a à morte por apoptose. A estimulação exacerbada destes neurônios também desencadeia a exocitose de mais neurotransmissores, que por sua vez, amplificam o fenômeno de excitotoxicidade.

Estudos sugerem o envolvimento glutamatérgico no TDAH (Carrey et al., 2003; Hong et al., 2011; Maltezos et al., 2014; Sagvolden et al., 2009; Sandau, Alderman, Corfas, Ojeda, & Raber, 2012; Sontag, Tucha, Walitza, & Lange, 2010; Winstanley, Eagle, & Robbins, 2006). Os estudos genéticos, por exemplo, têm relatado uma associação entre os genes dos receptores de glutamato e do TDAH (Dorval et al., 2007). Ao mesmo tempo, alguns modelos

animais implicam que a regulação de glutamato alterada do sistema dopaminérgico (Warton, Howells, & Russell, 2009) sustenta os déficits funcionais associados ao transtorno.

Existem vários modelos animais de TDAH. Os Ratos Espontaneamente Hipertensivos –SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) constituem o modelo de TDAH experimental mais utilizado, juntamente com o seu controle os ratos Wistar Kyoto - KWY (Davids, Zhang, Tarazi, & Baldessarini, 2003; Sagvolden, Russell, Aase, Johansen, & Farshbaf, 2005; Sagvolden, 2000). Os animais SHR apresentam hipofunção dopaminérgica (Figura 2) e um desequilíbrio entre o sistema dopamina e norepinefrina (Russell, 2007), que são algumas das alterações neurobiológicas que podem estar envolvidas na origem do TDAH (Solanto & Conners, 1982). Estudos mais recentes apontam para um importante papel na sinalização glutamatérgica na fisiopatologia do TDHA neste modelo (Sagvolden et al., 2009). Além disso, a linhagem SHR é considerada um modelo bem avaliado de TDAH porque esses ratos apresentam os sintomas comportamentais essenciais e prejuízos cognitivos tipicamente associados com o TDAH, incluindo hiperatividade, desatenção, impulsividade e déficits na memória de trabalho (Kantak et al., 2008; Russell, 2007; Sagvolden et al., 2005).

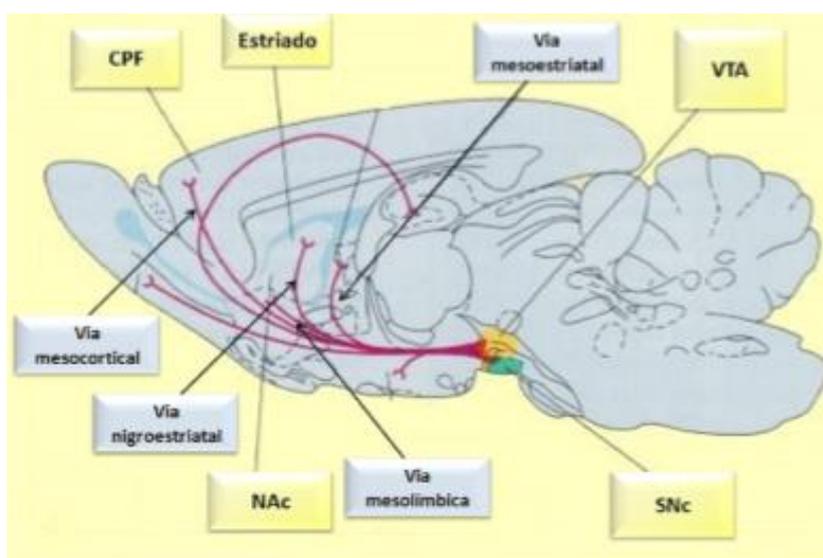


Figura 2. Representação de um corte sagital de cérebro de rato, mostrando as estruturas e as vias dopaminérgicas responsáveis pelos comportamentos observados na linhagem SHR. De forma correlatada aos humanos com TDAH, os ratos SHR apresentam alterações dopaminérgicas nas vias mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal. CPF: córtex pré-frontal; NAc: núcleo accumbens; SNc: parte compacta da substância negra; VTA: área tegmental ventral. (Retirada da tese de doutorado de PABLO PANDOLFO).

O tratamento do TDAH envolve tipicamente o acompanhamento psicológico ou o uso de medicamentos, ou a combinação entre eles. O tratamento visa melhorar os sintomas a longo prazo, porém, não há estudos que comprovem a reversão dos déficits provocados (Halperin, JM & Healey, 2011). Além disso, alguns estudos têm sugerido os benefícios da prática regular de exercícios físicos na melhora dos sintomas de hiperatividade e desatenção (Lambourne & Tomporowski, 2010).

1.2 ASTRÓCITO

O bom funcionamento dos neurônios e neurotransmissões tanto glutamatérgicas quanto dopaminérgicas depende do bom funcionamento dos astrócitos (Zoladz, Pilc, & Pilc, 2010). Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC, representando aproximadamente 50% do número total de células (Verkhatsky, Noda, & Parpura, 2013). Representam o principal elemento celular do sistema homeostático no SNC, sendo responsáveis pela maior parte dos aspectos do suporte metabólico, nutrição, regulação da concentração de íons e neurotransmissores no ambiente, manutenção da barreira hematoencefálica e preservação da integridade dos tecidos após lesão (Catalani et al., 2002; Korcok, Dixon, Lo, & Wilson, 2003; Theodosis, Poulain, & Oliet, 2008). Evidências recentes também sugerem que os astrócitos influenciam vários aspectos da transmissão sináptica e, assim como os neurônios, participam ativamente do processamento da informação através das sinapses “tripartite” (Figura 3) (Perea, Navarrete, & Araque, 2009). Estudos também sugerem que os astrócitos são sinalizadores de neurônios através da liberação de Ca^{+2} dependente de glutamato (Agulhon et al., 2008).

O glutamato possui um potencial neurotóxico que é atenuado pelo mecanismo de recaptção (Ruggiero et al., 2011), as células astrocitárias são fundamentais para manter os níveis adequados de glutamato na fenda sináptica, impedindo a excitotoxicidade glutamatérgica (Bernardi et al., 2013). As células astrocitárias captam o glutamato, através da presença de transportadores de alta afinidade, evitando sua permanência no espaço

extracelular. Ainda no astrócito, o glutamato é convertido em glutamina pela enzima *glutamina sintetase*, as moléculas de glutamina são liberadas para o meio extracelular e transferidas por transportadores específicos para o terminal pré-sináptico, onde são reconvertidas em glutamato pela enzima *glutaminase*. Portanto, o ciclo glutamato-glutamina é o principal mecanismo de finalização da neurotransmissão glutamatérgica, e exerce um efeito neuroprotetor no SNC (Gwak, Kang, Leem, & Hulsebosch, 2007).

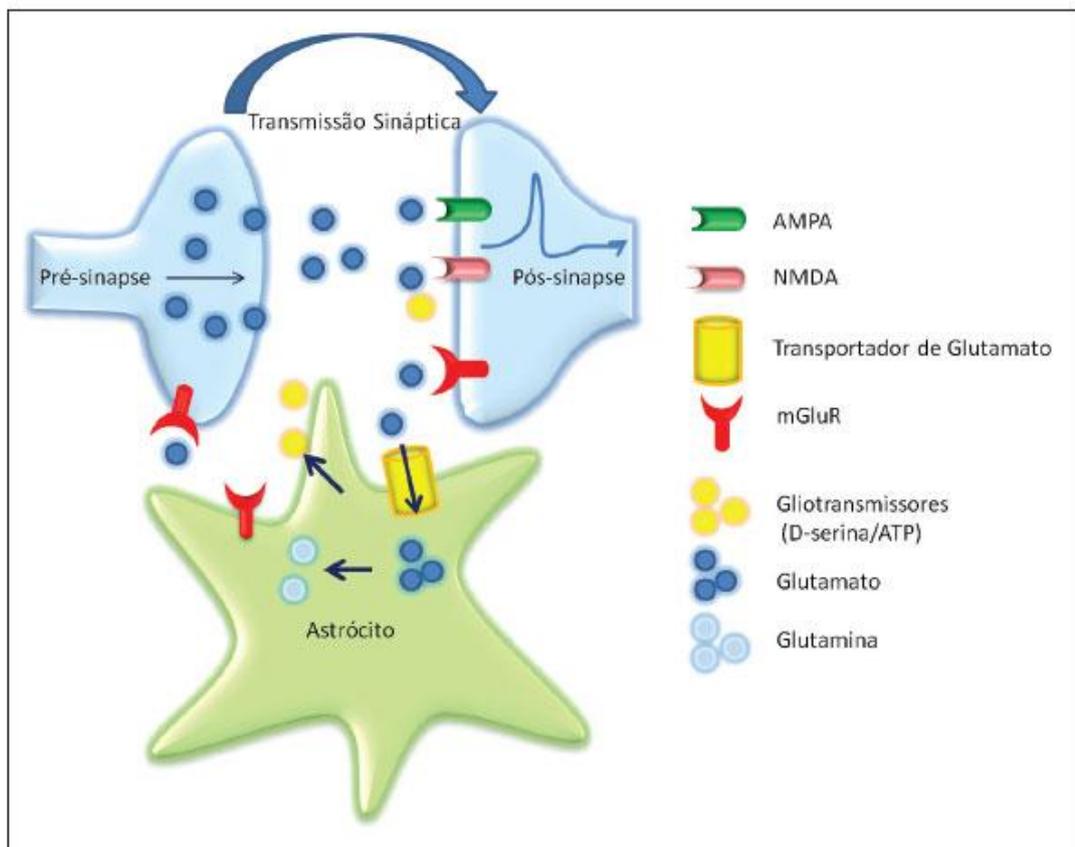


Figura 3. Representação da síntese de glutamato e sinapse tripartite composta pelos neurônios pré e pós sinápticos (em azul) e a célula astrocitária (em verde) no metabolismo glutamatérgico. A ação do glutamato liberado na fenda sináptica é limitada pela recaptação através de transportadores específicos em neurônios e células astrocitárias adjacentes. No terminal pré-sináptico, a glutamina liberada pelos astrócitos é recaptada pelos neurônios e convertida em glutamato. O glutamato é transportado para dentro das células através de transportadores de aminoácidos excitatórios e armazenado em vesículas por transportadores vesiculares de glutamato (Gomes, Tortelli, & Diniz, 2013).

