

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO GESTACIONAL NO
COMPORTAMENTO E NA NEUROPLASTICIDADE DA PROLE SUBMETIDA
A UM MODELO DE SEPARAÇÃO MATERNA

Adriana Souza dos Santos

Porto Alegre
2019

Adriana Souza dos Santos

EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO GESTACIONAL NO
COMPORTAMENTO E NA NEUROPLASTICIDADE DA PROLE SUBMETIDA
A UM MODELO DE SEPARAÇÃO MATERNA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lenir Orlandi
Pereira Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone
Marcuzzo

Porto Alegre
2019

*Dedico este trabalho aos animais utilizados nesta pesquisa, os principais
colaboradores na aquisição do conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre me deu coragem para questionar a realidade e propor sempre um mundo de possibilidades.

As pessoas mais importantes da minha vida: minha família. Pai, mãe, amo vocês de uma maneira inexplicável. Agradeço por sempre estarem ao meu lado em todas as dificuldades, alegrias e o mais doloroso sentimento: a saudade. A minha avó Eunice, que mesmo longe sempre me deu todo o carinho do mundo, se preocupando e orando por mim. A minha irmã Juliana, obrigada por todo o apoio, as conversas, sinto muito a sua falta e não me imagino em um mundo onde você não está presente. A minha tia Fátima e meu primo Lucas sempre presentes na minha vida. A minha avó Ercília e meu avô Everton, obrigada pelas orações e por todo o carinho. Eu amo vocês infinitamente, mesmo estando longe, meu coração sempre estará perto.

Meus sinceros agradecimentos a minha mãe científica Prof. Dra. Lígia Aline Centenaro. Obrigada por compartilhar comigo sua vasta experiência científica, por todo carinho, amizade e por me ensinar a ser uma pessoa infinitamente melhor.

Agradeço muito aos membros da banca por todas as contribuições valiosas nesse trabalho: Prof. Dr. Ângelo Piato, Prof. Dra. Natividade e Prof. Dra. Patrícia Nascimento.

A primeira pessoa que me recebeu na UFRGS Prof. Dra. Simone Marcuzzo, muito obrigada pela oportunidade e pela confiança depositada em mim.

A minha orientadora Prof. Dra. Lenir Orlandi Pereira, que me acolheu de uma maneira surpreendente no LG. Obrigada pela sua disponibilidade e seu incentivo, fundamentais para o desenvolvimento desse estudo. Sou grata pelo seu apoio incondicional, sempre interessada, extraordinária, pertinente e com muita paciência (hehehe). Suas críticas construtivas que possibilitaram discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Não posso esquecer a sua grande contribuição para o meu crescimento pessoal em

questões de convívio e trabalho em equipe. Minha trajetória no mestrado certamente foi mais feliz com sua orientação.

Aos meus colegas de laboratório que posteriormente (de uma maneira muito rápida) se tornaram meus amigos e minha família em Porto Alegre. Ao meu irmão do coração Wellington que me acompanha desde a graduação e agora na pós-graduação também, confio em ti de olhos fechados, obrigada pela amizade. A minha cunhada e minha amiga Bruna, sempre com as melhores risadas e conversas, e que ainda de quebra me deu sobrinhas lindas..amo vocês casal!!! Agradeço a Ethiane, que me acolheu logo que me mudei, dividimos apartamento e uma amizade maravilhosa. Você merece o mundo Ethão! A Heloisa, que sempre alegra meus dias e me da os melhores conselhos, obrigada por estar/permanecer na minha vida! A Pathy que também teve sua parcela de contribuição na minha transição Cascavel/Porto Alegre e nos aprendizados diários no laboratório. As nossas ICs sensacionais que contribuíram de maneira gigantesca neste trabalho e que enchem meu coração de orgulho e amor: Aline, Loise e Nati. Muito obrigada.

Minha gratidão aos colegas do PPG Neurociências e a todos os professores e funcionários do programa (Andréia, muito obrigada!!!) que de alguma forma contribuiriam para a minha formação.

Finalmente, agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório – CREAL e a todos os funcionários, e ao CNPq por todo auxílio estrutural e financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Estresse no início da vida	2
1.2 Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH)	5
1.3 Exercício físico	8
1.4 Exercício físico gestacional	9
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 ARTIGO.....	15
4. DISCUSSÃO GERAL	42
4.1 A separação materna causou comportamento hiperativo/impulsivo	43
4.2 O exercício resistido gestacional atenua as alterações comportamentais na prole submetida à separação materna.....	45
4.3 Separação materna e exercício gestacional causam alterações em parâmetros de estresse oxidativo	46
4.4 Separação materna causa perda neuronal no CPF em filhotes machos	47
4.5 Exercício resistido gestacional reverte a perda neuronal no CPF de filhotes machos submetidos a eventos estressores no início da vida	48
4.6 Efeito dependente do sexo em ratos submetidos à SM	49
5.CONCLUSÕES	51
6. ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO CEUA.....	52
6. REFERÊNCIAS.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ADT – antidepressivos tricíclicos

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

COMT –catecolO-metiltransferase

CPF – córtex pré-frontal

DAT –transportador de dopamina

DNMTs – do inglês *DNA Methyltransferases*

EROs –espécies reativas de oxigênio

HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal

OMS – OrganizaçãoMundial da Saúde

SM – separação materna

TDAH – transtorno do déficit de atenção e hiperatividade

Resumo

Situações estressantes e aborrecimentos diários são uma parte normal da vida cotidiana. Durante os primeiros períodos de desenvolvimento, as crianças não têm controle sobre os estressores de suas vidas, como abuso materno, abandono, divórcio dos pais, entre outros. Em períodos críticos do desenvolvimento tais situações estressantes podem resultar em neuropsicopatologias na idade adulta. A separação materna (SM) é um modelo animal bem estabelecido de estresse no início da vida, amplamente utilizado para imitar várias psicopatologias. Por outro lado, evidências promissoras apontam o exercício físico materno como a chave para prevenir vários distúrbios que afetam o sistema nervoso central, mas não há estudos mostrando seus efeitos na saúde da prole. Com isso, o objetivo deste estudo foi investigar se o exercício resistido durante a gestação é capaz de bloquear os possíveis efeitos deletérios causados pela SM sobre o comportamento e a neuroplasticidade da prole. Ratas prenhas realizaram exercício resistido durante todo o período gestacional, onde escalaram uma escada inclinada com um peso preso à cauda, 3 vezes por semana. No dia do nascimento dos filhotes (P0), machos e fêmeas foram divididos em 4 grupos experimentais (n= 10): 1) filhotes de mães sedentárias (SED), 2) filhotes de mães exercitadas durante a gravidez (EXE), 3) filhotes submetidos ao estresse no início da vida (ELS) e 4) filhotes de mães exercitadas e submetidos ao estresse no início da vida (ELS+EXE). Do P1 ao P10, os filhotes dos grupos 3 e 4 foram separados de suas mães durante 3 horas/dia. A partir do P30 foram realizados testes de labirinto em cruz elevado, campo aberto e preferência à sacarose. No P38, os filhotes foram eutanasiados e amostras do córtex pré-frontal foram coletadas. Análises de estresse oxidativo e dano tecidual por meio da coloração de Nissl foram realizadas. Nossos resultados demonstram que filhotes machos são mais susceptíveis ao estresse no início da vida do que as fêmeas, apresentando um comportamento impulsivo e hiperativo similar aquele visto em crianças com TDAH. Esse comportamento foi atenuado pelo exercício resistido gestacional. Adicionalmente, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi observada nos filhotes machos submetidos a SM e aqueles cujas mães realizaram exercício resistido durante a gestação. Esse aumento nas EROs foi capaz de causar uma perda neuronal no córtex pré-frontal dos filhotes machos, o que foi bloqueado pelo exercício resistido gestacional. Nossos achados demonstram pela primeira vez que o exercício resistido realizado durante o período gestacional previne os prejuízos causados pelo estresse no início da vida em ratos machos, os quais parecem ser mais susceptíveis que as fêmeas.

Palavras-chave: Impulsividade, hiperatividade, estresse no início da vida, dano tecidual.

Abstract

Stressful situations and daily hassles are a normal part of day-to day-life. During early periods of development, children do not have control over the stressors in their lives, such as maternal abuse, abandonment, divorce from parents, among others. Such stressful situations in critical periods of development can result in neuropsychopathologies in adulthood. Maternal separation (MS) is a well-established animal model of early-life stress, widely used to mimic various psychopathologies. On the other hand, promising evidence points to maternal physical exercise as the key to preventing various disorders that affect the central nervous system, but there are no studies showing its effects on offspring health. Thus, the aim of this study was to investigate whether resistance exercise during pregnancy is able to prevent the possible deleterious effects caused by MS on the behavior and neuroplasticity of offspring. Pregnant rats performed resistance exercise throughout the gestational period, where they climbed a sloping ladder with a weight attached to their tail 3 times a week. On the day of birth of pups (P0), males and females were divided into 4 experimental groups (n = 10): 1) pups of sedentary mothers (SED), 2) pups of mothers exercised during pregnancy (EXE), 3) pups subjected early-life stress (ELS) and 4) pups of mothers exercised and subjected early-life stress (ELS + EXE). From P1 to P10, pups from groups 3 and 4 were separated from their mothers for 3 hours/day. From P30 the Elevated Plus Maze, Open Field, and Sucrose Preference Test were performed and in P38 the pups were euthanized, and prefrontal cortex samples were collected. Oxidative stress and tissue damage analysis by *Nissl* staining were performed. Our results demonstrate that male pups are more susceptible to early-life stress than females, showing impulsive and hyperactive behavior similar to that seen in children with ADHD. This behavior was attenuated by the gestational resistance exercise. Additionally, an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) was observed in male pups submitted to MS and those whose mothers performed resistance exercise during pregnancy. This increase in ROS was able to cause neuronal loss in the prefrontal cortex of male pups, which was completely reversed by the resisted gestational exercise. Our findings demonstrate for the first time that resistance exercise performed during pregnancy prevents early-life stress damage in male rats, which appear to be more susceptible than females.

Keywords: Impulsivity, hyperactivity, early life stress, tissue damage.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse no início da vida

Situações estressoras no início da vida, como distúrbios no relacionamento entre pais e filhos, discórdia conjugal dos pais, separação social, abuso e disfunção familiar demonstraram afetar a função cognitiva e a emocionalidade além de estar amplamente associados ao desenvolvimento de diversas neuropsicopatologias na vida adulta (BANERJEE; MIDDLETON; FARAONE, 2007; BIEDERMAN et al., 1995; GIACHINO et al., 2007; KIM et al., 2007; PRYCE et al., 2005). Essas adversidades no início da vida alteram diversas áreas encefálicas sensíveis ao estresse como o hipocampo e amígdala e áreas frontais corticais (BAVA; TAPERT, 2010; ENOCH, 2011; GUERRI; PASCUAL, 2010). O córtex pré-frontal (CPF) está relacionado com função executiva, memória, atenção e aprendizado. Alterações nestas funções bem como o aumento da impulsividade regulada CPF pelo foram relatadas em adultos que experienciaram adversidades do início da vida (LOVALLO, 2013; MCCRORY; DE BRITO; VIDING, 2010). Da mesma forma, estudos em animais mostraram que a exposição ao estresse precoce produziu prejuízos estruturais e funcionais no CPF, resultando em déficits cognitivos (BAUDIN et al., 2012).

Estudos demonstram que crianças expostas à privação materna, por morte ou separação apresentam maior risco de desenvolver transtornos neuropsiquiátricos, como o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (CLASS et al., 2014; TYRKA et al., 2008). As bases biológicas de muitos destes transtornos têm sido fortemente associadas a modificações epigenéticas, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e alterações no status oxidativo que, por sua vez, pode causar alterações na ramificação dendrítica, morte neuronal, diminuição dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e da neurogênese no encéfalo dos descendentes (ARCHANA et al., 2012; NESTLER et al., 2002).

O paradigma de privação / separação materna (SM) é um modelo animal bem estabelecido de estresse no início da vida (do inglês *Early-life stress - ELS*), muito utilizado para mimetizar diversas condições como esquizofrenia (ALEKSIĆ et al., 2016), depressão e ansiedade (DANIELS et al., 2004). Todavia, alguns estudos experimentais vêm utilizando esse paradigma relatando alterações de impulsividade e hiperatividade semelhantes aqueles observados em indivíduos com TDAH (COLORADO et al., 2006; GONZALEZ-

LIMA; SADILE, 2000). O aparecimento de diferentes fenótipos depende de uma variedade de manipulações pós-natais como uma separação única ou repetida, a duração da separação e as condições circadianas e térmicas (PRYCE et al., 2005; RÜEDI-BETTSCHEIN et al., 2005). Arnold e Siviy (2002) relataram comportamento hiperativo em um grupo animais separados das mães durante 3 horas por dia, nas duas primeiras semanas de vida, mas não em um grupo de animais apenas privados das mães durante 15 minutos por dia(ARNOLD; SIVIY, 2002). Alguns protocolos de ELS induzem comportamentos de risco evidenciados por maior permanência em zonas expostas do teste campo aberto,além de um comportamento impulsivo identificado por aumento da locomoção semelhante àquele encontrado em modelos animais de TDAH (BRAUN et al., 2003; COLORADO et al., 2006; GONZALEZ-LIMA; SADILE, 2000; JIMÉNEZ-VASQUEZ et al., 2001; KING et al., 2000). Desta forma, os animais submetidos ao ELS são mais ativos e exibem mais comportamentos de risco em ambientes novos (BRAKE et al., 2004; PROULX et al., 2014).

Para alguns indivíduos, tais experiências adversas no início da vida podem aumentar o risco de desenvolver obesidade na idade adulta através de mecanismos associados ao estresse(FARR et al., 2015; HEMMINGSSON, 2018; OSADCHIY et al., 2019). Em modelos animais, sabe-se que o aumento no consumo de sacarose e aspartame estão relacionados a um comportamento alimentar considerado compulsivo(BABBS et al., 2018; SMAIL-CREVIER et al., 2018). Ramos e colaboradores demonstraram em seu estudo que o estresse no início da vida foi capaz de aumentar o consumo de sacarose e aspartame, indicando que estes animais apresentam uma maior preferência pela ingestão de alimentos palatáveis e calóricos (AYA-RAMOS et al., 2017).

Qualquer fator ou evento estressor que ameace os processos homeostáticos evoca uma resposta que geralmente promove adaptação, mas também pode liderar processos fisiopatológicos quando essa resposta é excessiva e desregulada. O encéfalo é o órgão central da regulação do estresse,pois determina o que está ameaçando e coordena as respostas fisiológicas e comportamentais aos estressores. Da mesma forma, o encéfalo também é alvo destas respostas, o que está fortemente associado à fisiopatologia e etiologia de alguns transtornos mentais, como transtornos do humor e transtornos de ansiedade (MAJCHER-MAŚLANKA et al., 2018;

MCEWEN et al., 2015; MCEWEN; NASCA; GRAY, 2016). Numerosos estudos experimentais revelam que o estresse no início da vida está fortemente associado com alterações consistentes no CPF, como diminuição no número de neurônios e aumento de células da glia (MAJCHER-MAŚLANKA et al., 2018; TEICHER; SAMSON, 2016).

Desequilíbrio no status oxidativo também é característico em indivíduos com TDAH bem como em modelos de ELS (ARCHANA et al., 2012; CEYLAN et al., 2010, 2012). O encéfalo, que é particularmente suscetível a essas alterações devido ao alto consumo de oxigênio, acaba sofrendo diversos danos teciduais em consequência da geração de radicais livres, mecanismos de defesa antioxidantes insuficientes e excitotoxicidade (HERBORN et al., 2014). Existem diversas estratégias experimentais para mensurar o estresse oxidativo em tecidos biológicos, tais como através da produção de radicais livres pela oxidação química da diclorodifluoresceína (DCFH), pela avaliação da peroxidação lipídica por meio da produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela atividade de enzimas antioxidantes como a SOD e CAT (GUPTA; RADHAKRISHNAN; KURHE, 2015; HOLLAND et al., 2014; KI MOORE et al., 2015; SASAKI; LEUTGEB; LEUTGEB, 2015; SPIERS et al., 2013). O desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs: moléculas quimicamente reativas formadas como um subproduto natural do metabolismo do oxigênio) e a capacidade dos sistemas antioxidantes de neutralizá-los (conhecido como desequilíbrio redox) pode induzir estresse oxidativo, uma característica bem conhecida de numerosos transtornos neuropsiquiátricos, incluindo o TDAH (SORCE; KRAUSE, 2009). No SNC, as EROs desempenham um papel fisiológico importante (CAMPESE et al., 2004), no entanto, o aumento de EROs é conhecido por resultar em uma maior suscetibilidade do tecido cerebral a lesões, acionando numerosas cascatas moleculares que, por sua vez, levam a um aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica, alterações da morfologia cerebral, neuroinflamação e morte neuronal (GU; DEE; SHEN, 2011)

Como descrito anteriormente, o ELS tem consequências ao longo da vida e está associado a um significativo aumento do risco de desenvolvimento de doenças mentais, incluindo ansiedade e depressão (ANDA et al., 2006; FELITTI et al., 2019). As mulheres correm um risco maior de desenvolver

essas patologias associada ao estresse com uma razão de risco feminino / masculino de 2:1 (KESSLER, 2003; REYNOLDS et al., 2015). Porém, tais diferenças de sexo vão além da taxa de prevalência, pois elas também existem na manifestação dos sintomas, início, curso da doença e eficácia do tratamento (RAMPP et al., 2018; VAN LOO et al., 2018). Apesar das disparidades significativas de sexo nas patologias associadas ao estresse, os mecanismos de apoio à suscetibilidade feminina são amplamente desconhecidos. Os modelos animais representam ferramenta muito útil para elucidar os mecanismos envolvidos nas diferenças sexuais, porém, poucos estudos testaram fêmeas nos modelos ELS, e menos ainda recapitulam o viés sexual associado aos resultados negativos.