Em regiões como o hipotálamo e o hipocampo, foi demonstrado que os astrócitos participam ativamente da plasticidade sináptica (Araque & Navarrete, 2010). Assim como os neurônios, os astrócitos são suscetíveis a plasticidade, e a remodelação dos processos astrocíticos está intimamente associada às

alterações morfológicas em neurônios vizinhos (Theodosios et al., 2008). As principais alterações morfológicas observadas nos astrócitos ocorrem em seus processos, os quais podem sofrer mudanças em sua organização estrutural em resposta a estímulos ambientais (Haber, Zhou, & Murai, 2006). Atividade física e experiências de aprendizado provocam alterações na morfologia astrocitária (Gibbs, Hutchinson, & Hertz, 2008; Rothstein et al., 2005) devido ao seu envolvimento na barreira hematoencefálica (Correale & Villa, 2009); o exercício físico parece aumentar a expressão de GFAP e o número de astrócitos GFAP positivos no córtex frontoparietal e no estriado (Hu et al., 2005) e estimula a proliferação dos astrócitos na zona subgranular do hipocampo de roedores (Uda, Ishido, Kami, & Masuhara, 2006).

Alguns autores têm estudado o envolvimento dos astrócitos no TDAH (Carrey et al., 2003; Killeen, Russell, & Sergeant, 2013; Todd & Botteron, 2001), porém, estas pesquisas ainda são em pequeno número. Considera-se relevante a investigação do papel destas células no TDAH, principalmente em relação às suas ações no sistema glutamatérgico.

1.3 EXERCÍCIO FÍSICO

Devida à alta probabilidade de expressão do TDAH na prole pelo aspecto genético, é importante investigar estratégias de neuroproteção para as crianças cujo os pais possuem o transtorno. Estudos em humanos e em modelos animais revelaram que o exercício físico tem efeito positivo sobre o funcionamento do cérebro, melhorando o aprendizado, a memória e a plasticidade do sistema nervoso (Gómez-Pinilla, Ying, Roy, Molteni, & Edgerton, 2002; Molteni et al., 2004; Noakes, St Clair Gibson, & Lambert, 2005; Henriette van Praag, Shubert, Zhao, & Gage, 2005; Henriette Van Praag, 2008) aumentando a vascularização (angiogênese) cerebral (T. G. Favero, Pessah, & Klug, 1993; Swain et al., 2003) e conferindo uma elevada neuroproteção, (Cotman, 2002; Marcelino et al., 2013).

A natação é considerada uma excelente forma de exercício físico para gestantes, que oferece uma carga mínima sobre as articulações e facilita o movimento. Esta atividade diminui o estresse mecânico pela flutuação, através

da redução da gravidade, e proporciona uma melhor distribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos, sendo assim, uma atividade física muito recomendada para gestantes (Katz, 1996). A natação também ajuda a reduzir o peso extra adquirido durante a gravidez, melhora a circulação sanguínea, aumenta a força e a resistência muscular, auxilia na redução da ansiedade e depressão e previne doenças do tipo Diabetes tipo 2 e pré-eclampsia (Bungum, Peaslee, Jackson, & Perez, 2000; POLLEY, WING, & SIMS, 2002). No feto, estudos mostram que o nado materno atua no crescimento placentário, aumenta o crescimento fetal e o peso ao nascimento (Seidell, Ph, & Mechelen, 2009), colaborando para uma melhor aptidão materna a este período e para maior bem estar-fetal (KATZ, 2003).

Até o presente momento não há relatos na literatura descrevendo os efeitos da natação materna, durante a gestação, e seus efeitos comportamentais e neuroquímicos sobre a prole no transtorno de déficit de atenção/ hiperatividade. Entretanto, alguns estudos mostram que a atividade física aumenta as funções cognitivas (Theodosis et al., 2008) e promove a neurogênese no rato adulto (H van Praag, Kempermann, & Gage, 1999). Também tem sido demonstrado que o exercício materno durante a gravidez aumenta a angiogênese, neurogênese, aprendizagem e memória em filhotes de ratos (K. Kim, Chung, Kim, & Lee, 2012; H. H. Lee et al., 2006; Swain et al., 2003). Além disso, pesquisas revelaram que o exercício durante a gravidez estimula o desenvolvimento pós-natal do hipocampo (Bick-Sander, Steiner, Wolf, Babu, & Kempermann, 2006), a neurogênese hipocampal e a angiogênese encefálica na prole (Marques-Aleixo, Oliveira, Moreira, Magalhães, & Ascensão, 2012).

O exercício afeta especialmente o hipocampo, aumentando a sua atividade, por meio do aumento do fluxo sanguíneo local (HOLSCHNEIDER, YANG, GUO, & MAAREK, 2007) e induzindo a plasticidade sináptica hipocampal, principalmente através do aumento da eficácia sináptica e da expressão de moléculas envolvidas na aprendizagem e memória (Molteni et al., 2004). A neurogênese induzida pela atividade física correlaciona-se positivamente à melhora da capacidade de aprendizagem e da memória de curta duração em ratos (H. H. Lee et al., 2006), possivelmente por induzir o

aumento da expressão de neurotrofinas como o Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo (BDNF) (Figurov, Pozzo-Miller, Olafsson, Wang, & Lu, 1996; H van Praag et al., 1999). O BDNF é conhecido por induzir a potenciação de longo prazo (LTP) (Figurov et al., 1996), aumentar a transmissão sináptica (Schinder, 2000) e por aumentar a plasticidade neuronal no SNC (Esmarck et al., 2001). Os astrócitos são responsáveis pela reciclagem do BDNF e essa reciclagem é importante para que ocorra a regulação da plasticidade sináptica (Bernardi et al., 2013).

Recentemente Marcelino e colaboradores (2013) demonstraram alterações metabólicas no cerebelo, córtex parietal e hipocampo de ratos cujas mães foram submetidas à natação gestacional e sugeriram que tais mudanças podem ser decorrentes da menor produção de espécies reativas de oxigênio, como óxido nítrico (NO). Outro trabalho com delineamento semelhante sugere que o exercício materno promove uma programação neurometabólica na prole, o que pode ser um benefício contra futuros insultos (Sanches et al., 2011).

Diante do acima exposto em relação ao TDAH, seu forte caráter genético, e frente aos benefícios que a atividade física materna parece oferecer à prole, o objetivo deste projeto é investigar o efeito da natação durante o período gestacional como alternativa de prevenção ao desenvolvimento do TDAH na prole de ratos SHR. Frente ao importante papel dos astrócitos no metabolismo glutamatérgico e na reciclagem do BDNF e diante das pesquisas que tem mostrado o envolvimento destas células na fisiopatologia do TDAH, este trabalho especificamente objetiva investigar o efeito da natação materna sobre a captação de glutamato astrocitária, os níveis de BDNF e GFAP no hipocampo e aspectos comportamentais como desenvolvimento sensório-motor, hiperatividade, ansiedade e memória da prole.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito neuroprotetor do nado gestacional na prole de ratas modelo de TDAH, sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade de captação de glutamato em astrócitos do hipocampo, na prole de ratas com TDAH submetidas ao protocolo de nado durante a gestação;

- Verificar os níveis de BDNF no hipocampo, na prole de ratas com TDAH submetidas ao protocolo de nado durante a gestação;

- Investigar o efeito do nado gestacional de ratas com TDAH sobre parâmetros comportamentais na prole como o desenvolvimento sensório-motor, hiperatividade, ansiedade e memória.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos Éticos

Os procedimentos realizados no presente trabalho obedeceram às normas propostas pelos Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS*). Todos os procedimentos estão de acordo com *Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication 85-23, 1985)*. Os protocolos experimentais que foram utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), projeto 28731, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar Kyoto (KWY) e ratos espontaneamente hipertensivos (SHR) obtidos do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica da UFRGS, e alocados no mesmo. Eles foram mantidos com alimentação padrão e água *ad libitum*, e ciclos de 12h claro e escuro em salas climatizadas ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Ratas SHR e WKY a partir dos 60 dias foram colocadas para acasalar em caixas *Plexiglass* (42x34x18), distribuídas da seguinte forma: duas fêmeas e um macho por caixa. As fêmeas foram divididas em 4 grupos: 2 grupos controles (SHR sedentário e WKY sedentário) e 2 grupos exercitados (SHR nado e WKY nado), totalizando 10 ratas por grupo. O macho foi colocado no período da noite, às 18 horas, e retirado pela manhã, às 8 horas. O esfregaço vaginal, nas fêmeas, para a confirmação da prenhez, foi realizado diariamente após a retirada dos machos. Confirmando a prenhez, ou seja, presença do espermatozoide no esfregaço vaginal, o protocolo de nado foi iniciado de forma imediata.

Para a realização dos testes comportamentais e análises bioquímicas foram usados animais de ambos os sexos e em um número de até 6 animais por prole, para evitar o efeito da ninhada. Nos testes de desenvolvimento sensorio-motor foram utilizados um total de 71 animais: 20 para KWY SED, 12 para KWY NADO, 21 para SHR SED e 17 para SHR NADO. Nos testes

cognitivos o número total de animais utilizados foi 60: 20 para KWY SED, 11 para KWY NADO, 14 para SHR SED e 15 para SHR NADO. Para as análises bioquímicas utilizamos 32 animais N = 8 animais por grupo.

3.3 Desenho Amostral

Após a confirmação da prenhez (DPN -21) foi imediatamente iniciado o protocolo de nado materno até o 20º dia de gestação (DPN -2), neste dia as fêmeas foram colocadas em caixas isoladas, permanecendo assim até o momento do parto. No DPN14 os animais foram pesados e foram realizados os teste para analisar as alterações de desenvolvimento sensório-motor, que são sintomas do TDAH. No DPN21 os animais foram pesados, desmamados e colocados em caixas de acordo com o sexo. A partir do DPN30 foram realizados os teste de Labirinto em Cruz Elevado (Plus Maze), Campo Aberto e Reconhecimento de Objeto. No DPN45 os animais foram anestesiados com xilazina/cetamina e decapitados, e o hipocampo coletado para a realização das análises bioquímicas (Figura 4).



Figura 4. Esquema do desenho experimental indicando os dias contados a partir do nascimento (DPN0) e os procedimentos a serem realizados.

3.4 Protocolo de nado materno

O treinamento de nado foi realizado diariamente começando no dia 0, o dia da confirmação da prenhez. O exercício perdurou durante todo o período gestacional encerrando entre o 21º e 22º dia gestacional (DG), considerado o último dia. Os animais do grupo SHR nado e KWY NADO, foram expostos individualmente em tanque de fibra circular, com dimensões de 50 cm de altura e 110 cm de diâmetro, com água à 25 cm de altura, aquecida em temperatura entre 30-32°C, permanecendo por um período de 20 minutos. Os animais do grupo SED (sedentários KWY e SHR) foram expostos ao mesmo ambiente do grupo NADO, porém, o tanque possuía água em um nível raso, com 3 cm de profundidade durante 10 minutos (adaptado de Lee et al., 2006).

3.5 Testes comportamentais

No DPN14 os animais executaram testes motores de endireitamento, geotaxia negativa e marcha, e sensorial de reconhecimento olfatório para verificar o efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento sensório-motor da prole.

3.5.1 Reflexo de Endireitamento Postural: Esse teste mede a função e a coordenação motora dos filhotes. Avaliou-se o tempo gasto do animal para assumir o decúbito dorsal após ser posicionado em supino (de costas para uma superfície). Foi medido o tempo de latência do animal para voltar a sua postura original, em um tempo máximo de 60 segundos (adaptado de Sanches et al., 2012)

3.5.2 Geotaxia Negativa: O teste mede o movimento automático de orientação ligada a estímulo considerado diagnóstico de função vestibular e / ou função proprioceptiva. Avaliou-se a capacidade do animal de retornar à direção cefálica contrária, virando 180°, ao solo quando em um plano inclinado de 30°. Mede-se a latência deste comportamento em um tempo máximo de 60 segundos (Sanches et al., 2012).

3.5.3 Marcha: É um teste que se mede a coordenação motora do animal, e é realizado em um círculo de aproximadamente 13 cm de diâmetro, desenhado em uma folha de papel. Foi medido o tempo de deslocamento do animal do centro até o momento em que as 4 patas estão fora do círculo, com tempo máximo de 60 segundos. (Cárdenas et al., 2015)

3.5.4 Teste Olfatório: É um teste para avaliar a capacidade sensorial do filhote. O teste é realizado em uma caixa acrílica retangular transparente, onde em um dos lados há maravalha limpa e do outro há maravalha da sua caixa original. Foi avaliado a capacidade do animal guiar-se em direção à maravalha original, em um tempo máximo de 180 segundos (A. M. Favero, Weis, Zeni, Rocha, & Nogueira, 2006).

A partir DPN30 foram realizados os seguintes testes comportamentais:

3.6 Testes Cognitivos

3.6.1 Campo aberto: Avaliou-se a atividade exploratória através da contagem do número de cruzamentos (número de linhas atravessadas), a exploração vertical(levantar e sustentar o corpo em duas patas) e a relação entre as áreas centrais e periféricas percorridas (Netto, Dias, & Izquierdo, 1985).

3.6.2 Labirinto em cruz elevado: É um teste de avaliação da ansiedade do animal. O teste consiste de um aparato de madeira em forma de cruz com dois braços abertos e dois braços fechados, sendo elevado a uma altura de 70 cm do solo. As entradas nos braços abertos ou fechados foram marcadas durante 5min e registrou-se o tempo total gasto em cada braço. Uma entrada será definida pela colocação das

quatro patas em um dos braços, não sendo cronometrado o tempo em que o animal permanece no centro do aparato (E. F. Sanches et al., 2013).

3.6.3 Reconhecimento de objetos: Consistiu em uma avaliação da memória não-espacial de curta e longa duração do animal. Na primeira fase do teste, cada animal foi exposto a dois objetos 1 iguais, colocados numa caixa de campo aberto, e o tempo de exploração do objeto foi registado em 5 min. Após 3 horas, o animal foi exposto ao objeto 1, já conhecido, e um diferente objeto 2, e o tempo de exploração foi de 5 min. Foi medido o tempo de exploração do objeto um, dois e três (Raber et al., 2004).

3.7 Análises bioquímicas

No DPN45 os animais foram decapitados e o hipocampo coletado e mantido em freezer -80°C, com exceção das fatias que foram utilizadas para mensuração da captação de glutamato hipocampal que foi realizada de imediatamente após a coleta.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina/cetamina (10 e 75 mg/kg, respectivamente) via intraperitoneal e posteriormente decapitados com auxílio de guilhotina, seus encéfalos removidos. Com auxílio de aparelho McIlwain Tissue Chopper®, foram feitas fatias de 300 µm no sentido anteroposterior.

3.7.1 Ensaio de Captação de Glutamato: a captação de glutamato foi realizada como previamente descrito por Thomazi et al., (2004). As fatias hipocampais foram transferidas para placas de 24 poços e incubadas por 23 minutos a 37°C em solução salina balanceada de Hank's (HBSS) contendo (em mM): 137 NaCl; 5,36 KCl; 1,26 CaCl₂; 0,41 MgSO₄; 0,49 MgCl₂; 0,63 Na₂HPO₄.7H₂O; 0,44 KH₂PO₄; 4,17 NaHCO₃, e 5,6 glicose, ajustada para pH 7,4. O ensaio foi iniciado através da adição de 0,1 mM L-glutamato e 0,33 µCi/mL L-[2,3-³H]

glutamato. A incubação foi parada após 5 minutos através da remoção do meio e lavagem das fatias duas vezes com HBSS gelado. As fatias foram lisadas em uma solução contendo 0,5M NaOH. A radioatividade foi mensurada em um contador de cintilação. A captação independente de sódio foi determinada usando N-metil-D-glucamina ao invés de sódio. A captação de glutamato dependente de sódio foi obtida através da subtração da captação de glutamato não-específica do total da captação de glutamato para obtenção da captação específica. Os resultados (nmol/mg de proteína/min) foram expressos com uma percentagem do controle.

3.7.2 Concentração de BDNF E GFAP: Foram realizados Western blottings para medir a concentração de BDNF e GFAP. Hipocampo foi homogeneizado em tampão TBS e suas proteínas foram separadas por SDS-PAGE em 10% (w / v) de géis de acrilamida e eletrotransferência para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas durante a noite com o anticorpo primário adequado BDNF (diluição 1: 1000) de Santa Cruz Biotechnology®, GFAP (diluição 1: 5000) e DAKO® β -actina (diluição 1: 2000) Sigma Aldrich®, e expostos a peroxidase de horse anticorpos anti-IgG - incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. Bandas quimioluminescentes foram detectadas utilizando ImageQuant LAS4000 GE Healthcare®, e análises de densitometria foram realizadas utilizando software Imagem-J®. Os resultados foram expressos como porcentagem de controle (Barbosa et al., 2013).

3.8 Análises Estatísticas

Após a verificação da normalidade dos resultados obtidos pelo teste de Levene, os dados paramétricos foram avaliados por Análise de Variância Multivariada de uma via (ANOVA) (nado ou sedentário e SHR ou KKY), seguidos do teste de *post-hoc* de Duncan. O nível de significância dos resultados a ser admitido foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Pesos

O resultado das pesagens feitas no DPN 7, DPN 14 e DPN21 revelou uma interação entre o ganho de peso dos animais dos diferentes grupos e os dias das pesagens (Figura 5). Foram encontradas diferenças significativas em todos os dias analisados. No DPN7 ($F(3,71) = 12,505$; $p < 0,05$) KWY NADO e SHR NADO tiveram um ganho de peso superior aos demais grupos. No DPN14 ($F(3,69) = 10,266$; $p < 0,05$) houve um ganho de peso maior no grupo SHR em relação ao grupo KWY. No DPN21 ($F(3,69) = 3,471$; $p < 0,05$) o grupo SHR NADO apresentou um ganho de peso maior do que os demais grupos.

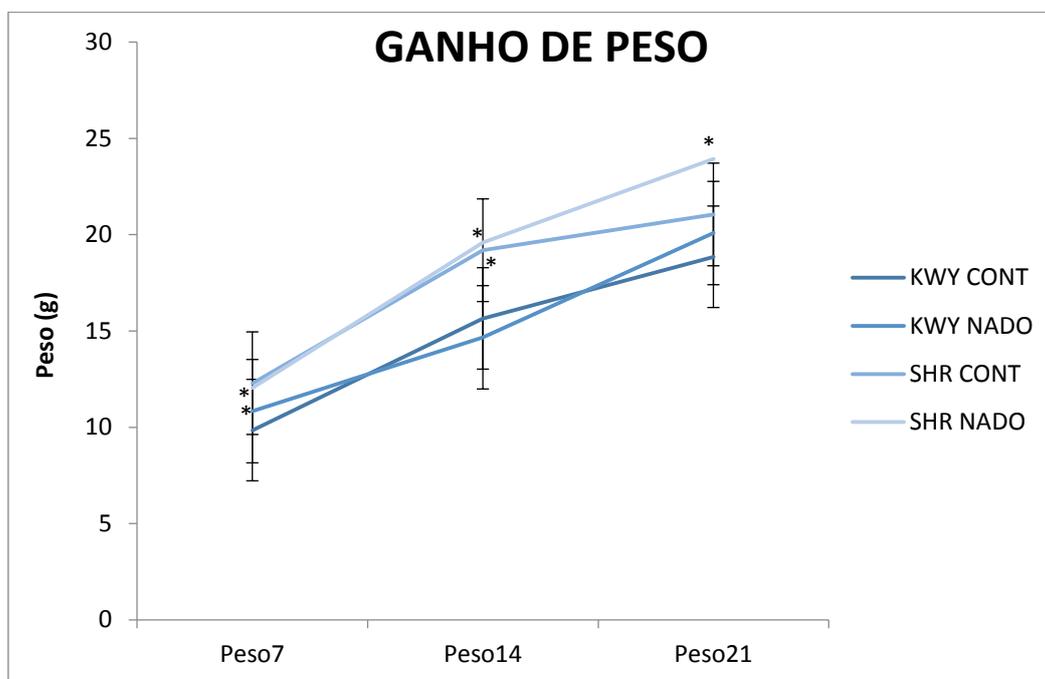


Figura 5. Ganho de peso. Os dados estão representados como peso (g) \pm EP, n=12-21 animais por grupo. # ANOVA. * Diferença dos grupos sobre o grupo KWY SED.