1.2 Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH)

O TDAH é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns com início na infância, com um curso crônico associado à alta disfunção e morbidade ao longo da vida apresentando uma prevalência mundial estimada em 7,2% enquanto no Brasil essa taxa varia amplamente entre 5,8 e 17,1%, (VASCONCELOS et al., 2003; FONTANA et al., 2007; BERGER, 2011). Geralmente o TDAH é aceito como tendo uma base genética, mas as influências ambientais também são relatadas como fatores contribuintes. A herdabilidade estimada do TDAH varia de 75 a 90%; a variação restante no fenótipo de TDAH (10-25%) seria amplamente atribuída a fatores ambientais. Com relação aos fatores genéticos, ainda não existe nenhum polimorfismo associado ao TDAH. Porém, grande parte dos estudos tem enfoque em genes associados com a sinalização dopaminérgica, uma vez que o sistema dopaminérgico apresenta um papel crucial na fisiopatologia do TDAH. Variações genéticas em receptores dopaminérgicos (DRD2, DRD4, DRD5), na enzima CatecolO-Metiltransferase (COMT), e no transportador de dopamina (DAT1) foram associados com o diagnóstico do transtorno (GIZERET et al., 2009).

Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o TDAH é caracterizado por sinais de desatenção, impulsividade, comprometimento da inibição e hiperatividade, o que acarreta diversos

problemas na vida cotidiana, social, acadêmica e ocupacional (GHANIZADEH; SALEHI; MOEINI, 2019). Além disso, estudos demonstram que crianças com TDAH podem apresentar alterações mais específicas em funções cognitivas superiores, também chamada de função executiva (BARKLEY; FISCHER, 2010). Esses déficits podem afetar a memória de trabalho, flexibilidade cognitiva, resposta à inibição e gerar impulsividade (GROEN et al., 2017).

Em cada estágio do desenvolvimento o TDAH está associado com resultados diversos resultados negativos, que podem ser exacerbados pela presença de comorbidades. Em crianças, problemas relacionados com risco de baixo desempenho escolar e baixo desempenho acadêmico, suspensões e expulsões escolares estão fortemente elevados nessa patologia do neurodesenvolvimento. Já em adolescentes, podemos citar más relações entre familiares, abandono escolar, agressão, problemas de conduta e delinquência e experimentação/abuso precoces de substâncias. Finalmente em adultos, elevam-se os riscos de envolvimento em acidentes de carro e violações em alta velocidade, dificuldades nas relações sociais, casamento e emprego (BIEDERMAN et al., 1995; HINSHAW, 2018; KESSLER, 2003). Desta forma, as deficiências vão além da esfera individual, afetando também os vários domínios da vida em família, relações com a comunidade, relacionamentos interpessoais, gerenciamento de dinheiro, atividades de lazer e recreação (BARKLEY; FISCHER, 2010).

A impulsividade e hiperatividade características de pacientes com TDAH podem contribuir para o aumento no uso abusivo de substâncias psicoativas e transtornos alimentares que podem levar à obesidade (BRUNAUT et al., 2019; CORTESE; TESSARI, 2017). De acordo com essa hipótese, estudos anteriores demonstraram que o TDAH está associado a sintomas de compulsão alimentar, transtorno de compulsão alimentar periódica (NAZAR et al., 2016) e perda de controle sobre a alimentação (HILBERT et al., 2018). No que diz respeito às alterações nos padrões alimentares, um mecanismo possivelmente relevante, mas até agora inexplorado, é representado pela compulsão alimentar. O conceito de dependência alimentar, proposto por GEARHARDT e colaboradores (2016), postula que algumas pessoas podem desenvolver um comportamento alimentar aditivo a alimentos altamente palatáveis, ou seja, alimentos ricos em açúcar, gordura, carboidratos e / ou sal (GEARHARDT;

CORBIN; BROWNELL, 2016). Desta forma, o desejo por esses alimentos é uma característica essencial do vício em comida, está associado ao ganho de peso (CONTRERAS-RODRÍGUEZ et al., 2017; ROMO et al., 2018). Portanto, é possível que o TDAH esteja associado a um maior risco de dependência alimentar e de dependência por substâncias ilícitas.

O diagnóstico desse transtorno é realizado através de avaliação clínica, sendo utilizado como principal ferramenta o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM V, *American Psychiatric Association- APA*; DUPAUL; GORMLEY; LARACY, 2013). Para o diagnóstico ser confirmado, os pacientes precisam reportar um mínimo de seis sintomas de desatenção ou de hiperatividade/impulsividade, caracterizados, por exemplo, por dificuldade de sustentar a atenção em tarefas ou atividades lúdicas ou dificuldade em esperar pela sua vez.

O CPF parece desempenhar um papel importante na neurofisiologia do TDAH. Essa área encefálica participa da regulação das funções executivas, inibindo o processamento de estímulos irrelevantes e aumentando o processamento daqueles importantes, assim como inibindo ações inapropriadas e/ou impulsivas (ARNSTEN; PLISZKA, 2011). Dessa forma, alterações nessa região parecem influenciar diretamente nos sintomas de desatenção e hiperatividade/impulsividade. Estudos utilizando neuroimagem apontam que em crianças com TDAH apresentam redução de volume em várias estruturas encefálicas importantes, como o córtex cerebral, CPF, estriado, núcleos da base, giro do cíngulo, corpo caloso e cerebelo. Além disso, essas crianças também apresentam uma menor atividade do assim como um atraso na maturação dessa estrutura CPF (CASTELLANOS, 2002; SEIDMAN; VALERA; MAKRIS, 2005; SHAW et al., 2006). Este atraso foi mais proeminente em regiões pré-frontais importantes para o controle de processos cognitivos, incluindo atenção e planejamento motor (SHAW et al., 2006, 2007).

O tratamento do TDAH pode consistir em terapia farmacológica e/ou comportamental. Independentemente da abordagem, o tratamento é recomendado para todas as crianças, pois o tratamento precoce do TDAH pode produzir um melhor prognóstico e menores problemas na idade adulta, além de melhor relacionamento com pais e professores (CHILDRESS; BERRY, 2012). Os fármacos mais utilizados para o tratamento do TDAH incluem

estimulantes (considerados agentes de primeira linha), como metilfenidato e anfetaminas, e fármacos não estimulantes (considerados agentes alternativos), como atomoxetina e agonistas α -2 de liberação prolongada (guanfacina e clonidina). Além disso, antidepressivos tricíclicos (ADTs), agonistas α -2 de liberação imediata e bupropiona têm sido utilizados *off-label* para tratar os sintomas do TDAH; no entanto, eles são usados apenas se os agentes acima falharem em mostrar benefícios ou não se não puderem ser utilizados (SHARMA; COUTURE, 2014). Recentemente, o exercício físico tem sido proposto como um tratamento alternativo ou adicional para o TDAH. Particularmente para as crianças, o exercício físico é considerado um método seguro e eficaz para gerenciamento de sintomas de TDAH, sugerindo um aliado importante para o tratamento (GAPIN; LABBAN; ETNIER, 2011). Archer e KOSTRZEWA (2012) demonstraram que exercício aeróbico de intensidade moderada reduz os sinais e sintomas do TDAH, incluindo controle de impulsos, falta de atenção, estresse, ansiedade e má conduta (ARCHER; KOSTRZEWA, 2012). Essas reduções foram relacionadas a um nível aumentado de fator neurotrófico que é tipicamente reduzido em pacientes com esse transtorno (DEN HEIJER et al., 2017).

1.3 Exercício físico

A prática regular de atividade física faz parte de um estilo de vida saudável e pode proporcionar inúmeros efeitos benéficos à saúde, como a redução do risco de desenvolvimento de doenças (cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, depressão, obesidade, câncer), aumento da força muscular e densidade óssea, melhora do desempenho sexual e, conseqüentemente, melhora no bem-estar e na qualidade de vida (BORTZ; WALLACE, 1999; BROWN et al., 2012; CIOLAC, 2013). Com isso, o exercício físico é uma subcategoria da atividade física que tem como características ser estruturado, planejado e repetitivo, com objetivo de manter ou melhorar componentes do condicionamento físico, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Ainda, essa organização recomenda a prática diária de no mínimo 30 minutos de exercício físico, como medida de combate ao sedentarismo.

O exercício físico pode ser dividido em dois tipos: aeróbico e anaeróbico. O exercício aeróbico é caracterizado por utilizar o oxigênio como principal fonte de energia, sob a forma de adenosina trifosfato – ATP, para a geração de trabalho muscular. Esse tipo de exercício é geralmente composto de atividades de longa duração e que exigem a utilização de diversos grupos musculares, como a corrida. Já o exercício anaeróbico utiliza duas vias principais como fonte de energia, a fosfogênio ATP-PC, presente nos músculos e utilizada em atividades de força e explosão de muito pouca duração; e a segunda via é a glicolítica, que utiliza o glicogênio presente nos músculos e fígado como fonte energética, são os exercícios com peso (UNESCO, 2013).

Diversos estudos clínicos mostram que o exercício físico traz benefícios a pacientes com ansiedade e depressão, pode atenuar os sintomas do TDAH, bem como reduzir o declínio das habilidades sensório-motoras causado pelo envelhecimento (BERCHICCI et al., 2014; DE ANDRADE et al., 2013). Vários estudos recentes apoiam os benefícios do exercício físico no desempenho cognitivo e no manejo de sintomas comportamentais em crianças com TDAH (GAPIN; LABBAN; ETNIER, 2011; PAN et al., 2017; ZANG, 2019). Após o exercício aeróbico (por exemplo, corrida em esteira, ciclismo) em crianças com TDAH, vários efeitos positivos foram percebidos, como melhora no funcionamento cognitivo (superior), melhora da atenção (com base e melhora na flexibilidade cognitiva (HARTANTO et al., 2016; PONTIFEX et al., 2013). Adicionalmente, o exercício físico é considerado uma medida preventiva para o desenvolvimento ou a exacerbação de várias condições clínicas crônicas, porém, seus efeitos transgeracionais são escassos.

1.4 Exercício físico gestacional

Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram que estímulos ambientais, como o exercício físico, parecem ter uma influência favorável no encéfalo em desenvolvimento (GOMES DA SILVA et al., 2012). O exercício materno durante a gravidez influencia positivamente a saúde fetal, melhorando o desempenho cognitivo dos descendentes durante a infância. Um estudo clássico de CALPP e colaboradores (1996) que avaliou características do desenvolvimento neurológico de crianças aos 5 anos de idade cujas mães realizaram exercício

aeróbico de maneira regular durante a gravidez, demonstrou que essas crianças apresentaram melhor desempenho em testes de inteligência, bem como habilidades de linguagem melhoradas. Em um estudo mais recente, ESTEBAN-CORNEJO e colaboradores (2015) encontraram uma relação positiva entre exercício aeróbico materno antes e durante o período gestacional e melhor desempenho acadêmico dos filhos na juventude, com pontuações altas em matemática e linguagem, comparando-se com filhos de mães que permaneceram sedentárias (ESTEBAN-CORNEJO et al., 2016).

Estudos pré-clínicos com roedores mostram que o exercício aeróbico durante a gravidez pode melhorar as funções cerebrais dos filhotes. Essa melhoria nas funções cerebrais tem sido descrita principalmente em diferentes modelos de atividade física para roedores, como corrida forçada em esteira (AKHAVAN et al., 2008; KIM et al., 2007; PARNPIANSIL et al., 2003), natação forçada (LEE et al., 2006), corrida voluntária com rodas (acesso livre à atividade com rodas) e atividade física voluntária de forma enriquecida no ambiente (KIYONO et al., 1985). Esse efeito benéfico pode ser resultado de alterações epigenéticas. Tais alterações modificam e controlam a estrutura e a função da cromatina e, portanto, medeiam as mudanças na expressão gênica (MENKE; BINDER, 2014). O DNA pode ser metilado via DNA metiltransferases (DNMTs), onde um aumento na metilação do DNA resulta em uma repressão transcricional e uma diminuição terá o efeito oposto na transcrição, ou seja, o seu favorecimento (JAENISCH; BIRD, 2003; MURGATROYD; SPENGLER, 2010). Além disso, sabe-se que o exercício aeróbico melhora o desempenho dos filhotes em tarefas que avaliam a memória aversiva e espacial, aumenta a neurogênese hipocampal e os níveis de BDNF no hipocampo da prole, além de ser capaz de proteger neurônios dessa estrutura contra danos hipóxicos-isquêmicos (LEE et al., 2006; PARNPIANSIL et al., 2003).

Por outro lado, poucos estudos demonstram os efeitos do exercício resistido durante a gestação. FIERIL e cols. (2015) mostraram que o exercício resistido no período gestacional não provocou alterações na prole como peso no dia do nascimento, circunferência da cabeça e escore no APGAR (PETROV FIERIL; GLANTZ; FAGEVIK OLSEN, 2015). No entanto, a prática de exercício resistido no período gestacional ainda é vista com certa estranheza e desaprovação, pois se imagina que essa modalidade possa ser prejudicial à

saúde materna e dos filhos, apesar de ser considerada a terceira atividade física mais praticada no Brasil, ficando atrás apenas da caminhada e futebol (GUIMARÃES LIMA et al., 2019). Historicamente, mulheres grávidas eram consideradas vulneráveis e, portanto, aconselhadas a reduzir seu nível de atividade física. Todavia, em 2002, o Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (do inglês *American College of Obstetricians and Gynecologists* - ACOG) atualizou suas recomendações, indicando a prática de atividade física de intensidade leve à moderada a todas as grávidas, mesmo as sedentárias que desejam iniciá-la durante a gestação. Desta forma, o exercício aeróbico e o exercício resistido são considerados seguros e durante o período gestacional, oferecendo benefícios para a saúde tanto para a mãe quanto para o bebê. Entretanto, não há estudos que evidenciam os efeitos do exercício físico resistido gestacional no comportamento e sistema nervoso da prole, ressaltando a necessidade de compreender sua fisiologia e suas repercussões.

Diversos métodos e equipamentos diferentes foram desenvolvidos para se estudar o exercício resistido em animais (CHOLEWA et al., 2014). Porém, diversos autores questionam a viabilidade de estudar os efeitos deste tipo de exercício por meio de modelos experimentais devido à dificuldade de mimetizar o exercício de força em humanos para animais (LOWE; ALWAYS, 2002; SEO et al., 2014). Buscando essa similaridade, diferentes protocolos de treinamento foram desenvolvidos, como agachamento, salto com resistência em água e esteira resistiva (CHOLEWA et al., 2014). Porém, grande parte destes modelos apresentam uma característica aversiva aos animais, além de não serem considerados exercícios voluntários. Recentemente, tem sido proposta a utilização de uma escada vertical com o intuito de mimetizar uma resposta biológica semelhante encontrada no treinamento de força humana e um treinamento do tipo voluntários para os animais (NETTO; GAMA, 2013). O aparato de treino utilizado consiste em uma escada inclinada (1,1 x 0,8 m) a 80°, onde os animais escalam com um peso acoplado à cauda de maneira voluntária pela escada até uma caixa escura que se encontra no fim do aparato. A cada escalada, o animal realiza cerca de 8-12 movimentos (Figura 1). Esse modelo de exercício resistido é bem estabelecido para o estudo de hipertrofia muscular, porém, os seus efeitos durante a gestação no sistema nervoso da prole ainda não foi descrito.

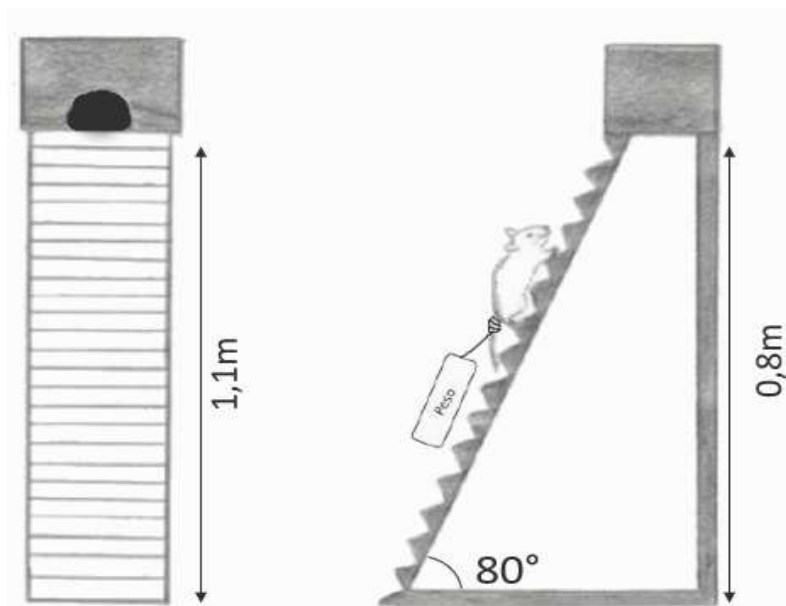


Figura 1 – Aparato utilizado para escalada em escada, adaptado de CHOLEWA et al., 2014.