4.2 Desenvolvimento Sensório-motor

No 14º dia (PND14) foram realizados testes de desenvolvimento sensório-motor. No teste de endireitamento, os animais do grupo KWY SED apresentaram um maior tempo na realização da tarefa em relação aos demais grupos ($F(3,69) = 6,038$; $p < 0,05$) (Figura 6A). Não houve

diferença significativa entre os grupos KWY NADO e SHR NADO, que apresentaram latências similares ao grupo SHR SED.

No teste de Marcha ($F(3,69) = 10,037$; $p < 0,05$), o grupo SHR NADO apresentou uma maior rapidez em sair do círculo comparado aos demais grupos (Figura 6B). Este resultado indica uma influência positiva do nado gestacional na realização da tarefa, melhorando a capacidade motora.

O teste olfatório, evidenciou um possível efeito do nado nos animais do grupo KWY NADO, porém, no grupo SHR também encontrou diferença significativa entre o SHR SED e o KWY SED ($F(3,69) = 5,037$; $p < 0,05$), onde houve diminuição da latência para se dirigir à maravalha das mães em relação aos demais grupos (Figura 6C). Não foi encontrada diferença significativa no teste de Geotaxia Negativa ($F(3,69) = 0,514$; $p = 0,674$) (Figura 6D).

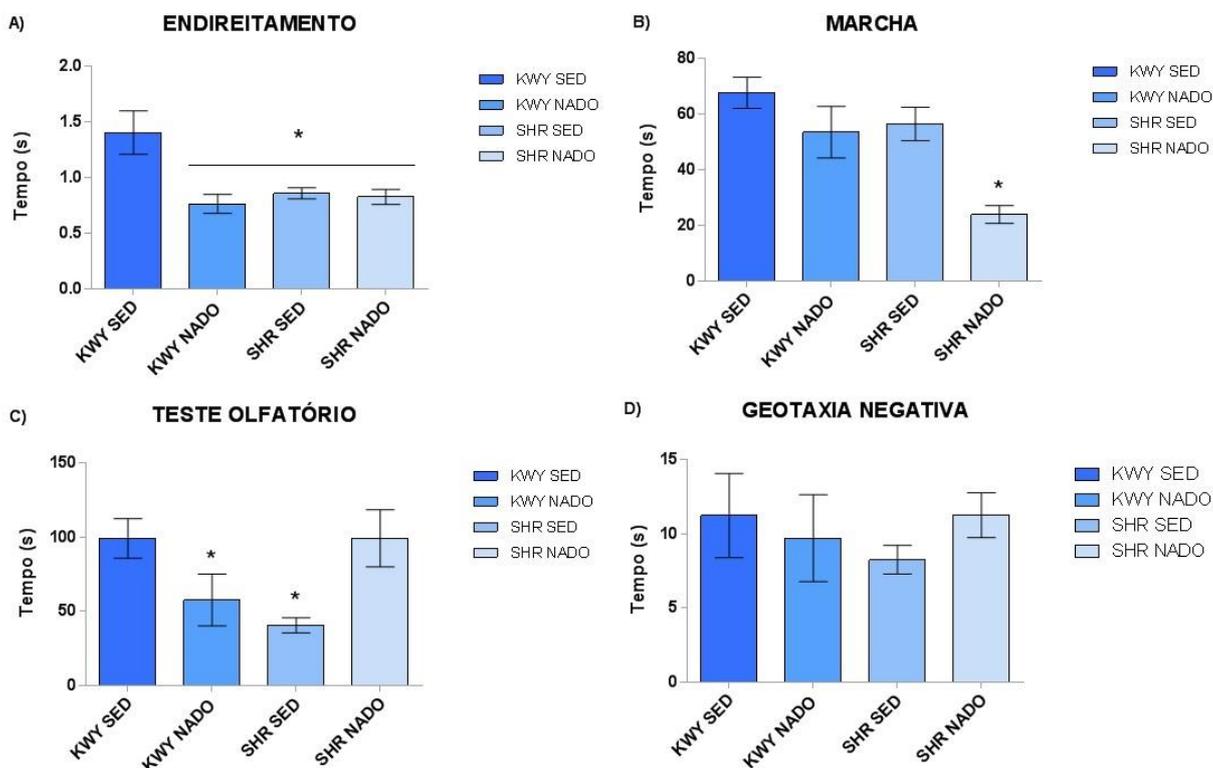


Figura 6. Desenvolvimento sensório-motor. Os dados estão expressos como média \pm EP do tempo para realizar os testes de (1) Endireitamento, (2) Marcha, (3) Geotaxia Negativa e (4) Teste Olfatório. $N=12-21$ animais por grupo. ($p < 0,05$). * Diferença em relação ao grupo KWY SED.

4.3 TESTES COGNITIVOS

4.3.1 Campo Aberto

No DPN 30 foram realizados testes cognitivos para a avaliação do efeito do nado gestacional sobre a prole de ratas SHR. Para confirmar a hiperatividade nos ratos SHR, o teste do campo aberto foi realizado (Kim et al., 2011).

Foi encontrado uma diferença significativa no número de cruzamentos (X) no minuto 1 (CROSS 1) e no minuto 2 (CROSS 2) onde houve um desempenho superior dos grupos SHR NADO ($F(3, 56) = 17,95; P < 0,0001$) e SHR SED ($F(3, 56) = 9,704; P < 0,0001$) comparado aos grupos KWY NADO e KWY SED. Isto demonstra uma atividade locomotora/exploratória aumentada nos ratos SHR, característica da hiperatividade presente na patologia. O nado materno não foi capaz de reverter o quadro de hiperatividade. Já nos demais minutos não houve diferença significativa entre os grupos, podendo estar relacionado com a habituação dos animais ao ambiente, diminuindo assim o interesse exploratório (Figura 7).

Sobre o número de *rearings* (comportamento exploratório em que o animal estende seu corpo e patas dianteiras, apoiando-se sobre as patas traseiras), houve uma diferença significativa entre os grupos SHR e KWY em todos os 5 minutos analisados (Figura 8). O grupo SHR teve um nível superior de *rearing* sem relação ao grupo KWY, o que indica um comportamento mais hiperativo. Dentro do grupo SHR, no *rearing* 1 (R1), o grupo SHR NADO teve um grau inferior quando comparado ao SHR SED ($F(3, 56) = 47,91; P < 0,0001$), porém, no R2 ($F(3, 56) = 29,53; P < 0,0001$) até o R4 ($F(3, 56) = 30,60; P < 0,0001$) o grupo SHR NADO apresentou um maior número de *rearings* em relação ao SHR SED mostrando um aumento na atividade exploratória do nado nesse minuto. No R5 ($F(3, 56) = 26,98; P < 0,0001$), houve apenas diferença do grupo SHR e o KWY. O grupo KWY NADO teve níveis melhores que o KWY SED no R4 e R5, sugerindo o efeito positivo do nado gestacional sobre o resultado da tarefa.

Com relação ao número total de *crossing*, os resultados mostram uma diferença significativa entre os grupos ($F(3, 56) = 6,626; P = 0,0007$), onde os

Ratos SHR mostraram um maior número de *crossing*, possivelmente confirmando o comportamento hiperativo destes animais. Não há efeito do nado gestacional em relação ao número total de *crossing* realizados pelos animais. Não houve diferença significativa com relação a latência no teste (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis analisadas do teste de Campo Aberto. Os dados estão expressos como média \pm EP dos valores absolutos

	Número total de crossing	Latência
KWY SED	63,8 \pm 5,586	7,5 \pm 3,172
KWY NAD	66,8 \pm 4,57	3,1 \pm 0,615
SHR SED	83,2 \pm 5,839*	1 \pm 0,331
SHR NADO	92,4 \pm 4,415*	0,9 \pm 0,228

P < 0,05 ANOVA de uma via. Diferença entre os grupos KWY e SHR e dentro do grupo SHR (NADO e SED).

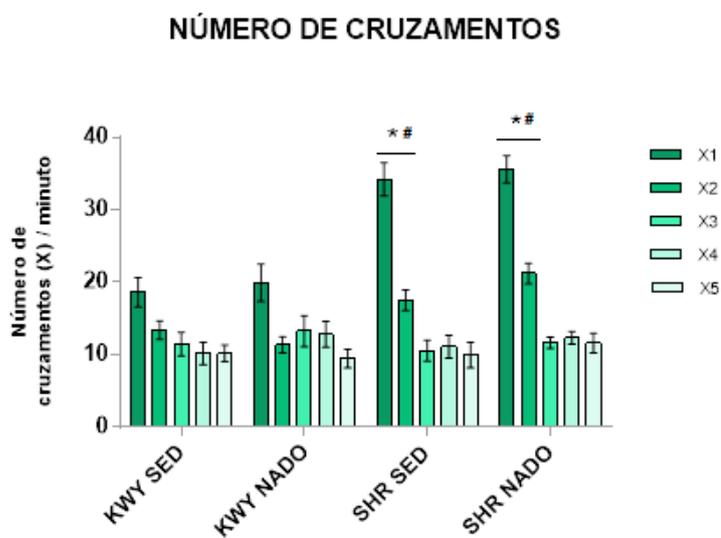


Figura 7. Número de Cruzamentos. Os dados estão expressos como média \pm EP do número de cruzamentos realizados pelo animal por minuto no teste. N= 9-16. * Diferença dos grupos em relação ao grupo KWY SED # diferença entre os modelos SHR e KWY.

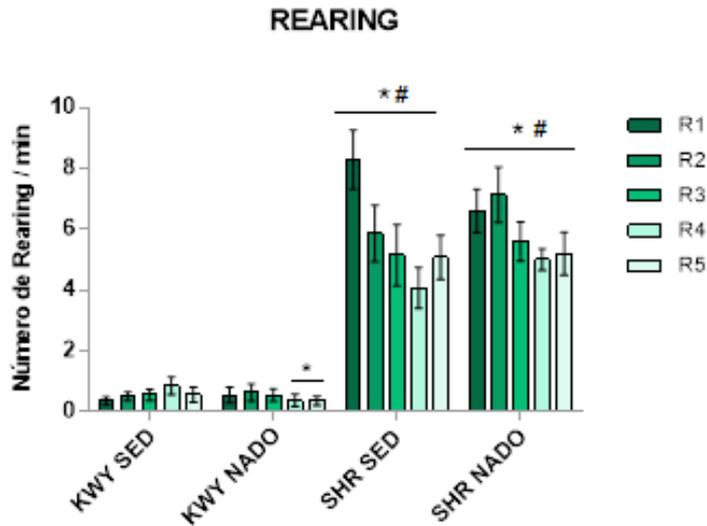


Figura 8. Número de Rearings. Os dados estão expressos como média \pm EP em relação ao número de rearings realizados pelo animal por minuto no teste. N= 9-16. * Diferença dos grupos sobre o Kwy SED # diferença entre os modelos SHR e Kwy.