Com isso, visto que evidências promissoras apontam o exercício resistido durante a gestação como a chave para a prevenção de diversos distúrbios psiquiátricos, considerando a escassez de estudos que mostrem seus efeitos no comportamento e no sistema nervoso da prole, nossa hipótese é que o exercício resistido durante a gestação é capaz de prevenir o comportamento impulsivo e hiperativo, bem como o dano tecidual em filhotes machos e fêmeas submetidos ao estresse no início da vida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo geral investigar se o exercício resistido durante a gestação é capaz de bloquear os possíveis efeitos deletérios causados pela separação materna sobre o comportamento e a neuroplasticidade da prole.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos do exercício resistido gestacional na prole submetida a um modelo de separação materna, analisando:

- a) O comportamento do tipo ansioso por meio do teste labirinto em cruz elevado;
- b) A atividade exploratória através do teste campo aberto;
- c) O comportamento alimentar compulsivo utilizando o teste de preferência por sacarose;
- d) O dano tecidual no córtex pré-frontal (CPF) através da coloração de *Nissl*;
- e) O estresse oxidativo por meio dos níveis de nitritos, da oxidação da 2'7' diclorofluoresceína, determinação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, conteúdo total de sulfidrilas e a atividade e imunoc conteúdo das enzimas antioxidantes SOD e CAT no CPF.

3 ARTIGO

**Maternal Separation Causes Impulsive Behavior and Neuronal Death in
Rats that is reversed by Resistance Exercise during Pregnancy**

Adriana Souza dos Santos, Ethiane Segabinazi, Wellington de Almeida, Aline Martins Faustino, Loise Bronauth, Tiago Marcon dos Santos, Fernanda Silva Ferreira, Angela Wyse, Simone Marcuzzo, Lenir Orlandi Pereira.

A ser submetido ao periódico *Brain Research*.

1. Introduction

Stressful situations at the beginning of life, such as disturbances in the relationship between parents and children, marital discord between parents, social separation, abuse and family dysfunction have been shown to affect cognitive function and emotionality, in addition to being widely associated with the development of several neuropsychopathologies in adult life (BANERJEE; MIDDLETON; FARAONE, 2007; BIEDERMAN et al., 1995; GIACHINO et al., 2007; KIM et al., 2007; PRYCE et al., 2005). These adversities early in life alter several brain areas sensitive to stress such as the hippocampus and amygdala and frontal cortical areas (BAVA; TAPERT, 2010; ENOCH, 2011; GUERRI; PASCUAL, 2010).

The maternal deprivation/separation (MS) paradigm is a well-established animal model of early-life stress (ELS), widely used to mimic various conditions such as schizophrenia (ALEKSIĆ et al., 2016), depression and anxiety (DANIELS et al., 2004). However, some experimental studies have been using this paradigm reporting changes in impulsivity and hyperactivity similar to those observed in individuals with Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD); COLORADO et al., 2006; GONZALEZ-LIMA; SADILE, 2000). The PFC seems to play an important role in ADHD neurophysiology. Thus, changes in this region seem to directly influence the symptoms of inattention and hyperactivity/impulsivity. Experimental studies reveal that MS is strongly associated with changes in PFC, such as increased oxidative stress, which consequently generates high level of free radicals and insufficient antioxidant defense, resulting in excitotoxicity (HERBORN et al., 2014). Thereby, the brain, which is particularly susceptible due to high oxygen consumption, can present intense neuronal loss and increase in glial cell number (TEICHER AND SAMSON, 2016; MASLANKA et al., 2018) resulting in impaired executive function, learning and memory (MCCRORY et al. 2010), as well as increased impulsivity (LOVALLO, 2013).

For some individuals, such adverse experiences early in life may increase the risk of developing obesity in adulthood through mechanisms associated with stress (FARR et al., 2015; HEMMINGSSON, 2018; OSADCHIY et al., 2019). In animal models, it is known that the increase in consumption of

sucrose and aspartame is related to eating behavior considered compulsive (BABBS et al., 2018; SMAIL-CREVIER et al., 2018). Ramos and colleagues demonstrated in their study that early life stress was able to increase the consumption of sucrose and aspartame, indicating that these animals have a greater preference for eating palatable and caloric foods (AYA-RAMOS et al., 2017).

As previously described, ELS has lifelong consequences and is associated with a significant increase in the risk of developing mental illness, including anxiety and depression (ANDA et al., 2006; FELITTI et al., 2019). Women are at a higher risk of developing these pathologies associated with stress with a female / male risk ratio of 2: 1 (KESSLER, 2003; REYNOLDS et al., 2015). However, such gender differences go beyond the prevalence rate, as they also exist in the manifestation of symptoms, onset, disease course and treatment effectiveness (RAMPP et al., 2018; VAN LOO et al., 2018). Despite the significant gender disparities in pathologies associated with stress, the mechanisms to support female susceptibility are largely unknown. Animal models represent a very useful tool to elucidate the mechanisms involved in sexual differences, however, few studies have tested females in ELS models, and even fewer recapitulate the sexual bias associated with negative results.

In contrast, clinical and preclinical studies demonstrate that beneficial environmental stimuli, such as exercise, appear to have a favorable influence on the developing brain (GOMES DA SILVA et al., 2012). Many studies have shown the effects of aerobic exercise during pregnancy. Treadmill exercise as well as swimming in rats during pregnancy improves pups performance in tasks that assess aversive and spatial memory, increase neurogenesis and BDNF levels in the hippocampus, and is able to protect neurons against hypoxic-ischemic damage (PARNPIANSIL et al., 2003; LEE et al., 2006). These benefits can be mediated by the metabolic adaptation elicited, which could be identified in the central nervous system (CNS) by raises in glycogen stores (DALSGAARD, 2006; MATSUI et al., 2012), glucose uptake, oxidative capacity, and the activity of the electron transport chain (DISHMAN et al., 2006; KINNI et al., 2011), besides promoting mitochondrial biogenesis (ZANG et al., 2012). Although the brain maintains its oxygen supplement virtually unchanged during exercise, the cellular adaptations to oxidative stress might be observed, such as

the upregulation of antioxidant enzymes and DNA repair enzymes, increasing the resistance to oxidative stress (RADAK et al., 2001, 2007, 2008).

The resistance exercise is considered the third most practiced physical activity in Brazil, behind only walking and football (GUIMARÃES LIMA et al., 2019). Nevertheless, resistance exercise practice during pregnancy is still viewed with some strangeness and disapproval, as it is thought that this modality may be harmful to maternal and children's health. In 2002, the American College of Obstetricians and Gynecologists updated your recommendations and recommends 30 min / day of moderate intensity exercise to all pregnant women, indicating that resistance exercise is safe and recommended, providing health benefits for both mother and baby (DE BARROS et al., 2010; BARAKAT et al., 2012; KASAWARA et al., 2012). However, there are no studies showing the effects of resistance exercise on the offspring's behavior and nervous system. Thus, the present study aimed to verify the effects of resistance exercise during pregnancy on behavior and neuroplasticity of offspring subjected to early-life stress.

2. Results

2.1 Elevated plus maze test

Two-way ANOVA showed a separation effect on the percentage of time that male pups remained in the open arm ($F(1, 36) = 8.42, p \leq 0.05$) which may indicate a hyperactive effect of animals subjected to early-life stress. No differences were observed in the other parameters evaluated. It is worth mentioning that the resistance exercise performed on the mothers was not harmful to the pups (Fig.1).

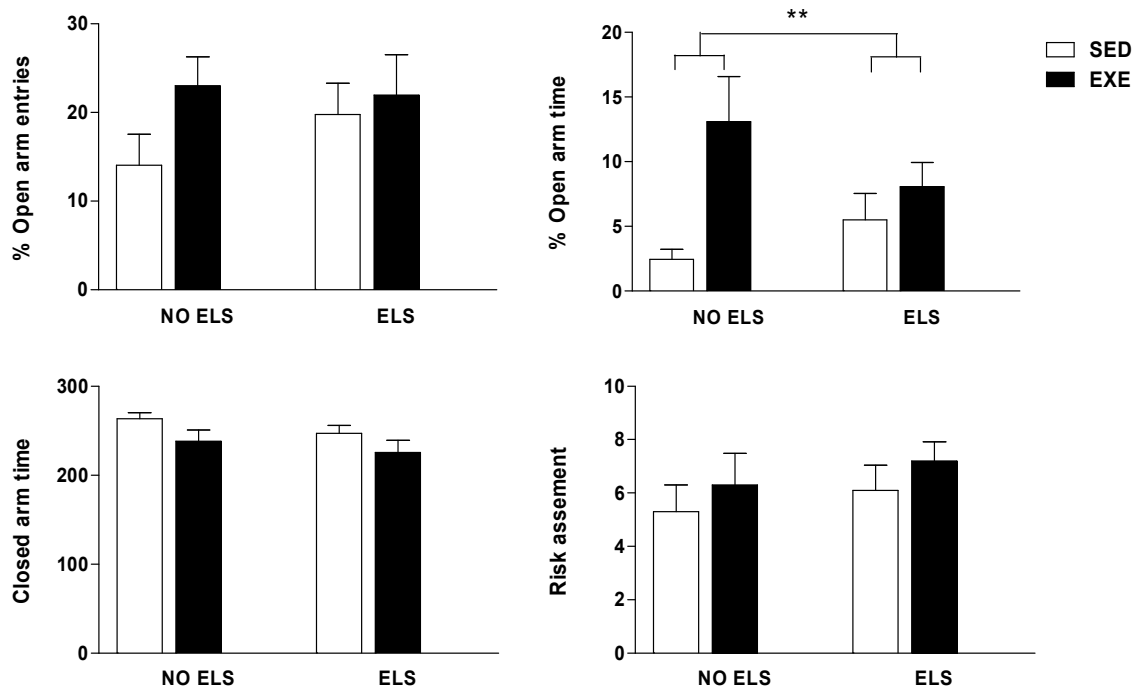


Figure 1 – Elevated plus-maze in males. (A) Percentage of entries in the open arms of the apparatus, (B) Percentage of time in open arms, (C) Closed Arm Time and (D) Risk Assessment(D). ** Represents $p \leq 0.05$ compared to NO ELS and ELS. Values are expressed as mean \pm standard error of the mean. Two-way ANOVA, $n = 10$.

No differences were observed in female pups in the elevated plus-maze test (Fig.2).

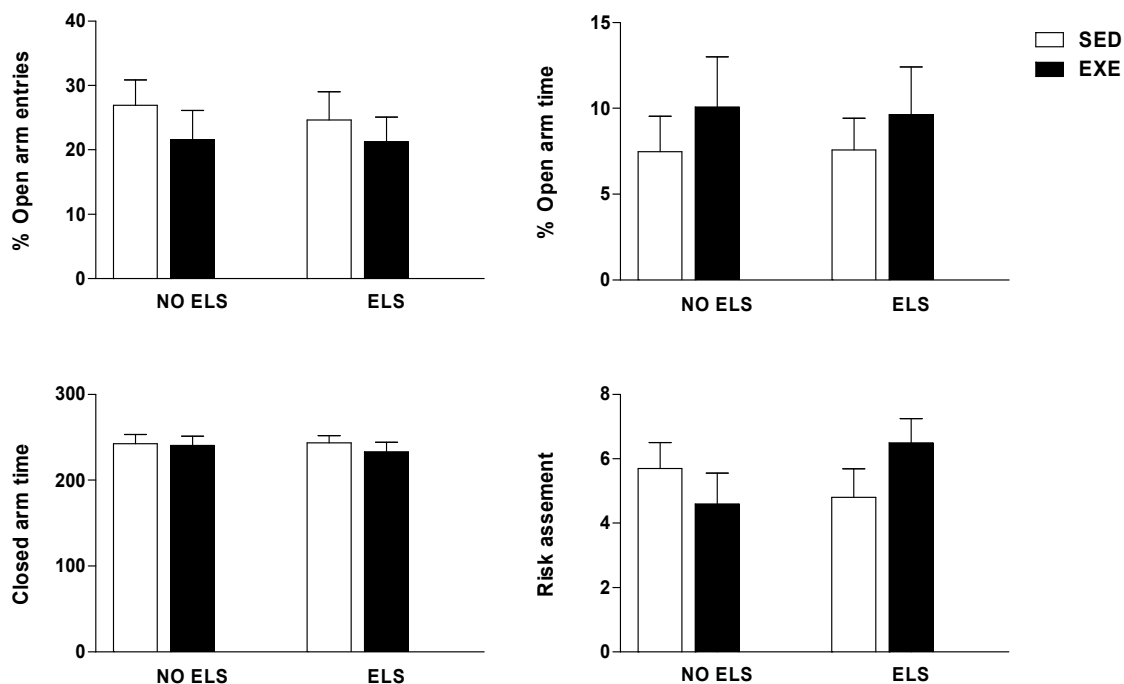


Figure 2 –Elevated plus-maze in females. (A) Percentage of entries in the open arms, (B) Percentage of time in open arms, (C) Closed Arm Time and (D) Risk Assessment (D). Values are expressed as mean \pm standard error of the mean. Two-way ANOVA, $n = 10$.

2.2 Open field

In male pup rats, two-way ANOVA demonstrated separation effect on the time spent in the central region ($F(1,36) = 4.92, p \leq 0.05$), time in peripheral ($F(1,36) = 5.84, p \leq 0.05$) and on the number of crossings ($F(1,36) = 5.32, p \leq 0.05$), demonstrating that pups subjected to early-life stress seem to be more impulsive and hyperactive. No additional differences were observed (Fig.3)

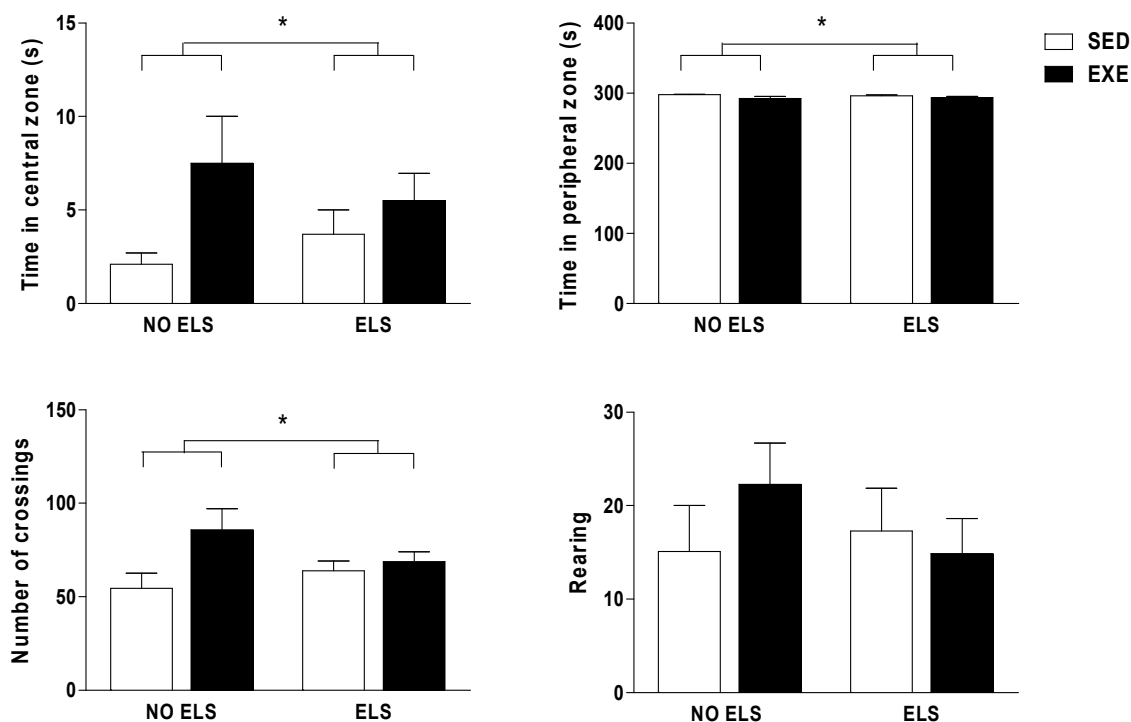


Figure 3 - Open field task in males. (A) Time in Central Zone, (B) Time in Peripheral Zone, (C) Number of Crossings and (D) Number of Rearings. * Represents $p \leq 0.05$ compared to NO ELS and ELS. Values are expressed as mean \pm standard error of the mean. Two-way ANOVA, $n = 10$.

In females pups, two-way ANOVA demonstrated separation effect on time spent in the central region ($F(1, 36) = 14.20$, $p \leq 0.05$) and on the number of crossings ($F(1, 36) = 7.50$, $p \leq 0.05$). No additional differences were observed (Fig. 4).