4.3.2 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz elevado é um teste bem estabelecido para determinar os níveis de impulsividade nos ratos (Ko et al, 2013). A latência nos braços abertos é apresentada na figura 9B. O grupo SHR SED ficou mais tempo nos braços abertos do que os demais grupos (ANOVA (F (3, 53) = 5,163; P < 0,05), demonstrando um aumento na atividade impulsiva. O grupo SHR NADO permaneceu mais tempo nos braços fechados (Figura 8A) em relação aos demais grupos (F (3, 53) = 2,823; P = 0,0475), demonstrando que o nado inibiu a impulsividade nos ratos TDAH.

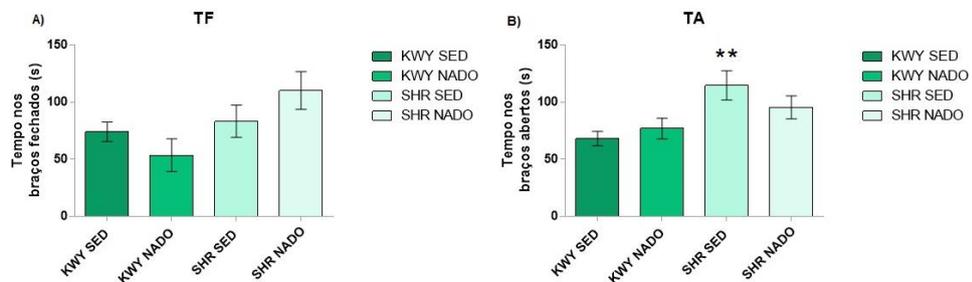


Figura 9. Labirinto em Cruz Elevado. As latências (s) estão expressas como média \pm EP no(A) tempo nos braços fechados, (B) tempo nos braços abertos. * Diferença dos grupos em relação ao Kwy SED ** Diferença entre NADO e SED.

Tabela 2. Variáveis analisadas do teste de labirinto em cruz elevado. Os dados estão expressos como média \pm EP dos valores absolutos.

	KWY SED	KWY NADO	SHR SED	SHR NADO
TF	74,0 \pm 8,51	53,5 \pm 14,381	83, 2 \pm 14,054	110,1 \pm 17,42*
EF	5,1 \pm 0,418	2,7 \pm 14,381*	7,3 \pm 0,676	7,1 \pm 0,499*
REANRING	2,2 \pm 0,403	1,1 \pm 0,377	10 \pm 1,037*	9,8 \pm 1,4711*
TA	68,0 \pm 6,411	76,9 \pm 9,074*	114,6 \pm 12,817*	95,4 \pm 10,05*
EA	4,9 \pm 0,387	4,7 \pm 0,449	7,5 \pm 0,701*	6,5 \pm 0,633
AR	5,8 \pm 0,655	5,8 \pm 0,615	4,0 \pm 0,658	4,9 \pm 0,434
HEAD	3,5 \pm 0,328	5,7 \pm 0,739	11,2 \pm 1,192	9,1 \pm 0,877
LATÊNCIA	29,6 \pm 3,734	25,2 \pm 5,361	10,2 \pm 2,851	13,2 \pm 3,097
TA/TF	1,37 \pm 0,266	5,6 \pm 2,729	2,1 \pm 0,485	1,3 \pm 0,322
BF	2 \pm 0,611	1,6 \pm 0,472	0	0

P < 0,05 ANOVA. *Diferença entre os grupos KWY e SHR e dentro do grupo SHR (NADO e SED).

4.3 Reconhecimento de Objeto

Não foi encontrado diferença significativa no teste de reconhecimento de objeto. O nado gestacional não teve efeito na realização da atividade exploratória na memória do objeto 2 de curta duração (3h) ($F(3, 60) = 1,112$; $p = 0,354$).

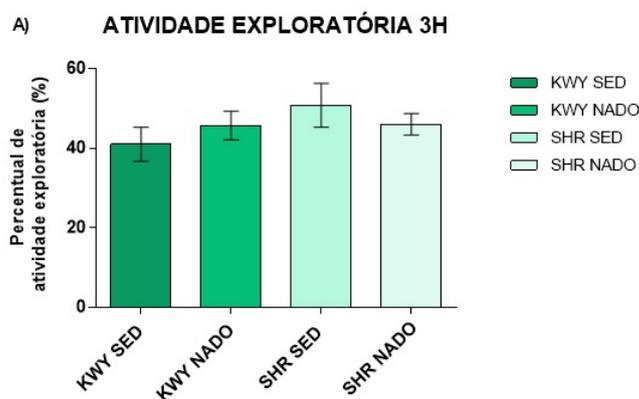


Figura 10. Tempo de exploração (s) \pm EP dos grupos no objeto 2 na memória de curta duração (3 horas).. N= 9-16 animais por grupo.

4.4 Análises Bioquímicas

4.4.1 Captação de Glutamato

No DPN 45 os animais foram eutanasiados e suas estruturas coletadas para a realização das análises bioquímicas. Evidenciou-se uma diferença significativa nos resultados da captação de glutamato ($F(3, 19) = 5,995; P = 0,0047$), havendo uma diferença dentro dos grupos SHR e KWYe uma diferença entre os animais do grupo KWy NADO e SHR NADO em relação ao grupo KWy SED (Figura 11), mostrando que o exercício físico durante a gestação aumenta a captação de glutamato, e assim, havendo uma tendência ao efeito neuroprotetor sobre a prole.

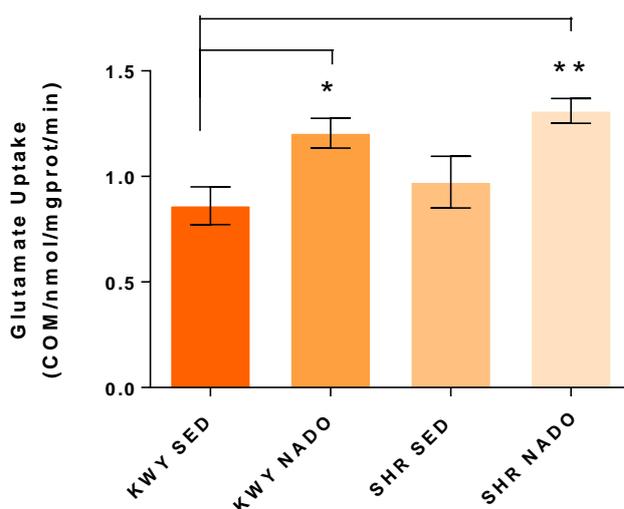


Figura 11. Captação de glutamato. Os dados estão expressos como média \pm EP da captação de glutamato (COM/nmol/mgprot/min). $N=6$ animais por grupo. * Diferença dos grupos sobre o KWy SED. ** Diferença entre NADO e SED. $P<0,05$ entre o KWy SED e SHR NADO.

4.4.2 Concentração de BDNF e GFAP

Não houve diferenças significativas sobre a concentração de BDNF na prole. Entretanto, na concentração de GFAP foi encontrada uma diferença significativa de aumento dos níveis de GFAP entre os grupos SHR NADO e KWy SED ($F(3, 26) = 5,671; P = 0,0040$). Há uma tendência de influência do

nado gestacional sobre o aumento da concentração de GFAP, mas com o erro ainda alto não houve diferença significativa entre o tratamento e o controle (Figura 11).

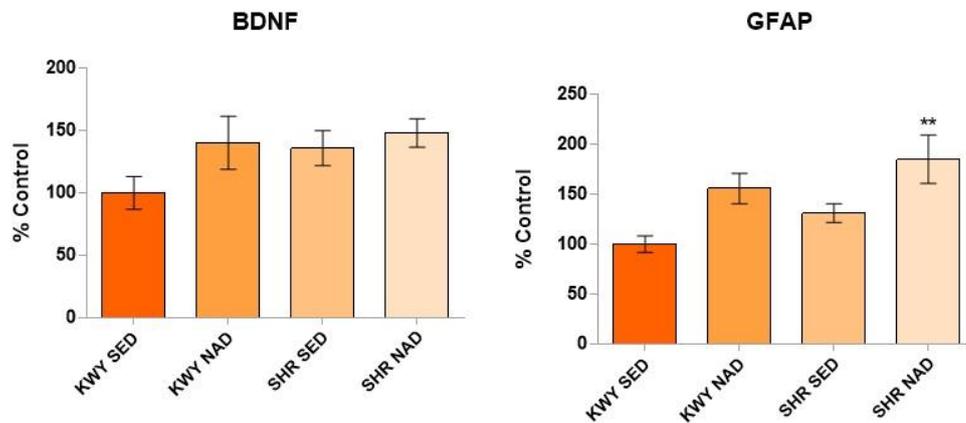


Figura 12. Western Blotting Concentração de (A) BDNF e (A) GFAP. Os dados estão expressos como média \pm EP do controle %. N= 8 animais por grupo. ** Diferença entre SHR NAD e Kwy SED, $P < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, estudamos o efeito do protocolo de nado gestacional em ratos modelo de TDAH como alternativa de neuroproteção da prole. Os ratos SHR foram utilizados como modelo animal de TDAH pois exibem hiperatividade, impulsividade (Kim et al., 2011; Prediger et al., 2005) e déficit de memória (Sagvolden, 2000) quando comparados com os ratos controle Wistar Kyoto.

Verificou-se que o nado materno não teve efeito sobre o comportamento hiperativo dos animais, porém, promoveu a redução da impulsividade, além de induzir alterações astrocitárias no hipocampo da prole, como o aumento das concentrações de GFAP e da captação de glutamato.

Os ratos SHR exibiram hiperatividade no teste de campo aberto, enquanto o controle KWHY não apresentaram quaisquer sintomas de TDAH, como descrito na literatura (Ji et al., 2014; Kim et al., 2011).

Tem sido amplamente aceito que o exercício regular desempenha um papel crucial para melhorar a estrutura do cérebro e função cognitiva. O exercício físico aumenta a neurogênese e a liberação de neurotransmissores, facilitando a maturação neuronal e melhorando a habilidade de aprendizagem e capacidade de memória em doenças neuropsiquiátricas (Jee et al, 2008; Kim et al, 2010; Kim et al, 2013; O'Dell et al, 2007). Nos pacientes pediátricos com TDAH, a atividade física parece melhorar os problemas de comportamento social e reduz a hiperatividade (Majorek et al, 2004). O efeito do treino em esteira na melhora dos sintomas de TDAH nos animais SHR foi demonstrado (Kim et al, 2011). A natação parece ser benéfica para o tratamento do TDAH como, por exemplo, no caso do atleta olímpico Michael Phelps (Baron, 2010).

Uma forma de analisarmos o desenvolvimento dos animais é através do ganho de peso corporal. Um estudo mostrou que o exercício durante a gravidez poderia criar uma competição entre a glicose para os músculos da mãe e os músculos placentários, o que influenciaria no desenvolvimento do feto (Matsuno, Esrey, Perrault, & Koski, 1999). Outros estudos sugerem que o exercício regular durante a gravidez pode melhorar o crescimento placentário, aumentar o crescimento fetal e aumentar o peso ao nascer (H. H. Lee et al., 2006) e que o nado gestacional pode aumentar esse ganho de peso. Em nosso

estudo, observamos efeito do nado materno, sobre essa medida, apenas nos primeiros 7 dias de vida, onde os grupos SHR e KQY NADO tiveram aumento dos seus pesos significativamente maiores do que o KQY SED.

O desenvolvimento posnatal é caracterizado, dentre muitos aspectos, pela maturação de reflexos neurológicos e coordenação motora (Lubics et al., 2005). Reflexo de endireitamento, geotaxia negativa e marcha refletem as respostas no desenvolvimento motor e atividade orientada pelo sistema vestibular (Lubics et al., 2005). DPN14 foram realizados testes de desenvolvimento sensório-motor para verificar o efeito do nado sobre possíveis déficits no desenvolvimento sensório-motor causados pelo TDAH. Entre as medidas de desenvolvimento sensório-motor abordadas (Figura 6), apenas o teste de marcha mostrou efeito significativo do nado no modelo de TDAH. Sendo assim, apresentando melhor coordenação motora que os demais grupos.

O teste de campo aberto analisa simultaneamente locomoção e exploração (Walsh & Cummins, 1976) e é muito utilizado para avaliar o comportamento hiperativo no transtorno de déficit de atenção em ratos SHR (Davids et al., 2003). O número de *crossings* e a frequência de *rearings* é usado para medir atividade locomotora e exploratória e em alguns casos ansiedade (Gould, Dao, & Kovacsics, 2009). Os resultados mostraram uma diferença entre os ratos SHR e KQY, onde os ratos modelo de TDAH demonstram um aumento na atividade exploratória nos animais modelo TDAH (Figura 7 e Figura 8), confirmando a sintomatologia do TDAH. Não foi encontrado efeito do nado materno sobre este sintoma.

O teste de labirinto em cruz elevado é usado para analisar nível de impulsividade e ansiedade (Ko et al., 2013) em ratos modelo de TDAH. O comportamento de impulsividade está presente quando o rato permanece mais tempo nos braços abertos do que nos braços fechados (Ko et al., 2013). Os resultados deste trabalho mostram que os ratos SHR SED permaneceram mais tempo nos braços abertos, sendo assim, comprovando o comportamento impulsivo do modelo. Entretanto, o grupo SHR NADO permaneceu mais tempo nos braços fechados em relação ao grupo SHR SED, mostrando um possível efeito do nado durante a gestação, diminuindo o comportamento impulsivo dos

animais. Este resultado é corroborado por autores que mostraram o efeito do nado sobre os sintomas de impulsividade em ratos SHR (Ko et al., 2013).

O teste de reconhecimento de objetos é utilizado para avaliar a memória de aprendizado de longa e de curta duração (Raber et al., 2004). Neste estudo foi analisado apenas a memória de curta duração (3 horas) e não houve diferença significativa. Robinson e Bucci (2013) mostraram haver uma melhora na memória de aprendizado em ratos wistar onde as mães fizeram exercício físico durante a gestação. Porém, em ratos SHR não foi encontrado estudos que explique o resultado neste trabalho.

Existem vários estudos que relatam o efeito benéfico do exercício sobre as funções cerebrais, tais como melhora no aprendizado e na memória (FORDYCE & WEHNER, 1993; Kramer et al., 1999), sobre a função cognitiva (Laurin, 2001) e auxilia na recuperação de lesões cerebrais traumáticas em humanos (D. N. Lee, Craig, & Grealy, 1999). Esses estudos atribuem a melhora cognitiva induzida pelo exercício físico ao fato de provocar alterações em vias de sinalização e em regiões específicas do hipocampo, aumentando a proliferação celular e a neurogênese no giro denteado da prole de ratas grávidas submetidas à natação durante a gestação (H. H. Lee et al., 2006).

Atividade física e experiências de aprendizado provocam alterações na morfologia astrocitária (Gibbs et al., 2008; Rothstein et al., 2005) devido ao seu envolvimento na barreira hematoencefálica (Correale & Villa, 2009). Glutamato é o principal neurotransmissor do SNC. Exercícios físicos induzem a mudança na função do sistema glutamatérgico influenciando na produção e na função de neurônios (Henriette Van Praag, 2008), prevenindo a excitotoxicidade e elevando os níveis de BDNF (Neeper et al. 1995).

Estudos indicam que a interação entre os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e glutamatérgico podem influenciar o comportamento e/ou a cognição, dois elementos que são afetados pelo TDAH (Gainetdinov et al, 2001; Miyamoto et al, 2001; Mohn et al, 1999). Existem evidências de que o TDAH é associado com anormalidades na via glutamatérgica, pelo menos em alguns casos (Maltezos et al, 2014). Esta evidência levou ao desenvolvimento de drogas moduladoras do glutamato como potencial tratamento para o TDAH. Além disso, estudos sugerem o papel do sistema glutamatérgico na regulação da função motora. (Zhang et al, 2002). Os dados do presente estudo sugerem

um possível aumento do metabolismo glutamatérgico evidenciado pelo aumento da captação de glutamato pelos astrócitos hipocampais dos animais SHR cujas mães nadaram durante a gestação, associado ao aumento do conteúdo de GFAP astrocitário (maltezos et al, 2014). Uma vez que o sistema glutamatérgico parece estar envolvido nas alterações comportamentais e motoras no TDAH, pode-se sugerir que, na presente pesquisa, este possível aumento do metabolismo glutamatérgico possa estar relacionado à melhora da impulsividade nos animais SHR NADO. Drogas que aumentam a neurotransmissão glutamatérgica inibem a hiperatividade/ impulsividade (Gainetdinov et al, 2001).

A proteína GFAP é um marcador confiável para identificação de astrócitos maduros, além de ser uma proteína de citoesqueleto necessária para a formação de processos astrocíticos estáveis (Weinstein et al. 1991). Neste trabalho foi observado um aumento de imunoconteúdo de astrócitos GFAP hipocampais, nos ratos em que as mães realizaram o protocolo de nado gestacional. Outros estudos também demonstraram que o exercício físico é capaz de produzir efeitos semelhantes, mas em outras regiões encefálicas (Komitova et al., 2005; Li et al. 2005; Uda et al., 2006). O aumento na densidade de astrócitos e na expressão de GFAP pode ser resultado do aumento do metabolismo astrogliar e da síntese de proteínas, em resposta ao acréscimo na demanda fisiológica gerada pela prática de atividade física (Eddleston e Mucke 1993).

O BDNF é um fator neurotrófico muito importante para o SNC. Possui a função de regular a diferenciação e a sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento e, também, está incluído nos processos de plasticidade sináptica hipocampal na idade adulta (Tapia-Arancibia et al., 2004) e defeitos nessas funções podem contribuir para a ansiedade e déficits cognitivos (Greenberg et al., 2009). Kim et al. (2011) mostrou que exercício físico em esteira durante 30 minutos por dia apresentaram efeito alívio da mais potente sobre a hiperatividade em ratos de TDAH. No entanto, neste trabalho, a natação durante a gravidez não mostrou diferença significativa, sendo assim, pode-se dizer que o protocolo de nado não foi eficiente, visto que muitos artigos consta uma melhora na expressão de BDNF no hipocampo, aliviando os déficits na capacidade de aprendizado espacial, em ratos modelo de TDAH que

realizaram exercício em esteira (H. Kim, Lee, Kim, Yoo, & Kim, 2007; K. Kim et al., 2012).

Neste estudo o nado gestacional aparenta ter reduzido a impulsividade na prole dos ratos SHR e assim, pode-se dizer que houve um possível envolvimento dos astrócitos e do sistema glutamatérgico pela promoção desse benefício. Entretanto, não houve melhora nos demais parâmetros comportamentais de hiperatividade e de memória de curta duração, que se relaciona com os níveis de BDNF hipocampal que também não foi alterado. Uma hipótese para esse resultado é o tempo de duração da prática do nado materno ter sido insuficiente para que houvesse alteração nos níveis de BDNF, e assim, promover melhora nos parâmetros comportamentais e bioquímicos analisados (Gómez-Pinilla et al., 2002; H. H. Lee et al., 2006; Liu et al., 2014; Molteni et al., 2004; Oliff, Oliff, & Berchtold, 1998; H. H. Lee et al., 2006).