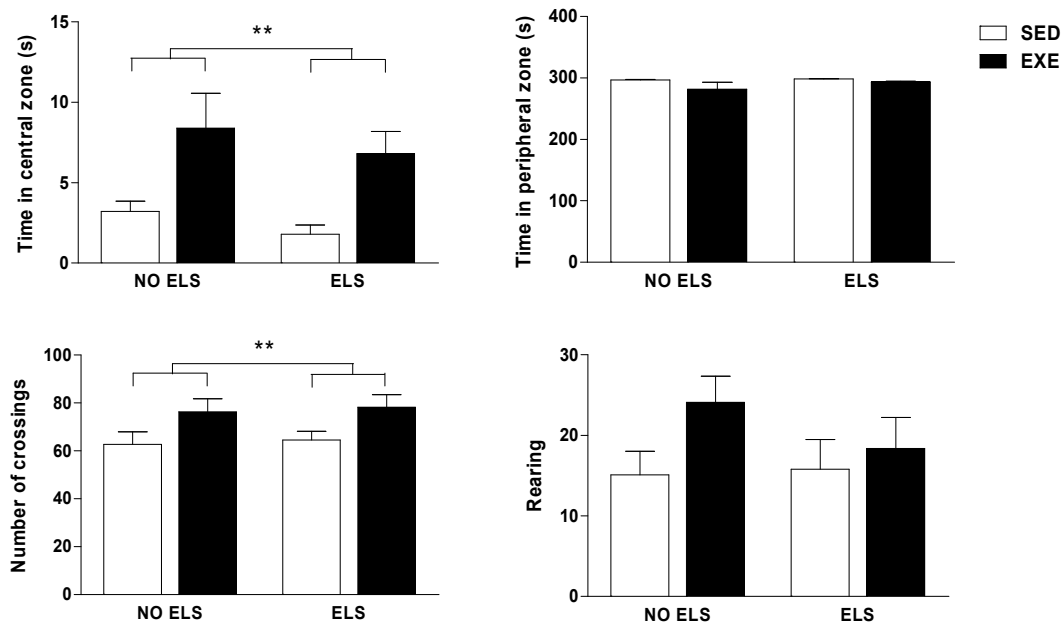


Figure 4 - Open field task in females. (A) Time in Central Zone, (B) Time in Peripheral Zone, (C) Number of Crossings and (D) Number of Rearings. ** Represents $p \leq 0.05$ compared to NO ELS and ELS. Values are expressed as mean \pm standard error of the mean. Two-way ANOVA, $n = 10$.

2.3 Sucrose preference test

No differences were observed in either male or female pup rats on the sucrose preference test (Fig. 5).

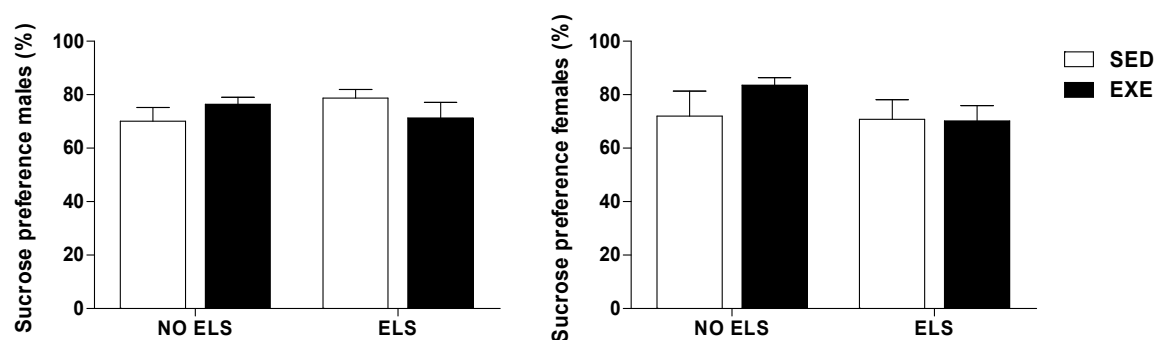


Figure 5 – Sucrose preference Test in (A) males and (B) females. Values expressed as mean \pm standard error of the mean. Two-way ANOVA, $n = 10$.

2.4 Histological study

Two-way ANOVA indicated a separation effect on the number of neurons in the CPF in male pup rats ($F(1,16) = 6.28, p \leq 0.05$) and also a significant interaction between maternal separation and exercise condition ($F(1,16) = 10.91, p \leq 0.05$) was observed. Bonferroni post hoc revealed that MS group had fewer neurons compared to all other groups and, interestingly, EXE+MS group was not different from the CT group indicating a neuronal preservation when compared to the MS group (Fig. 6).

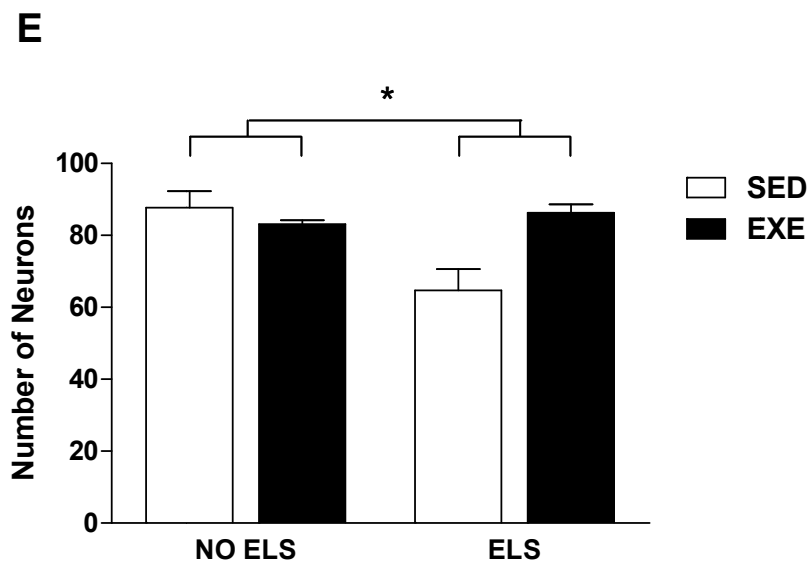
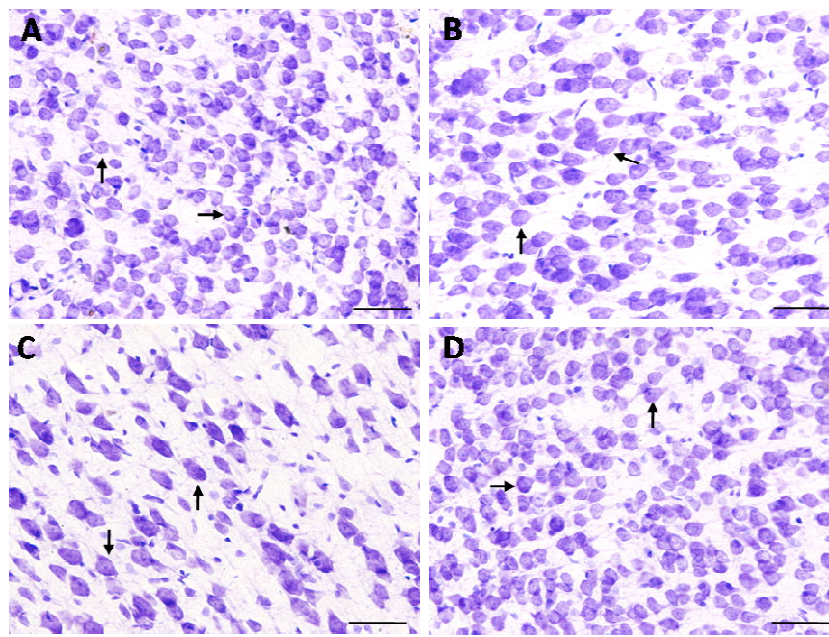


Figure 6 -Representative images of Nissl-stained sections from the PFC in males of the (A) CT group, (B) EXE group, (C) ELS group, (D) EXE + ELS group and (E) Number of neurons in the different groups. Neurons were identified by arrows. Scale bar 50 μ m. *Represents $p \leq 0.05$ compared to SED and EXE. Values were expressed as mean \pm standard error of the mean. Two-way ANOVA followed by *Bonferroni* post hoc test.

No differences were observed in the number of prefrontal cortex neurons in females consequent to maternal separation or exercise condition (Fig. 7).

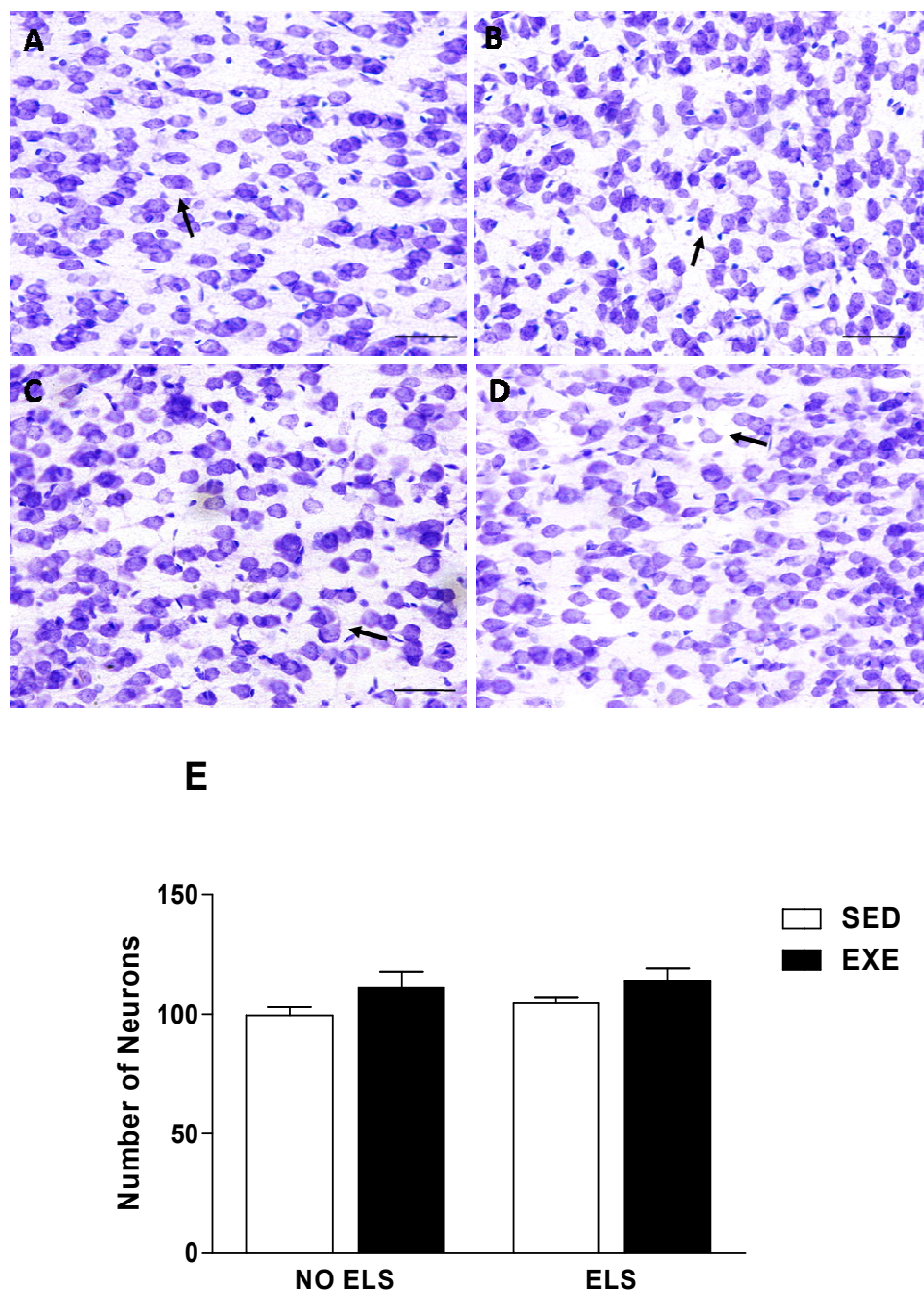


Figure 7 -Representative images of Nissl-stained sections from the PFC in males of the (A) CT group, (B) EXE group, (C) ELS group, (D) EXE + ELS group and (E) Number of neurons in the different groups. Neurons were identified by arrows. Scale bar 50 μ m. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean. Two-way ANOVA, n=5.

2.5 Oxidative stress analysis

Two-way ANOVA in male pups indicated a significant effect of factor separation, exercise and interaction between factors on the DCFH oxidation in the PFC ($F(1,16) = 8.81, p \leq 0.05$; $F(1,16) = 8.91, p \leq 0.05$, and $F(1,16) = 7.04, p \leq 0.05$, respectively). Bonferroni post hoc revealed that CT group showed lower DCFH oxidation when compared to all other groups. There were no differences in the other parameters evaluated (Fig. 8).

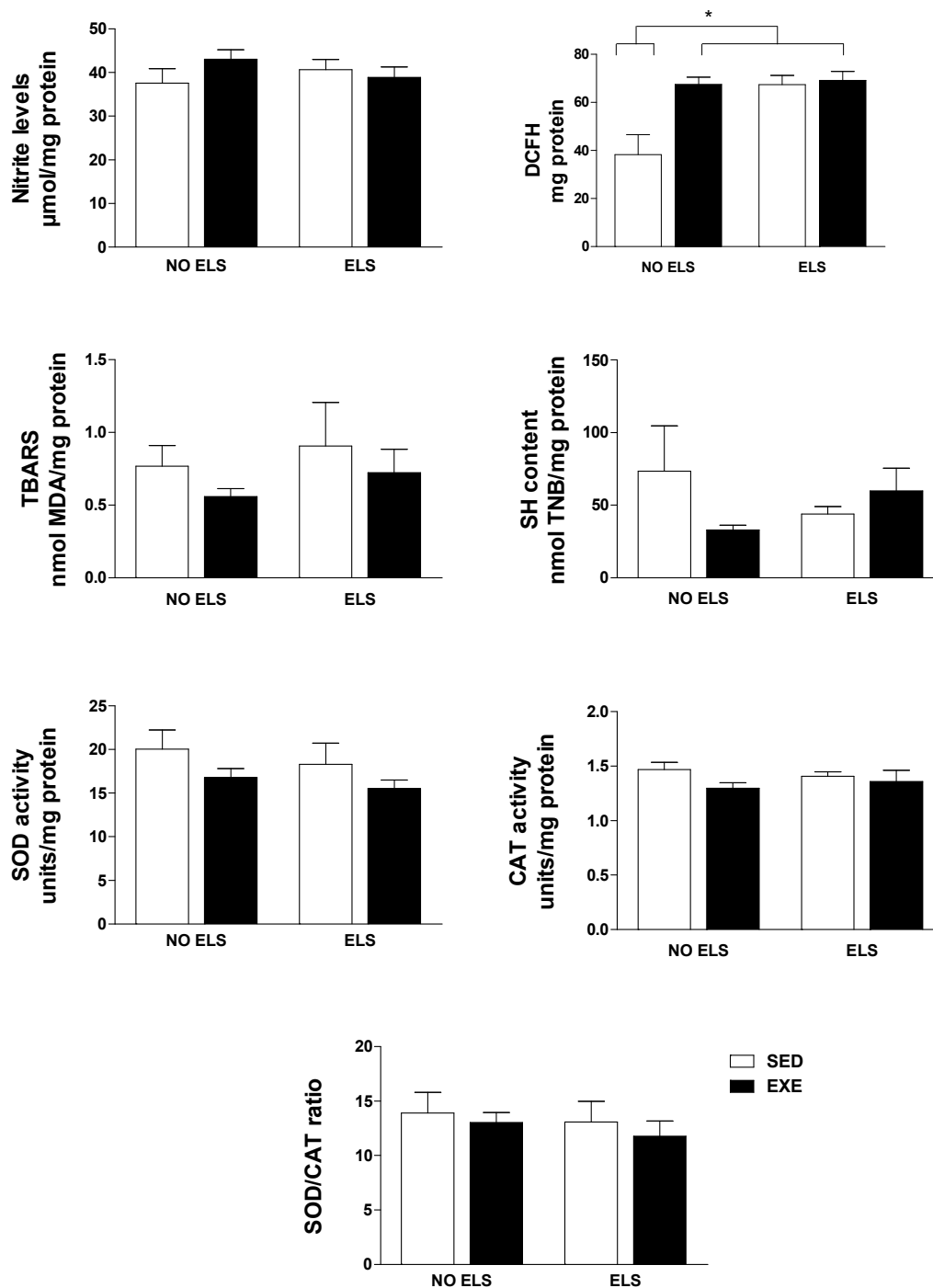


Figure 8 - Effects of resistant exercise and maternal separation on oxidative stress parameters in PFC of male pups. **(A)** Nitrite Levels, **(B)** DCFH oxidation, **(C)** TBARS, **(D)** SH content, **(E)** superoxide dismutase, **(F)** catalase and **(G)** SOD/CAT ratio in the prefrontal cortex. N = 5. *Represents $p \leq 0.05$ compared to CT. Data were expressed as mean \pm standard error. Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test.