O TDHA também afeta outras regiões do cérebro, como o CPF e o estriado (Davids et al., 2003; Hopkins, Sharma, Evans, & Bucci, 2009; Oades, Dauvermann, Schimmelmann, Schwarz, & Myint, 2010; Sagvolden et al., 2009; Winstanley et al., 2006) e também altera a funcionalidade dos sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos (Davids et al., 2003; Maltezos et al., 2014; Sagvolden et al., 2009; Winstanley et al., 2006). Com isso, pela falta de estudos envolvendo astrócitos e exercício físico e pela não eficácia do protocolo de nado gestacional, trazemos como perspectivas desse trabalho melhoramento do protocolo de nado e análises bioquímicas no CPF e no estriado, regiões importantes envolvidas no TDAH.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados nesse trabalho, podemos concluir que o nado gestacional é capaz de aumentar a captação de glutamato em astrócitos do hipocampo, contudo não foi possível evidenciar alterações nos níveis de BDNF e eficiência sobre os parâmetros sensório-motores e cognitivos. Ainda, apresentou uma tendência à promoção da neuroproteção através do aumento de GFAP envolvida na funcionalidade dos astrócitos. Logo, com o melhoramento do protocolo de nado gestacional e análises do córtex pré-frontal e estriado, estruturas envolvidas no TDAH, poderemos avaliar melhor o efeito do nado, dando continuidade a este estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J., Crosbie, J., Wigg, K., Ickowicz, a, Pathare, T., Roberts, W., ... Barr, C. L. (2004). Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A (GRIN2A) gene as a positional candidate for attention-deficit/hyperactivity disorder in the 16p13 region. *Molecular Psychiatry*, 9(5), 494–499. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4001455>
- Agulhon, C., Petravic, J., McMullen, A. B., Sweger, E. J., Minton, S. K., Taves, S. R., ... McCarthy, K. D. (2008). What Is the Role of Astrocyte Calcium in Neurophysiology? *Neuron*, 59(6), 932–946. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.09.004>
- Araque, A., & Navarrete, M. (2010). Glial cells in neuronal network function. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1551), 2375–2381. <http://doi.org/10.1098/rstb.2009.0313>
- Barbosa, V. a., Luciano, T. F., Marques, S. O., Vitto, M. F., Souza, D. R., Silva, L. a., ... De Souza, C. T. (2013). Acute exercise induce endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via Akt and AMP-activated protein kinase in aorta of rats: Role of reactive oxygen species. *International Journal of Cardiology*, 167(6), 2983–2988. <http://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.08.050>
- Bernardi, C., Tramontina, A. C., Nardin, P., Biasibetti, R., Costa, A. P., Vizueti, A. F., ... Gonçalves, C. A. (2013). Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats. *Neural Plasticity*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/709732>
- Bick-Sander, A., Steiner, B., Wolf, S. a, Babu, H., & Kempermann, G. (2006). Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3852–3857. <http://doi.org/10.1073/pnas.0502644103>
- Bungum, T. J., Peaslee, D. L., Jackson, a W., & Perez, M. a. (2000). Exercise during pregnancy and type of delivery in nulliparae. *Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing : JOGNN / NAACOG*, 29(3), 258–264. <http://doi.org/10.1111/j.1552-6909.2000.tb02047.x>
- Cárdenas, L., García-garcía, F., Santiago-roque, I., Martínez, A. J., Coria-ávila, G. A., & Corona-morales, A. A. (2015). International Journal of Developmental Neuroscience Enriched environment restricted to gestation accelerates the development of sensory and motor circuits in the rat pup. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 41, 68–73. <http://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.11.008>
- Carrey, N., MacMaster, F. P., Fogel, J., Sparkes, S., Waschbusch, D., Sullivan, S., & Schmidt, M. (2003). Metabolite changes resulting from treatment in children with ADHD: a 1H-MRS study. *Clinical Neuropharmacology*, 26(4), 218–221. <http://doi.org/10.1097/00002826-200307000-00013>
- Castellanos, F. X., Giedd, J. N., Hamburger, S. D., Marsh, W. L., & Rapoport, J. L. (1996). Brain morphometry in Tourette ' s syndrome : The influence of disorder, 5–7.

- Catalani, a, Sabbatini, M., Consoli, C., Cinque, C., Tomassoni, D., Azmitia, E., ... Amenta, F. (2002). Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mech Ageing Dev*, 123(5), 481–490. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11796133
- Conlay, L. a, Wurtman, R. J., G-coviella, I. L., Blusztajn, J. K., Vacanti, C. a, Logue, M., ... Hospital, M. G. (1989). m Journal of Neural Transmission 9. *Journal of Applied Physiology*, 65–71.
- Corbett, R., Camacho, F., Woods, a. T., Kerman, L. L., Fishkin, R. J., Brooks, K., & Dunn, R. W. (1995). Antipsychotic agents antagonize non-competitiveN-methyl-d-aspartate antagonist-induced behaviors. *Psychopharmacology*, 120(1), 67–74. <http://doi.org/10.1007/BF02246146>
- Correale, J., & Villa, A. (2009). Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochemical Research*, 34(12), 2067–2077. <http://doi.org/10.1007/s11064-009-0081-y>
- Cotman, C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 25(6), 295–301. [http://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02143-4](http://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02143-4)
- Davids, E., Zhang, K., Tarazi, F. I., & Baldessarini, R. J. (2003). Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 42(1), 1–21. [http://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00274-6](http://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00274-6)
- Dorval, K. M., Wigg, K. G., Crosbie, J., Tannock, R., Kennedy, J. L., Ickowicz, a., ... Barr, C. L. (2007). Association of the glutamate receptor subunit gene GRIN2B with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Genes, Brain and Behavior*, 6(5), 444–452. <http://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00273.x>
- Esmarck, B., Andersen, J. L., Olsen, S., Richter, E. a., Mizuno, M., & Kjær, M. (2001). Timing of postexercise protein intake is important for muscle hypertrophy with resistance training in elderly humans. *Journal of Physiology*, 535(1), 301–311. <http://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00301.x>
- Favero, A. M., Weis, S. N., Zeni, G., Rocha, J. B. T., & Nogueira, C. W. (2006). Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. *Neurotoxicology and Teratology*, 28(5), 607–616. <http://doi.org/10.1016/j.ntt.2006.08.003>
- Favero, T. G., Pessah, I. N., & Klug, G. a. (1993). Prolonged exercise reduces Ca²⁺ release in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 422(5), 472–475.
- Figurov, a, Pozzo-Miller, L. D., Olafsson, P., Wang, T., & Lu, B. (1996). Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. <http://doi.org/10.1038/381706a0>
- FORDYCE, D. E., & WEHNER, J. M. (1993). Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteratin in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Brain Research*, 619(1-2), 111–119. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4812781>

- Gibbs, M. E., Hutchinson, D., & Hertz, L. (2008). Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(5), 927–944. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.02.001>
- Gobatto, C. A., De Mello, M. a R., Sibuya, C. Y., De Azevedo, J. R. M., Dos Santos, L. A., & Kokubun, E. (2001). Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 130(1), 21–27. [http://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00362-2](http://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00362-2)
- Gomes, F. C. A., Tortelli, V. P., & Diniz, L. (2013). Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. *Estudos Avançados*, 27(77), 61–84. <http://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100006>
- Gómez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R. R., Molteni, R., & Edgerton, V. R. (2002). Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *Journal of Neurophysiology*, 88(5), 2187–2195. <http://doi.org/10.1152/jn.00152.2002>
- Gould, T., Dao, D., & Kovacsics, C. (2009). The open field test. *Mood and Anxiety Related Phenotypes ...*, (July), 1–9. Retrieved from <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf> http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60761-303-9_1
- Gwak, Y. S., Kang, J., Leem, J. W., & Hulsebosch, C. E. (2007). Spinal AMPA receptor inhibition attenuates mechanical allodynia and neuronal hyperexcitability following spinal cord injury in rats. *Journal of Neuroscience Research*, 85(11), 2352–2359. <http://doi.org/10.1002/jnr>
- Haber, M., Zhou, L., & Murai, K. K. (2006). Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(35), 8881–8891. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1302-06.2006>
- Halperin, JM and Healey, D. (2011). NIH Public Access. *Neurosci Biobehav*, 35(3), 621–634. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.006>.The
- HOLSCHNEIDER, D. P., YANG, J., GUO, Y., & MAAREK, J.-M. I. (2007). Reorganization of functional brain maps after exercise training : Importance of cerebellar-thalamic-cortical pathway. *Brain Research*, 1184, 96–107. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=19904371>
- Hong, Q., Wang, Y. P., Zhang, M., Pan, X. Q., Guo, M., Li, F., ... Chi, X. (2011). Homer expression in the hippocampus of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Molecular Medicine Reports*, 4(4), 705–712. <http://doi.org/10.3892/mmr.2011.479>
- Hopkins, M. E., Sharma, M., Evans, G. C., & Bucci, D. J. (2009). Voluntary physical exercise alters attentional orienting and social behavior in a rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Behavioral Neuroscience*, 123(3), 599–606. <http://doi.org/10.1037/a0015632>
- Hu, X., Pandolfi, P. P., Li, Y., Koutcher, J. a, Rosenblum, M., & Holland, E. C. (2005). mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT

signaling in glioblastoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(4), 356–368.
<http://doi.org/10.1593/neo.04595>

Kantak, K. M., Singh, T., Kerstetter, K. a, Dembro, K. a, Mutebi, M. M., Harvey, R. C., ... Dvoskin, L. P. (2008). Advancing the spontaneous hypertensive rat model of attention deficit/hyperactivity disorder. *Behavioral Neuroscience*, 122(2), 340–357.
<http://doi.org/10.1037/0735-7044.122.2.340>

KATZ, V. L. (n.d.). Exercise in water during pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 46(2), 432–441. Retrieved from
<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14996671>

Katz, V. L. (1996). Water exercise in pregnancy. *Seminars in Perinatology*, 20(4), 285–291. [http://doi.org/10.1016/S0146-0005\(96\)80021-8](http://doi.org/10.1016/S0146-0005(96)80021-8)

Killeen, P. R., Russell, V. A., & Sergeant, J. A. (2013). A behavioral neuroenergetics theory of ADHD. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(4), 625–57.
<http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.02.011>

Kim, H., Lee, S., Kim, S., Yoo, J., & Kim, C. (2007). The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups, 25, 243–249. <http://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.03.003>

Kim, K., Chung, E., Kim, C. J., & Lee, S. (2012). Swimming exercise during pregnancy alleviates pregnancy-associated long-term memory impairment. *Physiology and Behavior*, 107(1), 82–86. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.06.004>

Ko, I., Kim, S., Kim, T., Ji, E., Shin, M., Kim, C., ... Bahn, G. H. O. (2013). Swimming exercise alleviates the symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder in spontaneous hypertensive rats, 393–400. <http://doi.org/10.3892/mmr.2013.1531>