The condition of separation and maternal exercise did not alter nitrite levels, DCFH oxidation, TBARS levels, sulfhydryl content, SOD and CAT activity and SOD / CAT ratio in the PFC of the females rats (Fig. 9).

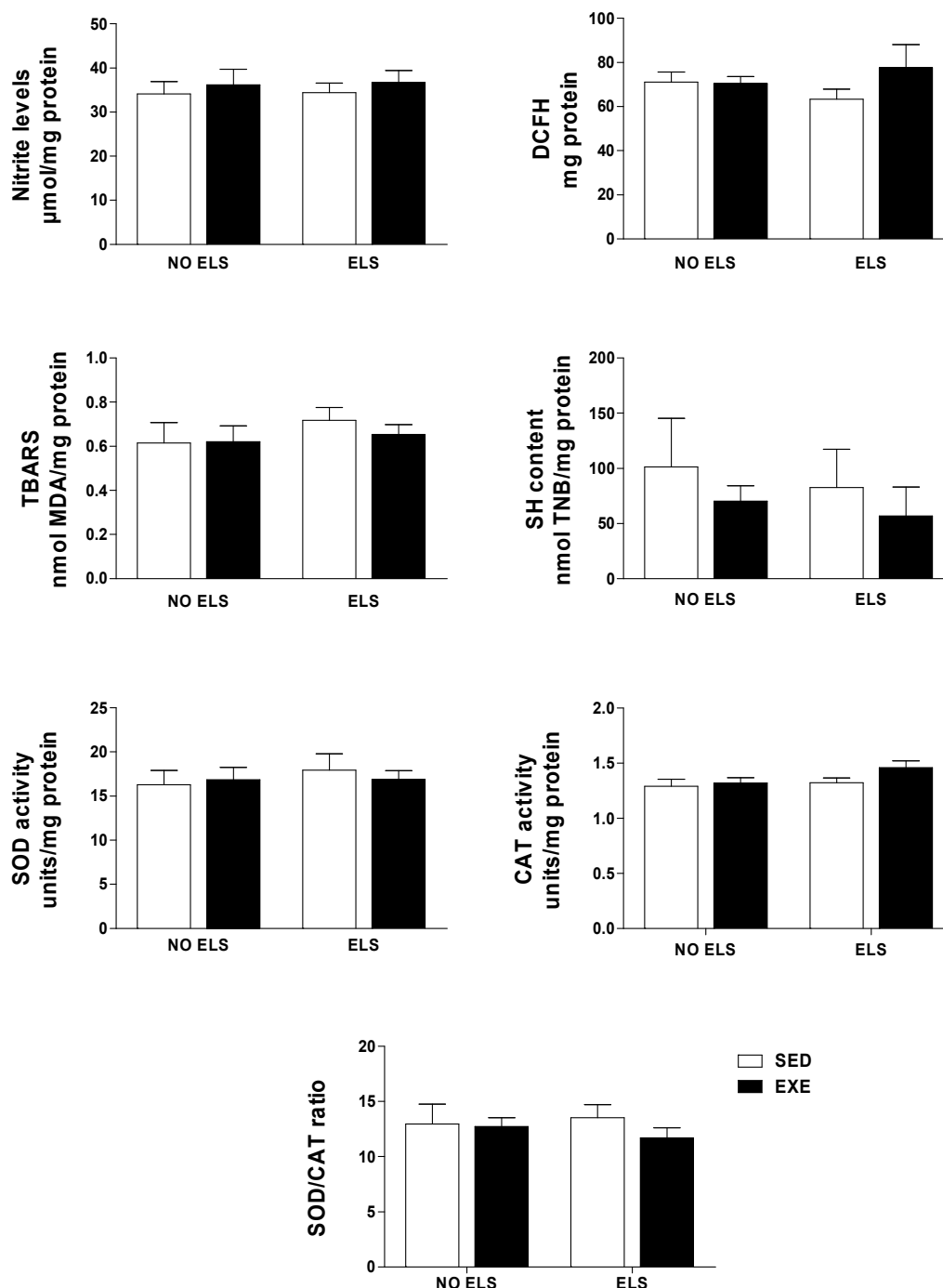


Figure 9 - Effects of resistant exercise and maternal separation on oxidative stress parameters in PFC of female pups. **(A)** Nitrite Levels, **(B)** DCFH oxidation, **(C)** TBARS, **(D)** SH content, **(E)** superoxide dismutase, **(F)** catalase and **(G)** SOD/CAT ratio in the

prefrontal cortex of female rats. N = 5. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean. Two-way ANOVA.

3. Discussion

Genetic factors are strongly associated with the development of ADHD, however, environmental influences such as psychosocial adversity, parental marital discord, and family dysfunction are reported as important risk factors (BANERJEE et al., 2007; KIM et al., 2009). Thus, it is considered that animal models that use MS as a strategy of early stress can mimic the clinical findings of children with ADHD (ARNOLD and SIVIY, 2002; BRAUN ET AL., 2003; COLORADO ET AL., 2006). In the present study, we aimed to investigate the neuroprotective effects of resistance exercise during gestation on the behavior and neuroplasticity of offspring submitted to early-life stress. Our results show that male pups appear to be more susceptible to MS compared to females, showing impulsive and hyperactive behavior, similar to that seen in children with ADHD. These results coincide with those found in clinical studies showing that males are more affected by this neuropsychiatric disorder compared to females (WILLCUTT, 2012). Additionally, early-life stress caused alterations in the nervous tissue of these male pups, evidenced by a decrease in the number of neurons and an increase in ROS in the PFC. As expected, the gestational resistance exercise presented an important neuroprotective potential, being able to attenuate the behavioral effects and reversing the neuronal loss in the PFC of the offspring submitted to MS.

3.1 Maternal separation caused hyperactive/impulsive behavior

Different behavioral tests have been used to identify impulsive, hyperactive and risk behaviors in laboratory animals. In this work we used the elevated plus-maze test, commonly used for the study of rodent anxiety neurobiology and the open field test, to evaluate the exploratory activity of animals (COLE, 1994; PEREIRA et al., 2005; GONZALEZ-LIMA, 2005). In both tests, the animal can freely explore the apparatus and its behavior is motivated by a conflict between the tendency to freely explore the open environment and to avoid potential dangers while remaining in more protected

environments. Animals subjected to different stressors in early life may exhibit anxiety-like behavioral as evidenced by a decrease in the number of entrances and time spent in the open arm of the maze, staying longer in the protected environment (DANIELS et al., 2004). However, our results showed that male pups submitted to MS present greater permanence in the open arms of the apparatus, exposing themselves more to risk in open environments, corroborates the results found by KWAK and collaborators (2009). At first, this finding effect could be considered an anxiolytic effect, therefore beneficial for pups, however, it is known that early-life adversities such as MS alter important frontal cortical areas, as seen in this paper, resulting in increased impulsivity and greater risk exposure (LOVALLO 2013; BAVA AND TAPERT 2010; ENOCH 2011). Additionally, our findings demonstrate that early-life stress causes an increase in locomotor activity of male pups, assessed by the number of crossings in the open field test. These results are consistent with those found by García et al. (2007) and Ramos et al. (2017), who found that measures of motor activity increase significantly in animals undergoing MS during early life. This effect may be mainly related to the negative effect of neonatal stress on HPA axis activity, as well as the negative effect of early adverse events on nervous system development.

In humans, impulsivity and hyperactivity, typical of ADHD patients, may contribute to the development of compulsive behaviors due to alcohol, drugs or food. Previous clinical studies have shown that children with ADHD have weight gain through unregulated eating patterns, associated with binge eating symptoms and loss of control over eating (NAZAR et al., 2016; HILBERT et al., 2018). In animal models, separate pups in early life are at higher risk for developing eating disorders and a greater preference for highly palatable foods (DALLMAN et al., 2003; SILVEIRA et al., 2004; JAHNG, 2011). The Sucrose Preference test was used in this study to identify a possible effect on the animals' compulsive/uncontrolled eating behavior, where we hypothesized that animals subjected to early-life stress would have a higher preference for sugary drink. However, our results show that animals do not exhibit compulsive behavior, with no difference between experimental groups. In contrast to our findings, RAMOS et al. (2017) demonstrated an increase in early stress-induced sucrose consumption in rats, corroborating the clinical findings in children with

ADHD. It is noteworthy that different paradigms of early stressors are studied (MARAS et al., 2016) and that in this paper we use a different model of MS than the model used by RAMOS and collaborators (2017) which may result in different behavioral phenotypes (ARNOLD AND SIVIY, 2002; SHALEV AND KAFKAFI, 2002; BRAUN et al., 2003). It is possible to postulate that the absence of compulsive eating behavior, demonstrated by our study, may be related to the type of maternal separation model employed, besides the low sensitivity of the test used to identify differences without the application of extreme experimental manipulations, such as daily stressful situations (ZURITA et al., 2000).

3.2 Gestational Resistance Exercise attenuates behavioral changes in offspring undergoing maternal separation

Recent studies have shown the benefits of exercise during pregnancy for mothers and neurological fetal development (HAAKSTAD et al., 2016; MUDD et al., 2015). However, almost all published studies focus on aerobic gestational exercise, and little is known about the effects of gestational resistance exercise on the behavior and nervous system of offspring. Our findings indicate that resistance exercise during pregnancy was able to attenuate impulsive and hyperactive behavior caused by ELS in male pups; this is the first work in the literature that demonstrates the effects of resistance exercise during pregnancy. Numerous studies have demonstrated the beneficial effects of aerobic exercise during gestation on offspring, such as improving glucose metabolism (HARRIS et al., 2018), increased insulin sensitivity (STANFORD et al., 2015), improved brain antioxidant defenses (MARCELINO et al., 2013) and memory improvement, which may persist into adulthood (ROBINSON AND BUCCI, 2014). These effects indicate a fetal reprogramming possibly through germ or somatic cell modifications; gestational exercise has the potential to transfer maternal traits to offspring, causing positive influences on its phenotype (SEGABINAZI et al., 2019). This effect may be related to epigenetic changes that modify and control the structure and function of chromatin and thus mediate changes in gene expression (MENKE AND BINDER, 2014). Several clinical evidences indicate that exercise acts as a powerful epigenetic modulator in many tissues, such as brain, sperm, muscle and leukocytes (MCGEE et al.,

2009; DENHAM et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; DORNELES et al., 2017; ELSNER et al., 2017; LAVRATTI et al., 2017). In addition, a recently published experimental study used paternal aerobic exercise showed a decrease in global DNA methylation in offspring hippocampus, reinforcing the idea that parents' healthy lifestyle can modulate changes in future generation DNA methylation (MEGA et al., 2018). Thus, the neuroprotective effect of resistance exercise during pregnancy on impulsivity and hyperactivity behaviors observed in offspring undergoing ELS may be the result of epigenetic changes, but further studies with this focus need to be performed, as there are no data in the literature to date show possible epigenetic changes in resistance exercise models similar to ours.

3.3 Maternal separation and gestational exercise cause changes in oxidative stress parameters

In this study, we observed that resistance exercise during pregnancy caused an increase in ROS production and did not alter antioxidant enzymes in the male pups PFC, which goes against some literature findings, where experimental studies have already shown a possible protective effect of physical exercise, attenuating the production of ROS and increasing the activity of antioxidant enzymes such as SOD and CAT (SOUZA et al., 2009; LIMA et al., 2018). Oxidative stress is recognized to be involved in many physiological conditions (i.e. aging and exercise) as well as various diseases (including inflammation, cardiovascular and neuropsychiatric disorders) (VALKO et al., 2007). In particular, the effect of exercise on redox balance is extremely complex, depending on age, gender and training level, as well as exercise intensity and duration. Although regular moderate training seems beneficial for oxidative stress and health, intense aerobic and resistance exercise can induce overproduction of ROS. In our study, although resistance exercise during pregnancy causes increased oxidative stress in the male PFC, the same stimulus was not able to positively regulate endogenous antioxidant defenses, which may be explained by the association of stressful events in early life.

In the present study, ELS was also able to increase the production of ROS in the PFC of male pups, which may be related to the impulsive and hyperactive behaviors found. Changes in these oxidative markers may be

related to the pathophysiology of psychiatric disorders such as ADHD, mediating the cause and/or consequence of abnormal brain signaling (LEFTA et al., 2017). A recently published meta-analysis of a total of 231 ADHD patients showed that this population has increased oxidative status, supposedly leading to increased oxidative damage (JOSEPH, ZHANG-JAMES & PERL, 2015). This result may be related to disruption of biological functions, causing damage to biomolecules such as DNA, lipids, proteins, and fats. Additionally, our results showed no differences in other oxidative stress parameters evaluated, such as the activity of antioxidant enzymes SOD and CAT. This result is consistent with a published meta-analysis that found no differences in antioxidant production among ADHD patients (JOSEPH et al., 2015).

3.4 Maternal separation causes neuronal loss in PFC in male pups

Our findings show that ELS caused PFC tissue damage in male pups, but not in females, in agreement with findings by MASLANKA and colleagues (2019) who also observed a reduction in the number of neurons in adolescent rats undergoing early-life stressor events. This effect seems to be related to changes in the HPA axis, since the application of stressors at crucial developmental periods alter the functioning of this axis, especially in neural structures with high density of glucocorticoid receptors, such as PFC (HEIM et al., 2002; LUPIEN et al., 2009; HEIM and BINDER, 2012; MALTER et al., 2013). Additionally, in our study we observed an increase in PFC production and ROS in male pups, which may be associated with increased susceptibility of brain tissue and consequently increased permeability of the blood-brain barrier, resulting in changes in brain morphology, such as a decrease in the number of neurons observed in this study.

3.5 Gestational resistance exercise reverses PFC neuronal loss in male pups undergoing stressful events in early-life

Environmental stimuli, such as maternal physical exercise, have the potential to influence the trajectory of brain development and the offspring phenotype (DA SILVA AND ARIDA, 2015). In our study, resistance exercise during pregnancy played an important neuroprotective role, preventing neuronal loss in PFC of pups exposed to ELS. Two interesting hypotheses can be

considered to explain this neuroprotective effect. The first concerns a possible improvement in cell survival via neurotrophic factors, a hypothesis based on previously published studies (HERRING et al., 2012; DA SILVA et al., 2016; SEGABINAZI et al., 2019). Some studies have observed that physical exercise in pregnant rats has increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and reelin levels, improving pups hippocampal neurogenesis (HERRING et al., 2012; DA SILVA et al., 2016). In addition, gestational aerobic exercise has been shown to increase cell survival in the offspring hippocampus (SEGABINAZI et al., 2019). A second hypothesis for the protective effect of gestational exercise is related to the impact of maternal care and, consequently, lower activation of the HPA axis in pups, which probably resulted in the improvement of the hyperactive and impulsive behavior observed in the EXE + ELS groups. KLEIN and colleagues (2018) reinforce this idea by observing that animals that practiced swimming during the gestational period exhibited an improvement in the quality of maternal care, proposing an important window of opportunity to improve the health of the offspring. However, further studies are needed to elucidate the neural pathways involved in this beneficial effect.

3.6 Sex-dependent effect in rats submitted to ELS

Our results demonstrate a marked difference between male and female pups. Male pups submitted to ELS showed an overactive and impulsive behavior in the elevated plus maze and open field test, as well as increased ROS production and significant tissue damage, identified by the decrease in the number of neurons in the PFC. Females showed only a risk behavior in the open field test, without changes in the other tests performed. Also, the females did not present alterations in oxidative stress analysis and did not present tissue damage resulted in early-life stress.

Taken together, these data indicate an evident greater susceptibility to the effects of ELS in males compared to females. Such a difference may be supported by a set of aspects, described hereinafter. The HPA axis of males appears to be more hyperresponsive than females, which is supported by the higher level of corticosterone found in separate males compared to females in the study by LUNDBERG et al. (2017). In addition to supporting the findings of the present study, the lower response to stressors in the neonatal period

explains the findings of JOHNSTON and FILE (1991) and more recently the study by DIMATELIS et al. (2016) that females exhibit greater resilience to behavioral change induced by stress. Interestingly, the difference in the effects of ELS between males and females also appears to be related to dopaminergic signaling, since only in male rats has an increase in brainstem dopamine receptors been identified (DE SOUZA et al., 2018). This result contributes to the understanding of the data found in this study, since behavioral findings are correlated with those found in humans with ADHD, such as hyperactivity and impulsivity. Accordingly, it is well established that in boys the highest prevalence of the disorder is found, ranging from 1 to 3 to 1 to 16 (girls/boys with ADHD; WILLCUTT, 2012). In this context, SPIVEY et al. (2009) found increased locomotion in male rats separated from mothers early in life, but without changes in females, demonstrating that they are more resistant to exhibiting hyperactive/impulsive behavioral effects. In addition, this same study evaluated the PFC thickness of animals separated from mothers at the beginning of life, identifying sexual differences in the anatomy and physiology of this brain region characterized by a reduction only in male PFC thickness, which may contribute to the increase of the impulsive behavior observed in these animals (SPIVEY et al., 2009).

In summary, our findings contribute to the literature because they demonstrate for the first time that resistance exercise performed during gestation prevents early-life stress damage in male rats, which appear to be more susceptible than females. Therefore, we emphasize that maintaining a moderate level of physical activity during pregnancy represents an important window of opportunity in order to improve the health of the offspring; However, future investigations exploring the possible physiological mechanisms involved in this improvement are essential.

4. Experimental procedure

4.1 General procedures

Experimental procedures were approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Nr.

36186). Initially, 44 adults pregnant Wistar rats with approximately 250–300 g in body weight were obtained from a local breeding colony (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório – CREAL, Brazil). Animals were maintained in four per boxes, in a temperature-controlled environment (20 ± 1 °C), under a 12:12 h light/dark cycle, with food and water available ad libitum. All tests were performed during the light phase of the cycle.

4.2 Resistance exercise

On the day of pregnancy confirmation (G0), a set of the females were adapted in the training apparatus ($n = 22$), which consisted of an inclined ladder (1.1 x 0.8 m) at 80°. Rats were encouraged with touches to voluntarily climb the ladder toward a dark box at the end of the apparatus, four times without load. Subsequently, the Maximum Load Capacity Test (MCC) was performed and lead weights were fixed in the tail of the rats during the climbing. The initial load of this test was 50% of the body weight and 4 - 8 climbs with progressive load increases (20g after a successful climb) were performed. Upon reaching the top of the apparatus the rat could rest for 120 seconds. This process was repeated until exhaustion, i. e. when the animals could not complete the climb. Thus, the highest load that the rat was able to complete the climb was considered the MCC for that session. This MCC test was performed every week throughout the training protocol to avoid adaptation to the resistance exercise. Pregnant rats were subjected to a 3 times per week training regimen during the gestational period (G1-G21), and the load was increased every day of the training (i. e.: 35%, 45%, 55%, 65% and 75% of maximum animal capacity/training day). The other group of females ($n = 22$) remained sedentary.

4.3 Early-life Stress

The pups' birthday was considered postnatal day zero (P0). On P0, the animals were standardized between 5 to 8 pups per litter (equally divided between males and females) and later divided into 4 experimental groups: 1) Control Group (CT) 2) Pup rats of exercised mothers (EXE), 3) Pup rats submitted to maternal separation (ELS) and 4) Pup rats of exercised mothers and submitted to maternal separation (EXE + ELS).

From P1 to P10, animals from MS and EXE + ELS groups were separated from their mothers during 180 minutes (protocol adapted from TOIGO *et al.*, 2012). The offspring were transferred to another room and placed in a water bath to maintain body temperature between 32 and 33 °C, simulating the normal nest temperature (SCHMIDT and DUMAN, 2007). Then, the pups were returned to their housing cages. Animals from CT and EXE groups were not subjected to this protocol and were not treated until weaning in P21, except for routine cage cleaning. All the offsprings were weaned at P21. On this day, the animals were randomized to avoid the box effect.

4.4 Behavioral assessments

From P30 male and female pups were evaluated in different behavioral tests, where all subsequent analyses were performed by a blind evaluator.

At P30, pups (n = 10 - 12) were evaluated in the elevated plus maze (EPM) commonly used for the study of anxiety. This maze consisted of two open arms, two closed arms (50.8 x 12.7 cm) and a central platform raised at 86 cm from the floor. The animal was gently placed on the central platform to explore the apparatus for 5 minutes. It was evaluated the number of visits to the open and closed arms, the time spent in the open arms and the risk assessment (PEREIRA *et al.*, 2005).

On the P31, the animals were submitted to the Open Field test used to assess the exploratory and locomotor behavior (n = 10 - 12; TATEM *et al.*, 2014; CONFORTI *et al.*, 2019). The apparatus consists of an acrylic arena (90cm total diameter), divided into 12 equal quadrants. The pups had their free exploration evaluated for 5 min. The number of quadrants traveled, the number of rearing, the time spent in the central and peripheral areas were evaluated.

Finally, the animals were underwent to sucrose preference test (n = 13) that evaluates compulsive eating behavior (DALLMAN *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 2017). Firstly, the animals were adapted to 1% sucrose solution with access to two bottles for 24 hours before the test and, later a food and water restriction was realized pups for 7 hours. On the first test day, the rats were housed in individual galleries with free access to two vials containing (1) 500 ml sucrose solution (1%) and (2) 500 ml water. The consumption of each bottle was measured after 12 hours of dark cycle exposure. On the second test day,

after water deprivation and feeding for seven hours, the same procedure was performed and the animals had free access to two bottles again (1% sucrose or water) for 12h also in the dark cycle. On this day, the position of the bottles was changed in order to avoid right or left side preference. Preference was calculated by the following formula: sucrose consumption on days 2 and 3 = (sucrose consumption, day 2 + day 3) / (total consumption, day 2 + day 3) (adapted ARCEGO et al., 2018).

4.5 Tissue collection

In the P37 or P38, a set of the animals (which performed the behavioral tests) was deeply anesthetized with ketamine and xylazine (100 mg/kg body weight, i.p., Syntec V-003, São Paulo, Brazil). After this, animals were transcardiacally perfused with saline solution and buffered 4% paraformaldehyde (pH 7.4) using a peristaltic pump (50 mL/minute, Milan, Brazil). Brains were dissected, postfixed during 4 h in the same fixative solution, cryoprotected in 15% and 30% sucrose at 4 °C, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C (DOS SANTOS et al., 2017). Another set of the animals that did not perform behavioral tests were euthanized by decapitation (n = 5) and the PFC was dissected, instantly placed in liquid nitrogen and stored at -80°C until oxidative stress analysis (FERREIRA et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2019).

4.6 Histological analysis

The brains were coronally sectioned (30µm thickness, 60µm apart from each other) using a cryostat (Thermo Scientific/Microm HM525) for PFC visualization. Then, slices were stained with Nissl method for neurons (n = 5). Briefly, samples were pre-incubated in a solution of chloroform and 100% ethanol (1:1) overnight. The slides were immersed in 100% and 95% alcohol, incubated in cresyl violet solution (Merck, Darmstadt, Germany, CAS number: 10510-54) at 34 °C for 15 min and washed with distilled water. After this, slices were differentiated in 95% alcohol, dehydrated, cleared in xylene and covered with permount and coverslips (Fisher Scientific®, USA).

Twenty four images of the PFC were captured at magnification of 400×, using a microscope (Carl Zeiss® Primo Star, Oberkochen, Germany) coupled to

a digital camera (Carl Zeiss® AxioCamMRc, Oberkochen, Germany). The neurons were identified by larger size, nonspherical outline and stained cytoplasm and counted in an area of interest ($6550.23\mu\text{m}^2$) positioned in 4 fields of each brain section (four in each hemisphere) (MARCUIZZO *et al.*, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2017; KONOPASKE *et al.*, 2007; DOS SANTOS *et al.*, 2017; CONFORTIM *et al.*, 2019).

4.7 Oxidative stress analysis

For the determination of oxidative stress parameters, the PFC was homogenized 1:10 in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) with 140 mM KCl and then the homogenates were centrifuged ($800\times g$, 10 min at $4\text{ }^\circ\text{C}$) and the supernatants were collected and were stored at $-70\text{ }^\circ\text{C}$ (DOS SANTOS *et al.*, 2019).

Nitrite levels were determined from a sodium nitrite standard and expressed in micromole per mg protein. The supernatants were incubated for 10 minutes at $25\text{ }^\circ\text{C}$ in a Griess reagent mixture (1:1 mixture of 0.1% naphthylethylenediaminedihydrochloride and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid). This mixture was then placed in a spectrophotometer at 543 nm and the absorbance was measured (GREEN *et al.* 1982).

For 2',7'-Dihydrodichlorofluorescein (DCFH) Oxidation measurement, the supernatants were incubated at $37\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 min with a solution of DCFH-diacetate. Then, the resultant fluorescence was measured at 488 nm of excitation and 525 nm of emission. DCF was calculated by a calibration curve with standard DCF, and the DCF formed were expressed as nanomole of DCF per mg protein. This protocol is in accordance with that published by LeBel method (LEBEL *et al.* 1992).

The supernatants were also incubated with 1.15% KCl, 20% trichloroacetic acid, and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 minutes to assess Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) through the Ohkawa method (OHKAWA *et al.* 1979). Its concentration was determined from a calibration curve with 1,1,3,3-tetramethoxypropane as standard. Finally, TBARS level was measured on a spectrophotometer at 535 nm and results are expressed in nanomoles of MDA per mg of protein.

The Sulfhydryl Content (SH) was measured as described by Aksenov and Markesbery (AKSENOV AND MARKESBERY 2001). The supernatant was mixed with phosphate saline buffer (pH 7.4) and 1 mM EDTA. After, 0.01 mol / L 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid in ethanol and 0.2 M potassium phosphate solution (pH 8.0) were added to the reaction medium. After 30 min of incubation at room temperature in the dark, the yellow color formed was measured at 412 nm in a spectrophotometer. The results are expressed as nanomole of TNB per mg protein.

For the measurement of Superoxide Dismutase (SOD) Activity, as described by Marklund et al. (1985), indirect SOD activity in the samples was measured by inhibition of pyrogallol self-oxidation at 420 nm. A calibration curve was performed using purified SOD as standard, and the results were expressed as units per mg protein.

Finally, Catalase (CAT) activity was measured from mixtures of the supernatant with 0.1% Triton X-100 preincubated for 15 min at room temperature and 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7) was added with 20 mM of H_2O_2 . One unit of CAT is defined as 1 mM of H_2O_2 consumed per min at 37 ° C. The degradation of H_2O_2 was measured at 240 nm. The activity was expressed as units per mg protein (AEBI, 1984).

4.8 Statistical analysis

Accordingly, to normality test results, data were analyzed by two-way ANOVA with *separation* and *gestational exercise* as factors. Bonferroni *post-hoc* test was used when necessary. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. Analyzes were performed in the GraphPad Prism software package.

4.DISSCUSSÃO GERAL

Fatores genéticos estão fortemente associados com o desenvolvimento de TDAH, porém, influências ambientais como adversidades psicossociais, discórdia conjugal dos pais e disfunção familiar são relatadas como importantes fatores de risco (BANERJEE; MIDDLETON; FARAONE, 2007; SHAW et al., 2007). Alguns estudos têm demonstrado que modelos animais que utilizam a SM como estratégia de estresse no início da vida podem mimetizar os achados clínicos de crianças com TDAH (ARNOLD; SIVIY, 2002; BRAUN et al., 2003; COLORADO et al., 2006). No presente estudo, objetivamos investigar os efeitos neuroprotetores do exercício resistido durante o período gestacional sobre o comportamento e a neuroplasticidade da prole submetida ao estresse no início da vida. Nossos resultados mostram que os filhotes machos parecem ser mais susceptíveis à SM em comparação com as fêmeas, apresentando um comportamento impulsivo e hiperativo. Esses resultados estão coincidentes com aqueles encontrados em estudos clínicos que mostram que indivíduos do sexo masculino são mais acometidos por esse distúrbio neuropsiquiátrico comparado ao sexo feminino (WILLCUTT, 2012). Adicionalmente, o estresse no início da vida causou alterações no PFC de filhotes machos, evidenciado por uma diminuição no número de neurônios e aumento nas espécies reativas de oxigênio. Como esperado, o exercício resistido gestacional apresentou um potencial neuroprotetor importante, sendo capaz de bloquear os efeitos do ELS revertendo a perda neuronal no CPF dos descendentes submetidos à SM.

4.1 A Separação materna causou comportamento hiperativo/impulsivo

Diferentes testes comportamentais vêm sendo utilizados para identificar comportamentos de risco, impulsividade e hiperatividade em animais de laboratório. Neste trabalho utilizamos o teste do labirinto em cruz elevado, comumente utilizado para o estudo da neurobiologia da ansiedade em roedores e o teste de campo aberto, a fim de avaliar a atividade exploratória dos animais (GONZALEZ-LIMA; SADILE, 2000; PEREIRA et al., 2005). Em ambos os testes, o animal pode explorar livremente o aparato e o comportamento é motivado por um conflito entre a tendência de explorar o ambiente aberto, livremente, e o de evitar perigos em potencial, permanecendo em ambientes mais protegidos. Animais submetidos a diferentes estressores no início da vida

podem apresentar um comportamento ansioso, evidenciado pela diminuição no número de entradas e do tempo despendido no braço aberto do labirinto, permanecendo mais tempo no ambiente protegido (DANIELS et al., 2004). Todavia, nossos resultados mostraram que os filhotes machos submetidos à SM apresentam maior permanência nos braços abertos do aparato, expondo-se mais a risco em ambientes abertos, o que corrobora com os resultados encontrados por KWAK e colaboradores (KWAK et al., 2009). A princípio, esse efeito achado poderia ser considerado um efeito ansiolítico, portanto benéfico para os filhotes, porém, sabe-se que adversidades no início da vida como a SM alteram importantes áreas corticais frontais, como visto neste trabalho, resultando no aumento da impulsividade e maior exposição a risco (BAVA; TAPERT, 2010; ENOCH, 2011; LOVALLO, 2013). Adicionalmente, nossos achados demonstram o estresse no início da vida causa um aumento na atividade locomotora dos filhotes machos, avaliado através do número de cruzamentos no teste campo aberto. Esses resultados são congruentes com os encontrados por García e colaboradores (2007) e Ramos e colaboradores (2017), que descobriram que a atividade motora aumenta significativamente em animais submetidos à SM durante o início da vida (AYA-RAMOS et al., 2017). Portanto, nossos achados podem ser explicados principalmente pelo efeito negativo do estresse neonatal na atividade do eixo HPA, bem como o efeito negativo de eventos adversos precoces no desenvolvimento do sistema nervoso.

Em humanos, a impulsividade e a hiperatividade, típicas em pacientes com TDAH, podem contribuir para o desenvolvimento de comportamentos compulsivos por álcool, drogas ou alimentos. Estudos clínicos prévios demonstraram que crianças com TDAH apresentam ganho de peso por meio de padrões alimentares desregulados, associado a sintomas de compulsão alimentar e perda de controle sobre a alimentação (HILBERT et al., 2018; NAZAR et al., 2016). Em modelos animais, filhotes separados no início da vida apresentam maior risco para o desenvolvimento de transtornos alimentares e uma maior preferência por alimentos altamente palatáveis (DALLMAN et al., 2003; JAHNG, 2011; SILVEIRA et al., 2004). O teste de preferência à sacarose foi utilizado nesse estudo a fim de identificar um possível efeito sobre o comportamento de compulsão/descontrole alimentar dos animais, onde

hipotetizamos que os animais submetidos ao estresse no início da vida apresentariam uma maior preferência à bebida açucarada. Todavia, nossos resultados mostram que os animais não apresentam um comportamento tipo compulsivo, não havendo diferença entre os grupos experimentais. Em contraponto aos nossos achados, RAMOS e colaboradores (2017) demonstraram um aumento no consumo de sacarose induzido pelo estresse no início da vida em ratos, corroborando com os achados clínicos em crianças com TDAH (AYA-RAMOS et al., 2017). Vale ressaltar que diferentes paradigmas de estressores no início da vida são estudados e que nesse trabalho utilizamos um modelo de SM diferente do modelo utilizado por RAMOS e colaboradores (2017) o que pode resultar em diferentes fenótipos comportamentais (ARNOLD; SIVIY, 2002; BRAUN et al., 2003; SHALEV; KAFKAFI, 2002). É possível postular que a ausência de um comportamento alimentar compulsivo, demonstrado por nosso estudo pode estar relacionada ao tipo de modelo de separação materna empregado, além da baixa sensibilidade do teste utilizado em identificar diferenças sem a aplicação de manipulações experimentais extremas, como situações estressoras diárias (ZURITA et al., 2000).

4.2 O exercício resistido gestacional atenua as alterações comportamentais na prole submetida à separação materna

Estudos recentes têm demonstrado os benefícios do exercício físico durante o período gestacional para as mães e sobre o desenvolvimento neurológico fetal (HAAKSTAD; TORSET; BØ, 2016; MUDD et al., 2015). Todavia, os trabalhos publicados apresentam o enfoque no exercício gestacional do tipo aeróbico, e pouco se sabe sobre os efeitos do exercício resistido gestacional no comportamento e no sistema nervoso dos descendentes. Nossos achados indicam que o exercício resistido na gestação foi capaz de atenuar o comportamento impulsivo e hiperativo causados pela SM em filhotes machos; esse é o primeiro trabalho que demonstra os efeitos do exercício resistido durante a gestação. Inúmeros trabalhos demonstram os efeitos benéficos do exercício aeróbico durante a gestação aos descendentes, tais como melhora o metabolismo da glicose (HARRIS; BAER; STANFORD,

2018), maior sensibilidade à insulina (STANFORD et al., 2015), melhora nas defesas antioxidantes encefálicas (MARCELINO et al., 2013) e melhora da memória, o que pode persistir até a vida adulta (ROBINSON; BUCCI, 2014). Esses efeitos indicam uma reprogramação fetal que possivelmente modifica de células germinativas ou somáticas; o exercício físico gestacional tem potencial para transferir traços maternos à prole, causando influências positivas em seu fenótipo (SEGABINAZI et al., 2019). Esse efeito pode estar relacionado com alterações epigenéticas que modificam e controlam a estrutura e a função da cromatina e, portanto, medeiam as mudanças na expressão gênica (MENKE; BINDER, 2014). Todavia, diversas evidências clínicas indicam que o exercício atua como um poderoso modulador epigenético em muitos tecidos, como encéfalo, esperma, músculo e leucócitos (DENHAM et al., 2015; DORNELES et al., 2017; MCGEE et al., 2009). Além disso, um estudo experimental publicado recentemente utilizou exercício aeróbico paterno e mostrou uma diminuição na metilação global do DNA no hipocampo da prole, reforçando a ideia de que o estilo de vida saudável dos pais pode modular alterações na metilação do DNA das gerações futuras (MEGA et al., 2018). Assim, o efeito neuroprotetor do exercício resistido durante a gestação em comportamentos de impulsividade e hiperatividade observados na prole submetida a SM pode ser resultado de modificações epigenéticas, porém, mais estudos com esse enfoque precisam ser realizados, pois até o momento não existem dados na literatura que mostrem as possíveis alterações epigenéticas em modelos de exercício resistido similar ao nosso.