Korcok, J., Dixon, S. J., Lo, T. C. Y., & Wilson, J. X. (2003). Differential effects of glucose on dehydroascorbic acid transport and intracellular ascorbate accumulation in astrocytes and skeletal myocytes. *Brain Research*, 993(1-2), 201–207. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.09.016>

Kramer, a F., Hahn, S., Cohen, N. J., Banich, M. T., McAuley, E., Harrison, C. R., ... Colcombe, a. (1993). Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature*, 400(6743), 418–419. <http://doi.org/10.1038/22682>

Lambourne, K., & Tomporowski, P. (2010). The effect of exercise-induced arousal on cognitive task performance: A meta-regression analysis. *Brain Research*, 1341, 12–24. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.091>

Laurin, D. (2001). Physical Activity and Risk of Cognitive Impairment and Dementia in Elderly Persons. *Archives of Neurology*, 58(3), 498–504.
<http://doi.org/10.1001/archneur.58.3.498>

Lee, D. N., Craig, C. M., & Grealy, M. a. (1999). Sensory and intrinsic coordination of movement. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 266(1432), 2029–2035. <http://doi.org/10.1098/rspb.1999.0882>

- Lee, H. H., Kim, H., Lee, J. W., Kim, Y. S., Yang, H. Y., Chang, H. K., ... Kim, C. J. (2006). Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. *Brain and Development*, 28(3), 147–154. <http://doi.org/10.1016/j.braindev.2005.05.007>
- Liu, D.-Y., Shen, X.-M., Yuan, F.-F., Guo, O.-Y., Zhong, Y., Chen, J.-G., ... Wu, J. (2014). The Physiology of BDNF and Its Relationship with ADHD. *Molecular Neurobiology*. <http://doi.org/10.1007/s12035-014-8956-6>
- Maltezos, S., Horder, J., Coghlan, S., Skirrow, C., Gorman, R. O., Lavender, T. J., ... Xenitidis, K. (2014). Glutamate / glutamine and neuronal integrity in adults with ADHD : a proton MRS study, (October 2013). <http://doi.org/10.1038/tp.2014.11>
- Marcelino, T. B., Longoni, a., Kudo, K. Y., Stone, V., Rech, a., De Assis, a. M., ... Matté, C. (2013). Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience*, 246, 28–39. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.04.043>
- Marques-Aleixo, I., Oliveira, P. J., Moreira, P. I., Magalhães, J., & Ascensão, A. (2012). Physical exercise as a possible strategy for brain protection: Evidence from mitochondrial-mediated mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 99(2), 149–162. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.08.002>
- Matsuno, a Y., Esrey, K. L., Perrault, H., & Koski, K. G. (1999). Low intensity exercise and varying proportions of dietary glucose and fat modify milk and mammary gland compositions and pup growth. *The Journal of Nutrition*, 129(6), 1167–1175.
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4S Suppl), 1007S–15S.
- Molteni, R., Wu, a., Vaynman, S., Ying, Z., Barnard, R. J., & Gómez-Pinilla, F. (2004). Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*, 123(2), 429–440. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.09.020>
- Netto, C. a, Dias, R. D., & Izquierdo, I. (1985). Interaction between consecutive learnings: inhibitory avoidance and habituation. *Behavioral and Neural Biology*, 44(3), 515–520. [http://doi.org/10.1016/S0163-1047\(85\)91048-9](http://doi.org/10.1016/S0163-1047(85)91048-9)
- Noakes, T. D., St Clair Gibson, a, & Lambert, E. V. (2005). From catastrophe to complexity: a novel model of integrative central neural regulation of effort and fatigue during exercise in humans: summary and conclusions. *British Journal of Sports Medicine*, 39(2), 120–124. <http://doi.org/10.1136/bjism.2003.010330>
- Oades, R. D., Dauvermann, M. R., Schimmelmann, B. G., Schwarz, M. J., & Myint, A. (2010). Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and glial integrity : S100B , cytokines and kynurenine metabolism - effects of medication, 1–14.
- Okubo, Y., Sekiya, H., Namiki, S., Sakamoto, H., Iinuma, S., Yamasaki, M., ... Iino, M. (2010). Imaging extrasynaptic glutamate dynamics in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 6526–6531. <http://doi.org/10.1073/pnas.0913154107>

- Oliff, H., Oliff, H. S., & Berchtold, N. C. (1998). Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor ž BDNF / transcripts in the rat hippocampus, (NOVEMBER). [http://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00222-8](http://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00222-8)
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, 32(8), 421–431. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.001>
- POLLEY, B. A., WING, R. R., & SIMS, C. J. (n.d.). Randomized controlled trial to prevent excessive weight gain in pregnant women. *International Journal of Obesity*, 26(11), 1494–1502. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14394364>
- Raber, J., Rola, R., LeFevour, A., Morhardt, D., Curley, J., Mizumatsu, S., ... Fike, J. R. (2004). Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiation Research*, 162(1), 39–47. <http://doi.org/10.1667/RR3206>
- Robinson, a M., & Bucci, D. J. (2013). Physical exercise during pregnancy improves object recognition memory in adult offspring. *Neuroscience*, 256C, 53–60. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.012>
- Rohde, L. a, & Halpern, R. (2004). Transtorno de déficit de atenção / hiperatividade : atualização Recent advances on attention deficit / hyperactivity disorder. *Jornal de Pediatria*, 24(4), 61–70. <http://doi.org/10.1590/S0021-75572004000300009>
- Rothstein, J. D., Patel, S., Regan, M. R., Haenggeli, C., Huang, Y. H., Bergles, D. E., ... Fisher, P. B. (2005). Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 433(7021), 73–77. <http://doi.org/10.1038/nature03180>
- Ruggiero, R. N., Bueno, L. S., De Ross, J. B., Fachim, H. a., Padovan-Neto, F. E., Merlo, S., ... Moreira, J. E. (2011). Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: Aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. *Medicina*, 44(2), 127–140.
- Russell, V. A. (2007). Reprint of “Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder.” *Journal of Neuroscience Methods*, 166(2). <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.12.020>
- Sagvolden, T. (2000). Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(1), 31–39. [http://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00058-5](http://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00058-5)
- Sagvolden, T., Johansen, E. B., Wøien, G., Walaas, S. I., Storm-Mathisen, J., Bergersen, L. H., ... Faraone, S. V. (2009). The spontaneously hypertensive rat model of ADHD - The importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacology*, 57(7-8), 619–626. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.08.004>

- Sagvolden, T., Russell, V. a., Aase, H., Johansen, E. B., & Farshbaf, M. (2005). Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, 57(11), 1239–1247. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.02.002>
- Sanches, E. F., Arteni, N. S., Nicola, F., Boisserand, L., Willborn, S., & Netto, C. a. (2013). Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience*, 237, 208–215. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.066>
- Sanches, E. F., Arteni, N. S., Spindler, C., Moysés, F., Siqueira, I. R., Perry, M. L., & Netto, C. A. (2012). Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. *Brain Research*, 1438, 85–92. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.024>
- Sandau, U. S., Alderman, Z., Corfas, G., Ojeda, S. R., & Raber, J. (2012). Astrocyte-Specific Disruption of SynCAM1 Signaling Results in ADHD-Like Behavioral Manifestations, 7(4). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036424>
- Schinder, a. (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends in Neuroscience*, 23(12), 639–645.
- Seidell, J. C., Ph, D., & Mechelen, W. Van. (2009). During Pregnancy, 18(10), 84–90.
- Solanto, M. V., & Conners, C. K. (1982). A dose-response and time-action analysis of autonomic and behavioral effects of methylphenidate in attention deficit disorder with hyperactivity. *Psychophysiology*, 19(6), 658–667.
- Sontag, T. a., Tucha, O., Walitza, S., & Lange, K. W. (2010). Animal models of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): A critical review. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, 2(1), 1–20. <http://doi.org/10.1007/s12402-010-0019-x>
- Swain, R. a., Harris, a. B., Wiener, E. C., Dutka, M. V., Morris, H. D., Theien, B. E., ... Greenough, W. T. (2003). Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience*, 117(4), 1037–1046. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00664-4](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00664-4)
- Theodosios, D. T., Poulain, D. a, & Oliet, S. H. R. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological Reviews*, 88(3), 983–1008. <http://doi.org/10.1152/physrev.00036.2007>
- Thomazi, A. P., Godinho, G. F. R. S., Rodrigues, J. M., Schwalm, F. D., Frizzo, M. E. S., Moriguchi, E., ... Wofchuk, S. T. (2004). Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: Sensitivity to guanosine. *Mechanisms of Ageing and Development*, 125(7), 475–481. <http://doi.org/10.1016/j.mad.2004.04.005>
- Todd, R. D., & Botteron, K. N. (2001). Is attention-deficit/hyperactivity disorder an energy deficiency syndrome? *Biological Psychiatry*, 50(3), 151–158. [http://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01173-8](http://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01173-8)
- Uda, M., Ishido, M., Kami, K., & Masuhara, M. (2006). Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Research*, 1104(1), 64–72. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.066>

- Van Praag, H. (2008). Neurogenesis and exercise: Past and future directions. *NeuroMolecular Medicine*, 10(2), 128–140. <http://doi.org/10.1007/s12017-008-8028-z>
- Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neuroscience*, 2(3), 266–270. <http://doi.org/10.1038/6368>
- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., & Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(38), 8680–8685. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005>
- Verkhatsky, A., Noda, M., & Parpura, V. (2013). Sodium Calcium Exchange: A Growing Spectrum of Pathophysiological Implications. *Adv Exp Med Biol*, 961, 295–305. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-4756-6>
- Warton, F. L., Howells, F. M., & Russell, V. a. (2009). Increased glutamate-stimulated release of dopamine in substantia nigra of a rat model for attention-deficit/hyperactivity disorder-lack of effect of methylphenidate. *Metabolic Brain Disease*, 24(4), 599–613. <http://doi.org/10.1007/s11011-009-9166-1>
- Winstanley, C. a., Eagle, D. M., & Robbins, T. W. (2006). Behavioral models of impulsivity in relation to ADHD: Translation between clinical and preclinical studies. *Clinical Psychology Review*, 26(4), 379–395. <http://doi.org/10.1016/j.cpr.2006.01.001>
- Zoladz, J. a, Pilc, a, & Pilc, J. (2010). The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies. *J Physiol Pharmacol*, 61(16), 533–541. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6251-09.2010>