4.3 Separação materna e exercício gestacional causam alterações em parâmetros de estresse oxidativo

Nesse trabalho observamos que o exercício resistido durante a gestação causou um aumento na produção de EROs e não alterou enzimas antioxidantes em filhotes machos, o que vai contra alguns achados da literatura, onde Lima e colaboradores (2018) e Souza e colaboradores (2009) já demonstraram um possível efeito protetor do exercício físico, atenuando o aumento de EROs e aumentando a atividade de enzimas antioxidantes como SOD e CAT (LIMA et al., 2018; SOUZA et al., 2009). O estresse oxidativo é

reconhecido por estar envolvido em muitas condições fisiológicas (por exemplo, envelhecimento e exercício físico) assim como em diversas doenças (incluindo inflamação, doenças cardiovasculares e neuropsiquiátricas) (VALKO et al., 2007). Em particular, o efeito do exercício no equilíbrio redox é extremamente complexo, dependendo da idade, sexo e nível de treinamento, bem como da intensidade e duração do exercício. Embora o treinamento moderado regular pareça benéfico para o estresse oxidativo e a saúde, exercícios aeróbicos e anaeróbicos intensos podem induzir a superprodução de EROs. Apesar do exercício causar um aumento do estresse oxidativo, o mesmo estímulo parece necessário para permitir uma regulação positiva nas defesas antioxidantes endógenas (PINGITORE et al., 2015).

No presente estudo, a SM também foi capaz de aumentar a produção de EROs no CPF de filhotes machos, o que pode estar relacionado com os comportamentos impulsivos e hiperativos encontrados. A alteração nesses marcadores oxidativos parece estar relacionada com a fisiopatologia dos transtornos psiquiátricos como o TDAH, mediando causa e/ou consequência de uma sinalização cerebral anormal (LEFTA et al., 2017). Uma meta-análise publicada recentemente com um total de 231 pacientes com TDAH mostrou que essa população apresenta um aumento no status oxidativo, supostamente levando ao aumento do dano oxidativo (JOSEPH et al., 2015). Esse resultado pode estar relacionado com interrupção de funções biológicas, causando danos a biomoléculas como o DNA, lipídios, proteínas e gorduras. Adicionalmente, nossos resultados não apontaram diferenças em outros parâmetros de estresse oxidativo avaliados, como a atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT. Este resultado está de acordo com uma meta-análise publicada que não apontou diferenças na produção de antioxidantes entre pacientes com TDAH (JOSEPH et al., 2015).

4.4 Separação materna causa perda neuronal no CPF em filhotes machos

Nossos achados mostram que a SM causou um dano tecidual no CPF dos filhotes machos, mas não nas fêmeas, em concordância com os achados de Maslanka e colaboradores (2019) que também observaram uma redução no número de neurônios em ratos adolescentes submetidos a eventos estressores

no início da vida. Esse efeito parece estar relacionado com alterações no eixo HPA, uma vez que a aplicação de estressores em períodos cruciais para o desenvolvimento alteram o funcionamento do eixo, principalmente em estruturas neurais com alta densidade de receptores de glicocorticoides, como é o caso do CPF (HEIM; BINDER, 2012; HEIM; NEMEROFF, 2002; LUPIEN et al., 2009). Adicionalmente, em nosso estudo observamos um aumento na produção de EROs no CPF de filhotes machos, o que pode estar associado a uma maior suscetibilidade do tecido cerebral e conseqüentemente, aumento de permeabilidade da barreira hematoencefálica, resultando em alterações na morfologia cerebral, como a diminuição no número de neurônios observada nesse trabalho.

4.5 Exercício resistido gestacional previne a perda neuronal no CPF de filhotes machos submetidos a eventos estressores no início da vida

Estímulos ambientais, como o exercício físico materno, tem o potencial de influenciar a trajetória do desenvolvimento cerebral e o fenótipo da prole (ARIDA et al., 2015). Em nosso trabalho, o exercício resistido durante a gestação apresentou um papel neuroprotetor importante, prevenindo a perda neuronal no CPF de filhotes expostos à SM. Duas hipóteses interessantes podem ser consideradas para se explicar esse efeito neuroprotetor. A primeira diz respeito a uma possível melhora na sobrevivência celular via fatores neurotróficos, hipótese fundamentada em trabalhos previamente publicados. Alguns estudos observaram que o exercício físico em ratas prenhes aumentou os níveis de BDNF e de reelin, melhorando a neurogênese no hipocampo de filhotes (HERRING *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2016). Ainda, foi demonstrado que o exercício aeróbico gestacional aumentou a sobrevivência celular no hipocampo da prole (SEGABINAZI et al., 2019). Uma segunda hipótese para o efeito protetor de exercício gestacional está relacionada com o impacto do cuidado materno e conseqüentemente, menor ativação do eixo HPA nos filhotes, o que provavelmente resultou na melhora do comportamento hiperativo e impulsivo observada nos grupos EXE+ELS. KLEIN e colaboradores (2018) reforçam essa idéia ao observarem que animais que praticaram natação durante o período gestacional exibiram uma melhora na qualidade do cuidado

materno, propondo uma importante janela de oportunidade para melhorar a saúde dos descendentes (KLEIN et al., 2018). Todavia, mais estudos são necessários para elucidar as vias neurais envolvidas nesse efeito benéfico.

4.6 Efeito dependente do sexo em ratos submetidos à SM

Nossos resultados demonstram uma marcante diferença entre filhotes machos e fêmeas. Filhotes machos submetidos à SM apresentaram um comportamento hiperativo e impulsivo no teste labirinto em cruz elevado e campo aberto, bem como aumento na produção de EROs e dano tecidual importante, identificado pela diminuição no número de neurônios no CPF. As fêmeas apresentaram apenas um comportamento de risco no teste de campo aberto, sem alterações nos demais testes realizados. Ainda, as fêmeas não apresentaram alterações em análises de estresse oxidativo e não apresentaram dano tecidual frente ao estresse no início da vida.

Em conjunto, esses dados indicam uma maior suscetibilidade aos efeitos da SM nos machos em comparação com as fêmeas. Tal diferença pode ser fundamentada por um conjunto de aspectos, descritos aqui na sequência. O eixo HPA dos machos parece ser mais hiperresponsivo do que o das fêmeas, o que é fundamentado pelo maior nível de corticosterona encontrado em machos separados, em comparação às fêmeas no estudo de LUNDBERG e colaboradores, (2017). Além de fundamentar os achados do presente estudo, a menor resposta a agentes estressores no período neonatal explica os achados de Johnston e File (1991) e, mais recentemente, o estudo de Dimatelis e colaboradores (2016) que afirmaram que fêmeas exibem maior resiliência a alterações comportamentais induzidas por estresse (DIMATELIS et al., 2016; JOHNSTON; FILE, 1991). Interessantemente, a diferença nos efeitos do ELS entre machos e fêmeas parece também estar relacionada à sinalização dopaminérgica, pois apenas em ratos machos foi identificado aumento de receptores para dopamina no tronco encefálico (DE SOUZA et al., 2018). Em consonância, já é bem estabelecido que em meninos é encontrada a maior prevalência do transtorno, variando nos estudos de 1 para 3 a 1 para 16 (meninas/meninos com TDAH; WILLCUTT, 2012). Neste contexto, Spivey e colaboradores (2009) encontraram aumento da locomoção em ratos machos

separados das mães no início da vida, porém, sem alterações nas fêmeas, demonstrando que essas são mais resistentes aos efeitos da SM, e não exibem os efeitos comportamentais hiperativos/impulsivos (SPIVEY et al., 2009). Além disso, esse mesmo estudo avaliou a espessura do CPF dos animais separados das mães no início da vida, identificando diferenças sexuais na anatomia e fisiologia dessa região encefálica caracterizada por uma redução na espessura do CPF apenas de machos, o que pode contribuir para o aumento do comportamento impulsivo observado nesses animais (SPIVEY et al., 2009). Em resumo, nossos achados contribuem para a literatura pois demonstram pela primeira vez que o exercício resistido realizado durante o período gestacional previne os prejuízos causados por um agente estressor no início da vida em ratos machos, os quais parecem ser mais suscetíveis que as fêmeas. Portanto, reforçamos que manter um nível moderado de atividade física durante a gestação representa uma importante janela de oportunidade a fim de melhorar a saúde dos descendentes; porém, investigações futuras explorando os possíveis mecanismos fisiológicos envolvidos são essenciais.

5.CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos nesse estudo, podemos concluir que:

- Filhotes machos submetidos ao ELS e avaliados no teste do labirinto em cruz elevado e campo aberto apresentaram um comportamento impulsivo e hiperativo que foi prevenido pela realização do exercício resistido gestacional;
- O exercício resistido durante a gestação bem como eventos estressores no início da vida e causam aumento na produção de EROs no CPF de filhotes machos, e não de filhotes fêmeas;
- O ELS causou dano tecidual no CPF apenas em filhotes machos revertido pelo exercício resistido gestacional.

ANEXO 1



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 36186

Título: EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO GESTACIONAL SOBRE O COMPORTAMENTO E A NEUROPLASTICIDADE DE MÃES E DA PROLE SUBMETIDAS A UM MODELO DE SEPARAÇÃO MATERNA

Vigência: 01/01/2019 à 01/09/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LENIR ORLANDI PEREIRA SILVA - coordenador desde 01/01/2019
SIMONE MARCUZZO - pesquisador desde 01/01/2019
ETHIANE SEGABINAZI - Aluno de Doutorado desde 01/01/2019
Wellington de Almeida - Aluno de Mestrado desde 01/01/2019
Adriana Souza dos Santos - Aluno de Mestrado desde 01/01/2019
Wesley Roberto de Aguida - Aluno de Mestrado desde 01/01/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 03/12/2018 - Sala 323 - Anexo I do prédio da Reitoria - Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 256 filhotes da linhagem Wistar (metade de cada sexo) provenientes de 60 ratas prenhas, todos oriundos do CREAL/UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 14 de Dezembro de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética

6. REFERÊNCIAS

AKHAVAN, M. M. et al. Serotonergic and noradrenergic lesions suppress the enhancing effect of maternal exercise during pregnancy on learning and memory in rat pups. **Neuroscience**, v. 151, n. 4, p. 1173–1183, 19 fev. 2008.

ALEKSIĆ, D. et al. Long-term Effects of Maternal Deprivation on the Volume, Number and Size of Neurons in the Amygdala and Nucleus Accumbens of Rats. **Psychiatria Danubina**, v. 28, n. 3, p. 211–219, 2016.

ANDA, R. F. et al. The enduring effects of abuse and related adverse experiences in childhood. A convergence of evidence from neurobiology and epidemiology. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 256, n. 3, p. 174–186, abr. 2006.

ARCHANA, E. et al. Altered biochemical parameters in saliva of pediatric attention deficit hyperactivity disorder. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 2, p. 330–334, fev. 2012.

ARCHER, T.; KOSTRZEWA, R. M. Physical exercise alleviates ADHD symptoms: regional deficits and development trajectory. **Neurotoxicity Research**, v. 21, n. 2, p. 195–209, fev. 2012.

ARIDA, R. M. et al. Differential effects of exercise on brain opioid receptor binding and activation in rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 132, n. 2, p. 206–217, jan. 2015.

ARNOLD, J. L.; SIVIY, S. M. Effects of neonatal handling and maternal separation on rough-and-tumble play in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 41, n. 3, p. 205–215, nov. 2002.

ARNSTEN, A. F. T.; PLISZKA, S. R. Catecholamine influences on prefrontal cortical function: relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 99, n. 2, p. 211–216, ago. 2011.

AYA-RAMOS, L. et al. Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. **Food & Function**, v. 8, n. 7, p. 2592–2600, 19 jul. 2017.

BABBS, R. K. et al. Genetic differences in the behavioral organization of binge eating, conditioned food reward, and compulsive-like eating in C57BL/6J and DBA/2J strains. **Physiology & Behavior**, v. 197, p. 51–66, 01 2018.

BANERJEE, T. D.; MIDDLETON, F.; FARAONE, S. V. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)**, v. 96, n. 9, p. 1269–1274, set. 2007.

BARKLEY, R. A.; FISCHER, M. The unique contribution of emotional impulsiveness to impairment in major life activities in hyperactive children as adults. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 49, n. 5, p. 503–513, maio 2010.

BAUDIN, A. et al. 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**, v. 98, n. 3, p. 207–214, out. 2012.

BAVA, S.; TAPERT, S. F. Adolescent brain development and the risk for alcohol and other drug problems. **Neuropsychology Review**, v. 20, n. 4, p. 398–413, dez. 2010.

BERCHICCI, M. et al. Benefits of physical exercise on basic visuo-motor functions across age. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, p. 48, 2014.

BERGER, I. Diagnosis of attention deficit hyperactivity disorder: much ado about something. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 13, n. 9, p. 571–574, set. 2011.

BIEDERMAN, J. et al. Family-environment risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. A test of Rutter's indicators of adversity. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, n. 6, p. 464–470, jun. 1995.

BORTZ, W. M.; WALLACE, D. H. Physical fitness, aging, and sexuality. **The Western Journal of Medicine**, v. 170, n. 3, p. 167–169, mar. 1999.

BRAKE, W. G. et al. Influence of early postnatal rearing conditions on mesocorticolimbic dopamine and behavioural responses to psychostimulants and stressors in adult rats. **The European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 7, p. 1863–1874, abr. 2004.

BRAUN, K. et al. Influence of parental deprivation on the behavioral development in *Octodon degus*: modulation by maternal vocalizations. **Developmental Psychobiology**, v. 42, n. 3, p. 237–245, abr. 2003.

BROWN, W. J. et al. Physical activity and all-cause mortality in older women and men. **British Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 9, p. 664–668, jul. 2012.

BRUNAUT, P. et al. Adulthood and childhood ADHD in patients consulting for obesity is associated with food addiction and binge eating, but not sleep apnea syndrome. **Appetite**, v. 136, p. 25–32, 01 2019.

CAMPESE, V. M. et al. Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 2, p. H695-703, ago. 2004.

CASTELLANOS, F. X. Anatomic magnetic resonance imaging studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 4, n. 4, p. 444–448, dez. 2002.

CEYLAN, M. et al. Oxidative imbalance in child and adolescent patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Progress in Neuro-**

Psychopharmacology & Biological Psychiatry, v. 34, n. 8, p. 1491–1494, 1 dez. 2010.

CEYLAN, M. F. et al. Changes in oxidative stress and cellular immunity serum markers in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 66, n. 3, p. 220–226, abr. 2012.

CHILDRESS, A. C.; BERRY, S. A. Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder in adolescents. **Drugs**, v. 72, n. 3, p. 309–325, 12 fev. 2012.

CHOLEWA, J. et al. Basic models modeling resistance training: an update for basic scientists interested in study skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 9, p. 1148–1156, set. 2014.

CIOLAC, E. G. Exercise training as a preventive tool for age-related disorders: a brief review. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 68, n. 5, p. 710–717, maio 2013.

CLASS, Q. A. et al. Offspring psychopathology following preconception, prenatal and postnatal maternal bereavement stress. **Psychological Medicine**, v. 44, n. 1, p. 71–84, jan. 2014.

COLORADO, R. A. et al. Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rats. **Behavioural Processes**, v. 71, n. 1, p. 51–58, 10 jan. 2006.

CONTRERAS-RODRÍGUEZ, O. et al. Ventral and Dorsal Striatum Networks in Obesity: Link to Food Craving and Weight Gain. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 9, p. 789–796, 01 2017.

CORTESE, S.; TESSARI, L. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) and Obesity: Update 2016. **Current Psychiatry Reports**, v. 19, n. 1, p. 4, jan. 2017.

DALLMAN, M. F. et al. Chronic stress and obesity: a new view of “comfort food”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11696–11701, 30 set. 2003.

DANIELS, W. M. U. et al. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. **Metabolic Brain Disease**, v. 19, n. 1–2, p. 3–14, jun. 2004.

DE ANDRADE, L. P. et al. Benefits of multimodal exercise intervention for postural control and frontal cognitive functions in individuals with Alzheimer’s disease: a controlled trial. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 61, n. 11, p. 1919–1926, nov. 2013.

DE SOUZA, J. A. et al. Pre-weaning maternal separation increases eating later in life in male and female offspring, but increases brainstem dopamine receptor 1a and 2a only in males. **Appetite**, v. 123, p. 114–119, 01 2018.

DEN HEIJER, A. E. et al. Sweat it out? The effects of physical exercise on cognition and behavior in children and adults with ADHD: a systematic literature review. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 124, n. Suppl 1, p. 3–26, 2017.

DENHAM, J. et al. Genome-wide sperm DNA methylation changes after 3 months of exercise training in humans. **Epigenomics**, v. 7, n. 5, p. 717–731, ago. 2015.

DIMATELIS, J. J. et al. Female rats are resistant to developing the depressive phenotype induced by maternal separation stress. **Metabolic Brain Disease**, v. 31, n. 1, p. 109–119, fev. 2016.

DORNELES, G. P. et al. Acute Strenuous Exercise Induces an Imbalance on Histone H4 Acetylation/Histone Deacetylase 2 and Increases the Proinflammatory Profile of PBMC of Obese Individuals. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1530230, 2017.

DUPAUL, G. J.; GORMLEY, M. J.; LARACY, S. D. Comorbidity of LD and ADHD: implications of DSM-5 for assessment and treatment. **Journal of Learning Disabilities**, v. 46, n. 1, p. 43–51, fev. 2013.

ENOCH, M.-A. The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence. **Psychopharmacology**, v. 214, n. 1, p. 17–31, mar. 2011.

ESTEBAN-CORNEJO, I. et al. Maternal physical activity before and during the prenatal period and the offspring's academic performance in youth. The UP&DOWN study. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians**, v. 29, n. 9, p. 1414–1420, 2016.

FARR, O. M. et al. Posttraumatic stress disorder, alone or additively with early life adversity, is associated with obesity and cardiometabolic risk. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, v. 25, n. 5, p. 479–488, maio 2015.

FELITTI, V. J. et al. REPRINT OF: Relationship of Childhood Abuse and Household Dysfunction to Many of the Leading Causes of Death in Adults: The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 56, n. 6, p. 774–786, 2019.

GAPIN, J. I.; LABBAN, J. D.; ETNIER, J. L. The effects of physical activity on attention deficit hyperactivity disorder symptoms: the evidence. **Preventive Medicine**, v. 52 Suppl 1, p. S70-74, jun. 2011.

GEARHARDT, A. N.; CORBIN, W. R.; BROWNELL, K. D. Development of the Yale Food Addiction Scale Version 2.0. **Psychology of Addictive Behaviors: Journal of the Society of Psychologists in Addictive Behaviors**, v. 30, n. 1, p. 113–121, fev. 2016.

GHANIZADEH, A.; SALEHI, A.; MOEINI, S. R. Clinical Presentation of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Symptoms in Terms of Gender and Chronological Age. **International Journal of Community Based Nursing and Midwifery**, v. 7, n. 3, p. 241–246, jul. 2019.

GIACHINO, C. et al. Maternal deprivation and early handling affect density of calcium binding protein-containing neurons in selected brain regions and emotional behavior in periadolescent rats. **Neuroscience**, v. 145, n. 2, p. 568–578, 16 mar. 2007.

GOMES DA SILVA, S. et al. Early exercise promotes positive hippocampal plasticity and improves spatial memory in the adult life of rats. **Hippocampus**, v. 22, n. 2, p. 347–358, fev. 2012.

GONZALEZ-LIMA, F.; SADILE, A. G. Network operations revealed by brain metabolic mapping in a genetic model of hyperactivity and attention deficit: the naples high- and low-excitability rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 157–160, jan. 2000.

GROEN, Y. et al. Blink rate and blink timing in children with ADHD and the influence of stimulant medication. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 124, n. Suppl 1, p. 27–38, 2017.

GU, Y.; DEE, C. M.; SHEN, J. Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. **Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)**, v. 3, p. 1216–1231, 1 jun. 2011.

GUERRI, C.; PASCUAL, M. Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. **Alcohol (Fayetteville, N.Y.)**, v. 44, n. 1, p. 15–26, fev. 2010.

GUIMARÃES LIMA, M. et al. Leisure-time physical activity and sports in the Brazilian population: A social disparity analysis. **PloS One**, v. 14, n. 12, p. e0225940, 2019.

GUPTA, D.; RADHAKRISHNAN, M.; KURHE, Y. Effect of a novel 5-HT₃ receptor antagonist 4i, in corticosterone-induced depression-like behavior and oxidative stress in mice. **Steroids**, v. 96, p. 95–102, abr. 2015.

HAAKSTAD, L. A. H.; TORSET, B.; BØ, K. What is the effect of regular group exercise on maternal psychological outcomes and common pregnancy complaints? An assessor blinded RCT. **Midwifery**, v. 32, p. 81–86, jan. 2016.

HARRIS, J. E.; BAER, L. A.; STANFORD, K. I. Maternal Exercise Improves the Metabolic Health of Adult Offspring. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 29, n. 3, p. 164–177, 2018.

HARTANTO, T. A. et al. A trial-by-trial analysis reveals more intense physical activity is associated with better cognitive control performance in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Child Neuropsychology: A Journal on Normal and Abnormal Development in Childhood and Adolescence**, v. 22, n. 5, p. 618–626, 2016.

HEIM, C.; BINDER, E. B. Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. **Experimental Neurology**, v. 233, n. 1, p. 102–111, jan. 2012.

HEIM, C.; NEMEROFF, C. B. Neurobiology of early life stress: clinical studies. **Seminars in Clinical Neuropsychiatry**, v. 7, n. 2, p. 147–159, abr. 2002.

HEMMINGSSON, E. Early Childhood Obesity Risk Factors: Socioeconomic Adversity, Family Dysfunction, Offspring Distress, and Junk Food Self-Medication. **Current Obesity Reports**, v. 7, n. 2, p. 204–209, jun. 2018.

HERBORN, K. A. et al. Stress exposure in early post-natal life reduces telomere length: an experimental demonstration in a long-lived seabird. **Proceedings. Biological Sciences**, v. 281, n. 1782, p. 20133151, 7 maio 2014.

HILBERT, A. et al. Cue reactivity, habituation, and eating in the absence of hunger in children with loss of control eating and attention-deficit/hyperactivity disorder. **The International Journal of Eating Disorders**, v. 51, n. 3, p. 223–232, 2018.

HINSHAW, S. P. Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Controversy, Developmental Mechanisms, and Multiple Levels of Analysis. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 14, p. 291–316, 07 2018.

HOLLAND, F. H. et al. Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. **Neuroscience Letters**, v. 566, p. 131–136, 30 abr. 2014.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics**, v. 33 Suppl, p. 245–254, mar. 2003.

JAHNG, J. W. An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. **Hormones and Behavior**, v. 59, n. 2, p. 213–220, fev. 2011.

JIMÉNEZ-VASQUEZ, P. A. et al. Early maternal separation alters neuropeptide Y concentrations in selected brain regions in adult rats. **Brain Research. Developmental Brain Research**, v. 131, n. 1–2, p. 149–152, 26 nov. 2001.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 49, n. 2, p. 245–250, fev. 1991.

JOSEPH, N. et al. Oxidative Stress and ADHD: A Meta-Analysis. **Journal of Attention Disorders**, v. 19, n. 11, p. 915–924, nov. 2015.

KESSLER, R. C. Epidemiology of women and depression. **Journal of Affective Disorders**, v. 74, n. 1, p. 5–13, mar. 2003.

KI MOORE, I. M. et al. Increase in oxidative stress as measured by cerebrospinal fluid lipid peroxidation during treatment for childhood acute

lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 37, n. 2, p. e86-93, mar. 2015.

KIM, H. et al. The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 4, p. 243–249, jun. 2007.

KING, J. A. et al. Early androgen treatment decreases cognitive function and catecholamine innervation in an animal model of ADHD. **Behavioural Brain Research**, v. 107, n. 1–2, p. 35–43, jan. 2000.

KIYONO, S. et al. Facilitative effects of maternal environmental enrichment on maze learning in rat offspring. **Physiology & Behavior**, v. 34, n. 3, p. 431–435, mar. 1985.

KLEIN, C. P. et al. Swimming exercise before and during pregnancy: Promising preventive approach to impact offspring's health. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 71, p. 83–93, dez. 2018.

KWAK, H. R. et al. Maternal social separation of adolescent rats induces hyperactivity and anxiolytic behavior. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 79–83, abr. 2009.

LEE, H.-H. et al. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. **Brain & Development**, v. 28, n. 3, p. 147–154, abr. 2006.

LIMA, A. H. R. A. et al. Acute effects of walking and combined exercise on oxidative stress and vascular function in peripheral artery disease. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 38, n. 1, p. 69–75, jan. 2018.

LOVALLO, W. R. Early life adversity reduces stress reactivity and enhances impulsive behavior: implications for health behaviors. **International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology**, v. 90, n. 1, p. 8–16, out. 2013.

LOWE, D. A.; ALWAY, S. E. Animal models for inducing muscle hypertrophy: are they relevant for clinical applications in humans? **The Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy**, v. 32, n. 2, p. 36–43, fev. 2002.

LUNDBERG, S. et al. Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. **Hormones and Behavior**, v. 87, p. 137–144, 2017.

LUPIEN, S. J. et al. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 434–445, jun. 2009.

MAJCHER-MAŚLANKA, I. et al. Previous Early-life Stress Modifies Acute Corticosterone-induced Synaptic Plasticity in the Medial Prefrontal Cortex of Adolescent Rats. **Neuroscience**, v. 379, p. 316–333, 21 2018.

MARCELINO, T. B. et al. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. **Neuroscience**, v. 246, p. 28–39, 29 ago. 2013.

MCCRORY, E.; DE BRITO, S. A.; VIDING, E. Research review: the neurobiology and genetics of maltreatment and adversity. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 51, n. 10, p. 1079–1095, out. 2010.

MCEWEN, B. S. et al. Mechanisms of stress in the brain. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1353–1363, out. 2015.

MCEWEN, B. S.; NASCA, C.; GRAY, J. D. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 1, p. 3–23, jan. 2016.

MCGEE, S. L. et al. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. Pt 24, p. 5951–5958, 15 dez. 2009.

MEGA, F. et al. Paternal physical exercise demethylates the hippocampal DNA of male pups without modifying the cognitive and physical development. **Behavioural Brain Research**, v. 348, p. 1–8, 01 2018.

MENKE, A.; BINDER, E. B. Epigenetic alterations in depression and antidepressant treatment. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 395–404, set. 2014.

MUDD, L. M. et al. Maternal Physical Activity During Pregnancy, Child Leisure-Time Activity, and Child Weight Status at 3 to 9 Years. **Journal of Physical Activity & Health**, v. 12, n. 4, p. 506–514, abr. 2015.

MURGATROYD, C.; SPENGLER, D. Histone tales: echoes from the past, prospects for the future. **Genome Biology**, v. 11, n. 2, p. 105, 2010.

NAZAR, B. P. et al. The risk of eating disorders comorbid with attention-deficit/hyperactivity disorder: A systematic review and meta-analysis. **The International Journal of Eating Disorders**, v. 49, n. 12, p. 1045–1057, dez. 2016.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13–25, 28 mar. 2002.

OSADCHIY, V. et al. History of early life adversity is associated with increased food addiction and sex-specific alterations in reward network connectivity in obesity. **Obesity Science & Practice**, v. 5, n. 5, p. 416–436, out. 2019.

PAN, C.-Y. et al. Effects of Physical Activity Intervention on Motor Proficiency and Physical Fitness in Children With ADHD: An Exploratory Study. **Journal of Attention Disorders**, v. 21, n. 9, p. 783–795, jul. 2017.

PARNPIANSIL, P. et al. Exercise during pregnancy increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression and spatial learning in neonatal rat pup. **Neuroscience Letters**, v. 352, n. 1, p. 45–48, 27 nov. 2003.

PEREIRA, L. O. et al. The gradient of luminosity between open/enclosed arms, and not the absolute level of Lux, predicts the behaviour of rats in the plus maze. **Behavioural Brain Research**, v. 159, n. 1, p. 55–61, 15 abr. 2005.

PETROV FIERIL, K.; GLANTZ, A.; FAGEVIK OLSEN, M. The efficacy of moderate-to-vigorous resistance exercise during pregnancy: a randomized controlled trial. **Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica**, v. 94, n. 1, p. 35–42, jan. 2015.

PINGITORE, A. et al. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 31, n. 7–8, p. 916–922, ago. 2015.

PONTIFEX, M. B. et al. Exercise improves behavioral, neurocognitive, and scholastic performance in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **The Journal of Pediatrics**, v. 162, n. 3, p. 543–551, mar. 2013.

PROULX, É. et al. Early stress prevents the potentiation of muscarinic excitation by calcium release in adult prefrontal cortex. **Biological Psychiatry**, v. 76, n. 4, p. 315–323, 15 ago. 2014.

PRYCE, C. R. et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 649–674, 2005.

RAMPP, C. et al. Sex-related differential response to dexamethasone in endocrine and immune measures in depressed in-patients and healthy controls. **Journal of Psychiatric Research**, v. 98, p. 107–115, 2018.

REYNOLDS, K. et al. Prevalence of psychiatric disorders in U.S. older adults: findings from a nationally representative survey. **World psychiatry: official journal of the World Psychiatric Association (WPA)**, v. 14, n. 1, p. 74–81, fev. 2015.

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

ROMO, L. et al. Attention-deficit hyperactivity disorder and addictions (substance and behavioral): Prevalence and characteristics in a multicenter study in France. **Journal of Behavioral Addictions**, v. 7, n. 3, p. 743–751, 1 set. 2018.

RÜEDI-BETTSCHEM, D. et al. Early deprivation under specific conditions leads to reduced interest in reward in adulthood in Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, v. 156, n. 2, p. 297–310, 30 jan. 2005.

SASAKI, T.; LEUTGEB, S.; LEUTGEB, J. K. Spatial and memory circuits in the medial entorhinal cortex. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 32, p. 16–23, jun. 2015.

SEGABINAZI, E. et al. Effects of Maternal Physical Exercise on Global DNA Methylation and Hippocampal Plasticity of Rat Male Offspring. **Neuroscience**, v. 418, p. 218–230, 15 2019.

SEIDMAN, L. J.; VALERA, E. M.; MAKRIS, N. Structural brain imaging of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 11, p. 1263–1272, 1 jun. 2005.

SEO, D. Y. et al. Humanized animal exercise model for clinical implication. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 466, n. 9, p. 1673–1687, set. 2014.

SHALEV, U.; KAFKAFI, N. Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 73, n. 1, p. 115–122, ago. 2002.

SHARMA, A.; COUTURE, J. A review of the pathophysiology, etiology, and treatment of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 48, n. 2, p. 209–225, fev. 2014.

SHAW, P. et al. Longitudinal mapping of cortical thickness and clinical outcome in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 5, p. 540–549, maio 2006.

SHAW, P. et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder is characterized by a delay in cortical maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19649–19654, 4 dez. 2007.

SILVEIRA, P. P. et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. **Physiology & Behavior**, v. 80, n. 5, p. 739–745, fev. 2004.

SMAIL-CREVIER, R. L. et al. Binge-like intake of sucrose reduces the rewarding value of sucrose in adult rats. **Physiology & Behavior**, v. 194, p. 420–429, 01 2018.

SORCE, S.; KRAUSE, K.-H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 10, p. 2481–2504, out. 2009.

SOUZA, M. A. et al. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50, n. 4, p. 811–823, abr. 2009.

SPIERS, J. G. et al. Acute restraint stress induces rapid and prolonged changes in erythrocyte and hippocampal redox status. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 11, p. 2511–2519, nov. 2013.

SPIVEY, J. M. et al. Adolescent female rats are more resistant than males to the effects of early stress on prefrontal cortex and impulsive behavior. **Developmental Psychobiology**, v. 51, n. 3, p. 277–288, abr. 2009.

STANFORD, K. I. et al. Exercise before and during pregnancy prevents the deleterious effects of maternal high-fat feeding on metabolic health of male offspring. **Diabetes**, v. 64, n. 2, p. 427–433, fev. 2015.

TEICHER, M. H.; SAMSON, J. A. Annual Research Review: Enduring neurobiological effects of childhood abuse and neglect. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, v. 57, n. 3, p. 241–266, mar. 2016.

TYRKA, A. R. et al. Childhood parental loss and adult psychopathology: effects of loss characteristics and contextual factors. **International Journal of Psychiatry in Medicine**, v. 38, n. 3, p. 329–344, 2008.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN LOO, H. M. et al. Sex similarities and differences in risk factors for recurrence of major depression. **Psychological Medicine**, v. 48, n. 10, p. 1685–1693, 2018.

WILLCUTT, E. G. The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 9, n. 3, p. 490–499, jul. 2012.

ZANG, Y. Impact of physical exercise on children with attention deficit hyperactivity disorders: Evidence through a meta-analysis. **Medicine**, v. 98, n. 46, p. e17980, nov. 2019.

ZURITA, A. et al. Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. **Behavioural Brain Research**, v. 117, n. 1–2, p. 163–171, 20 dez. 2000.